

MARIA EDUARDA LEANDRO ASSIS

**ANÁLISE DE CONDIÇÕES *IN VITRO* PARA A PRODUÇÃO DE
METABÓLITOS SECUNDÁRIOS POR *Streptomyces noursei* CAB-C 50**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientadora: Denise Mara Soares Bazzolli

Coorientador: Róbson Ricardo Teixeira

**VIÇOSA – MINAS GERAIS
2023**

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa

T

A848a
2023 Assis, Maria Eduarda Leandro, 1996-
Análise de condições *in vitro* para a produção de
metabólitos secundários por *Streptomyces noursei* CAB-C 50 /
Maria Eduarda Leandro Assis. – Viçosa, MG, 2023.
1 dissertação eletrônica (66 f.): il. (algumas color.).

Inclui anexo.

Orientador: Denise Mara Soares Bazzolli.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Microbiologia Agrícola, 2023.

Referências bibliográficas: f. 57-66.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2023.339>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Actinobactérias. 2. Fusariose. 3. Banana - Cultivo.
I. Bazzolli, Denise Mara Soares, 1974-. II. Universidade Federal
de Viçosa. Departamento de Microbiologia Agrícola. Programa
de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola. III. Título.

CDD 22. ed. 579.37

MARIA EDUARDA LEANDRO ASSIS

**ANÁLISE DE CONDIÇÕES *IN VITRO* PARA A PRODUÇÃO DE
METABÓLITOS SECUNDÁRIOS POR *Streptomyces noursei* CAB-C 50**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 01 de março de 2023.

Assentimento:

Maria Eduarda Leandro Assis
Autora



Documento assinado digitalmente
DENISE MARA SOARES BAZZOLLI
Data: 13/06/2023 16:20:21-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Denise Mara Soares Bazzolli
Orientadora

Dedico esse trabalho ao meu Deus, à minha família, à minha namorada Gabriella Novais que sempre esteve ao meu lado nos momentos mais difíceis e aos meus amigos que trilharam essa jornada junto a mim.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me proporcionado força e sabedoria na minha trajetória acadêmica.

À minha namorada Gabriella por estar sempre ao meu lado em todos os momentos dessa caminhada.

À minha mãe Maria Gorete e à minha irmã Isadora por sempre acreditarem em mim e apoiarem os meus sonhos.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola por toda estrutura e suporte proporcionados para execução desse trabalho.

Às agências de fomento, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG por todo suporte financeiro à pesquisa realizada pelo nosso grupo de pesquisa e ao Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária – Bioagro/UFV; e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES/Proex (001) pelo apoio financeiro.

Ao Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI), especialmente ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) que me concedeu a bolsa de estudo através da Chamada Mai Dai CNPq Nº 12/2020 - Programa de Mestrado e Doutorado Acadêmico para Inovação - MAI/DAI – Processo: 403610/2020-6.

À Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), por todo apoio financeiro ao Núcleo de Microscopia e Microanálises da Universidade Federal de Viçosa e ao Bioagro.

À empresa Sitio Barreiras Fruticultura Ltda pela parceria, confiança e apoio financeiro nos trabalhos realizados pelo nosso grupo de pesquisa.

À professora e orientadora Denise Mara Soares Bazzolli por toda paciência, orientação e inspiração como profissional.

À técnica Patrícia Pereira Fontes por ser essa excelente profissional, por toda amizade, paciência e colaboração proporcionada durante a execução dos experimentos realizados.

À professora Maria Catarina Megumi Kasuya, por ter iniciado a parceria com empresa Sitio Barreiras e por todo apoio dedicado a esse trabalho.

Ao Professor Róbson Ricardo Teixeira, ao Departamento de Química da UFV e à Universidade Federal de Maringá em especial ao professor Eduardo Jorge Pilau e ao pesquisador Felipe de Oliveira Souza por todo auxílio e disponibilidade durante a etapa de extração e identificação dos metabólitos secundários.

À Rita, Dâmaris e Lilian por todo trabalho realizado anteriormente na linha de pesquisa voltada ao estudo de *Streptomyces*.

Ao Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária - Bioagro/UFV e a todos funcionários ali presentes pela estrutura e pelo excelente trabalho realizado.

Aos meus amigos que sempre estiveram ao meu lado, em especial à Jéssica, Matheus Bruna, Alexia e Rodrigo pela disposição para me ouvirem e me aconselharem.

À Luna, minha cachorra por ser tão importante para mim e estar sempre ao meu lado.

A todos que de alguma forma contribuíram para que esse trabalho fosse concluído os meus mais sinceros agradecimentos.

“Quem caminha sozinho pode até chegar mais rápido, mas aquele que vai acompanhado, com certeza vai mais longe”.

Clarice Lispector.

RESUMO

ASSIS, Maria Eduarda Leandro, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2023. **Análise de condições *in vitro* para produção de metabólitos secundários por *Streptomyces noursei* CAB-C 50.** Orientadora: Denise Mara Soares Bazzolli. Coorientador: Róbson Ricardo Teixeira.

A busca por novos bioinsumos que impulsionam a consolidação de uma agricultura mais sustentável é uma realidade crescente em escala global. Os insumos bioativos ou bioinsumos são produtos de origem vegetal, animal ou microbiana, que agregam benefícios ao setor agropecuário, seja no controle de pragas e doenças ou na promoção do desenvolvimento vegetal. Entre os microrganismos promissores para formulação de bioinsumos podemos destacar o gênero *Streptomyces* devido a sua capacidade de produzir uma ampla gama de metabólitos secundários de potencial uso biotecnológico. Este trabalho teve como objetivo investigar a produção de metabólitos secundários pela linhagem *Streptomyces noursei* CAB-C 50 em meios de cultivo suplementados e não suplementados com o extrato de composto orgânico (ECO) produzido pela empresa Sítio Barreiras, Bahia - Brasil. Desta forma, foram utilizados os meios de cultura: ISP-2, ISP-2+ECO, M+G+ECO, M+G, M+ECO. Para estas condições foi aferido alterações de pH, análise de unidades formadoras de colônia (UFC.mL⁻¹), alterações morfológicas com auxílio do microscópio eletrônico de varredura (MEV) e produção de biomassa. Posteriormente, foi obtido o extrato orgânico utilizando acetato de etila e os metabólitos secundários foram caracterizados por cromatografia de camada delgada (CCD) e identificados por cromatografia líquida de ultra eficiência (UHPLC) acoplado ao espectrofotômetro de massas (HRMS). Realizamos atividade de biocontrole de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc) com o sobrenadante e o extrato obtido após o crescimento de *S. noursei* CAB-C50. Inspeccionamos o genoma de *S. noursei* CAB-C50 para detecção de grupos gênicos codificadores de metabólitos secundários com os bancos de dados antiSMASH 7.0 e BAGEL4. Verificamos que espécie *S. noursei* CAB-C 50 quando cultivadas em meio ISP-2 e ISP-2+ECO o pH final foi mais alcalino, os demais meios o pH final ficou mais próximo a neutralidade. Observou-se alteração na pigmentação após quatorze dias de crescimento, não sendo influenciado pela presença ou não de ECO. Nos meios de cultura ISP-2 e ISP- 2+ECO, a produção de massa seca foi maior que nos meios

M+G+ECO, M+G e M+ECO. Os meios ISP-2, ISP-2+ECO e M+G+ECO apresentaram uma população de 10^6 UFC.mL⁻¹ e os meios de cultivos M+G e M+ECO uma população de 10^4 UFC.mL⁻¹. Essa diferença pode estar relacionada a maior produção dos esporos. A análise de MEV revelou hifas com padrão de enovelado e produção de esporos de aspecto espiculado em todas as condições investigadas. A maior taxa de inibição de Foc foram observadas nos extratos e sobrenadantes obtidos a partir do cultivo em meio ISP-2. A atividade do sobrenadante foi maior do que o extrato. Através das análises de UHPLC- HRMS foi possível identificar a presença de duas substâncias de interesse biotecnológico produzidas por *S. noursei* CAB-C 50, a anisomicina e um alcaloíde bisindólico. A predição de genes envolvidos na biossíntese de metabólitos por *S. noursei* CAB-C 50 revelou um grande arsenal para produção de compostos bioativos caracterizados e alguns ainda não descobertos. *Streptomyces noursei* CAB-C 50 é uma linhagem promissora para aplicação biotecnológica, tendo a capacidade para produção de uma gama de bioativos que precisa ser explorada e investigada em condições *in vivo*.

Palavras-chave: Actinobactérias. Bioinsumos. Fusariose. Bananicultura.

ABSTRACT

ASSIS, Maria Eduarda Leandro, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March, 2023. **Analysis of *in vitro* conditions to produce secondary metabolites by *Streptomyces noursei* CAB-C 50.** Adviser: Denise Mara Soares Bazzolli. Co-adviser: Robson Ricardo Teixeira.

The search for new bio-inputs that drive the consolidation of more sustainable agriculture is a growing reality on a global scale. Bioactive inputs or bio-inputs are plant products, of animal or microbial origin, which add benefits to the agricultural sector, whether in the control of pests and diseases or in the promotion of plant development. Among the promising microorganisms for the formulation of bio-inputs, we can highlight the genus *Streptomyces* due to its ability to produce a wide range of secondary metabolites of potential biotechnological use. This work aimed to investigate the production of secondary metabolites by the strain *Streptomyces noursei* CAB-C50 in culture media supplemented and not supplemented with organic compound extract (ECO) produced by the company Sítio Barreiras, Bahia - Brazil. Thus, the following culture media were used: ISP-2, ISP-2+ECO, M+G+ECO, M+G, M+ECO. For these conditions, changes in pH, analysis of colony forming units (CFU.mL⁻¹), morphological changes with the aid of a scanning electron microscope (SEM), and biomass production were measured. Subsequently, the organic extract was obtained using ethyl acetate and the secondary metabolites were characterized by thin-layer chromatography (TLC) and identified by ultra-performance liquid chromatography (UHPLC) coupled to a mass spectrophotometer (HRMS). We carried out biocontrol activities for *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* (*Foc*) with the supernatant and the extract obtained after the growth of *S. noursei* CAB-C50. Was inspected the genome of *S. noursei* CAB-C50 for the detection of gene clusters encoding secondary metabolites with the antiSMASH 7.0 and BAGEL4 databases. We verified that the species *S. noursei* CAB-C50 when cultivated in ISP-2 and ISP-2+ECO medium the final pH was more alkaline, in the other media the final pH was closer to neutrality. A change in pigmentation was observed after fourteen days of growth, not being influenced by the presence or absence of ECO. The dry mass production was higher in the ISP-2 and ISP-2+ECO culture media than in the M+G+ECO, M+G, and M+ECO media. The ISP-2, ISP-2+ECO, and M+G+ECO media had a population of

10^6 CFU.mL⁻¹ and the M+G and M+ECO culture media had a population of 10^4 CFU.mL⁻¹. This difference may be related to the greater production of spores. SEM analysis revealed hyphae with a coiled pattern and the production of spiculated spores in all investigated conditions. The highest Foc inhibition rates were observed in extracts and supernatants obtained from cultivation in ISP-2 medium. The activity of the supernatant was greater than that of the extract. Through the UHPLC-HRMS analyses, it was possible to identify the presence of two substances of biotechnological interest produced by *S. noursei* CAB-C50, anisomycin and a bisindole alkaloid. The prediction of genes involved in the biosynthesis of metabolites by *S. noursei* CAB-C50 revealed a large arsenal for the production of characterized bioactive compounds and some are still undiscovered. *Streptomyces noursei* CAB-C50 is a promising strain for biotechnological application, having the capacity to produce a range of bioactive that needs to be explored and investigated under *in vivo* conditions.

Keywords: Actinobacteria. Bioinsumes. Fusariosis. Banana farming

LISTA DE ABREVIATURAS

μL – Microlitro, unidade de medida de volume (1×10^{-6} L)

AIA – Ácido indol-3-acético

ATP – Adenosina trifosfato

BDA – Batata dextrose ágar

BGC – Cluster de genes biossintéticos

CAB- C – Coleção de Actinobactérias provenientes do Composto orgânico

CCD – Cromatografia em camada delgada

DO – Densidade óptica

ECO – Extrato de composto orgânico

FOC – *Fusarium oxysporum* f. sp *cubense*

GNPS - Global *Natural Products Social Molecular Networking*

HRMS – Espectrômetro de massas de alta resolução

ISP-2 – *International Streptomyces Project*

ISP-2+ECO – *International Streptomyces Project* + Extrato de composto orgânico

LGMB – Laboratório de Genética Molecular de Bactérias

M+ECO – Meio mineral mínimo + Extrato de composto orgânico

M+G – Meio mineral mínimo + glicose

M+G+ECO – Meio mineral mínimo + Glicose + Extrato de composto orgânico

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MEV - Microscopia eletrônica de varredura

MI – Micélio de substrato inicial

MII – Micélio de substrato tardio

MIP – Manejo integrado de pragas

mL – Mililitro, unidade de medida de volume (1×10^{-3} L)

NRPS – Sintases peptídeos não ribossômicos

PCD – Processo de morte celular programada

rpm – Rotação por minuto

T1PKS – Sintase de policetídeo tipo 1

TOF – Tempo de voo

TR4 – Raça tropical 4

UFC – Unidades formadoras de colônias

UHPLC - HRMS – Ultra-high-performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry

VOC – Compostos orgânicos voláteis

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1. A banana e sua origem	16
2.2. Principais doenças que acometem as bananeiras	17
2.3. <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp cubense (<i>Foc</i>) e a fusariose da bananeira	18
2.4. Controle das doenças que acometem a bananicultura	19
2.5. O controle biológico e as plantações agrícolas no contexto global	21
2.6. Actinobactérias e o gênero <i>Streptomyces</i>	22
2.7. A trajetória da linhagem <i>S. noursei</i> CAB-C 50	24
3. MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1. Microrganismos, condições de cultivo e manutenção	25
3.2. Preparo de diferentes combinações de meios de cultivo suplementados com extrato do composto orgânico (ECO)	25
3.3. Avaliação do crescimento de <i>S. noursei</i> CAB-C 50 nas diferentes composições de meio de cultivo com e sem ECO	27
3.3.1 Análises morfológicas	27
3.3.2. Avaliação do crescimento	27
3.3.3. Determinação da massa seca micelial em cada meio de cultivo	27
3.3.4. Análise de pH do sobrenadante no início e no final do crescimento	28
3.4. Condições de crescimento das <i>Streptomyces noursei</i> CAB-C 50 para obtenção dos compostos bioativos	28
3.5. Obtenção do sobrenadante	28
3.6. Extração dos compostos bioativos	28
3.7. Análise cromatográfica	28
3.8. Análise dos metabólitos secundários produzidos	29
3.9. Atividade antifúngica dos sobrenadantes	30
3.10. Atividade antifúngica dos extratos	30
3.11. Identificação do arsenal genético de <i>S. noursei</i> CAB-C 50 para a produção de metabólitos secundários	31
3.11.1. Predição <i>in silico</i> de genes envolvidos com vias de produção de metabólitos secundários em <i>S. noursei</i> CAB-C 50 e análise comparativa entre outros genomas da espécie	31
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	31

4.1. Diferentes combinações de meios de cultura suplementados com extrato do composto orgânico (ECO)	31
4.2. Análise macro e micromorfológica de <i>S. noursei CAB-C 50</i>	32
4.3. Avaliação do crescimento	39
4.4. Variação de pH durante o crescimento da <i>S. noursei CAB-C 50</i>	40
4.5. Atividade antagônica do sobrenadante obtido de <i>S. noursei CAB-C 50</i> nos diferentes meios de cultivo	41
4.6. Atividade antifúngica dos extratos obtidos de <i>S. noursei CAB-C 50 cultivado em diferentes meios de cultura</i>	43
4.7. Compostos bioativos produzidos por <i>Streptomyces noursei CAB-C 50</i>	45
4.8 Identificação do arsenal genético de <i>S. noursei CAB-C 50</i> para a produção de metabólitos secundários	51
4.8.1. Predição <i>in silico</i> de clusters de genes envolvidos com vias de produção de metabólitos secundários.	51
4.8.2. Análise de genômica comparativa entre os metabólitos secundários produzidos pela espécie <i>Streptomyces noursei</i>	53
5. CONCLUSÃO	55
6. REFERÊNCIAS	57

1. INTRODUÇÃO

A banana é uma fruta com alto valor nutritivo, sendo a mais consumida no Brasil, com consumo médio no país de cerca de 25 quilos per capita por ano. No cenário mundial, o Brasil ocupa a quarta posição na produção, perfazendo uma produção de 7 milhões de toneladas em 2021 (CNA, 2021).

Assim como todas as plantações agrícolas, commodities ou não, a bananicultura é afetada por uma ampla gama de doenças, que se não controladas são capazes de comprometer gravemente a produção, gerando grandes perdas econômicas. As principais doenças da bananicultura são causadas por fungos, no entanto outros agentes como vírus, bactérias e ácaros podem impactar significativamente o setor (DA SILVA *et al.*, 2016).

Na bananicultura são empregados diferentes tipos de controle e manejo de doenças, na maior parte das vezes de forma integrada. No entanto, nos últimos anos, o controle biológico tem se destacado ao que se refere ao controle de pragas e doenças agrícolas. Dessa forma, os insumos biológicos ou bioinsumos tem se consolidado como uma alternativa importante. Bioinsumos podem ser microrganismos, materiais vegetais, orgânicos ou naturais que podem ser utilizados para combater pragas e doenças e/ou para melhorar a fertilidade do solo e a disponibilidade de nutrientes para as plantas (SHANKAR; SINGH; MONDAL, 2016, MOHITE *et al.*, 2019).

O mercado de bioinsumos se encontra em constante ascensão em todo mundo, sendo avaliado em torno de 10,6 bilhões de dólares no ano de 2021, e com projeção de aumento para 18,5 bilhões de dólares no ano de 2026. O Brasil, devido a sua grande biodiversidade, é um dos países que se destacam na produção desses insumos. Assim, em 2021 o Programa Nacional de Bioinsumos foi criado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) com o objetivo de impulsionar ainda mais o crescimento desse mercado no território brasileiro através da elaboração de protocolos a serem seguidos pelos agricultores, investimento em infraestrutura e capacitação de mão de obra especializada (MAPA, 2021).

Entre os microrganismos que podem ser utilizados para biocontrole, o gênero bacteriano *Streptomyces* merece destaque pelo seu reconhecido valor biotecnológico. No entanto, nenhum produto gerado por esses microrganismos é comercializado com

esta finalidade no Brasil. Reconhecidamente, *Streptomyces spp* são capazes de produzir uma gama de metabólitos secundários que podem agregar valores na proteção das plantas, como a banana, seja no controle biológico ou na promoção do crescimento vegetal (LI *et al.*, 2021).

Considerando o gênero *Streptomyces* como importantes bactérias do ponto de vista biotecnológico, com significativa plasticidade na produção de novos metabólitos secundários, o presente trabalho tem como objetivo analisar o perfil de crescimento e produção de metabólitos secundários por *S. noursei CAB-C 50* em diferentes combinações entre meios de cultura e um extrato de composto orgânico (ECO), identificar e caracterizar *in silico* os genes biossintéticos envolvidos na produção de metabólitos secundários e avaliar a melhor condição de crescimento que potencialize a produção de um número maior de metabólitos que podem atuar tanto no controle biológico como na promoção de crescimento vegetal.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. A banana e sua origem

A banana que tem como nome científico *Musa spp.* teve sua domesticação iniciada há cerca de 7.000 anos atrás tendo suas origens na Ásia Meridional em regiões da Índia e da Malásia, e, desde então, a cultura se disseminou pelos demais países, se concentrando nas regiões de clima tropical quente, onde é cultivada durante todo o ano como fonte de alimento, de renda e subsistência, sobretudo para produtores familiares de micro e pequeno porte (DEBNATH *et al.*, 2019; ZHONGMING *et al.*, 2020).

A banana apresenta uma excelente aceitação pela população global e agrega um alto valor nutritivo, com altos níveis de potássio apresentando também outros minerais como magnésio, fósforo, cálcio, ferro e cobre, assim como também possui baixos teores de lipídios, sendo rica em fibra alimentar, vitaminas A e do complexo B e C, além de apresentar três tipos diferentes de açúcares naturais, sacarose, frutose e glicose (SOUSA *et al.*, 2012).

De acordo com dados disponibilizados pela Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura, a taxa de exportação mundial de banana em 2022 foi de 16,6 milhões de toneladas. No entanto, a produção de banana sofreu uma queda em relação a 2021 de aproximadamente 1,2 milhões de toneladas. Dentre os fatores

que colaboraram para essa queda, podemos citar as condições climáticas, o alto custo dos defensivos agrícolas e a propagação de doenças que podem afetar gravemente a taxa de produção, como a fusariose TR4 (FAO, 2022).

O Brasil por sua vez, é o quarto maior produtor de bananas do mundo, com uma produção de 7 milhões de toneladas da fruta no território nacional em 2021 e o mercado da fruta registra cerca de 13,8 bilhões de reais por ano. Considerada a fruta mais consumida no país, a banana além de contribuir para uma alimentação saudável devido ao seu alto valor nutricional, agrega também um importante fator social através da geração de emprego aos brasileiros (SALATI, 2021).

O clima tropical apresentado pelo território brasileiro oferece condições satisfatórias para o cultivo de bananas, o que justifica o país ocupar o quarto lugar na produção mundial, sendo a maior parte do plantio destinada ao mercado interno. Os estados que mais se destacam na produção brasileira são o estado de São Paulo com 1 milhão de toneladas seguido da Bahia com 869 mil toneladas e Minas Gerais com 791.7 mil toneladas (IBGE, 2021; PEREIRA *et al.*, 2022).

A bananicultura requer condições de temperatura ambiente em torno de 28 °C, sendo que temperaturas inferiores a 15 °C ou superiores a 35 °C se tornam um fator limitante para desenvolvimento da cultura devido a paralisia das atividades fisiológicas e desidratação das folhas (DE OLANDA SOUZA *et al.*, 2020). A elevada taxa de luminosidade é necessária para o completo desenvolvimento, fato que está diretamente relacionado com sua taxa de fotossíntese, favorecendo assim o seu crescimento. Além disso, uma alta concentração de umidade também proporciona um melhor desenvolvimento da planta (BORGES, 2006; NOMURA *et al.*, 2013).

2.2. Principais doenças que acometem as bananiculturas

As plantações estão sempre sofrendo ameaças por uma grande diversidade de pragas (STEPHAN *et al.*, 2022). Assim, a bananicultura também enfrenta vários problemas em relação ao controle de doenças causadas por bactérias, vírus, fungos e ácaros responsáveis por causarem grandes danos econômicos às culturas (DA SILVA *et al.*, 2016).

Essas doenças limitam o desenvolvimento das bananiculturas de forma considerável prejudicando processos metabólicos importantes que estão relacionados ao desenvolvimento da planta e a produção de seus frutos. Tal realidade faz com que ocorra o aumento do uso de produtos químicos para o controle dessas doenças;

entretanto, quando usados de maneira indiscriminada, podem acarretar riscos ao homem, ao meio ambiente e selecionar pragas resistentes (KRUSCHEWSKY, 2019).

Entre os microrganismos que constantemente acometem as plantações de banana podemos citar: *Fusarium oxysporum f. sp. cubense*, agente causador da Fusariose da bananeira; *Mycosphaella musicola*, agente causador da Sigatoka-amarela; *Pseudocercospora fijiensis*, causador da Sigatoka-negra; *Ralstonia solanacearum*, responsável pela doença conhecida como Moko da bananeira, sendo considerada uma das principais enfermidades que atacam as bananeiras no Amazonas; e o inseto *Cosmopolites sordidus*, agente causal do popularmente conhecido Moleque-da-bananeira. Além destes, as bananeiras também podem ser atacadas por uma diversidade de nematoides que podem causar danos desde a diminuição da quantidade de raízes, ao amarelamento foliar, assim como a diminuição da produção de frutos (FLORENTINO, 2020; MACEDO-RAYGOZA *et al.*, 2019; ALVAREZ, 2020).

Dentre essas doenças, as culturas de bananas vêm sendo ameaçadas de maneira global principalmente pela disseminação da fusariose da bananeira causada pelo fungo fitopatogênico *Foc*, que possui 4 raças classificadas de acordo com o tipo de hospedeiro (cultivar), sendo as raças 1,2 e 4 específicas da bananeira (DE MAIO *et al.*, 2021).

2.3. *Fusarium oxysporum f.sp cubense (Foc)* e a fusariose da bananeira

A fusariose da bananeira causada pelo *Foc* foi relatada pela primeira vez por Earlier Bancroft em 1876 na Austrália (BANCROFT, 1876), sendo também descrita por Higgins 1904, que demonstrou os danos apresentados pelas bananeiras doentes, como amarelamento e murcha, sendo gravemente letal (HIGGINS, 1904).

Atualmente o *Foc* é classificado em quatro raças, sendo que apenas três dessas raças são capazes de afetar as bananeiras. O *Foc* raça 1, que causa doenças na cultivar Gros Michel e Lady Finger, ocasionou a destruição do cultivar 'Gros Michel' durante o século XX e teve que ser substituída por cultivares resistentes a essa raça, cultivar essa conhecida como Cavendish. O *Foc* raça 2, além de conseguir infectar os mesmos cultivares que a raça 1, afeta a cultivar Bluggoe. Já o *Foc* raça 4 no contexto atual é a mais problemática por capaz de causar doença na maioria dos cultivares, incluindo a Cavendish. O *Foc* raça 3 por sua vez não é considerado infectante para O gênero *Musa*, sendo capaz de causar danos apenas em *Heliconia spp*, plantas

popularmente ornamentais (STOVER, 1962; WARMAN; AITKEN, 2018; MAYMON et al, 2020).

No Brasil, o primeiro registro da fusariose ocorreu em 1930, na cidade de Piracicaba, São Paulo, onde o *Foc* raça 1 acometeu cerca de um milhão de plantas durante três a quatro anos (MONTEIRO *et al.*, 2013). Atualmente, a doença possui caráter endêmico em todo território nacional (EMBRAPA, 2022).

O *Foc* TR4 se encontra disseminada em vários países do mundo (KEMA *et al.*, 2021). Apesar de não se ter registros até o momento em território brasileiro, relatos recentes do aparecimento da TR4 na Colômbia e no Peru colocam em alerta todo território nacional, uma vez que essa raça coloca em risco as principais variedades de banana produzidas no Brasil (IDORAN, 2022; EMBRAPA 2022).

O ciclo de vida de *Foc* começa com a germinação dos esporos desencadeada pela secreção de exsudato das raízes das plantas hospedeiras. Após a germinação, inicia-se o desenvolvimento das hifas infecciosas que são capazes de penetrar na epiderme da raiz. A partir desse momento, as hifas avançam intracelularmente até alcançarem o tecido do xilema, as células parenquimatosas e vasos e o patógeno progride na colonização dos vasos vasculares até ocasionar bloqueio dos mesmos, o que leva a um escurecimento do tecido vascular. O avanço da doença ocasiona a dobra das folhas, clorose, murcha e, por fim, a morte da planta (JANGIR *et al*, 2021).

A maior parte das espécies de *Fusarium* produzem três tipos de esporo, sendo eles os macroconídeos, microconídeos e clamidósporos, sendo que esse último é considerado um esporo de resistência, capaz de sobreviver no solo por longos períodos até que encontre uma condição favorável para sua germinação (CANNON *et al.*, 2022). A disseminação da doença ocorre principalmente através de mudas infectadas, mas o patógeno também pode ser transportado pelo solo, levado pelo homem, animais, equipamentos e águas pluviais ou de irrigação (JOSHI, 2018; DONATO *et al.*, 2020).

2.4. Controle das doenças que acometem a bananicultura

O controle de doenças agrícolas pode ser químico, físico, cultural, genético, comportamental e biológico e a aplicação simultânea dessas estratégias de controle são os pilares que sustentam o conceito de manejo integrado de pragas e doenças estabelecido no ano de 1930, que auxiliam na tomada de decisão dos agricultores frente aos problemas enfrentados no campo (CropLife, 2020).

O controle químico se baseia na utilização de produtos químicos que sejam capazes de controlar as pragas sem afetar os inimigos naturais presentes na planta (CropLife, 2020). Entretanto, o controle químico tem sido comumente associado à seleção de patógenos resistentes e, como apresentam um largo espectro de ação, pode ocasionar complicações ao ambiente, como morte dos insetos predadores e a contaminação ambiental, devido a incorporação na cadeia alimentar, pois muitos possuem capacidade de chegar até os frutos que são comercializados (FRIENSEN, 2016).

O controle físico está associado à manipulação dos fatores físicos, dentre eles a remoção manual de lagartas, mudança na temperatura, na umidade relativa, implementação de barreiras físicas e a destruição de ovos (MOREIRA, 2005).

O controle cultural de doenças consiste basicamente na manipulação das condições de pré-plantio e durante o desenvolvimento do hospedeiro em detrimento ao patógeno e possui como objetivo primordial quebrar o ciclo das doenças reduzindo assim o percentual de infecção e o progresso da doença (BELLÉ; FONTANA, 2018).

Já o uso da genética na agricultura é cada vez mais frequente em todo mundo. As melhorias nas lavouras se dão pelo desenvolvimento de cultivares resistentes a doenças, seja por meio da genética clássica ou por desenvolvimento de cultivares geneticamente modificadas (CropLife, 2021). O gargalo da obtenção de plantas resistentes ao *Fusarium* é a presença de várias raças do fungo, que torna complicado o desenvolvimento de uma cultivar que seja resistente a todas as raças do patógeno (HU *et al.*, 2022).

No contexto atual, o controle biológico é considerado necessário e urgente. Este tipo de controle se baseia na utilização de organismos ou substâncias de ocorrência natural que possuam a característica de prevenir, reduzir ou erradicar pragas e doenças nas plantações (VIDAL; SALDANHA; VERISSIMO, 2020). O controle biológico pode ser dividido em duas vertentes: uma que utiliza substâncias químicas naturais, como os aleloquímicos e ferormônios, e outra que utiliza agentes biológicos, que são organismos vivos capazes de controlar pragas e doenças (BARRAT *et al.*, 2018, HARRIS, 2019, RAYMAEKERS *et al.*, 2020).

2.5. O controle biológico e as plantações agrícolas no contexto global

A utilização de produtos biológicos na agricultura vem se tornando uma prática cada vez mais comum, sendo que o aumento do uso desses produtos no campo pode ser explicado pela alta dependência dos defensivos químicos importados, mas também pela atual oferta de ativos biológicos no mercado e sobretudo a utilização de produtos com apelo de menor impacto ambiental (Croplife Brasil, 2022).

Assim, com o objetivo de ampliar e fortalecer o setor bioinsumos no território brasileiro, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) lançou em 2020 o Programa Nacional de Bioinsumos, que visa investir na criação de empresas/biofábricas, e na capacitação de profissionais com formação adequada para a produção e manejo dos bioinsumos, colocando assim o Brasil em posição de destaque na agricultura mundial, através do desenvolvimento de novas soluções de origem biológica (MAPA, 2020).

O MAPA define como bioinsumos produtos de origem animal, vegetal ou microbiana destinada ao setor agropecuário que influenciem positivamente, no desenvolvimento e nos mecanismos de respostas de plantas e animais (MAPA, 2020). O setor se encontra em crescente ascensão, tal método de controle possui um baixo teor de toxicidade o que contribui para o desenvolvimento de uma agricultura mais sustentável (VIDAL; SALDANHA; VERISSIMO, 2020).

A taxa global de crescimento de bioinsumos está em torno de 15 % ao ano, sendo que no território brasileiro esse valor chega quase que ao dobro, com índice de 28 % e movimentação de mais de R\$ 1 bilhão/ano (MAPA, 2022). As projeções indicam que o Brasil alcançará em breve as primeiras posições no mercado global de produtos biológicos, contribuindo assim para o desenvolvimento de uma agricultura mais sustentável, diminuindo a dependência dos agroquímicos, gerando menos danos ao meio ambiente e proporcionando novas ofertas de emprego (MAPA, 2022).

O Brasil se encontra entre os países que mais vem prosperando no mercado de bioinsumos, registrando no ano de 2022 mais de 20 novos produtos, entre eles estão produtos registrados a base de *Tetrastichus howardi*, *Trichoderma asperellum*, *Bacillus thuringiensis var. kurstaki*, *Beauveria bassiana* entre outros (MAPA, 2022). Apesar de caminhar a passos largos na produção de bioinsumos, o Brasil ainda não possui registrado bioinsumos a base de *Streptomyces*, que é um gênero promissor para utilização nas lavouras. Países como Estados Unidos, Canadá, Ucrânia, Nova

Zelândia entre outros já possuem bioinsumos a partir desses microrganismos como controle para vários tipos de doenças (TORRES-RODRIGUES *et al.*, 2022).

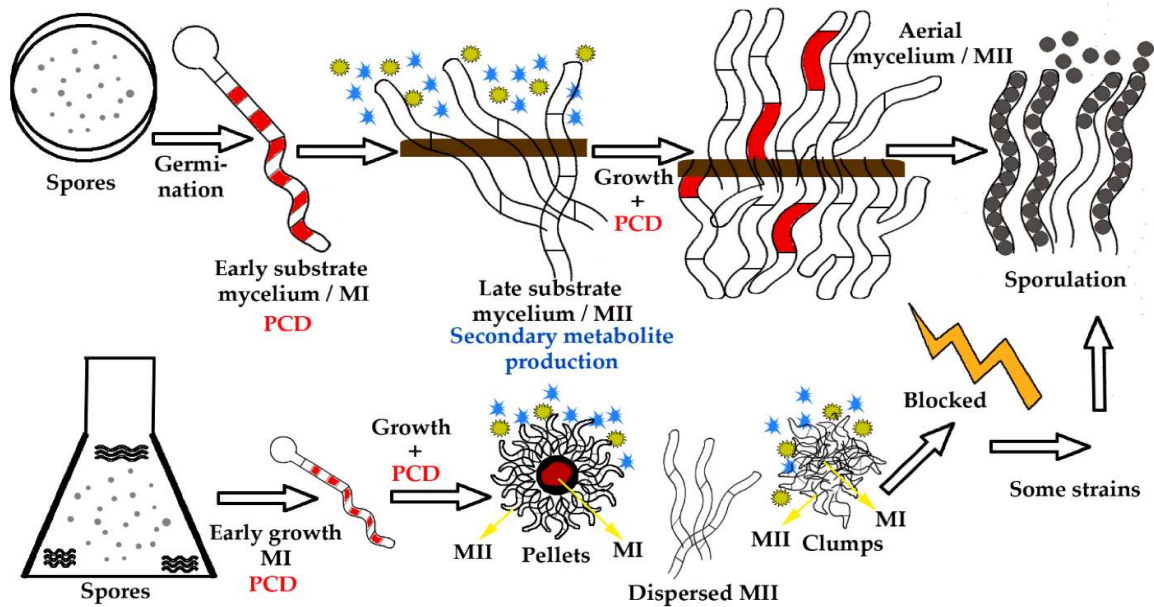
2.6. Actinobactérias e o gênero *Streptomyces*

O filo Actinobacteria abrange bactérias Gram positivas com alto conteúdo G+C, ubíquos, com diferentes morfologias e estilos de vida (ANANDAN; DHARUMADURAI; MANOGARAN, 2016). O gênero *Streptomyces* corresponde ao maior desse filo e engloba bactérias Gram positivas, morfologicamente descritas como bactérias filamentosas devido a sua peculiaridade de formar um micélio de substrato como também um micélio aéreo, e são comumente encontradas no solo assim como em ambientes marinhos (MAWANG *et al.*, 2021). Essas bactérias são as responsáveis pelo característico cheiro de terra molhada em solos recém-arados (ANANDAN; DHARUMADURAI; MANOGARAN, 2016).

O ciclo de vida das *Streptomyces* se inicia com a germinação dos esporos e posterior desenvolvimento de hifas compartimentalizadas, descritas com micélio de substrato inicial (MI) (Figura 1). Os eventos de diferenciação das hifas são disparados pelo processo de morte celular programada (PCD) e surge o micélio de substrato tardio (MII). A partir disso, o micélio começa a se desenvolver acima da superfície do meio de cultivo, sendo definido como micélio aéreo. Por fim, uma nova PCD acontece e há a formação de esporos a partir das hifas remanescentes. Este ciclo de desenvolvimento é observado principalmente quando as bactérias são crescidas em meio sólido. A produção de metabólitos secundários neste tipo de cultivo ocorre durante o processo de diferenciação das hifas (MANTECA, 2018).

No entanto, se percebe uma clara diferenciação desse ciclo dependendo do tipo de cultivo das *Streptomyces*. Quando cultivadas em meios de cultura líquidos, ocorrem algumas pequenas alterações no ciclo dessa bactéria. Em grande parte das espécies desse gênero em meio líquido não há a formação do micélio aéreo e esporulação; em vez disso ocorre a formação de pellets e aglomerados e os metabólitos secundários são produzidos pelo micélio tardio (MII), como mostrado na figura 1 (MANTECA, 2018).

Figura 1 – Crescimento das *Streptomyces* em culturas sólidas e líquidas



Fonte: Manteca *et al.*, (2018)

O gênero *Streptomyces* apresenta um arsenal importante de cluster de genes biossintéticos (BGCs) para a produção de compostos bioativos e metabólitos secundários de alto interesse biotecnológico, representando 80% dos metabólitos secundários produzidos pelas actinobactérias. Esses metabólitos são conhecidos como substâncias orgânicas que não se encontram de maneira intrínseca associadas ao crescimento do organismo; no entanto esses compostos se tornam de relevante importância para a sua sobrevivência (SELIM; ABDELHAMID, 2021; ANANDAN, 2016). As *Streptomyces* são ainda capazes de secretar enzimas de interesse biotecnológico, que tem a capacidade de degradar os substratos orgânicos presentes no solo, auxiliando assim no crescimento vegetal. (ANANDAN; DHARUMADURAI; MANOGARAN, 2016).

As *Streptomyces* possuem cerca de 25-70 BGCs sendo que as principais classes mais comumente encontradas entre as *Streptomyces* são as sintases peptídeos não ribossômicos (NRPS), sintase de policetídeo tipo 1 (T1PKS), terpenos e lanpeptídeos (BELKNAP *et al.*, 2020; DOROGHAZI, 2013). A quantidade de BGCs preditos nos genomas das *Streptomyces* são muito maiores do que as moléculas já descobertas relacionadas a esse gênero, o que demonstra o enorme arsenal de moléculas bioativas ainda não explorados (SINGH *et al.*, 2021). Isso ocorre principalmente

porque muitos desses metabólitos não são produzidos nas condições padrões de cultivo em laboratório (YAGÜE *et al.*, 2022).

Mediante isso, muitas pesquisas vêm sendo desenvolvidas a fim de buscar estratégias para ativar a produção de uma maior diversidade de compostos. Dentre essas alternativas, podemos citar a modificação dos meios de cultivo, pois a produção de certas moléculas necessita de algum nutriente em específico para ocorrer, assim como o cultivo em condições de estresses, como por exemplo estresse nutricional, uma vez que a depleção adenosina trifosfato (ATP), aumenta a expressão de várias vias relacionadas a produção de metabólitos secundários (SEGHEZZI *et al.*, 2022).

2.7. A trajetória da linhagem *S. noursei* CAB-C 50

A pesquisa com actinobactérias conduzida por nosso grupo no Laboratório de Genética Molecular de Bactérias da Universidade Federal de Viçosa teve seu início em 2015, onde vários isolados do gênero *Streptomyces* foram obtidos a partir de um composto orgânico maduro (fase IV de compostagem) produzido e comumente utilizado pela Empresa Sítio Barreiras Fruticultura Ltda. Alguns desses isolados apresentaram excelentes resultados na inibição do *Foc*, tanto em ensaios *in vitro* como *in vivo* (MELO, 2019). Dentre esses isolados promissores, três foram selecionados para maiores estudos, baseado nas características de promoção de crescimento vegetal e controle de *Foc*. Os genomas dos três isolados foram sequenciados, sendo eles os isolados nomeados de CAB-C 50, CAB-S 66 e CAB-C 25. A linhagens de *Streptomyces* receberam a identificação de CAB, que significa coleção de actinobactérias, C se refere à origem, que foi o composto orgânico, ou S, proveniente do solo rizosférico de bananeira, do qual essa linhagem foi isolada, e o número se refere à ordem de isolamento (MELO, 2019).

S. albulus CAB-C 50 se mostrou também um bom produtor de enzimas de interesse biotecnológico, apresentando atividade das enzimas amilase, lipase, L-asparaginase e L-glutaminase, sendo que a produção de lipase foi a que se mais destacou entre as análises (ABREU, 2020). Outro estudo de nosso grupo relatou a importância desse isolado na promoção do crescimento vegetal, sendo capaz de realizar a produção de ácido indol-3-acético (AIA), produção de sideróforos, também importante na supressão de doenças, além de solubilização de fosfato e de zinco, outro parâmetro importante visto que enriquece o solo e desvia distorções que impactam o crescimento (LOURENÇO, 2021).

Recentemente a espécie *Streptomyces albulus* sofreu uma reclassificação com os estudos desenvolvidos por Butdee e colaboradores (2023), no qual foi relatado que todas as sequências genômicas e características fenotípicas das *Streptomyces noursei* são compatíveis com a *Streptomyces albulus*, propondo então que se trata da mesma espécie, sugerindo assim que *S. albulus* é sinônimo de *S. noursei*. Assim, atualizamos a linhagem para *S. noursei CAB-C 50*.

Este trabalho teve como objetivo avaliar o perfil de crescimento e produção de metabólitos secundários produzidos por *Streptomyces noursei CAB-C 50* em diferentes combinações entre os meios de cultura e extrato do composto orgânico (ECO), identificar e caracterizar *in silico* os genes biossintéticos envolvidos na produção de metabólitos secundários e avaliar a melhor condição de crescimento que potencialize a produção de metabólitos secundários que podem atuar tanto no controle biológico, como na promoção de crescimento vegetal.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Microrganismos, condições de cultivo e manutenção

A linhagem *Streptomyces noursei CAB-C 50* pertencente da coleção de actinobactérias de importância agrícola do Laboratório de Genética Molecular de Bactérias (LGMB) previamente obtidas por Melo (2019) foi investigada neste trabalho. *S. noursei CAB-C 50* foi reativada em meio ISP-2 (International *Streptomyces* Project - extrato de levedura 4 g L⁻¹, extrato de malte 10 g L⁻¹, dextrose 4 g L⁻¹, ágar 20 g L⁻¹, pH 7,3) e incubada à 28 °C por sete dias em estufa tipo BOD Forma Diurnal Growth Chamber. A manutenção das culturas de *S. noursei CAB-C 50* foi realizada em solução de manutenção, na proporção 1:1 de solução I (*skim milk power* 10 g, água destilada 50 ml) e solução II (glicose 7,5 g, sacarose 10 g, albumina bovina 1 g, água destilada 50 ml) e as suspensões armazenadas a -80 °C.

3.2. Preparo de diferentes combinações de meios de cultivo suplementados com extrato do composto orgânico (ECO)

Os meios foram preparados com e sem a suplementação do composto orgânico (ECO) maduro (fase IV de compostagem) produzido e comumente utilizado pela Empresa Sítio Barreiras Fruticultura Ltda. O ECO é composto de diferentes proporções de resíduos como cama de aviário, engaço de banana, levedo de cerveja e cana de açúcar. Após cerca de 45 dias de compostagem, atinge-se a fase IV, onde

se tem o composto maduro, pronto para utilização. O mesmo é utilizado para a fertirrigação de áreas de plantio de bananeiras nos estados da Bahia e Ceará a cada quinze dias.

Dois tipos de meio de cultivo base foram utilizados: o ISP-2 (International *Streptomyces* Project) e o meio mínimo mineral descrito por Pontecorvo e colaboradores (1953). As diferentes combinações utilizadas estão descritas na tabela 1.

Tabela 1- Combinações de meios de cultivo analisadas.

Meios de cultivo	Composição
ISP-2	Extrato de levedura 4 g L ⁻¹
	Extrato de malte 10 g L ⁻¹
	Glicose 4 g L ⁻¹
ISP-2+ECO	Extrato de levedura 4 g L ⁻¹
	Extrato de malte 10 g L ⁻¹
	Glicose 4 g L ⁻¹
	ECO 1% (v/v)
M+G+ECO	Sulfato de amônio 1 g L ⁻¹
	Fosfato de potássio monobásico 2 g L ⁻¹
	Fosfato de potássio dibásico 7 g L ⁻¹
	Sulfato de magnésio heptahidratado 5% (m/v)
	Glicose 0,4% (m/v)
	ECO 1% (v/v)
M+G	Sulfato de amônio 1 g L ⁻¹
	Fosfato de potássio monobásico 2 g L ⁻¹
	Fosfato de potássio dibásico 7 g L ⁻¹
	Sulfato de magnésio heptahidratado 5% (m/v)
	Glicose 0,4% (m/v)
M+ECO	Sulfato de amônio 1 g L ⁻¹
	Fosfato de potássio monobásico 2 g L ⁻¹
	Fosfato de potássio dibásico 7 g L ⁻¹
	Sulfato de magnésio heptahidratado 5% (m/v)
	ECO 1% (v/v)

Para a determinação dessas combinações dos meios de cultivo, ensaios preliminares foram realizados para análise da variação do pH e de densidade óptica (600 nm) (DO) em um período de 24 horas do meio mineral mínimo contendo diferentes concentrações do ECO. As concentrações de ECO variaram de 0,01% até 1% (v/v) do composto.

3.3. Avaliação do crescimento de *S. noursei* CAB-C 50 nas diferentes composições de meio de cultivo com e sem ECO

3.3.1 Análises morfológicas

Para análise do crescimento da *S. noursei* CAB-C 50 foram preparadas placas contendo 20 mL dos diferentes meios de cultivo, M+G+ECO, M+G, M+ECO, ISP-2+ECO e ISP-2. As placas foram incubadas a 28 °C por 14 dias e a cada 24 horas, a característica fenotípica de coloração foi documentada.

Já nas análises micromorfológicas foi empregada a técnica de microcultivo nos distintos tratamentos citados acima, sendo os mesmos incubados em BOD a 28°C até o início da formação dos esporos. Posteriormente foi feito o preparo das amostras para observação das estruturas em microscópio eletrônico de varredura (MEV) conforme descrito por Prakash (2014) com adaptações. As amostras foram fixadas *overnight* em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4. Após a fixação, as amostras foram lavadas em tampão fosfato e seguiu-se para o processo de desidratação. Na etapa de desidratação, as amostras foram incubadas em concentrações de etanol que variam de 30 a 100% (v/v) por 15 minutos por 3 vezes á temperatura ambiente. As etapas seguintes foram realizadas no Núcleo de Microscopia e Microanálises da UFV. O ponto crítico foi realizado para a completa secagem do material no secador de ponto crítico Balzer CPD030. Em seguida, foram montados os *stubs*, as amostras foram cobertas por uma camada de ouro no metalizador Quorum Q150R S e posteriormente visualizadas no microscópio eletrônico de varredura Leo 1430VP.

3.3.2. Avaliação do crescimento

Para avaliar o perfil de crescimento desse isolado em cada uma das combinações dos meios de cultivo foi realizada a contagem de unidades formadoras de colônias (UFCs) após 14 dias de incubação em agitador rotativo a 30°C a uma rotação de 150 rpm. A diluição seriada foi realizada a partir de 1 mL da cultura obtida e 100 uL de cada diluição foram plaqueados em ISP-2.

3.3.3. Determinação da massa seca micelial em cada meio de cultivo

Após 14 dias de incubação (30°C/150 rpm) as culturas foram centrifugadas por 20 min a 5000 rpm. O pellet foi lavado com PBS e filtrado em papel filtro para obtenção da massa micelial de cada tratamento. Os papeis foram colocados em estufa a 60 °C para a secagem e pesagem da massa seca.

3.3.4. Análise de pH do sobrenadante no início e no final do crescimento

Foi realizada a determinação dos valores de pH dos meios M+G+ECO, M+G, M+ECO, ISP-2+ECO e ISP-2 antes e após os 14 dias de crescimento (30°C/150 rpm) a fim de verificar se ocorreram variações no pH durante o período de crescimento da *S. noursei* CAB-C 50.

3.4. Condições de crescimento das *Streptomyces noursei* CAB-C 50 para obtenção dos compostos bioativos

Após 11 dias de crescimento, três discos de 6 mm da cultura de *S. noursei* CAB-C 50 em ISP-2 foram transferidos para frascos tipo Erlenmeyer de 500 mL contendo 250 mL com os respectivos meios de cultura: M+G+ECO, M+G, M+ECO, ISP-2+ECO e ISP-2. Como controle foram utilizados frascos contendo os meios de cultivo acima sem a presença do inóculo. Os mesmos foram incubados por 14 dias a uma temperatura de 30 °C em agitador rotativo a 150 rpm.

3.5. Obtenção do sobrenadante

Após 14 dias de crescimento, as culturas foram centrifugadas por 20 min a 5.000 rpm. O pellet foi lavado com tampão PBS e filtrado em papel filtro para separação do sobrenadante da massa micelial. Posteriormente, o sobrenadante foi filtrado novamente com auxílio de um filtro de 0,22 µm para esterilização do mesmo.

3.6. Extração dos compostos bioativos

A extração dos metabólitos secundários foi realizada de acordo com a metodologia proposta por Danial *et al.* (2020) com adaptações. Os metabólitos bioativos contidos no sobrenadante foram extraídos três vezes com acetato de etila (AE) na proporção 1:1 (v/v) por agitação durante 1 hora. Um funil de separação foi utilizado para a separação da fase aquosa da fase orgânica. O solvente foi evaporado em evaporador rotativo a 38 °C. Os extratos foram dissolvidos em acetona para se realizar a transferência do material obtido para frascos de ampicilina previamente estéreis.

3.7. Análise cromatográfica

A cromatografia em camada delgada (CCD) foi realizada para verificação da presença de possíveis compostos de interesse. O extrato foi depositado em placas de

CCD de 1 mm de espessura e com a fase móvel composta por clorofórmio:metanol (6:1 v/v). Após a separação, as placas foram reveladas em solução de vanilina. Como controle foi utilizado o próprio extrato oriundo dos meios de cultivos que não foram inoculados.

Após a realização da CCD, os frascos de ampicilina contendo os extratos dissolvidos em acetona foram colocados sob ar comprimido para a evaporação do solvente. As massas obtidas foram determinadas. Os frascos contendo os extratos foram armazenados em freezer na temperatura de -20 °C até a execução de análises futuras.

3.8. Análise dos metabólitos secundários produzidos

Os extratos obtidos foram encaminhados para o Departamento de Química na Universidade Estadual de Maringá, onde em parceria com o professor Eduardo Jorge Pilau e do pesquisador Felipe de Oliveira Souza, foi realizada a identificação dos compostos bioativos com auxílio da cromatografia líquida de ultra alta eficiência (UHPLC) acoplado com um espectrômetro de massas de alta resolução (HRMS).

As amostras foram inseridas por injetor automático em um sistema de separação cromatográfica UHPLC (Shimadzu, modelo Nexera X2) acoplado a um espectrômetro de massas (Bruker, modelo Impact II) de alta resolução com fonte de ionização por Electrospray e analisadores Quadrupolo (Q) e Tempo de voo (TOF). Para a separação das moléculas contidas nas amostras foi utilizado uma coluna cromatográfica do tipo ACQUITY UPLC CSH C18 1,7µm (2,1 x 100 mm). Foram injetados 2 µL de cada amostra, com a temperatura do cromatográfico ajustada para 40 °C. A fase móvel continha 0,1% de ácido fórmico na bomba A e metanol (MeOH) com 0,1% de ácido fórmico na bomba B. A eluição foi realizada em gradiente, em fluxo contínuo de 0,250 mL/minuto. Do início da corrida cromatográfica até 6 minutos, a fase móvel foi 95 % de A e 5% de B; de 7 a 11 minutos, 50% de A e 50% de B; de 12 a 17 minutos, 30% de A e 70% de B; de 18 a 20 minutos, 5% de A e 95% de B; de 21 até 25 minutos finais, a fase móvel A foi de 95% e a fase B 5%.

O espectrômetro de massas foi calibrado com solução de formato de sódio sendo a aquisição dos espectros de MS realizada em modo positivo com obtenção de espectros de MS/MS no modo scan para os íons mais intensos na faixa de 50 a 2000 m/z. Após o término das análises, os arquivos contendo os espectros de MS das respectivas amostras, foram inseridos na plataforma Global Natural Products Social

Molecular Networking (GNPS) para a obtenção de uma rede molecular, na qual as entidades químicas são agrupadas em Clusters por similaridade espectral, que acaba por corresponder a similaridade química entre os compostos. As identificações dos compostos foram cuidadosamente analisadas individualmente considerando: intensidade dos íons de MS; atribuição dos íons dos espectros de MS/MS, baseado nos mecanismos reacionais e na literatura específica; plausibilidade biossintética da molécula; cálculo de erro experimental.

3.9. Atividade antifúngica dos sobrenadantes

O teste de atividade antifúngica com os sobrenadantes foi seguido conforme descrito por Abdelmoteleb (2020), no qual o meio BDA previamente autoclavado e resfriado foi suplementado com 25% (v/v) do sobrenadante obtido da *S. noursei* CAB-C 50 após os 14 dias de crescimento nos diferentes cultivos. Foram retirados discos de aproximadamente 6 mm de placas contendo o *Foc* previamente crescidos e colocados no centro das placas contendo BDA suplementado com os sobrenadantes. Como controle, foi utilizado o meio BDA suplementados com o próprio meio de cultivo sem a presença do inóculo. As placas foram incubadas em BOD a 25 °C até que o crescimento fúngico atingisse as bordas da placa controle. Após o tempo de incubação foram registrados o raio do micélio de cada placa e os resultados foram expressos em porcentagem inibitória do crescimento do micélio radial em comparação com o controle de acordo com a equação:

$$\text{Porcentagem inibitória} = [(\text{raio controle} - \text{raio tratamento}) / \text{raio controle}] \times 100$$

3.10. Atividade antifúngica dos extratos

O teste de atividade antifúngica com os extratos oriundos da extração com acetato de etila do sobrenadante da *S. noursei* CAB-C 50 foi realizado conforme descrito por Xiaojuan (2021). Os extratos foram diluídos em 100 uL de DMSO e 200 µg/mL de cada extrato foram utilizados para suplementar o meio BDA. Discos de 6 mm foram retirados de placas contendo o *Foc* previamente crescido e colocados no centro das placas contendo BDA suplementado com os extratos. Como controle, foi utilizado o meio BDA suplementado com os extratos do próprio meio de cultivo sem a presença do inóculo. As placas foram incubadas em BOD a 25 °C até que o crescimento fúngico atingisse as bordas da placa controle. Após o tempo de incubação foram registrados o raio do micélio de cada placa e os resultados foram

expressos em porcentagem inibitória do crescimento do micélio radial em comparação com o controle de acordo com a equação demonstrada no item.

3.11. Identificação do arsenal genético de *S. noursei* CAB-C 50 para a produção de metabólitos secundários

3.11.1. Predição *in silico* de genes envolvidos com vias de produção de metabólitos secundários em *S. noursei* CAB-C 50 e análise comparativa entre outros genomas da espécie

A prospecção de genes envolvidos com a biossíntese de metabólitos secundários foi realizada com o banco de dados antiSMASH 5.0 e o BAGEL como proposto no trabalho de GOSSE e colaboradores (2019).

A análise de genômica comparativa foi realizada entre o isolado *S. noursei* CAB-C 50 e outros genomas de diferentes linhagens da espécie *S. noursei* disponíveis no banco de dados GenBank NCBI até o dia 5 de janeiro de 2023.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Diferentes combinações de meios de cultura

Os metabólitos secundários podem ser dispensáveis para o crescimento de microrganismos, principalmente quando os mesmos se encontram em condições favoráveis para o seu crescimento. No entanto, os mesmos são indispensáveis para a sobrevivência do organismo quando este se encontra em condições de estresse (RODRÍGUEZ *et al.*, 2018). Assim, nesse estudo utilizamos diferentes meios de cultivo com diferentes condições de crescimento para avaliar o crescimento e produção de metabólitos secundários por *S. noursei* CAB-C 50.

Os ensaios preliminares mostram que após 24 horas, a adição de extrato de composto orgânico (ECO), nas diferentes concentrações no meio mineral mínimo suplementado (MS) não alterou significativamente a densidade óptica do meio de cultivo, assim como o pH do meio. Diante disso, a concentração de ECO a 1% (v/v) foi utilizada para verificar se o mesmo influenciava positivamente na produção dos metabólitos secundários, podendo servir como fonte de carboidrato, principalmente quando adicionado ao meio mineral mínimo, um meio de baixo valor nutritivo para o microrganismo.

Além do composto, a glicose também foi utilizada em algumas combinações como fonte de carbono. De acordo com Grasso (2016), a utilização de fontes de

carboidratos como a glicose é capaz de inativar os genes para a produção do metabolismo secundário. Mediante a isso, ao escolher o percentual de glicose para a suplementação dos meios minerais, foi utilizado uma baixa concentração definida como 0,4 % (p/v), mesma concentração de glicose utilizada no meio de cultivo ISP-2, um dos meios também utilizados e que já está estabelecido para o crescimento de *Streptomyces*.

4.2. Análise macro e micromorfológica de *S. noursei CAB-C 50*

Nas cinco condições de cultivo testadas (ISP-2, ISP-2+ECO, M+G+ECO, M+G e M+ECO), observou-se que o micélio formado no início do crescimento apresentou uma coloração na escala do branco com tons acinzentados a partir do momento em que a colônia iniciou o processo de esporulação. Nos meios de cultivo ISP-2 e ISP-2+ECO, foi possível observar, ao verificar o fundo das placas, que o isolado produziu um pigmento que alterou a cor do meio de cultivo para amarelo a partir de 72 h de crescimento. Já nos meios de cultivo M+G+ECO, M+G, M+ECO verificamos um comportamento similar, com a produção de um pigmento com uma coloração mais amarronzada (Figura 2 e 3).

O micélio de substrato das actinobactérias pode apresentar diferentes padrões de cores. Eles podem se apresentar branco, amarelo, marrom, vermelho, rosa, laranja, verde ou preto; além disso, os mesmos podem produzir pigmentos capazes de alterar a cor do meio de cultivo no qual se encontram (LI, 2016). Já micélio aéreo tem uma maior espessura quando comparado ao micélio de substrato, sendo considerado um importante critério de classificação quando se deseja distinguir as *Streptomyces*, sendo considerados como critério de avaliação a estrutura, a formação de anéis ou zonas concêntricas e a sua pigmentação (ANANDAN; DHARUMADURAI; MANOGARAN, 2016).

Como foi possível observar, as diferentes composições nutricionais dos meios utilizados foram capazes de alterar a forma de crescimento da *S. noursei CAB-C 50* (Figura 2 e 3). Já tem sido relatado que essa forma de crescimento pode variar de acordo com o meio de cultivo, podendo ocasionar mudança nas cores dos micélios de substratos, assim como também na pigmentação dos esporos que são produzidos (OUBAHA *et al.*, 2019).

Figura 2 – Crescimento da linhagem *S. noursei* CAB-C 50 nos meios de cultivo ISP-2 e ISP-2+ECO ao longo de 240 horas de crescimento.

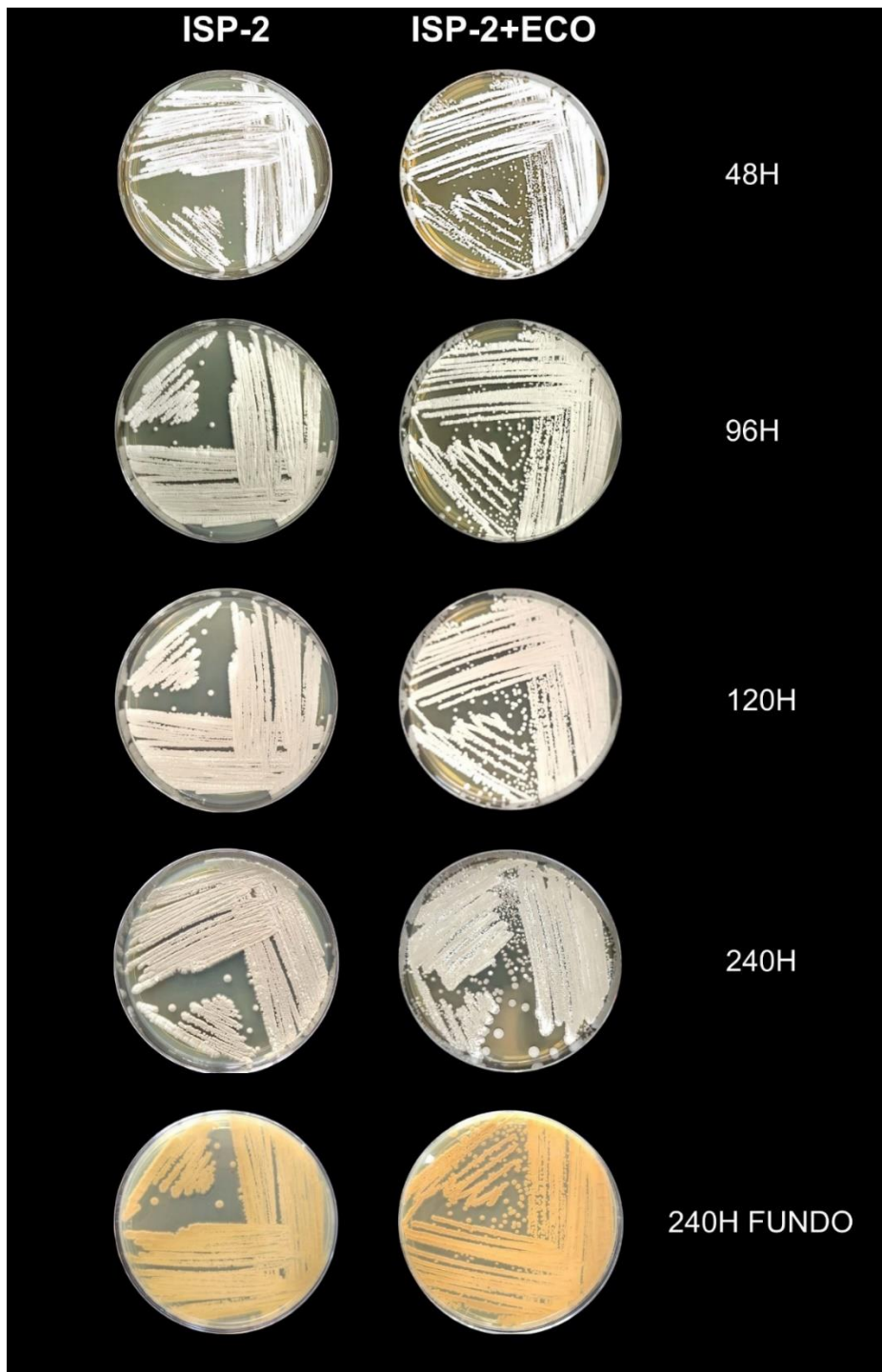
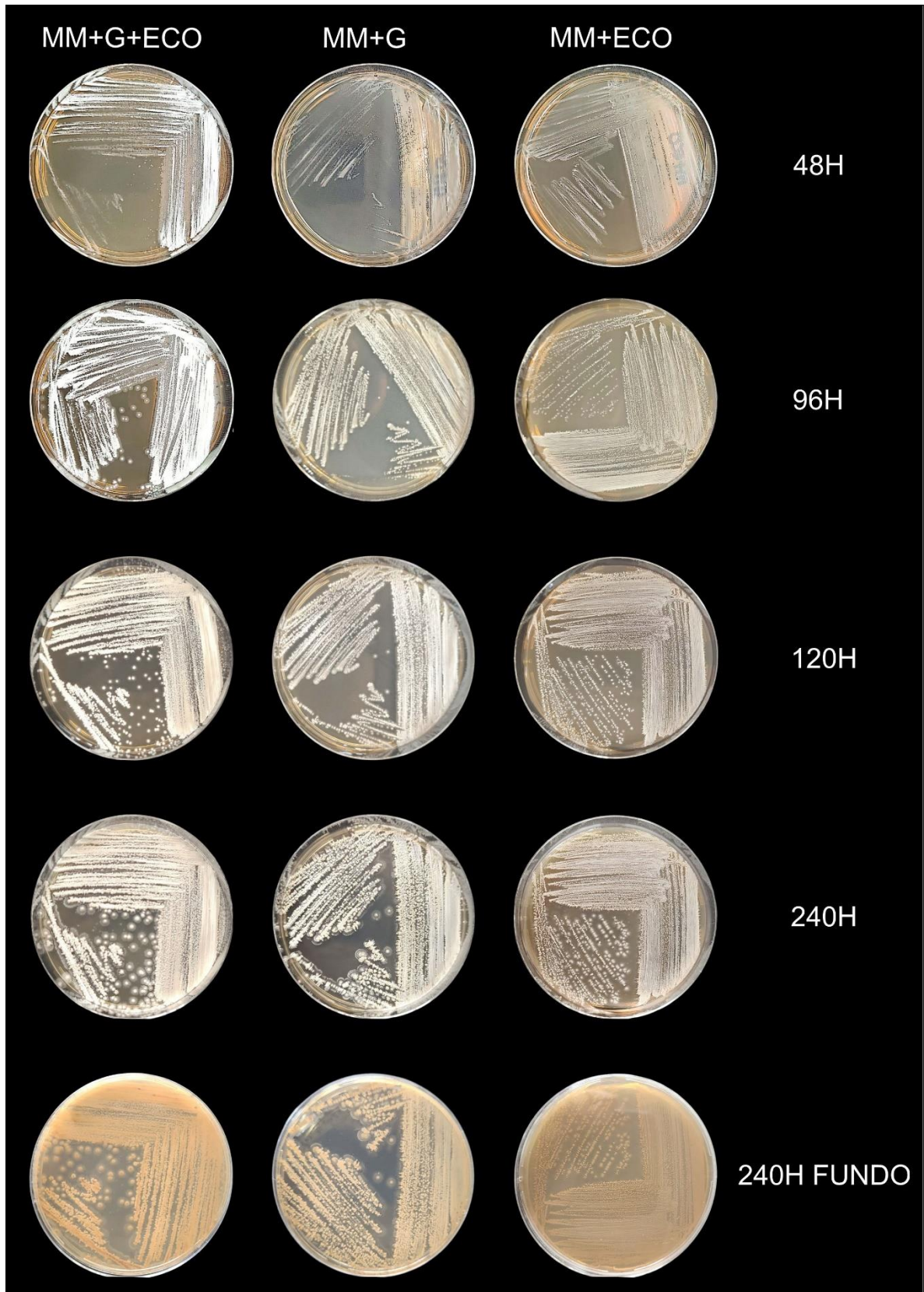


Figura 3 – Crescimento da linhagem *S. noursei* CAB-C 50 nos meios de cultivo M+G+ECO, M+G e M+ECO, ao longo de 240 horas de crescimento.



Os pigmentos produzidos pelas *Streptomyces* além de contribuírem para as indústrias têxtil também possuem grande interesse para área farmacêutica uma vez que muitos desses pigmentos apresentam atividade antimicrobiana (SARMIENTO-TOVAR et al., 2022). Em seu estudo, KAZI e colaboradores (2022) caracterizaram um pigmento marrom produzido por uma linhagem pertencente ao gênero *Streptomyces* que apresentou ampla atividade antibacteriana contra *Bacillus cereus* e *Escherichia coli*. LI e colaboradores (2021) verificaram que a *Streptomyces spectabili* tem a capacidade de produzir um pigmento vermelho identificado como metacicloprodigosina e que o mesmo possui atividade antimicrobiana, demonstrando ser promissor como um novo medicamento.

As análises micromorfológicas foram realizadas por MEV. A partir das imagens obtidas por MEV foi possível verificar que as hifas são enoveladas nas suas extremidades e que os esporos produzidos por essa linhagem possuíam a superfície irregular e espiculada. Observamos que essas características não variaram de acordo com o meio de cultivo utilizado. Entretanto, foi possível observar uma diminuição no número de esporos observados no meio M+ECO demonstrando que quando cultivadas nesse tratamento a *S. noursei* CAB-C 50 esporula menos (Figuras 4 e 5).

Figura 4 – Aspectos micromorfológicos de *S. noursei* CAB-C 50 em IPS-2 e ISP-2+ECO após 7 dias de crescimento. A: Micélio formado no tratamento ISP-2; B: Esporos formados no tratamento ISP-2; C: Micélio formado no tratamento ISP-2+ECO; D: Esporos formados no tratamento ISP-2+ECO.

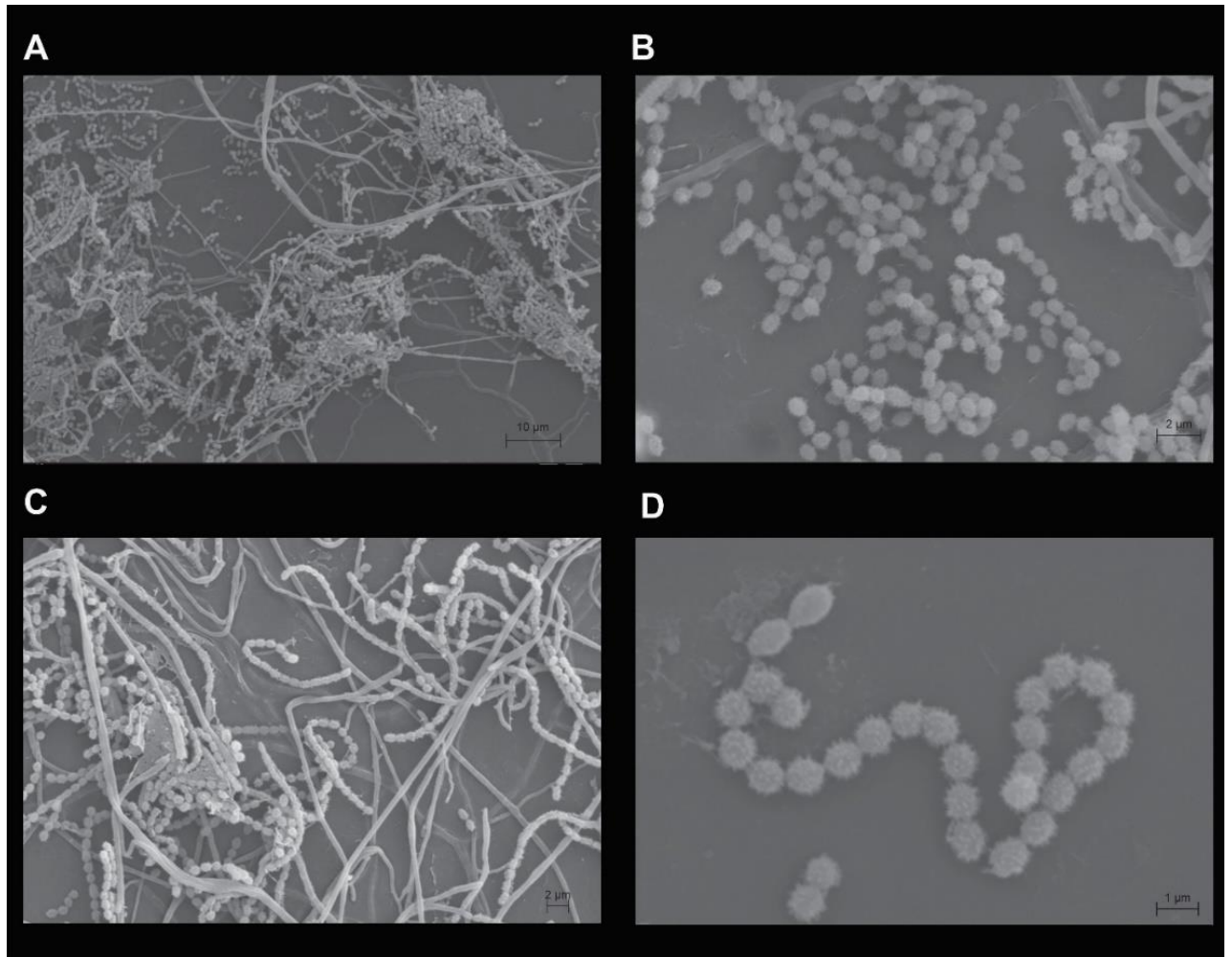
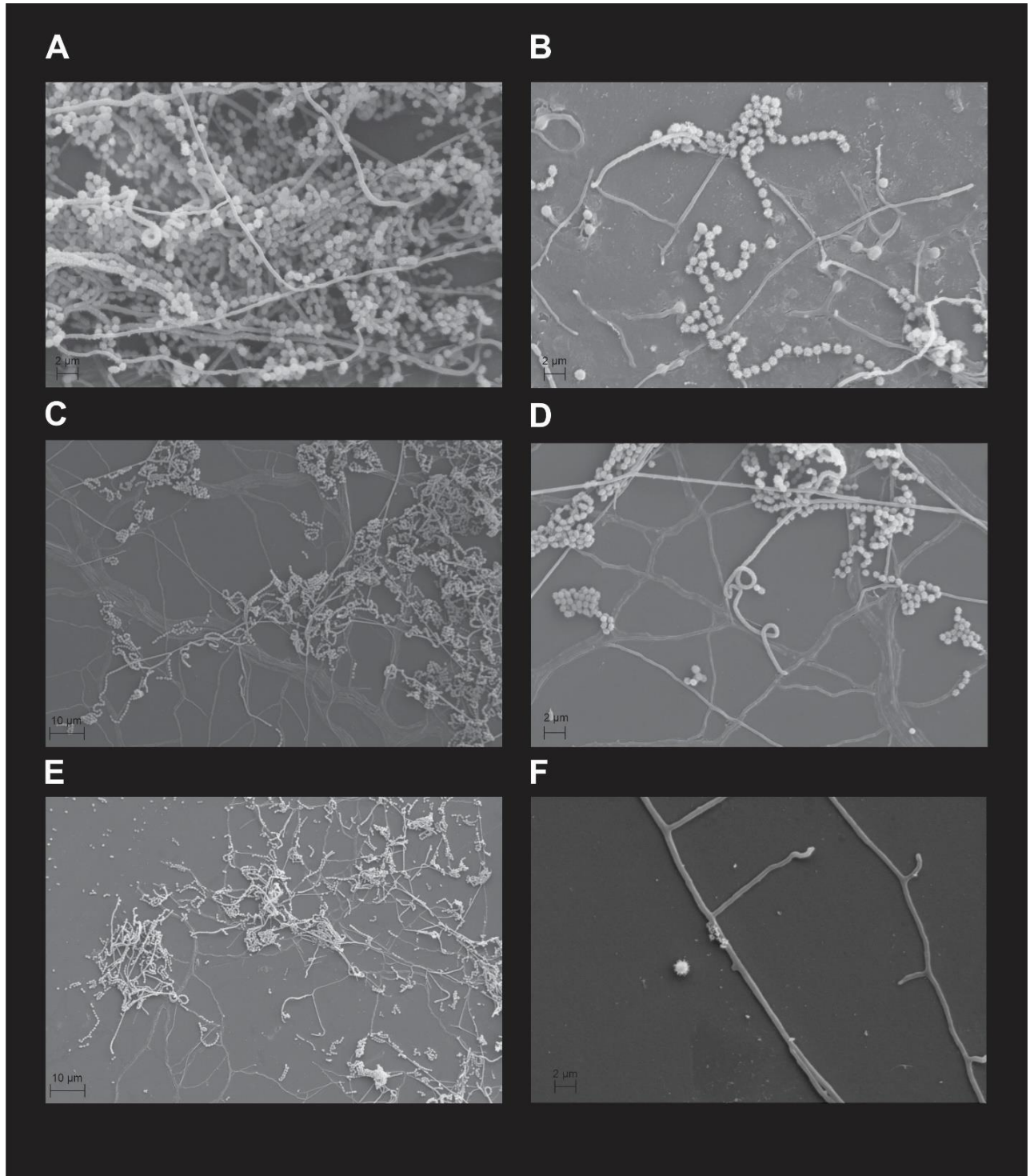
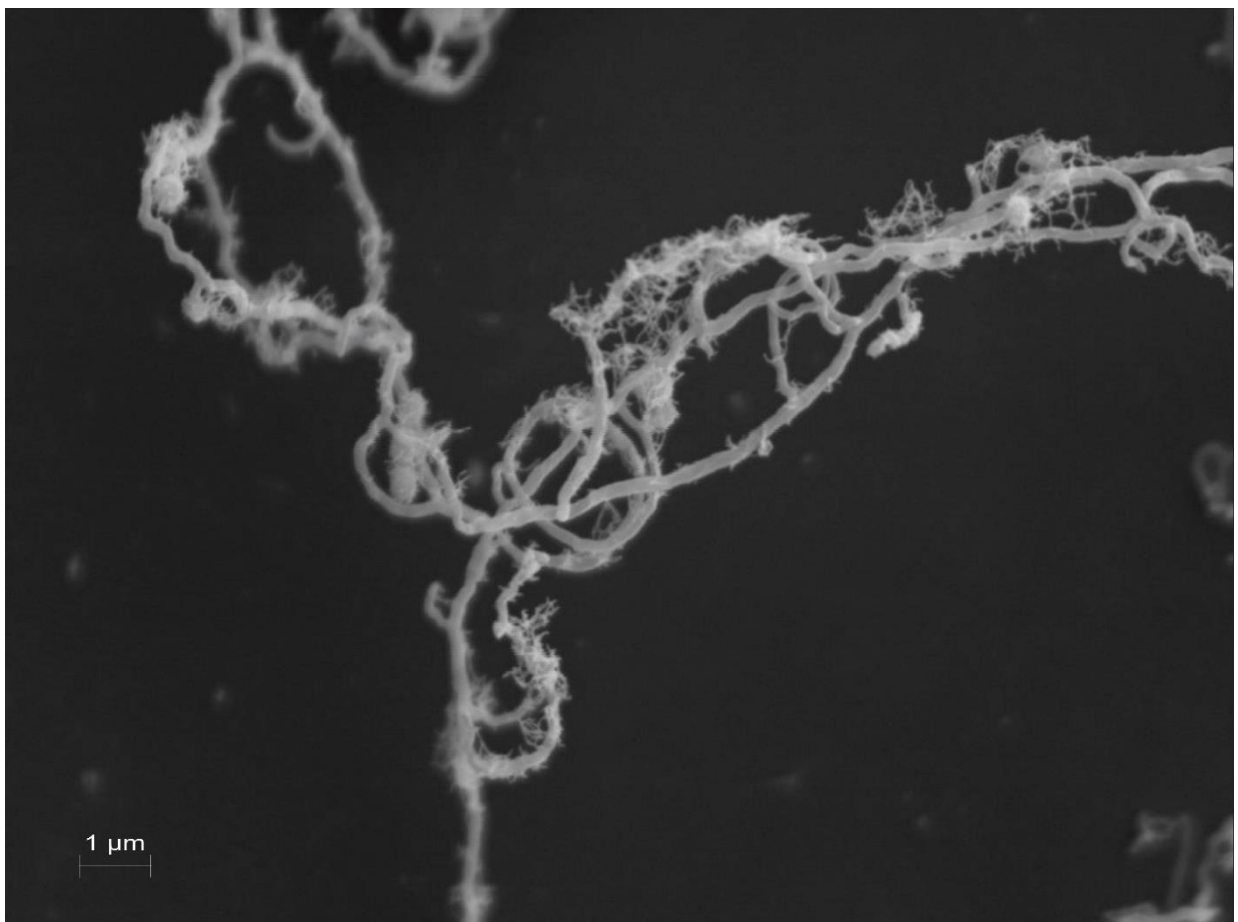


Figura 5 – Aspectos micromorfológicos de *S. noursei* CAB-C 50 em M+G+ECO, M+G e M+ECO após 7 dias de crescimento. A: Micélio formado no tratamento M+G+ECO; B: Esporos formados no tratamento M+G+ECO; C: Micélio formado no tratamento M+G; D: Esporos formados no tratamento M+G; E: Micélio formado no tratamento M+ECO; F: Esporos formados no tratamento M+ECO.



O gênero *Streptomyces* é conhecido por formar cadeias de esporos alongadas, podendo ser encontrados mais de 50 esporos por cadeia. Os esporos produzidos pelas *Streptomyces* são conhecidos como artrósporos o que significa que a formação desses se dá pela fragmentação das hifas (LI, 2016). Apesar das diferenças observadas nas análises macromorfológicas, entre os 5 tratamentos testados não foi observado diferença na morfologia das hifas e dos esporos. No entanto, quando *S. noursei* CAB-C 50 foi cultivada em M+ECO, o meio com menor valor nutricional, foi observado em alguns pontos a deformidade das hifas aéreas como observado na figura 6, o que pode ser explicado pela condição de estresse que a mesma se encontrava.

Figura 6 – Deformações encontradas nas hifas da *S. noursei* CAB-C 50 quando cultivadas no tratamento M+ECO.



As análises da micromorfologia da *S. noursei* CAB-C 50 descritas neste estudo corroboram com o que foi relatado no trabalho de Liu (2019) onde a análise morfológica de duas linhagens de *S. noursei* com auxílio da microscopia eletrônica de

varredura também revelou que os esporos produzidos possuíam superfície irregular na forma de espinhos.

O gênero *Streptomyces* apresenta diversas formas em relação a sua cadeia de esporos, podendo ser sem espirais, na forma de ganchos, monovorticiladas sem espirais, bivorticiladas contendo espirais, bivorticiladas sem espirais (LI, 2016). A ornamentação das superfícies dos esporos produzidos por *Streptomyces* spp pode se apresentar de diferentes formas, como lisa, rugosa irregular, rugosa paralela, verrucosa, espinhosa ou peluda e todas essas características são pontos importantes a se analisarem para caracterização morfológicas das mesmas (LI, 2016).

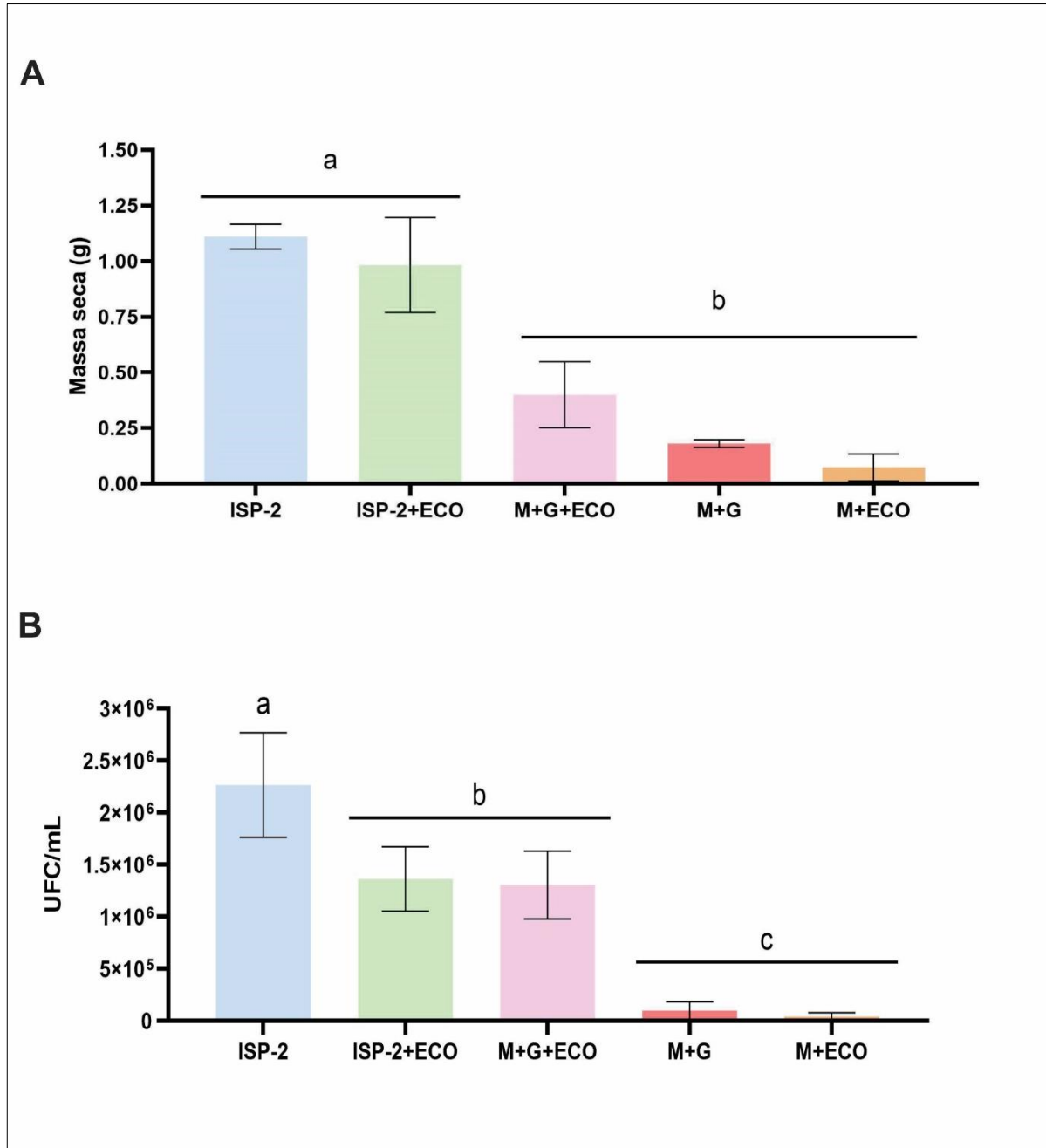
4.3. Avaliação do crescimento

Os resultados do crescimento a partir de células viáveis (UFC.mL⁻¹) e da massa seca micelial a partir das 5 condições de cultivo investigadas (ISP-2, ISP-2+ECO, M+G+ECO, M+G e M+ECO) podem ser observados na figura 7.

Em relação à massa seca, foi observado que o maior crescimento foi obtido nos meios de cultivo ISP-2 e ISP-2+ECO em relação aos outros meios (Figura 7A). Esse resultado é esperado, uma vez que o meio de cultivo ISP-2 é um meio de cultivo específico para o gênero *Streptomyces* (SHIRLING et al.,1966). Ahmad e colaboradores (2015) em seu estudo com *Streptomyces bikiniensis* relataram que o meio ISP-2 demonstrou ser eficiente quando comparados com outras condições de cultivo. Djebbah *et al* (2021) também observaram que uma linhagem do gênero *Streptomyces* isolada de caverna na Argélia apresentou um bom crescimento quando cultivadas em ISP-2. A diferença de crescimento entre os meios alternativos com ISP-2 e os com o meio mineral pode ser explicada pela disponibilidade de nutrientes encontrada em cada meio de cultivo.

Quando analisado o crescimento de células viáveis UFC.mL⁻¹ (Figura 7B), foi observado que os meios de cultivo ISP-2, ISP-2+ECO e M+G+ECO apresentaram a maior população e que entre esses tratamentos não houve diferença significativa, diferente do observado para massa. Isto pode indicar que nesse meio de cultivo, *S.noursei* CAB-C 50 produz uma maior quantidade de esporos do que quando cultivada em M+G e M+ECO e assim resultou em maior população.

Figura 7– Perfil de crescimento de *S. noursei* CAB-C 50 em diferentes meios de cultura, crescidos por 14 dias a 30 °C. A: população (UFC.mL⁻¹) e B: Massa seca (g).



4.4. Variação de pH durante o crescimento da *S. noursei* CAB-C 50

Ao analisar a variação de pH antes da inoculação (pH_i = pH do meio original) definido como 7,3 com o pH obtido ao final dos 14 dias de incubação (pH_f), observou-se que, quando cultivadas em ISP-2 e ISP-2+ECO, o pH_f aumentou, ficando na faixa de 8,2 e 8,5 respectivamente. Já quando cultivadas em M+G+ECO, M+G e M+ECO,

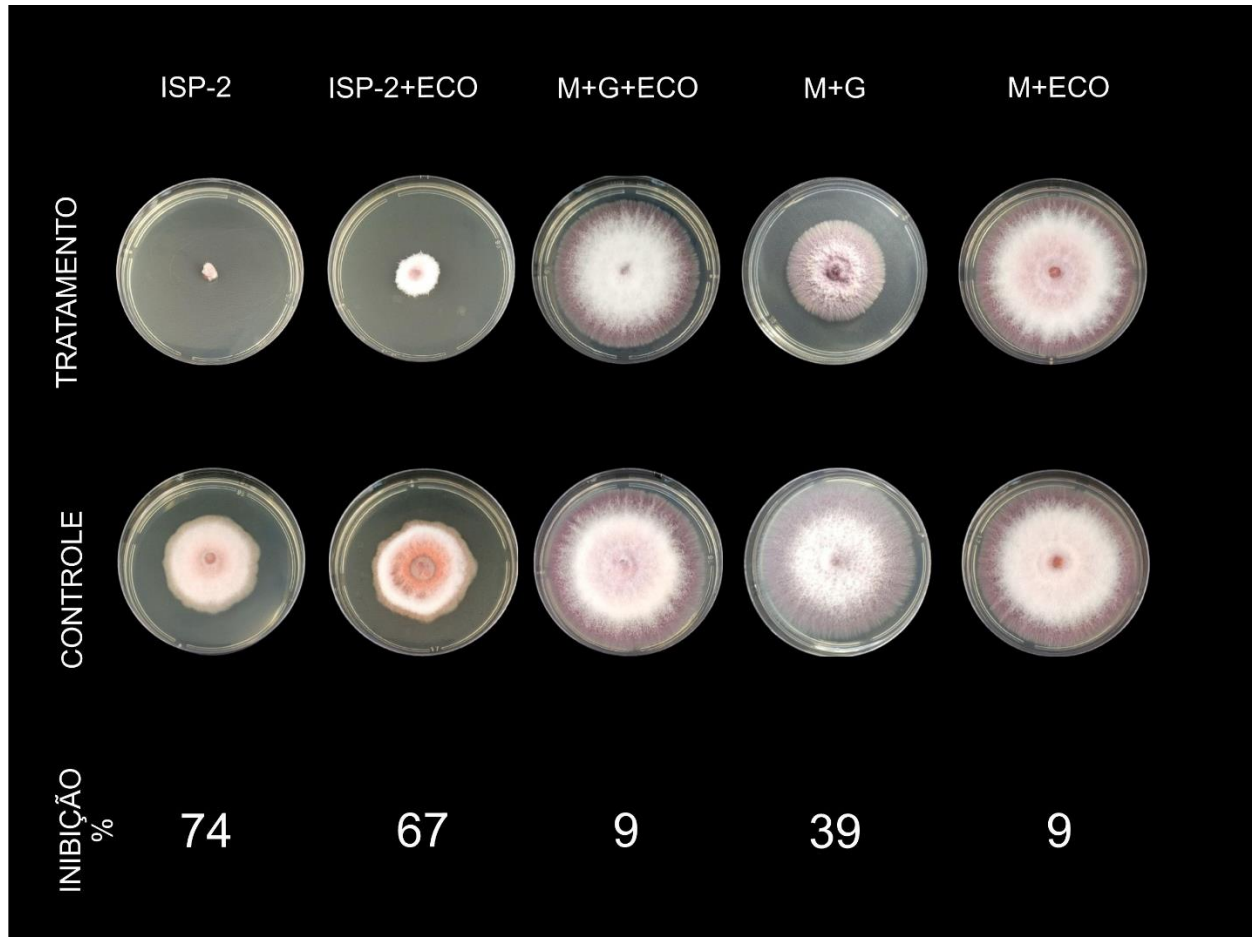
ao fim do crescimento ocorreu uma diminuição do pH_f ficando na faixa de 6,8, 6,8 e 7,1 respectivamente.

As *Streptomyces* são amplamente conhecidas por produzirem uma gama de enzimas e compostos antimicrobianos e, a produção desses compostos no meio de cultivo podem ser os responsáveis pela alteração do pH final do crescimento (KONTRO *et al.*, 2005). Além disso, o fato desse isolado manter o pH básico quando cultivados em meio ISP-2 pode ser uma alternativa para a aplicação em solos de características ácidas (ROMANO-ARMADA *et al.*, 2020). Kontro *et al* (2005) demonstrou em seu estudo que as faixas de pH ideal para o crescimento de *Streptomyces spp* não são constantes e que a alteração do pH durante o crescimento pode estar relacionado à composição do meio de cultivo, indicando que quando cultivadas em meios de cultura mais complexos, essa bactéria tem a característica de aumentar o pH do meio. Isso pode explicar o aumento do pH quando a *S.noursei CAB-C 50* foi cultivado em ISP-2, que é considerado um meio mais complexo em comparação com os demais tratamentos utilizando o meio mineral. Além disso, um ambiente mais rico em diversidade de componentes pode simular as condições ambientais das bactérias de solo rizosférico, onde a concentração de nutrientes é bem diversa (ABREU, 2020).

4.5. Atividade antagônica do sobrenadante obtido de *S. noursei CAB-C 50* nos diferentes meios de cultivo

Ao realizar o teste de atividade do sobrenadante livre de células produzidos por *S. noursei CAB-C 50* nos 5 meios de cultivos investigados, contra o fungo *Fusarium oxysporum cubense (Foc)*, foi observado que os tratamentos ISP-2 e ISP-2+ECO apresentaram uma maior taxa de inibição do crescimento, apresentando respectivamente 74 % e 67 %. Já os tratamentos M+G+ECO, M+G, M+ECO apresentaram um percentual de inibição mais baixo, sendo eles, respectivamente 9 %, 39 % e 9 % (Figura 8).

Figura 8 – Atividade biológica dos sobrenadantes de *S.noursei* CAB-C 50 cultivada nos diferentes meios de cultura *contra Foc*. Os testes foram realizados pela suplementação do meio BDA com os sobrenadantes livre de células.



Abdelmoteleb e González-Mendoza (2020) avaliaram a atividade antifúngica do sobrenadante livre de células produzido por *Streptomyces netropsis* isolada de solo rizosférico e verificaram que o sobrenadante extraído demonstrou atividade contra os fungos fitopatogênicos *Macrophomina phaseolina*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Fusarium equiseti*, *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata* e *Colletotrichum gloeosporioides*. Neste mesmo trabalho, o percentual de inibição contra *F. oxysporum* não ultrapassou 60 %. O sobrenadante obtido a partir do crescimento de *Streptomyces morookaensis* também demonstrou ser eficiente no controle de *Foc* de acordo com o estudo de Zhu (2021). Estes trabalhos corroboram a ideia de que este gênero pode ser uma alternativa eficiente para o controle desse fungo fitopatogênico, além de ressaltar que *S. noursei* CAB-C 50 se destaca como um isolado promissor na produção de compostos antifúngicos.

Apesar do potencial para produção de metabólitos secundários por *Streptomyces* spp muitas vias biossintéticas não são ativadas nas condições normais de cultivo ou somente pela condição de estresse nutricional, essas vias são denominadas vias crípticas de produção vias (YAGÜE *et al.*, 2022). A ativação dessas vias crípticas é hoje o principal foco de pesquisas em relação às *Streptomyces*, sendo necessário estratégias multidisciplinares para obter acesso a novos compostos que são produzidos por essas vias (YAGÜE *et al.*, 2022).

4.6. Atividade antifúngica dos extratos obtidos de *S. noursei* CAB-C 50 cultivado em diferentes meios de cultura

A atividade antifúngica *in vitro* dos extratos obtidos a partir do crescimento de *S. noursei* CAB-C 50 nos 5 tratamentos contra o fungo fitopatogênico *Foc* (Figura 9) mostrou que apenas o extrato obtido do tratamento ISP-2 foi capaz de inibir o crescimento do fungo. Nas condições usadas o extrato apresentou uma taxa de inibição de 30 %.

Jin e colaboradores (2020) em seu trabalho avaliaram o potencial de biocontrole de uma linhagem de *Streptomyces* isolada do solo frente a *Foc* TR4. Nesse estudo foi verificado que o extrato obtido a partir de *Streptomyces violaceusniger* JBS5-6 apresentou forte atividade antifúngica contra *Foc* isolado de plantações de banana. Sholkamy *et al.* (2020) também verificaram em seu estudo que o extrato produzido por *Streptomyces cuspidosporus* SA4 apresentou atividade antimicrobiana de grande relevância contra bactérias e fungos como *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Shigella flexneri*, *Candida albicans*, *Aspergillus niger* e *Fusarium sp.*

Figura 9 – Atividade biológica dos extratos de *S. noursei* CAB-C 50 contra *Foc*. Os testes foram realizados pela suplementação do meio BDA com os extratos de *S. noursei* CAB-C 50 obtidos em cada meio de cultivo.



Apesar de vários estudos relatarem o potencial antimicrobiano dos extratos produzidos por linhagens do gênero *Streptomyces*, dentre os extratos obtidos neste estudo, apenas o extrato obtido da *S. noursei* CAB-C 50 em ISP-2 foi capaz de inibir significativamente o *Foc*.

Resultados observados com o teste da atividade do extrato e do sobrenadante de ISP-2 podem estar relacionados a uma baixa concentração dos compostos de interesse biológico após a extração. É possível que o método de extração utilizando acetato de etila não foi eficiente para a recuperação de todos os compostos de atividade antimicrobiana produzidos durante o cultivo. Além disso, o fato do sobrenadante ter sido mais eficaz pode estar relacionado ao efeito sinérgico de alguns compostos que podem ter sido perdidos durante o processo de extração. Além disso, a concentração dos compostos foi reduzida durante o processo (TAN; LEE, 2020; PESSOTTI *et al.*, 2021).

Vale ressaltar que *Streptomyces* também podem produzir compostos orgânicos voláteis (VOCs), compostos de baixo peso molecular e de fácil evaporação (YANG *et al.*, 2019) Já foi constatado que os VOCs possuem grande interesse biotecnológico, possuindo atividade antimicrobiana, nematicida e ajudando na promoção de

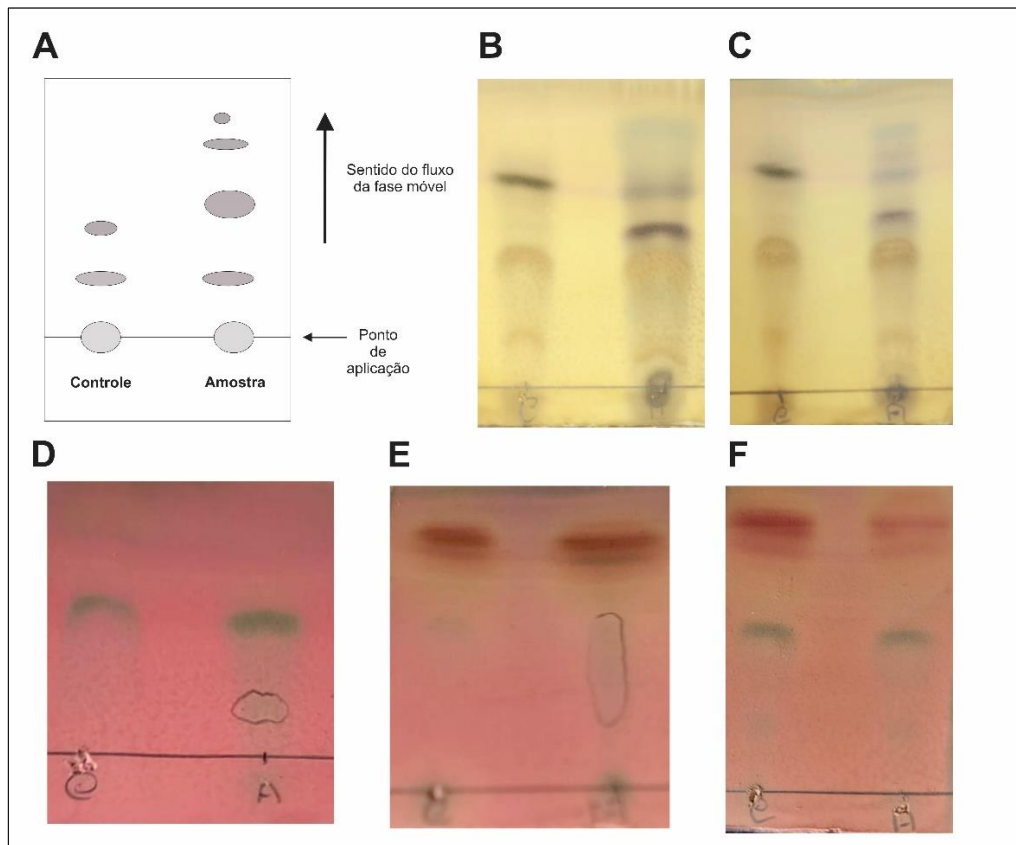
crescimento vegetal (AYED *et al.*, 2021). Porém, o método de extração utilizado nesse estudo não permite a extração desses compostos, o que pode explicar a baixa atividade dos extratos aqui testados.

A maior atividade antifúngica do sobrenadante pode ser muito vantajosa, visto que a utilização direta dos compostos produzidos no cultivo evita os processos de extração, que muitas vezes são trabalhosos e custosos. Assim, ensaios posteriores podem ser realizados para prospectar os metabólitos a partir do sobrenadante sem procedimentos mais elaborados.

4.7. Compostos bioativos produzidos por *Streptomyces noursei* CAB-C 50

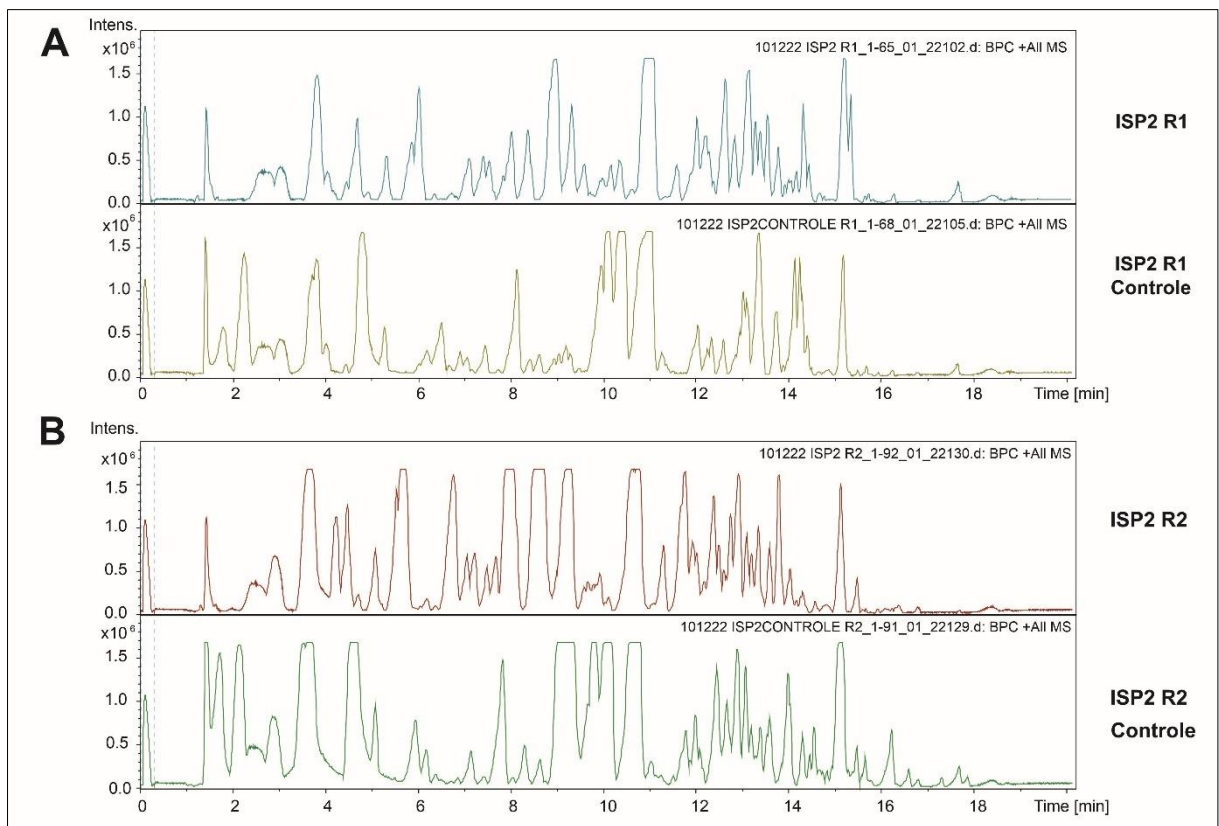
A análise dos extratos em cromatografia de camada delgada (CCD) permitiu observar diferenças entre os perfis de separação obtidos nos diferentes meios de cultivo, além de diferenças entre os tratamentos e os controles. Isso demonstra a possível presença de compostos bioativos nos extratos obtidos como demonstrado na figura 10.

Figura 10 – Cromatografia de camada delgada (CCD) A: Representação esquemática do funcionamento da separação por CCD; B: ISP-2; C: ISP-2+ECO; D: M+G; E: M+G+ECO; F: M+ECO.



Os extratos obtidos foram submetidos a identificação por UHPLC-HRMS. Devido ao tempo necessário para a obtenção dos dados metabolômicos desses extratos e análise acurada dos resultados obtidos, o extrato do tratamento ISP-2, que se mostrou promissor nos testes *in vitro*, foi escolhido para ser o primeiro a ser analisado para identificação dos compostos bioativos produzidos. O cromatograma obtido pode ser observado na figura 11.

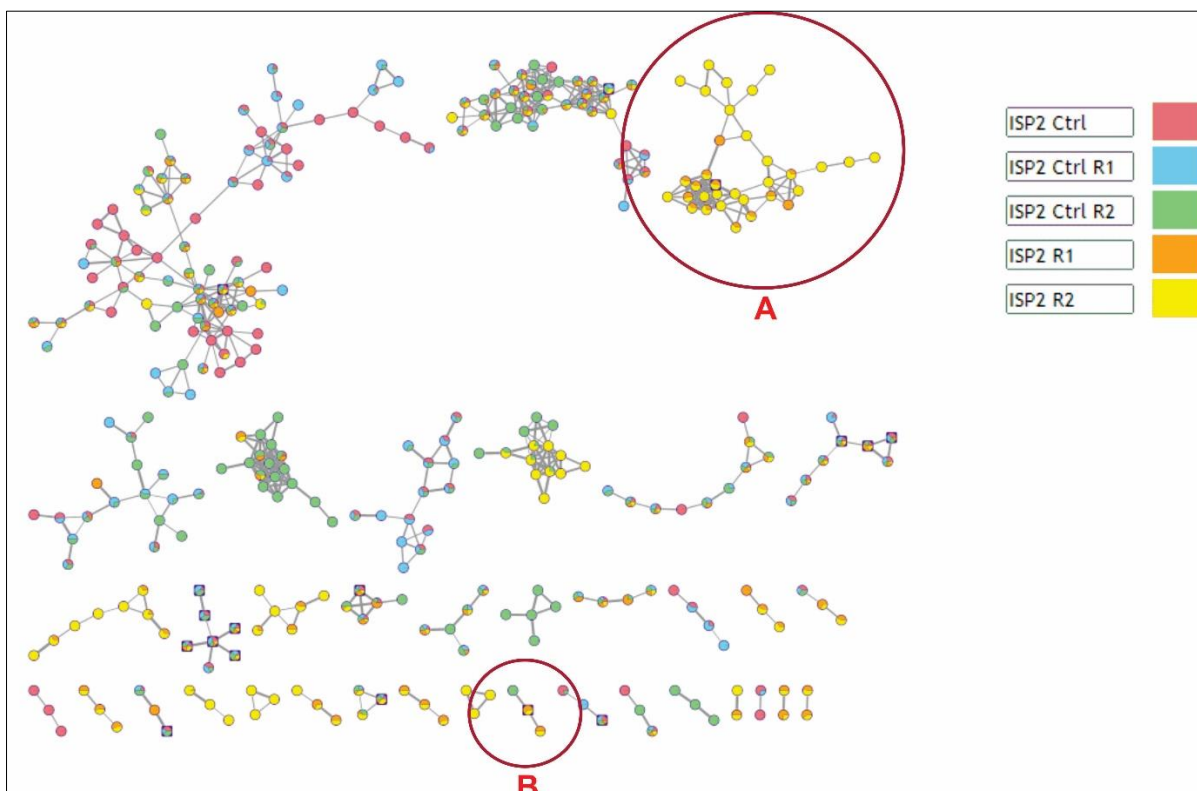
Figura 11 – Cromatograma obtido por UHPLC-HRMS para o extrato ISP-2. Duas réplicas biológicas de cada extrato foram submetidas e identificação.



A identificação dos compostos foi realizada após análise dos espectros de massas na plataforma GNPS. Nesta plataforma, os espectros são agrupados de acordo com a similaridade química e, pela similaridade com espectros de amostras já conhecidas, apresentadas sugestões de estruturas de substâncias relacionadas aos espectros. Assim, para as amostras analisadas foi obtido a rede molecular com as entidades químicas agrupadas em *clusters* (Figura 12). Vários compostos estão presentes nas amostras analisadas e vários *clusters* apresentaram entidades químicas tanto dos cultivos quanto dos controles. Alguns, no entanto, apresentaram apenas nós representativos dos tratamentos, sendo estes os de relevância para as análises. Desses, apenas dois *clusters* apresentaram compostos com

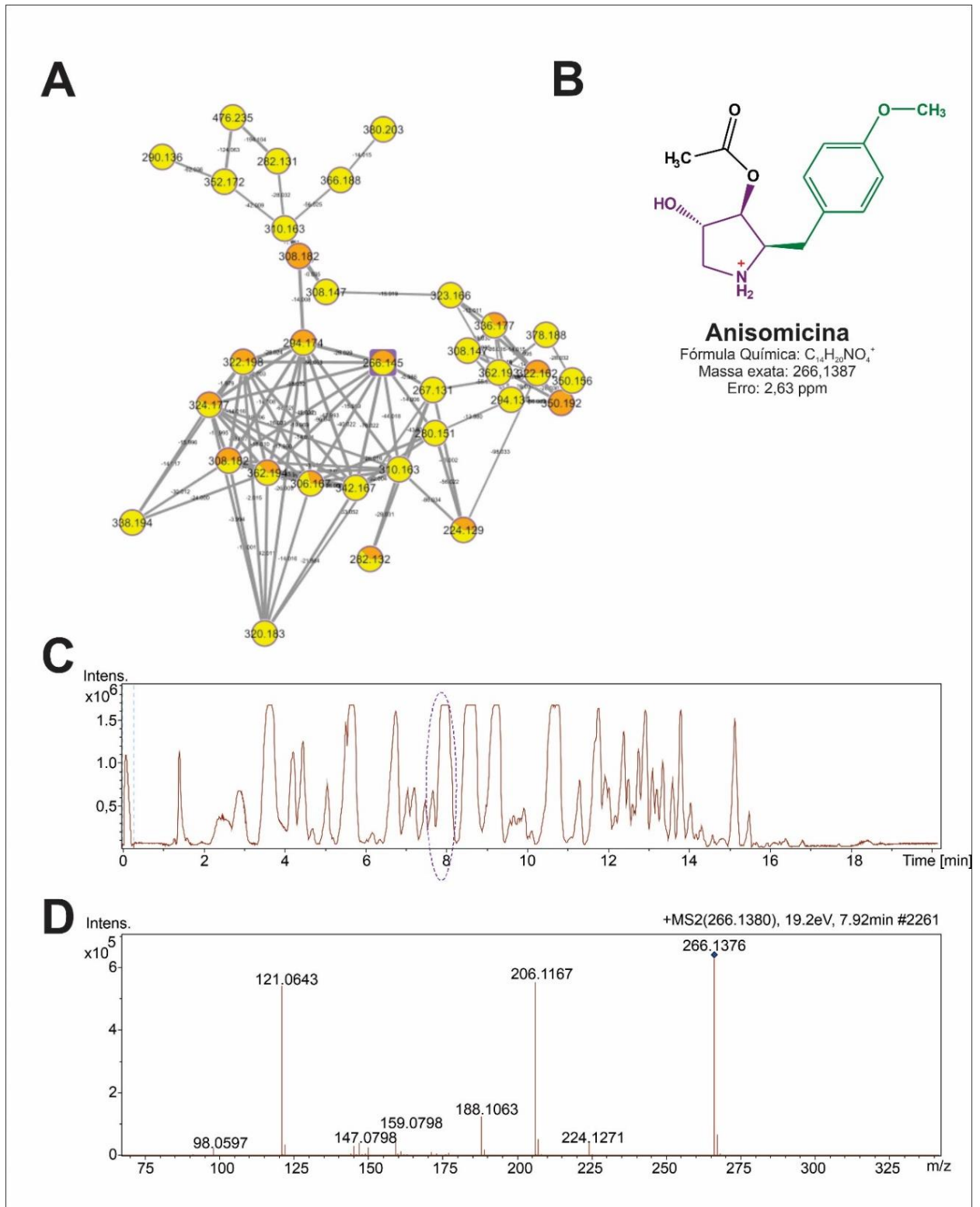
correspondência espectral com a biblioteca do GNPS, sendo denominados HITs, que permitiram a identificação dos possíveis compostos.

Figura 12 – Rede molecular gerada pelo GNPS. Os *clusters* são agrupamentos de entidades químicas por similaridade de espectros. A representação dos nós de cada amostra é identificada pelas cores descritas na legenda no canto superior da figura. A e B correspondem aos dois *clusters* de interesse com compostos identificados



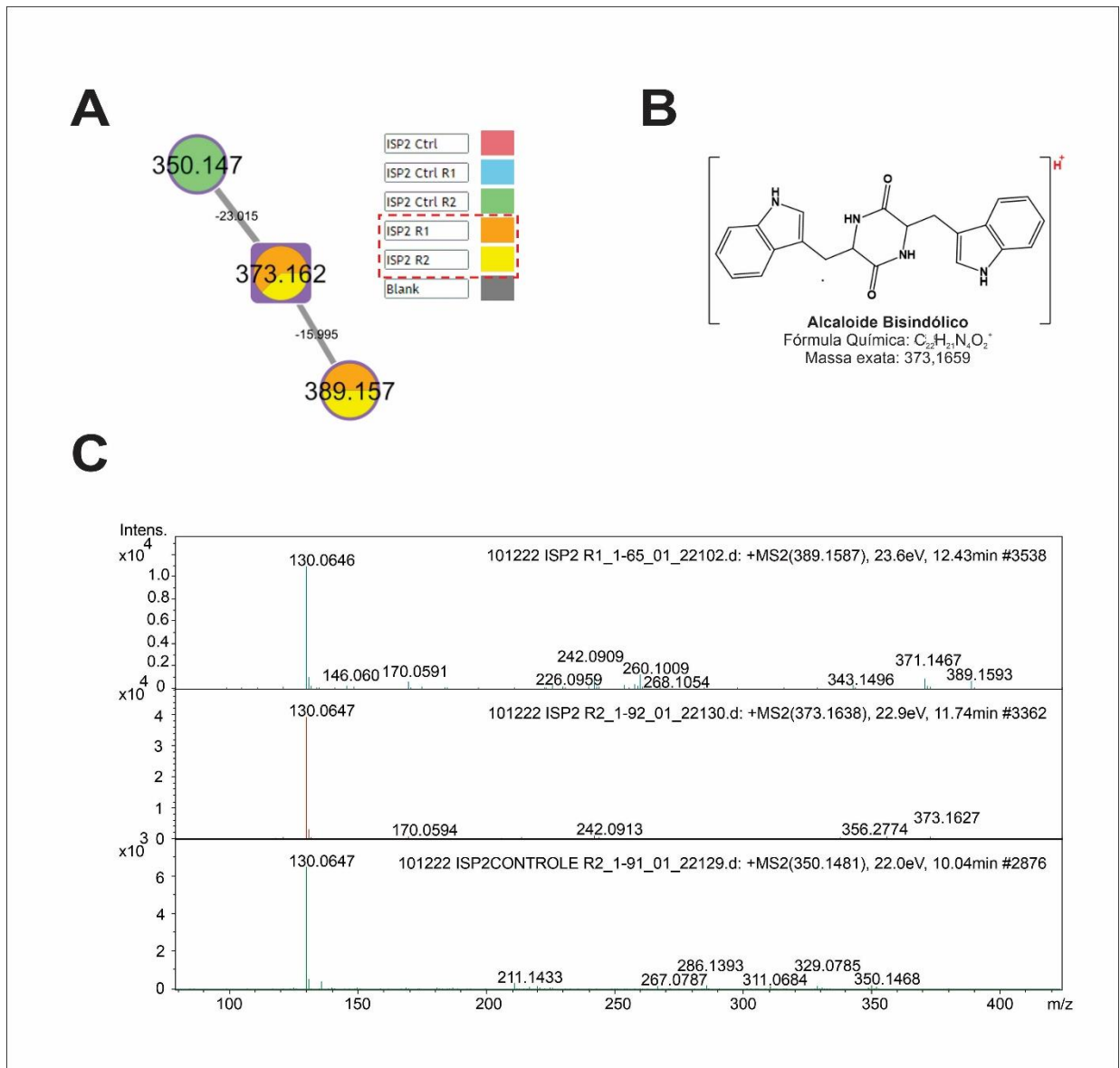
O primeiro agrupamento de interesse (Figura 12A) contém um HIT espectral identificado com o composto anisomicina (Figura 13). Ao analisar o *cluster* mais de perto (Figura 13A), é possível observar que vários nós estão diretamente ligados ao HIT, o que mostra que estes podem ser compostos diretamente relacionados à anisomicina (Figura 13B). O pico referente a esse composto está destacado no cromatograma obtido na separação da amostra, próximo ao tempo de retenção de 8 min (Figura 13C). A identificação desse composto foi conferida manualmente para a acurácia do resultado pela análise do espectro de fragmentação obtido e comparação com o esperado para o composto identificado. A proposta de fragmentação da anisomicina é mostrada na Figura 13D, com fragmentos de m/z 206,1176, 188,107 e 121,0648.

Figura 13 – Identificação do composto anisomicina. A: Cluster de interesse agrupados com anisomicina. B: Fórmula química e estrutural do composto. C: Cromatograma resultante do UHPLC-HRMS, com o pico correspondente ao composto anisomicina em destaque. D: Proposta de fragmentação da molécula



Além do *cluster* químico contendo a anisomicina, um segundo *cluster* de interesse foi identificado (Figura 12B e 15A). O HIT associado é um alcaloide bisindólico (Figura 15B). A análise dos demais nós do *cluster* indicam a presença de um análogo desse composto sendo produzido nos cultivos e algum precursor no controle. Isso podemos verificamos ao analisar o perfil de fragmentação da molécula caracterizada, do seu análogo e do controle. Há uma correspondência química entre os íons m/z 389 (análogo) e 373 (HIT), baseado no perfil de sinais-fragmentos, o que não é observado para o íon m/z 350 (controle) (Figura 15C).

Figura 15 – A: Identificação do *cluster* de interesse. B: Alcaloide bisindólico identificado. C: Proposta de fragmentação da molécula de alcaloide bisindólico encontrado, o seu análogo e o possível precursor.



A via de produção, assim como os genes envolvidos ainda permanece obscura, uma vez que não se tem dados suficientes sobre a molécula identificada em literatura.

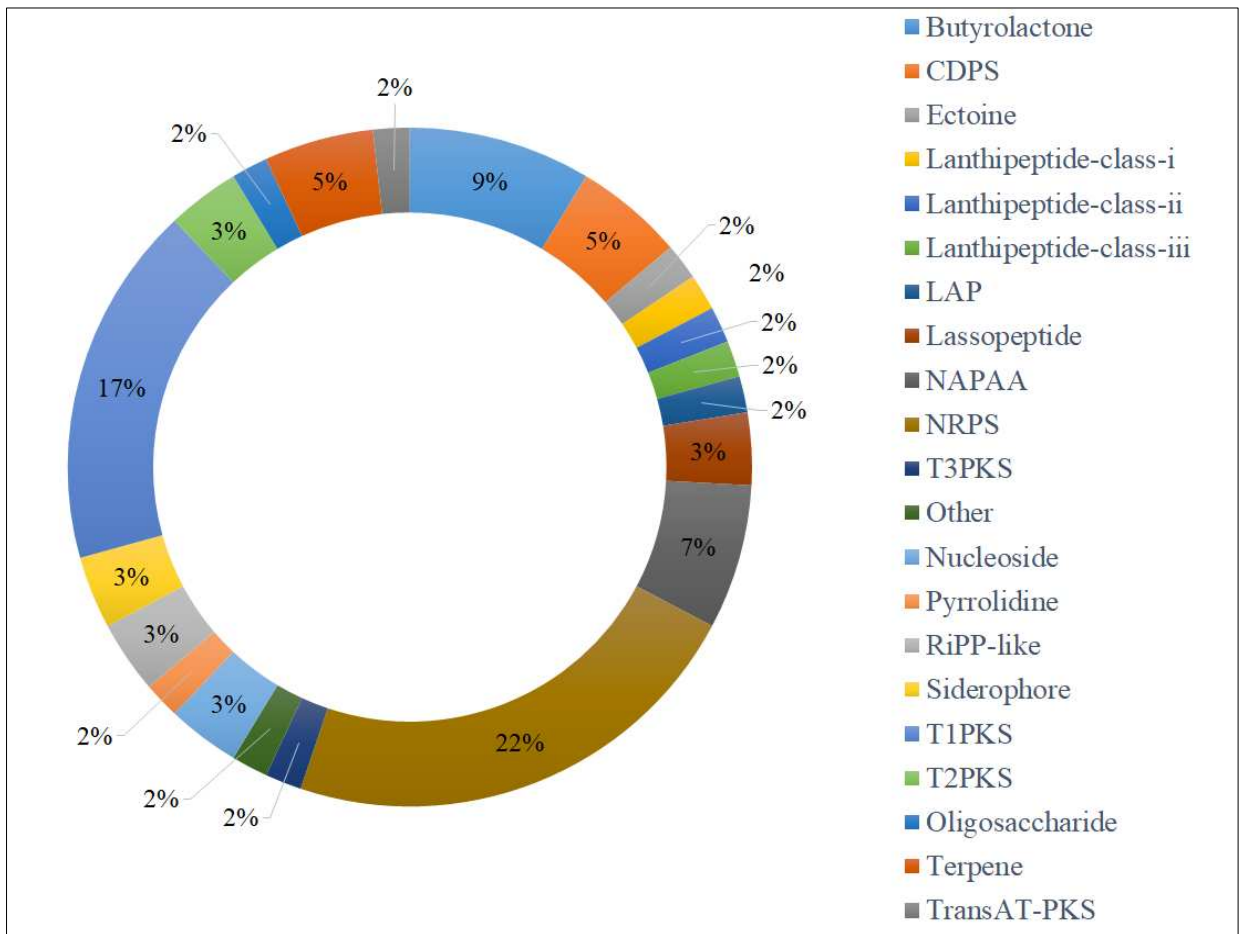
Estes dados reforçam o potencial da *S. noursei CAB-C 50* na produção de compostos de interesse biotecnológico, além de mostrar que *S. noursei* é capaz de produzir compostos importante mesmo em condições ótimas de crescimento e que os compostos identificados podem ser um dos responsáveis pela atividade antifúngica observada nos ensaios *in vitro* com o sobrenadante e o extrato.

4.8 Identificação do arsenal genético de *S. noursei CAB-C 50* para a produção de metabólitos secundários

4.8.1. Predição *in silico* de clusters de genes envolvidos com vias de produção de metabólitos secundários.

A predição *in silico* da sequência de *S. noursei CAB-C 50* usando o antiSMASH 4.0 revelou 47 agrupamentos de genes biossintéticos para produção de metabólitos secundários com uma ampla diversidade de classes de BGC (Figura 16). A classe predominante de BGCs encontrada para esta linhagem estão as sintetases de peptídeos não ribossomais (NRPS), que no geral apresentam uma baixa similaridade com os produtos naturais conhecidos (similaridade abaixo de 40 %), sugerindo que podem estar relacionadas a vias capazes de sintetizar novos produtos ou produtos sem BGCs caracterizados.

Figura 16 – Perfil de classes de BGCs encontrados em *Streptomyces noursei* CAB-C 50 obtidos a partir de predições *in silico* com auxílio do servidor antiSMASH.



Apesar disso, alguns BGCs relacionados a NRPS demonstram alto grau de similaridade (100 %) a produtos já conhecidos, como xenematide que é um peptídeo cíclico com atividade antimicrobiana. Esse composto é considerado como uma alternativa de controle da bactéria *Erwinia amylovora*, patógeno que causa a doença popularmente conhecida como fogo bacteriano que causa a morte de macieiras e pereiras (HUNG et al, 2011).

Entre outras classes de BGCs também previstas para *S. noursei* CAB-C 50 estão os terpenos, lantipeptídeos, sideróforos, sintase de policetídeo tipo 1 (T1PKS) entre outros. Vale ressaltar que nem todos os BGCs apresentam similaridade com uma molécula já previamente conhecida, o que pode significar que esse isolado possui potencial para produção de compostos bioativos ainda desconhecidos. No trabalho realizado por Lourenço (2021), *S. noursei* CAB-C 50 foi capaz de produzir sideróforos, corroborando os dados encontrados nas análises *in silico*. A produção

desses compostos é de grande interesse para a indústria agrícola por exemplo, onde os mesmos podem atuar na promoção do crescimento vegetal.

O composto anisomicina, identificado pelo UHPLC-HRMS apresentou uma similaridade de 100 % na predição feita pelo servidor antiSMASH. Foi possível observar que o BGC responsável pela produção desse composto está presente no genoma da *S. noursei CAB-C 50*.

O potencial de produção de bacteriocinas foi analisada exclusivamente pelo BAGEL 4.0, uma vez que muitas bacteriocinas são codificadas por pequenos genes que podem acabar sendo omitidos numa busca mais geral (VAN HEEL *et al*, 2013). As classes de bacteriocinas preditas são descritas na tabela 2.

Tabela 2 – Classe de bacteriocinas preditas pelo servidor BAGEL para a *S. noursei CAB-C 50*.

Isolado	Classe	Cluster
<i>S. noursei CAB-C 50</i>	Sap_B	1
	Zoocin_A	1
	Lanthipeptide_class_II	1
	LAPs	1
	Lasso peptide	2
	Sactipeptides	1

A Zoocin A é uma bacteriocina que tem a capacidade de interferir na homeostase da parede celular, uma vez que é considerada uma hidrolase bacteriolítica da parede celular, sendo capaz de clivar ligações peptídicas do peptidoglicano, estrutura responsável por conceder forma e rigidez a parede celular de bactérias (VACHHER *et al*, 2021; BEUKES *et al.*, 2000).

Estes dados ressaltam o grande potencial de produção de metabólitos secundários pela *S. noursei CAB-C 50*, sendo que grande parte desses compostos podem ser inéditos. Assim, estudos como este são necessários para tentar acessar esse arsenal ainda a ser descoberto.

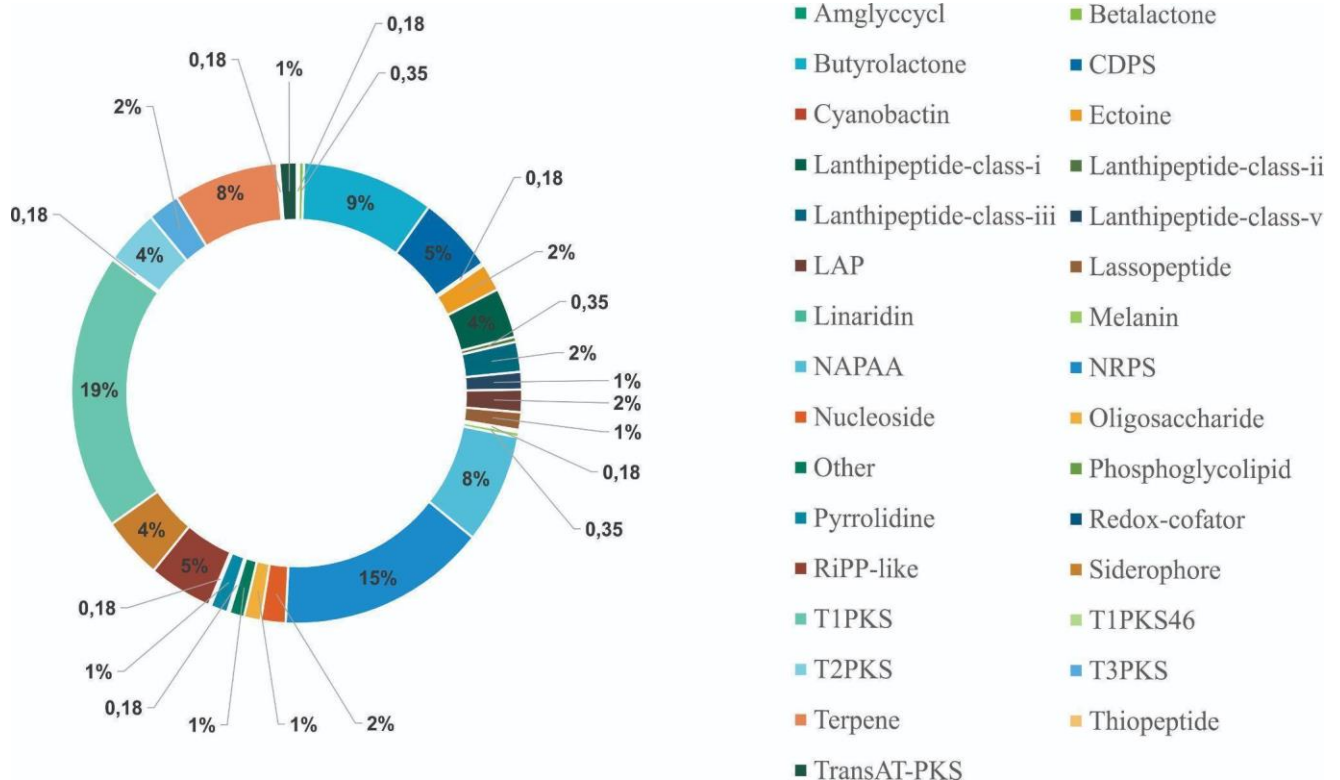
4.8.2. Análise de genômica comparativa entre os metabólitos secundários produzidos pela espécie *Streptomyces noursei*

O gênero *Streptomyces* é conhecido por possuir um cromossomo linear, diferentemente da maioria das demais bactérias. Além disso, possuem um alto conteúdo GC, chegando a cerca de 72 % e dos maiores genomas entre as bactérias (6-15 Mb), o que reflete diretamente no seu estilo de vida livre nos mais diversos

ambientes, na alta complexidade do seu ciclo de vida e na ampla diversidade de seus metabólitos secundários (CHEN et al.; 2002; LORENZI et al.; 2022).

Ao analisar os genomas das espécies *Streptomyces noursei* no servidor antiSMASH (Figura 17), foi verificado que o número de BGCs entre as linhagens da mesma espécie variou entre 33 a 44 e que o BGCs mais comum entre essa espécie são as sintases de policetídeos do tipo 1 (T1PKS) e sintases de peptídeo não ribossômico (NRPS), além disso, quanto maior o genoma, mais BGCs foram encontrados pelo servidor. Apesar das similaridades por serem genomas de linhagens da mesma espécie, algumas classes de BGCs que não foram identificadas em todos genomas analisados, como a classe a amglicil que possuiu uma similaridade de 55 % com o composto estreptomicina que foi o primeiro antibiótico dessa classe descoberta há mais de 60 anos atrás (OHNISHI et al., 2008).

Figura 18 – Classes de BGCs previstas pelo programa antiSMASH para a espécie *S. noursei*



Belknap e colaboradores (2020) averiguaram a diversidade de BGCs em 1.100 genomas de *Streptomyces* disponíveis e verificou que, entre os BGCs mais comuns, também estavam as T1PKS e as NRPS, e que mesmo entre a mesma espécie, a

diversidade de BGCs pode ser grande e que por isso o sequenciamento é interessante para verificar essa diversidade.

Ao verificar o perfil de bacteriocinas produzidas pela espécie, o servidor BAGEL identificou a presença de bacteriocinas apenas em 5 genomas dos 11 analisados. O antiSMASH, por sua vez, identificou a presença da bacteriocina Zoocin A em todos os 5 genomas que como já relatado acima está diretamente relacionada a quebra da homeostase da parede celular das bactérias levando a sua morte (VACHHER et al.; 2021; BEUKES *et al.*; 2000).

Apesar da espécie *Streptomyces albulus* ser popularmente descrita na literatura em janeiro de 2023 Butdee e colaboradores relataram que, com base nas características genéticas e fenotípicas, *S.albulus* e *S. noursei* pertencem à mesma espécie sugerindo que ocorra uma reclassificação das mesma. Tal alteração já foi adotada pelo banco de dados NCBI esse ano, porém como todas as análises já tinham sido feitas utilizando os genomas referentes somente a espécie *S.albulus* depositadas nos banco de dados, optamos por manter somente os genomas que estavam referentes a essa espécie deixando para que os demais dados genômicos relacionados a *S. noursei* seja utilizado em trabalhos futuros.

5. CONCLUSÃO

Foi verificado *S. noursei CAB-C 50* conseguiu se desenvolver em todos os meios testados e que a composição do meio de cultivo pode estar diretamente ligada à capacidade dessa bactéria de alterar o pH do meio e que, de acordo com as condições de cultivo, as mesmas podem apresentar macromorfologias distintas. Os sobrenadantes produzidos pela *S.noursei CAB-C 50* quando cultivadas em ISP-2 apresentou uma elevada taxa de inibição do *Foc*; no entanto, apenas o extrato obtido da *S.noursei CAB-C 50* em ISP-2 apresentou atividade contra o fungo. Duas moléculas de interesse biotecnológico importante produzidas pela *S.noursei CAB-C 50* foram identificadas por UHPLC-HRMS, sendo elas a anisomicina e um alcaloíde bisindólico A predição dos metabólitos secundários produzidos pela *S.noursei CAB-C 50* demonstrou que o genoma da mesma possui um grande arsenal para produção de compostos bioativos apresentando uma alta diversidade de BGCs e indicando que novos compostos bioativos podem estar presentes nesse genoma. O potencial genético de produção de metabólitos secundários da espécie possui em média 37 BGCs, sendo que as classes T1PKS e as NRPS foram as mais comuns. No entanto

o acesso a maioria dessas vias de produção de metabólitos são um grande gargalo para a busca de novas antimicrobianos, uma vez que a maioria delas não são expressas em condições laboratoriais padrões. A identificação futura dos compostos produzidos nas demais combinações de meios de cultivos utilizados nesse estudo podem auxiliar no entendimento da regulação dessas vias e proposição de novas estratégias de obtenção de compostos bioativos.

6. REFERÊNCIAS

- ABDELMOTELEB, Ali; GONZÁLEZ-MENDOZA, D. **A novel *Streptomyces* rhizobacteria from desert soil with diverse anti-fungal properties.** *Rhizosphere*, v. 16, p. 100243, 2020.
- ABREU, D.S.G. (2020). **Potencial enzimático e perfil de crescimento de isolados de *Streptomyces* spp.** Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola). Universidade Federal de Viçosa – Minas Gerais.
- ALVAREZ PUENTE, Reinaldo José et al. **Manejo do Bananal com ênfase na produção de mudas a partir do fracionamento do rizoma.** 2020
- ANANDAN, Ranjani; DHARUMADURAI, Dhanasekaran; MANOGARAN, Gopinath Ponnusamy. **An introduction to actinobacteria.** In: **Actinobacteria-Basics and Biotechnological Applications.** IntechOpen, 2016.
- AHMAD, Maged Sayed et al. **Anticancer activity of biostabilized selenium nanorods synthesized by *Streptomyces bikiniensis* strain Ess_amA-1.** *International journal of nanomedicine*, v. 10, p. 3389, 2015.
- AYED, Ameni *et al.* **Antifungal activity of volatile organic compounds from *Streptomyces* sp. strain S97 against *Botrytis cinerea*.** *Biocontrol Science and Technology*, v. 31, n. 12, p. 1330-1348, 2021.
- BANCROFT, J. **Report of the board appointed to enquire into the cause of disease affecting livestock and plants.** *Votes Proc*, v. 3, p. 1011-1038, 1876.
- BARRAT, B. P. I. *et al.* **The status of biological control and recommendations for improving uptake for the future.** *BioControl*, 2018.
- BELLÉ, Rafael; FONTANA, Daniele Cristina. **Patógenos de solo: principais doenças vasculares e radiculares e formas de controle.** *Enciclopédia biosfera*, v. 15, n. 28, 2018.
- BELKNAP, K. C. et al. **Genome mining of biosynthetic and chemotherapeutic gene clusters in *Streptomyces* bacteria.** *Sci Rep* 10 (1): 1–9. 2020.
- BEUKES, M. et al. **Purification and partial characterization of a murein hydrolase, millericin B, produced by *Streptococcus milleri* NMSCC 061.** *Applied and Environmental Microbiology*, v. 66, n. 1, p. 23-28, 2000.

BUTDEE, Waranya et al. ***Streptomyces rhizoryzae* sp. nov., isolated from paddy rhizosphere soil and formal proposal to reclassify *Streptomyces albulus* as a later heterotypic synonym of *Streptomyces noursei*.** International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, v. 73, n. 1, p. 005639, 2023.

BORGES, Ana Lúcia; DE MATOS, Aristoteles Pires. **Banana: instruções práticas de cultivo.** 2006.

CANNON, Stuart et al. **Multi-site fungicides suppress banana Panama disease, caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense Tropical Race 4.** PLoS Pathogens, v. 18, n. 10, p. e1010860, 2022.

CHEN, Carton W. et al. **Once the circle has been broken: dynamics and evolution of *Streptomyces* chromosomes.** TRENDS in Genetics, v. 18, n. 10, p. 522-529, 2002.

Croplife Brasil. 2022. **Produtos biológicos ganham mais espaço na agricultura de baixo carbono.** Disponível: <https://croplifebrasil.org/noticias/produtos-biologicos-e-agricultura-de-baixo-carbono/>. Acesso em 29 de dezembro de 2022.

CropLife. 2020. **Manejo integrado de pragas é parte essencial da agricultura moderna.** Disponível: <https://croplifebrasil.org/noticias/o-manejo-integrado-de-pragas-e-parte-essencial-da-agricultura-moderna/>. Acesso em: 09 de fevereiro de 2023

CropLife 2021. **Produção agrícola sustentável para enfrentar pragas e doenças nas lavouras.** Disponível: <https://croplifebrasil.org/noticias/producao-agricola-sustentavel-para-enfrentar-pragas-e-doencas-nas-lavouras/>. Acesso em: 09 de fevereiro de 2023

DANIAL, A. Mohd et al. **Efficacy of metabolites of a *Streptomyces* strain (AS1) to control growth and mycotoxin production by *Penicillium verrucosum*, *Fusarium verticillioides* and *Aspergillus fumigatus* in culture.** Mycotoxin research, v. 36, p. 225-234, 2020.

DA SILVA STACHIW, Rosani Teresinha. **Percepção de trabalhadores rurais quanto aos efeitos toxicológicos do uso e exposição a agrotóxicos.** Nature and Conservation, v. 12, n. 2, p. 11-18, 2019.

DEBNATH, Sanjit et al. **Genetic diversity in banana. In: Genetic Diversity in Horticultural Plants.** Springer, Cham, 2019. p. 217-241.

DE OLANDA SOUZA, Gabriel Henrique et al. **Agroclimatic zoning for bananas under climate change in Brazil. Journal of the Science of Food and Agriculture,** v. 102, n. 14, p. 6511-6529, 2022.

DE MAIO, A. M. D. et al. **Diálogos para prevenção da raça 4 tropical da Fusariose em bananeiras.** Embrapa Pecuária Sudeste-Livro técnico (INFOTECA-E), 2021.

DONATO, S. L. R. et al. **BANANA: do plantio á colheita.** Belo Horizonte: EPAMIG, 2021.

DOROGHAZI, James R.; METCALF, William W. **Comparative genomics of actinomycetes with a focus on natural product biosynthetic genes. BMC genomics,** v. 14, n. 1, p. 1-13, 2013.

DJEBBAH, Fatima Zohra et al. **Isolation and characterization of novel Streptomyces strain from Algeria and its in-vitro antimicrobial properties against microbial pathogens.** Journal of Infection and Public Health, v. 14, n. 11, p. 1671-1678, 2021.

EMBRAPA-<https://www.embrapa.br/en/busca-de-noticias/-/noticia/72678135/plantas-de-cobertura-sao-hospedeiras-do-fungo-causador-da-fusariose-da-bananeira>, acesso em:08/02/2023.

FAO. 2022. **Banana Market Review – Preliminary results 2022.** Rome, acesso em: <https://www.fao.org/3/cc3421en/cc3421en.pdf>

FLORENTINO, Juscelino Teixeira et al. **Pragas e doenças associadas à cultura da bananeira no estado da Paraíba.** 2020.

FRIENSEN, T.L. **Combating the Sigatoka Disease Complex on Banana.** PLoS Genetic, v. 12, 2016.

FORBES - <https://forbes.com.br/forbesagro/2023/01/o-mercado-de-bioinsumos-vai-para-onde-no-brasil/>, acesso em: 07 de fevereiro de 2023

GOSSE, Jessica Thandara et al. Whole genome sequencing and metabolomic study of cave *Streptomyces* isolates ICC1 and ICC4. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 1020, 2019.

GRASSO, L. L.; MARTINO, D. C.; ALDUINA, R. **Production of antibacterial compounds from Actinomycetes**. *Actinobacter Basics Biotechnol Applic* 11: 177–198. 2016.

HARRIS, P. **Monitoring and impact of weed biological control agents**. *In: Ecological Interactions and Biological Control*. CRC Press, Boca Raton, 2019.

HIGGINS, James Edgar. **The banana in Hawaii**. 1904.

HU, Chunhong et al. **Arms Race between the Host and Pathogen Associated with Fusarium Head Blight of Wheat**. *Cells*, v. 11, n. 15, p. 2275, 2022.

HUNG, Kuo-yuan, Paul WR Harris, Amanda M. Heapy, and Margaret A. Brimble. **"Synthesis and assignment of stereochemistry of the antibacterial cyclic peptide xenematide."** *Organic & Biomolecular Chemistry* 9, no. 1 (2011): 236-242.

IBGE - Instituto brasileiro de geografia e estatística. **Produção de banana**. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/explica/producaoagropecuaria/banana/br>. Acesso em: 09/02/2023.

IDORAN - **Agência de Defesa Sanitária Agrosilvopastoril do Estado de Rondônia**. Disponível em: <http://www.idaron.ro.gov.br/index.php/2022/11/30/em-parceria-com-o-mapa-e-embrapa-idaron-promove-capacitacao-tecnica-para-prevencao-da-raca-4-tropical-da-fusariose-em-bananeiras/>. Acesso em: 08/02/2023.

JANGIR, Pooja *et al.* **Secreted in xylem genes: Drivers of host adaptation in Fusarium oxysporum**. *Frontiers in plant science*, v. 12, p. 628611, 2021.

JING, T. et al. **Newly isolated *Streptomyces* sp. JBS5-6 as a Potential Biocontrol Agent to Control Banana Fusarium Wilt: Genome Sequencing and Secondary Metabolite Cluster Profiles**. *Front. Microbiol*, v. 11, p. 3036, 2020.

JOSHI, Renu. **A review of *Fusarium oxysporum* on its plant interaction and industrial use**. *J. Med. Plants Stud*, v. 6, n. 3, p. 112-115, 2018.

KAZI, Zareenkousar et al. **Production, Characterization, and Antimicrobial Activity of Pigment from *Streptomyces* Species**. *Journal of Nanomaterials*, v. 2022, 2022.

KEMA, Gert HJ et al. **Fusarium wilt of banana, a recurring threat to global banana production**. *Frontiers in Plant Science*, v. 11, p. 628888, 2021.

KONTRO, M.; LIGNELL, U.; HIRVONEN, M.-R.; NEVALAINEN, A. **PH effects on 10 *Streptomyces* spp. growth and sporulation depend on nutrients**. *Letters In Applied Microbiology*, [S.L.], v. 41, n. 1, p. 32-38, jul. 2005. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1472-765x.2005.01727.x>.

KRUSCHEWSKY, Lorena Santos et al. **Compatibilidade de *Trichoderma asperellum* com produtos agrícolas aplicados na cultura da bananeira**. 2019.

LI, Qinyuan et al. **Morphological identification of actinobacteria**. *Actinobacteria-basics and biotechnological applications*, p. 59-86, 2016.

LI, Xiaojuan et al. **Controle biológico da murcha da bananeira causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. Cubense usando *Streptomyces* sp. H4**. *Controle Biológico*, v. 155, p. 104524, 2021. See More

LIU, Yongjuan et al. **Improved Production of ϵ -Poly-L-Lysine in *Streptomyces albulus* Using Genome Shuffling and Its High-Yield Mechanism Analysis**. *Frontiers in Microbiology*, v. 13, 2022.

LOURENÇO, L.L (2021). **Identificação e caracterização de *Streptomyces* spp como produtoras de bioativos importantes para a promoção de crescimento vegetal**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.

LORENZI, Jean-Noël et al. **Ribosomal RNA operons define a central functional compartment in the *Streptomyces* chromosome**. *Nucleic Acids Research*, v. 50, n. 20, p. 11654-11669, 2022.

MACEDO-RAYGOZA, Gloria M. *et al.* ***Enterobacter cloacae*, an endophyte that establishes a nutrient-transfer symbiosis with banana plants and protects against the black Sigatoka pathogen**. *Frontiers in microbiology*, v. 10, p. 804, 2019.

MAYMON, Marcel et al. **The origin and current situation of *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense tropical race 4 in Israel and the Middle East**. *Scientific reports*, v. 10, n. 1, p. 1-11, 2020.

MAPA, 2022. **Brasil deve ser destaque mundial no uso de bioinsumos nos próximos anos.** Disponível:<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/noticias/com-expressiva-procura-do-publico-curso-de-producao-de-bioinsumos-tera-outras-turmas>. Acesso em 29 dezembro de 2022.

MAPA- 2020. **Programa Nacional de Bioinsumos é lançado e vai impulsionar uso de recursos biológicos na agropecuária.** Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/noticias/programa-nacional-de-bioinsumos-e-lancado-e-vai-impulsionar-uso-de-recursos-biologicos-na-agropecuaria-brasileira>. Acesso: 23/01/2023.

MAPA, 2020. **O Programa de bioinsumos.** Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inovacao/bioinsumos/o-programa/conceitos>. Acesso: 09 de fevereiro de 2023.

MAPA, 2022. **Mapa registra mais de 20 defensivos de controle biológico, incluindo produtos para uso na agricultura orgânica.** Disponível: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/noticias/mapa-registra-mais-20-defensivos-de-controle-biologico-incluindo-produtos-para-uso-na-agricultura-organica>. Acesso em: 09 de fevereiro de 2023.

MAWANG, Christina-Injan *et al.* **Actinobacteria: An eco-friendly and promising technology for the bioaugmentation of contaminants.** *Biotechnology Reports*, v. 32, p. e00679, 2021.

MANTECA FERNÁNDEZ, Ángel *et al.* ***Streptomyces* differentiation in liquid cultures as a trigger of secondary metabolism.** *Antibiotics*, 7, 2018.

MONTEIRO, Fernando P. *et al.* **Influence of plant extracts and essential oils against panama disease (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*) in banana seedlings.** *Journal of Agricultural Science*, v. 5, n. 4, p. 63, 2013.

MOREIRA, Marcos Antônio Barbosa; ZARBIN, Paulo Henrique Gorgatti; CORACINI, Miryan Denise Araújo. **Feromônios associados aos coleópteros-praga de produtos armazenados.** *Química nova*, v. 28, p. 472-477, 2005.

MOHITE, Bhavana V. *et al.* **New age agricultural bioinputs.** *Microbial Interventions in Agriculture and Environment: Volume 1: Research Trends, Priorities and Prospects*, p. 353-380, 2019.

MELO, R. C. C. (2019). **Microbiota do solo de bananeira comercial e do composto orgânico, isolamento de actinobactérias e avaliação do potencial biotecnológico**. Tese (Doutorado Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.

NOMURA, Edson Shigueaki et al. **Avaliação agrônômica de genótipos de bananeiras em condições subtropicais, Vale do Ribeira, São Paulo-Brasil. Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 35, p. 112-122, 2013.

OUBAHA, Brahim et al. **The potential of antagonistic moroccan *Streptomyces* isolates for the biological control of damping-off disease of pea (*Pisum sativum* L.) caused by *Aphanomyces euteiches***. Journal of Phytopathology, v. 167, n. 2, p. 82-90, 2019.

OHNISHI, Yasuo et al. **Genome sequence of the streptomycin-producing microorganism *Streptomyces griseus* IFO 13350**. Journal of bacteriology, v. 190, n. 11, p. 4050-4060, 2008.

PEREIRA, Beatriz Salustiano et al. **Brazilian banana, guava, and orange fruit and waste production as a potential biorefinery feedstock**. Journal of Material Cycles and Waste Management, p. 1-15, 2022.

PESSOTTI, Rita de Cassia et al. **Multiple lineages of *Streptomyces* produce antimicrobials within passalid beetle galleries across eastern North America**. *Elife*, v. 10, p. e65091, 2021.

PONTECORVO, Gr et al. **The genetics of *Aspergillus nidulans***. Advances in genetics, v. 5, p. 141-238, 1953.

PRAKASH, Divya; NAWANI, N. N. **A rapid and improved technique for scanning electron microscopy of actinomycetes**. Journal of microbiological methods, v. 99, p. 54-57, 2014.

QUINTANA, V.M.; SELISKO, B.; BRUNETTI, J.e.; EYDOUX, C.; GUILLEMOT, J.C.; CANARD, B.; DAMONTE, E.B.; JULANDER, J.G.; CASTILLA, V.. **Antiviral activity of the natural alkaloid anisomycin against dengue and Zika viruses**. *Antiviral Research*, v. 176, p. 104749, abr. 2020.

RAYMAEKERS, K. *et al.* **Screening for novel biocontrol agents applicable in plant disease management – A review.** *Biological Control*, 2020

ROMANO-ARMADA, Neli; YAÑEZ-YAZLLE, María Florencia; IRAZUSTA, Verónica P.; RAJAL, Verónica B.; MORAGA, Norma B.. **Potential of Bioremediation and PGP Traits in *Streptomyces* as Strategies for Bio-Reclamation of Salt-Affected Soils for Agriculture.** *Pathogens*, [S.L.], v. 9, n. 2, p. 117-147, 13 fev. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/pathogens9020117>.

SANTOS, Rodrigo Souza *et al.* **Pragas e doenças da terra indígena Kaxinawá de Nova Olinda e práticas agroecológicas de controle.** *Conservação e tecnologias para o desenvolvimento agrícola e florestal no Acre.* Rio Branco, AC: IFAC, p. 293-335, 2019.

SALATI, Paula. **De onde vem o que eu como? Brasil é o quarto maior produtor de banana e está atento à 'pandemia' no campo que afeta a cultura.** G1, 4 de maio. Disponível em: <https://g1.globo.com/economia/agronegocios/agro-a-industria-riqueza-do-brasil/noticia/2021/05/17/de-onde-vem-o-que-eu-como-brasil-e-o-4o-maior-produtor-de-banana-e-esta-atento-a-pandemia-que-afeta-cultura.ghtml>. Acesso em 13 de fev.2023

SARMIENTO-TOVAR, Aixa A. *et al.* ***Streptomyces*-Derived Bioactive Pigments: Ecofriendly Source of Bioactive Compounds.** *Coatings*, v. 12, n. 12, p. 1858, 2022.

SHIRLING, EB T. *et al.* **Methods for characterization of *Streptomyces* species.** *International journal of systematic bacteriology*, v. 16, n. 3, p. 313-340, 1966.

SHOLKAMY, Essam Nageh *et al.* **Antimicrobial and antinematocidal metabolites from *Streptomyces cuspodosporus* strain SA4 against selected pathogenic bacteria, fungi and nematode.** *Saudi Journal of Biological Sciences*, v. 27, n. 12, p. 3208-3220, 2020.

SHEN, Jufang *et al.* **A LuxR family transcriptional regulator AniF promotes the production of anisomycin and its derivatives in *Streptomyces hygrospinosus* var. *beijingensis*.** *Synthetic and Systems Biotechnology*, v. 4, n. 1, p. 40-48, 2019.

SINGH, Tanim Arpit et al. **Tapping into Actinobacterial genomes for natural product discovery**. *Frontiers in Microbiology*, v. 12, p. 655620, 2021.

STEPHAN, Georgie et al. **The Use of Next-Generation Sequencing to Study Banana Traits, Pests and Diseases in Tropical Agriculture**. In: *Next-Generation Sequencing and Agriculture*. GB: CABI, 2022. p. 1-23.

STOVER, Robert Harry et al. Fusarial wilt (Panama Disease) of bananas and other *Musa* species. **Fusarial wilt (Panama disease) of bananas and other *Musa* species.**, 1962.

SEGHEZZI, Nicolas *et al.* **The Generation of an artificial ATP deficit triggers antibiotic production in *Streptomyces lividans***. *Antibiotics*, v. 11, n. 9, p. 1157, 2022.

SELIM, Manal Selim Mohamed; ABDELHAMID, Sayeda Abdelrazek; MOHAMED, Sahar Saleh. **Secondary metabolites and biodiversity of actinomycetes**. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, v. 19, n. 1, p. 1-13, 2021.

SOUSA. Érica Braga De et al. **Caracterização físico-química da Banana Prata (*Musa sapientum*) comercializada em quatro cidades do Sertão da Paraíba, 7.**, 2012, Palmas. *Resumos*, 2012. p. 2.

SOBIN, Ben A.; TANNER JR, Fred W. **Anisomycin, 1 a new anti-protozoan antibiotic**. *Journal of the American Chemical Society*, v. 76, n. 15, p. 4053-4053, 1954.

SHANKAR, Uma; SINGH, AK; MONDAL, Amit. **Manejo integrado de pragas em bananeira**. *Manejo Integrado de Pragas nos Trópicos*. New Delhi: New India Publishing Agency , p. 329-349, 2016.

TANG, Zhengle; XING, Feiyue; CHEN, Di; YU, Yu; YU, Chunyan; DI, Jingfang; LIU, Jing. **In vivo toxicological evaluation of Anisomycin**. *Toxicology Letters*, v. 208, n. 1, p. 1-11, jan. 2012.

.

TORRES-RODRIGUEZ, Juan A. et al. **Actinomycete Potential as Biocontrol Agent of Phytopathogenic Fungi: Mechanisms, Source, and Applications.** *Plants*, v. 11, n. 23, p. 3201, 2022.

VACHHER, Meenakshi *et al.* **Microbial therapeutic enzymes: A promising area of biopharmaceuticals.** *Current Research in Biotechnology*, v. 3, p. 195-208, 2021.

VAN HEEL, Auke J. et al. **BAGEL3: automated identification of genes encoding bacteriocins and (non-) bactericidal posttranslationally modified peptides.** *Nucleic acids research*, v. 41, n. W1, p. W448-W453, 2013.

VIDAL, Mariane C.; SALDANHA, Rodolfo; VERISSIMO, Mario Alvaro Aloisio. **Bioinsumos: o programa nacional e a sua relação com a produção sustentável. Sanidade vegetal: uma estratégia global para eliminar a fome, reduzir a pobreza, proteger o meio ambiente e estimular o desenvolvimento econômico sustentável.**/Organizadores Diego Medeiros Gindri, Patrícia Almeida Barroso Moreira, Mario Alvaro Aloisio Veriso.–1. ed. Florianópolis: CIDASC, p. 382-409, 2020.

WARMAN, Noeleen M.; AITKEN, Elizabeth AB. **The movement of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* (sub-tropical race 4) in susceptible cultivars of banana.** *Frontiers in Plant Science*, v. 9, p. 1748, 2018.

YAGÜE, Paula et al. **New Strategies to Activate Secondary Metabolism** in. In: *Natural Products from Actinomycetes*. Springer, Singapore, 2022. p. 185-198.

YANG, Mingguan e cols. **Atividade de biocontrole de compostos orgânicos voláteis de *Streptomyces alboflavus* TD-1 contra o crescimento de *Aspergillus flavus* e produção de aflatoxinas.** *Journal of Microbiology* , v. 57, p. 396-404, 2019.

ZHONGMING, Zhu et al. *On the hunt for wild bananas in Papua New Guinea.* 2020.

ZHU, Zhiyan; TIAN, Zhihong; LI, Jianxiong. **A *Streptomyces morookaensis* strain promotes plant growth and suppresses *Fusarium* wilt of banana.** *Tropical Plant Pathology*, v. 46, n. 2, p. 175-185, 2021