



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

PAULA DE FRANÇA

DO GENOMA AOS PRODUTOS NATURAIS: UM ESTUDO DO
POTENCIAL BIOSINTÉTICO E METABÓLICO DE BACTÉRIAS
DA ANTÁRTICA

FROM GENOME TO NATURAL PRODUCTS: A STUDY ABOUT
A BIOSYNTHETIC AND METABOLIC POTENTIAL OF
BACTERIA FROM ANTARCTICA

CAMPINAS

2020

PAULA DE FRANÇA

**DO GENOMA AOS PRODUTOS NATURAIS: UM ESTUDO DO
POTENCIAL BIOSSINTÉTICO E METABÓLICO DE BACTÉRIAS DA
ANTÁRTICA**

**FROM GENOME TO NATURAL PRODUCTS: A STUDY ABOUT A
BIOSYNTHETIC POTENTIAL AND METABOLITES OF BACTERIA
FROM ANTARCTICA**

*Tese apresentada ao Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de Campinas como parte dos
requisitos exigidos para obtenção do título de Doutora
em Genética e Biologia Molecular, na área de
Genética de Micro-organismos.*

*Thesis presented to the Biology Institute of the
University of Campinas in partial fulfillment of the
requirements for the degree of Doctor in Genetics and
Molecular Biology, in the area of Genetics of
Microorganisms.*

Orientadora: PROF^a. DR^a. FABIANA FANTINATTI GARBOGGINI

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA PAULA DE
FRANÇA E ORIENTADA PELA PROF^a. DR^a. FABIANA
FANTINATTI GARBOGGINI

CAMPINAS

2020

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

F884d França, Paula de, 1987-
Do genoma aos produtos naturais : um estudo do potencial biossintético e metabólico de bactérias da Antártica / Paula de França. – Campinas, SP : [s.n.], 2020.

Orientador: Fabiana Fantinatti Garboggini.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Metabólitos. 2. *Streptomyces*. 3. *Marinobacter*. 4. Mineração do genoma. 5. Expressão heteróloga. I. Fantinatti-Garboggini, Fabiana, 1965-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: From genome to natural products : a study about a biosynthetic and metabolic potential of bacteria from Antarctica

Palavras-chave em inglês:

Metabolites

Streptomyces

Marinobacter

Genome mining

Heterologous expression

Área de concentração: Genética de Microorganismos

Titulação: Doutora em Genética e Biologia Molecular

Banca examinadora:

Fabiana Fantinatti Garboggini [Orientador]

Valeria Maia Merzel

Andrea Balan Fernandes

Alysson Wagner Fernandes Duarte

Suzan Pantaroto de Vasconcellos

Data de defesa: 06-11-2020

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-4416-0845>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/99444487520007791>

Campinas, 06 de novembro de 2020.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Fabiana Fantinatti Garboggini (Orientadora)

Prof^a. Dr^a. Valeria Maia Merzel

Prof^a. Dr^a. Andrea Balan Fernandes

Prof^a. Dr^a. Suzan Pantaroto de Vasconcellos

Prof. Dr. Alysson Wagner Fernandes Duarte

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa de Genética e Biologia Molecular do Instituto de Biologia.

Dedico à Deus e à minha família

AGRADECIMENTOS

À Dr^a. Fabiana Fantinatti Garboggini pela orientação e por propor novos desafios à minha carreira. Pela paciência, amizade e ensinamentos.

À Prof^a. Dr^a. Taicia Pacheco Fill do Instituto de Química da UNICAMP pela colaboração nos experimentos químicos, por toda a paciência e por ceder espaço do seu laboratório e o tempo da sua equipe, em especial ao Jonas.

À Profa. Dr^a. Alessandra Eustáquio da University of Illinois at Chicago por me orientar no meu estágio no exterior, pela equipe, em especial à Sylvia Kunakon.

À Prof^a. Dr^a. Ana Tasca Gois Ruiz e sua equipe pela realização do experimento de atividade antiproliferativa que enriqueceram esse trabalho.

Ao Prof. Dr. Marcos José Salvador do Instituto de Biologia pela colaboração, e por toda sua equipe, em especial ao Álvaro.

Aos colegas e amigos da Divisão de Recursos Microbianos, por dividir essa experiência e pela ajuda nos experimentos.

Ao grupo de pesquisa da Dr^a. Fabiana, em especial a Nataly, René, Gabriel, Marcela pela colaboração e amizade. E as amigas Milene e Milena pela amizade e momentos de descontração.

À querida amiga Rayza, que estará sempre no meu coração. Obrigada pela sua amizade, seu carinho e sua complexidade.

Ao CPQBA por ceder espaço e material para os meus experimentos.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de doutorado, Processo 17057612017-5.

À UNICAMP, em especial ao Instituto de Biologia, e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, pela estrutura cedida, recursos, eficiência e pelo aprendizado.

À minha família, meus pais Silvia e Jorge, meus irmãos Bruna e Felipe, e ao meu namorado Raoni, e sua amorosa família, que com paciência me auxiliaram carinhosamente nesse percurso, e me trouxeram confiança.

Às minhas amigas, Ângela, Bianca, Mariela, que mesmo longe estavam presentes de alguma forma me acompanhando e dando força.

À Deus, minha fortaleza.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para o desenvolvimento dessa tese e estiveram me apoiando nesse momento da minha vida.

RESUMO

A pandemia da COVID-19 mostrou a vulnerabilidade da sociedade humana frente às doenças infecciosas. Produtos naturais representam a principal fonte de agentes terapêuticos usados como antivirais, anticâncer e antibióticos. Nesse contexto, o objetivo desse trabalho foi avaliar o potencial biossintético e metabólico de produtos naturais de duas bactérias isoladas da Antártica. Foram sequenciados o genoma completo de duas bactérias, permitindo a análise filogenética das mesmas, concluindo-se que estas são relacionadas à *Streptomyces albidoflavus* e *Marinobacter* sp.. A análise de *Genome mining* identificou 24 clusters gênicos biossintéticos (BGCs) para *S. albidoflavus* ANT_B131 das classes ectoína, peptídeos não-ribossomais (NRP), policetídeos (PK), peptídeos sintetizados via ribossomos e modificados pós-tradução (RiPPs), sideróforos, entre outros, dos quais 50 % apresentavam baixa (<20%) ou nenhuma similaridade com as sequências de BGCs conhecidos. Para *Marinobacter* sp. ANT_B65 foi possível identificar três BGCs relacionados às classes ectoína e betalactona, cuja última classe não apresentou similaridade com os BGCs descritos até o momento. Tais resultados revelaram um potencial ainda não explorado e desconhecido do potencial biossintético dos clusters gênicos “órfãos”. Frente ao potencial genético revelado, experimentos de atividade antiproliferativa foram realizadas, no qual o extrato bruto da bactéria *S. albidoflavus* ANT_131 mostrou atividade citotóxica frente à cinco linhagens de células humanas tumorais. Para expressar o potencial genético observado no *Genome mining*, foi realizado um experimento de produção de metabólitos secundários e analisados através do *Molecular Networking*. Compostos codificados pelo mesmo BGC, como desferrioxamina E e B, com atividade anticâncer e antibiótica, e surugamida A e D, com atividade antifúngica e antibiótica, foram expressos em diferentes condições de cultivo e de extração, indicando que diferentes produtos naturais podem ser obtidos do mesmo BGC a partir de diferentes condições à qual a *Streptomyces albidoflavus* ANT_131 foi submetida. Por fim, foi realizada a expressão heteróloga de um lasso peptídeo, de massa 1889 Da, usando uma *Burkholderia* como hospedeira de expressão a fim de se obter um novo produto natural, entretanto, são necessários experimentos adicionais para caracterização da molécula. Esse estudo evidencia o potencial das duas bactérias da Antártica e do uso de estratégias ômicas para promover a descoberta de produtos naturais.

Palavras-chave: Metabólitos Secundários; *Streptomyces*; *Marinobacter*; *Genome mining*; Expressão Heteróloga.

ABSTRACT

The COVID-19 pandemic showed the society vulnerability against the infectious diseases. Natural products represent the main source of therapeutic agents used as antiviral, anticancer and antibiotics. In this context, the aim of this study was to evaluate the biosynthetic and metabolic potential of natural products associated to two bacteria isolated from Antarctica. The bacterial whole genomes were sequenced, and the phylogenetic analysis revealed that they are related to *Streptomyces albidoflavus* and *Marinobacter* sp.. The *Genome mining* analysis identified 24 biosynthetic gene clusters (BGCs) to *S. albidoflavus* ANT_B131 associated to ectoin, non-ribosomal peptide (NRP), polyketides (PK), ribosomally synthesized and post-translationally modified peptides (RiPPs), siderophores, etc., and 50% showed low (<20%) or none similarity between known BGCs. It was possible to identify three BGCs, for *Marinobacter* sp. ANT_B65, related to ectoin and betalactone, this last one did not show similarity with the BGCs described so far. These results reveal the unexplored and unknown biosynthetic potential of orphan genetic clusters. Faced with the revealed genetic potential, antiproliferative assays were performed, and the crude extract of *S. albidoflavus* ANT_131 showed cytotoxic activity against five human tumoral cell lines. In order to express the genetic potential found in the *Genome mining*, an experiment of secondary metabolites production was performed and analyzed by Molecular Networking. Compounds encoded by the same BGC, such as desferrioxamine E and B, with antibiotic and anticancer activity, and surugamide A and D, with antifungal and antibiotic activity, were expressed in different cultivation conditions and extraction methods. These results indicated that different natural products could be expressed from a unique BGC using different conditions of growth for *Streptomyces albidoflavus* ANT_131. At least, this study shows a heterologous expression of a lasso peptide, mass 1889 Da, using a *Burkholderia* as expression host with the aim to get a new natural product, however, additional molecular characterization tests are necessary. This study highlights the potential of two bacteria from Antarctica and the use of omics strategies to increase the natural products discovery.

Keywords: Secondary Metabolites; *Streptomyces*; *Marinobacter*; *Genome mining*; Heterologous Expression.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Sublasses de policetídeos: policetídeos aromáticos, macrolactonas, policetídeo contendo decalina, polienos e poliéters (Walsh e Tang, 2017).....	23
Figura 2. Subclasses de PKS de acordo com a estrutura e função. (A) PKS tipo I; (B) PKS tipo II; (C) PKS tipo III. Domínios cetoacil sintase (KS), acil transferase (AT), desidratase (DH) e ceto-redutase (KR), proteína carreadora de acil (ACP) e domínio terminal (TD) (Wang <i>et al.</i> , 2020 - modificado). 24	24
Figura 3. Organização modular do BGC da actinomicina. (A) BGC formado por quatro genes <i>acmD</i> , <i>acmA</i> , <i>acmB</i> e <i>acmC</i> ; (B) Organização dos seis módulos (1-6) que catalisa a formação da 4_MHA pentapeptídeo lactona, com a representação de cada domínio; (C) Indicação de cada módulo 1-6 responsável por uma unidade da molécula; (D) Molécula de 4_MHA pentapeptídeo lactona que corresponde a metade da molécula de actinomicina. A, C e T são domínios de adenilação, condensação e thiolização, E – epimerase, MT – metiltransferase e TE – tioesterase (Singh, Chaudhary e Sareen, 2017).	26
Figura 4. Via biossintética geral para RiPPs (traduzido e modificado de Arnison <i>et al.</i> , 2013).	27
Figura 5. Esquema do processo de descoberta de novos produtos naturais envolvendo a identificação de BGCs pelo <i>Genome mining</i> , busca de novas moléculas pela metabolômica, engenharia genética de BGCs e uso de ferramentas de transcriptômica e proteômica (Ziemert, Weber e Medema, 2020 - traduzido e modificado).	30
Figura 6. Ciclo de vida da <i>Streptomyces coelicolor</i> (Angert, 2005).	35
Figura 7. Árvore filogenética baseada na análise da sequência do gene RNA ribossomal 16S da bactéria ANTB_65 isolada da Antártica e micro-organismos relacionados. Valores de <i>bootstrap</i> (1000 repetições, mostradas em %) estão listadas. A barra de escala representa 2 substituições de nucleotídeos por posição em 100 nucleotídeos. <i>Pseudoalteromonas arabiensis</i> JCM17292 foi usado como outgroup.	45
Figura 8. Árvore filogenética baseada na análise da sequência do gene RNA ribossomal 16S da bactéria ANTB_131 isolada da Antártica e micro-organismos relacionados. Valores de <i>bootstrap</i> (1000 repetições, mostradas em %) estão listadas. A barra de escala representa 1 substituição de nucleotídeo por posição em 100 nucleotídeos. <i>Saccharopolyspora gregorii</i> NCIB 12823 foi usado como outgroup.	46
Figura 9. Distribuição das categorias de subsistemas pelo servidor PATRIC 3.6.7 de <i>Marinobacter</i> sp. ANTB_65, incluindo o total de 272 subsistemas e 1750 CDSs. Entre parênteses subsistemas em verde e genes em amarelo.	48
Figura 10. Distribuição das categorias de subsistemas pelo servidor PATRIC 3.6.7 de <i>Streptomyces</i> sp. ANT_B131, incluindo o total de 250 subsistemas e 1281 CDSs. Entre parênteses subsistemas em verde e genes em amarelo.	48
Figura 11. <i>Multilocus Sequence Analysis</i> (MLSA) da sequência dos genes <i>atpD</i> (ATP synthase, F1, subunidade beta), <i>gyrB</i> (DNA gyrase B subunidade), <i>rpoB</i> (RNA polymerase, subunidade beta), <i>recA</i> (recombinase A), e <i>trpB</i> (tryptophan synthetase, beta subunidade A) da bactéria ANTB_131 isolada da Antártica e micro-organismos correlacionados. Valores de Bootstrap (1000 repetições, mostrados em %) estão listadas. Barra de escala representa 1 substituição de nucleotídeo por posições de 100 nucleotídeos.....	50

Figura 12. Genes relacionados aos metabólitos secundários preditos no genoma da <i>Streptomyces albidoflavus</i> ANT_B131. De fora para dentro: fitas de DNA <i>reverse</i> e <i>forward</i> ; <i>contigs</i> ; BGCs; Conteúdo de G+C. Tipos de BGCs são mostrados com diferentes cores de acordo com a legenda.	54
Figura 13. BGCs identificados nos genomas das linhagens de <i>Streptomyces albidoflavus</i> utilizando antiSMASH. Tipos de BGC identificado por diferentes cores.	56
Figura 14. Clusters biossintéticos identificados no genoma da bactéria <i>Marinobacter</i> sp. ANT_B65. (A) Cluster 1 identificado como ectoína; (B) Cluster identificado na <i>M. antarcticus</i> CGMCC 1.10835 similar ao cluster 1 (C) Cluster 2 identificado como betalactona da ANT_B65 (D) Cluster 3 identificado como betalactona da ANT_B65.	59
Figura 15. BGCs identificados nos genomas das linhagens do gênero <i>Marinobacter</i> utilizando antiSMASH. Tipos de BGC identificado por diferentes cores.	59
Figura 16. Atividade antiproliferativa em linhagens de células humanas tumorais. (A) Extrato bruto de <i>Streptomyces albidoflavus</i> . ANT_B131 (B) Extrato bruto de <i>Marinobacter</i> sp. ANT_B65 (C) Controle positivo doxorrubicina.	69
Figura 17. Molecular Networking realizado no servidor GNPS com dados de espectro de massas de LC-ESI-MS/MS do extrato bruto da <i>Marinobacter</i> sp. ANT_B65. (A) Nó do composto 1 identificado pelo GNPS; (B) Fórmula estrutural do composto 1.	71
Figura 18. Desreplicação e Molecular Networking realizado no servidor GNPS com dados de espectro de massas de LC-ESI-MS/MS do extrato bruto da <i>Streptomyces albidoflavus</i> ANT_B131: (A) Fórmula estrutural do composto 1, (B) composto 2, e (C) composto 3 identificados pelo GNPS; (D) Espectro MS/MS mostrando a massa molecular 934,6146 <i>m/z</i> associada a surugamida A.	72
Figura 19. MS/MS mirror match da surugamida A entre a base de dados do GNPS (verde) e extrato bruto da <i>S. albidoflavus</i> ANT_B131 (preto).	72
Figura 20. Estruturas de metabólitos secundários detectados durante o fracionamento do extrato bruto da <i>Streptomyces albidoflavus</i> ANT_B131. (1) enniantin B1; (2) surugamida A; (3) surugamida D; (4) enniantin B.	75
Figura 21. Esquema representativo de métodos de obtenção de extratos brutos a partir de dois crescimentos bacterianos para <i>Streptomyces albidoflavus</i> ANT_B131 e <i>Marinobacter</i> sp. ANT_B65.	80
Figura 22. Cromatograma de íons totais de 912,62 <i>m/z</i> para (A) meio de cultura (controle) e (B) <i>S. albidoflavus</i> ANT_B131. (C) Espectro de massa obtido da surugamida A. (D) Espectro MS/MS do íon [M+H] ⁺ de 912,6295 <i>m/z</i> . (E) Típica massa de fragmentos da surugamida A.	83
Figura 23. Cromatograma de íons totais de 898,61 <i>m/z</i> para (A) meio de cultura (controle) e (B) <i>S. albidoflavus</i> ANT_B131. (C) Espectro de massa obtido da surugamida D. (D) Espectro MS/MS do íon [M+H] ⁺ de 898,6117 <i>m/z</i> . (E) Típica massa de fragmentos da surugamida D.	84
Figura 24. Cromatograma de íons totais de 585,32 <i>m/z</i> para (A) meio de cultura (controle) e (B) <i>S. albidoflavus</i> ANT_B131. (C) Espectro de massa obtido da desferrioxamina B (D) Espectro MS/MS do íon [M+H] ⁺ de 585,3204 <i>m/z</i> . (E) Típica massa de fragmentos da desferrioxamina B.	85
Figura 25. Cromatograma de íons totais de 623,34 <i>m/z</i> para (A) meio de cultura (controle) e (B) <i>S. albidoflavus</i> ANT_B131. (C) Espectro de massa obtido da desferrioxamina B (D) Espectro MS/MS do íon [M+Na] ⁺ de 623,3403 <i>m/z</i>	86

Figura 26. Cromatogramas de íons totais de 143,08 <i>m/z</i> para (A) meio de cultura (controle) e (B) <i>S. albidoflavus</i> ANT_B131. (C) Espectro de massa obtido da ectoína (D) Espectro MS/MS do íon $[M+H]^+$ de 143,0816 <i>m/z</i> . E) Espectro MS/MS da ectoína no Mass Bank of North America database (adaptado de https://mona.fiehnlab.ucdavis.edu/spectra/display/CCMSLIB00005435933 – acesso em 10 de setembro de 2020).	87
Figura 27. Rede molecular (<i>Molecular Networking</i>). de <i>S. albidoflavus</i> ANT_B131 Composto 1 (surugamida A), 2 (surugamida D), 3 (desferrioxamina B + Al), 4 (desferrioxamina E), 5 (ectoína) foram identificadas em três diferentes meios de cultivo. (A) e três diferentes métodos de extração (B). E1; extração líquido-líquido com acetato de etila; E2; extração no meio de cultura usando metanol; E3; extração intracelular usando metanol. Massa precursora é mostrada acima dos nós.	89
Figura 28. Fórmula estrutural de (A) composto 1 anotado pelo Dereplicator e (B) euryjanicin B.	91
Figura 29. Fórmula estrutural do (A) composto 2 anotado pelo Dereplicator e (B) wainunamide.	92
Figura 30. Fórmula estrutural de (A) composto 3 anotado pelo Dereplicator e (B) hymenamide D.	93
Figura 31. Abordagem de <i>genome mining</i> dos lasso peptídeos (Cheung-Lee e Link, 2019).	98
Figura 32. BGC de lasso peptídeo, Cluster 24, identificado pelo antiSMASH e PRISM, oriundo de <i>Streptomyces albidoflavus</i> ANT_B131.	102
Figura 33. Modelos de estrutura molecular preditas pelo RiPPMiner.	104
Figura 34. Amplificação por PCR do BGC do lasso peptídeo, analisado em gel de agarose a 1% em tampão TAE, 110 V, 400 A, por 60 min. (L) 1kb ladder; (1) Temperatura de anelamento de 72 °C (2) Temperatura de anelamento de 71,2 °C; (3) Temperatura de anelamento de 70,4 °C; (4) Temperatura de anelamento de 68 °C. Tamanho do produto amplificado de 4783 pb.	105
Figura 35. Vetor pSK019 e sítios para as enzimas de restrição EcoRI e SacI.	106
Figura 36. Plasmídeo pPF002: vetor pSK019 ligado ao cluster do lasso peptídeo.	106
Figura 37. DNA e DNA digerido analisado em gel de agarose 1% em tampão TAE, 110 V, 400 A, 60 min; L- DNA ladder 1 kb; 1, 2, 3, 4, 5 – clones de <i>E. coli</i> (tamanho esperado 12 kb); A- plasmídeo digerido com enzima AatII; B-plasmídeo digerido com enzima NcoI.	107
Figura 38. Produtos amplificados do BGC do lasso peptídeo da <i>Burkholderia</i> sp. FERM BP-3421 transformada, analisada por gel de agarose 1% em tampão TAE, 110 V, 400 A por 60 min, L- DNA ladder de 10 kb	108
Figura 39. Análise de MALDI-TOF MS dos extratos obtidos de (A) células de ANT_B131, (B) sobrenadante do ANT_B131, (C) clone 4 da FERM BP-3421, (D) clone 5 da FERM BP-3421, e (E) WT da FERM BP-3421.	111
Figura 40. Análise de MALDI-TOF MS dos extratos obtidos de (A) clone 10 da FERM BP-3421, (B) clone 10 da FERM BP-3421 (C) células de ANT_B131, (D) sobrenadante do ANT_B131 e (E) WT da FERM BP-3421.	112
Figura 41 UHPLC-MS/MS do extrato obtido do clone 10 da FERM-BP-3421; Íon selecionado (SIM) de 1888,59 <i>m/z</i>	113

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Avaliação da atividade antimicrobiana, pelo Método de Micro-diluição, de extratos brutos obtidos por bactérias isoladas de ambientes extremos contra micro-organismos indicadores.	39
Tabela 2. Origem e local do isolamento de bactérias, presença de genes de potencial farmacológico e identificação em nível de gênero dos isolados.	39
Tabela 3. Número de acesso das sequências dos genes usados no <i>Multilocus Sequence Analysis</i>	43
Tabela 4. Informações dos genomas de <i>Marinobacter</i> sp. ANT_B65 e <i>Streptomyces</i> sp. ANT_B131.	47
Tabela 5. Correlação de pares entre genomas completos de <i>S. albidoflavus</i> ANT_B131 e linhagens correlacionadas e <i>Marinobacter</i> sp. ANT_B65 e linhagens correlacionadas.	52
Tabela 6. BGCs identificados no genoma da <i>Streptomyces albidoflavus</i> ANT_B131.	55
Tabela 7. BGCs identificados no genoma da <i>Marinobacter</i> sp. ANT_B65.	58
Tabela 8. Atividade antiproliferativa dos extratos brutos de <i>S. albidoflavus</i> ANT_B131, <i>Marinobacter</i> sp ANT_B65 e do controle positivo doxorrubicina. Valores referentes a concentração efetiva (GI ₅₀).	70
Tabela 9. Avaliação da atividade antimicrobiana, pelo Método de Micro-diluição, de extratos brutos e frações obtidos da bactéria <i>Streptomyces albidoflavus</i> ANT_B131 contra micro-organismos indicadores.	74
Tabela 10. Características dos compostos identificados nos extratos brutos da bactéria <i>Streptomyces albidoflavus</i> ANT_B131.	88
Tabela 11. Picos anotados pelo Dereplicator para o composto 1.	92
Tabela 12. Picos anotados pelo Dereplicator para o composto 2.	93
Tabela 13. Picos anotados pelo Dereplicator para o composto 3.	94
Tabela 14. Condições de PCR para amplificação do BGC do lasso peptídico da <i>S. albidoflavus</i> ANT_B131.	99

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

° C	Graus Celsius
µL	Microlitros
16S rRNA	RNA ribossomal 16S
AcOEt	Acetato de etila
AcOH	Ácido acético
ASW	<i>Artificial Sea Water</i> (Água do mar artificial)
ATCC	<i>Amercian Type Culture Collection</i>
BGC	<i>Biosynthetic Gene Cluster</i> (Cluster Gênico Biossintético)
CAPES	Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CBMAI	Coleção Brasileira de Micro-organismos de Ambiente e Indústria
CDS	<i>Coding sequences</i>
cm	Centímetros
CPQBA	Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas Biológicas e Agrícolas
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo trifosfato
DRM	Divisão de Recursos Microbianos
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético
EIC	<i>Extract ion chromatogram</i>
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
h	Hora
IO/USP	Instituto Oceanográfico / Universidade de São Paulo
kDa	Quilodalton
KS	Cetosintase
LC	<i>Liquid chromatography</i> / Cromatografia líquida
M	Molar
MALDI	<i>Matrix-assisted laser desorption/ionization</i>
MEGA	<i>Molecular Evolutionary Genetics Analysis</i>
MeOH	Metanol
mg	Miligrama
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
MS/MS	Espectrometria de massa em tandem
NA	<i>Nutrient Agar</i>
ng	nanogramas
NRPS	<i>Non Ribosomal Peptide Synthetases</i> (Peptídeo Sintases Não Ribossomal)
ORF	<i>Open Reading frames</i>

pb	Pares de bases
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação de polimerase em cadeia)
pH	Potencial hidrogeniônico
PKS	<i>Polyketide Synthases</i> (Policetídeos Sintases)
RDP	<i>Ribosomal Database Project</i>
RiPP	<i>Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptides/</i> Peptídeos sintetizados via ribossomos e modificados pós-traducionais
RNA	Ácido ribonucleico
rRNA	Ácido ribonucleico ribossomal
RNase	Ribonuclease
rpm	Rotações por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SET	Tris-Salt-EDTA
T	Linhagem tipo
TIC	<i>Total Ion Chromatogram</i>
TOF	<i>Time-of-flight</i>
TSA	Tryptone Soya Agar
UIC	University of Illinois at Chicago
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
V	Volts

SUMÁRIO

1. APRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA DA TESE.....	19
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
2.1. Antártica como fonte de produtos naturais.....	20
2.2. Descoberta de produtos naturais.....	21
2.3. Classes de produtos naturais e biossíntese	22
2.3.1. Policetídeos	22
2.3.2 Peptídeos	25
2.4. <i>Genome mining</i>	27
2.5. Combinação de abordagens ômicas para descoberta de produtos naturais	29
2.6. A busca por novos produtos naturais.....	30
3. OBJETIVOS	33
3.1. Objetivos específicos.....	33
Capítulo 1. Sequenciamento e análise dos genomas das bactérias antárticas <i>Streptomyces albidoflavus</i> ANT_B131 e <i>Marinobacter</i> sp. ANT_B65.....	34
1. INTRODUÇÃO	35
2. MATERIAL E MÉTODOS	37
2.1. Reativação e manutenção das bactérias.....	37
2.2. Caracterização das espécies de bactérias.....	37
2.2.1. Identificação dos isolados por amplificação e sequenciamento do gene RNA ribossomal 16S ..	38
2.3. Análises dos genomas bacterianos	41
2.3.1. Sequenciamento, montagem e anotação dos genomas.....	41
2.3.2. <i>Multi-Locus Sequence Analysis</i> (MLSA) para <i>Streptomyces</i> sp.	41
2.3.3. Hibridização DNA–DNA <i>in silico</i>	42
2.3.4. <i>Genome mining</i>	44
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
3.1. Identificação dos isolados por amplificação e sequenciamento do gene RNA ribossomal 16S	44
3.2. Sequenciamento, montagem e anotação dos genomas.....	46
3.3. <i>Multilocus Sequence Analysis</i> (MLSA).....	49
3.4. Hibridização DNA-DNA.....	50
3.5. <i>Genome mining</i>	52
3.5.1. <i>Streptomyces albidoflavus</i> ANT_B131.....	53

3.5.2. <i>Marinobacter</i> sp. ANT_B65	57
4. CONCLUSÕES	60
Capítulo 2. Atividade antimicrobiana e antiproliferativa dos extratos brutos e frações de <i>Streptomyces albidoflavus</i> ANT_B131 e <i>Marinobacter</i> sp. ANT_B65.....	61
1. INTRODUÇÃO	62
2. MATERIAL E MÉTODOS	63
2.1. Produção de extratos brutos	63
2.2. Avaliação da atividade antiproliferativa dos extratos brutos	64
2.3. Avaliação da atividade antimicrobiana	64
2.4. Fracionamento de extratos brutos.....	65
2.5. Análise de Espectrometria de Massa e <i>Molecular Networking</i>	66
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	67
3.1. Atividade antiproliferativa.....	67
3.2. Identificação de compostos químicos nos extratos brutos e frações	70
3.2.1. Extratos brutos	70
3.2.2. Frações do extrato bruto de <i>Streptomyces albidoflavus</i> ANT_B131	73
4. CONCLUSÕES	76
Capítulo 3. Análise dos metabólitos secundários produzidos pelas bactérias <i>Streptomyces albidoflavus</i> ANT_B131 e <i>Marinobacter</i> sp. ANT_B65.....	77
1. INTRODUÇÃO	78
2. MATERIAL E MÉTODOS	79
2.1. Cultivo bacteriano utilizando diferentes meios de cultura	79
2.2. Obtenção de metabólitos utilizando diferentes métodos de extração.....	79
2.3. Análise de espectrometria de massas e <i>Molecular Networking</i>	81
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	82
3.1. Expressão de BGCs por <i>Streptomyces albidoflavus</i> ANT_B131.....	82
3.2. <i>Marinobacter</i> sp. ANT_B65 produz possíveis análogos de peptídeos detectados em esponjas	90
4. CONCLUSÃO	94
Capítulo 4. Expressão heteróloga do cluster gênico biossintético do lasso peptídeo identificado no genoma da bactéria <i>Streptomyces albidoflavus</i> ANT_B131 em <i>Burkholderia</i> sp. FERM BP-3421	96
1. INTRODUÇÃO	97
2. MATERIAL E MÉTODOS	98
2.1. Procedimentos Gerais.....	98

2.2. Amplificação do BGC	98
2.3. Construção do plasmídeo	99
2.4. Eletroporação do plasmídeo na <i>Burkholderia</i> sp. FERM BR-3421	100
2.5. Cultivo da FERM BP-3421 para produção do lasso peptídeo.....	100
2.6. Extração do lasso peptídeo	101
2.7. Análise de MALDI-TOF MS	101
2.8. Análise de UHPLC-MS	101
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	101
3.1. Predição do lasso peptídeo no RiPPMiner	101
3.2. Amplificação do BGC	103
3.3. Construção do plasmídeo e obtenção de clones de <i>E. coli</i>	105
3.4. Transformação da FERM BP-3421 e expressão do lasso peptídeo.....	107
3.5. Análise dos extratos brutos por MALDI-TOF MS e UHPLC MS/MS	109
4. CONCLUSÃO	110
DISCUSSÃO FINAL.....	114
CONCLUSÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	117
REFERÊNCIAS	118
ANEXOS.....	130

1. APRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA DA TESE

A presente tese foi dividida em quatro capítulos:

No **Capítulo 1** são apresentados e discutidos os resultados do sequenciamento dos genomas e as análises filogenéticas de duas bactérias isoladas de uma esponja e uma salpa da Antártica, relacionando-as com *Streptomyces albidoflavus* e *Marinobacter* sp.. Em seguida são apresentados os resultados relacionados ao *Genome mining* (mineração dos genomas – identificação de genes envolvidos na produção de metabólitos secundários a partir do sequenciamento do genoma) indicando 24 clusters gênicos biossintéticos (BGCs) para *S. albidoflavus* e três para *Marinobacter* sp.. Além disso, a comparação com genomas de bactérias da mesma espécie indicou a presença de BGCs únicos para ambas as espécies, revelando um potencial biossintético ainda inexplorado.

O **Capítulo 2** apresenta e discute os resultados de atividade antiproliferativa e antimicrobiana dos extratos brutos e frações obtidas a partir do crescimento das bactérias *Streptomyces albidoflavus* e *Marinobacter* sp.. O extrato bruto da bactéria *S. albidoflavus* mostrou atividade citotóxica frente à cinco linhagens de células humanas tumorais.

No **Capítulo 3** são apresentados e discute os resultados de produção de metabólitos secundários das bactérias *S. albidoflavus* e *Marinobacter* sp. frente à três meios de cultivo e três métodos distintos de extração e analisados através da abordagem do *Molecular Networking*. Compostos como sideróforos, peptídeos não-ribossômicos e ectoínas foram identificados através dessa análise.

O **Capítulo 4** se refere ao estudo específico da bactéria *S. albidoflavus* para realizar a expressão heteróloga de um lasso peptídeo, cujo BGC é exclusivo para essa bactéria. Como resultado obtivemos compostos com massas moleculares candidatas, porém estudos posteriores de ressonância magnética nuclear (RMN) serão necessários para caracterizar a molécula.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Antártica como fonte de produtos naturais

O continente antártico contém alguns dos mais fortes gradientes ambientais no planeta. Os ambientes terrestres e aquáticos não marinhos incluem o continente Antártico e a Península (Convey et al., 2014). Os ecossistemas antárticos variam quanto a complexidade dos habitats de altamente diversificada a habitats muito simples. No continente antártico as condições ambientais que variam entre os desertos polares, incluindo o gelo do continente e água doce, a lagos hipersalinos e sua capa de gelo, até as pastagens e lagos. Os ecossistemas marinhos variam de regiões costeiras rasas às profundezas abissais do oceano aberto, incluindo áreas livres de gelo até áreas cobertas de gelo permanente, (Thomas et al., 2008).

Nos anos recentes, o estudo dos ecossistemas da Antártica, e dos seus micro-organismos, tem recebido mais atenção por que os micro-organismos psicrófilos tem assumido considerável importância para aplicações biotecnológicas (Lamilla et al., 2017). A busca por novos produtos naturais tem se estendido por biofilmes, solos, oceanos, recifes de corais e sedimentos costais rasos, porém, a biosfera marinha profunda subsuperficial pode ser uma fonte inexplorada de repositório de descoberta de novos antimicrobianos. Um exemplo disso é que os sedimentos da subsuperfície pode gerar novos genes antimicrobianos, enquanto ao mesmo tempo essa informação é capaz de responder questões ecológicas importantes sobre a comunidade microbiana (Mullis et al., 2019).

Bactérias antárticas do filo Actinobactéria tem mostrado importância na produção de compostos bioativos. Actinobactérias pertencentes aos gêneros *Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Curtobacterium*, *Janibacter*, *Knoellia*, *Rhodococcus*, *Streptomyces* e *Thermoleophilum*. isoladas da South Shetland Islands, Antártica, produziram enzimas extracelulares com potencial biotecnológico, como gelatinase, protease e celulase (Lamilla et al., 2017).

Uma nova dicetopiperazina foi obtida da bactéria *Microbispora aerata*, isolada de excrementos de pinguins na Antártica. Essa molécula possui baixa atividade antiproliferativa e citotóxica frente a células de fibroblasto de rato L-929, célula de leucemia humana K-562 e célula de carcinoma de cérvix HeLa (Ivanova et al., 2013).

A *Streptomyces fildesensis* So13.3 isolada da Península Fildes, na Ilha do Rei George mostrou importante atividade antibiótica frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (MIC= 15.6 µg.mL⁻¹) e o sequenciamento do genoma indicou 56 clusters gênicos putativos associados a produtos naturais, o que representa 22% do genoma bacteriano (Núñez-Montero et al., 2019). Já a psicrotrofica *Streptomyces* sp. INACH3013 foi capaz de inibir o crescimento

de bactérias patogênicas de origem alimentar, sendo sete Gram-positivas e oito Gram-negativas (Lavin *et al.*, 2016).

O potencial biotecnológico não está restrito as actinobactérias, outros grupos também demonstraram potencial de produção de produtos naturais bioativos. O isolado de *Pseudomonas* sp. 99 demonstrou potencial antimicrobiano frente a um amplo espectro de micro-organismos, além de atividade antiproliferativa e antiparasitária (Silva *et al.*, 2018). Antimicrobianos de baixo peso molecular (<6000 Da) foram produzidos por três cepas de *Halomonas titanicae* e apresentaram atividade frente a bactérias de origem alimentar e fitopatogênicas, exibindo um amplo espectro de atividade (Danilovich *et al.*, 2018).

A Antártica está enfrentando uma mudança ambiental complexa. Sua biota única está enfrentando mudanças ambientais devido a impactos diretos da atividade humana. Estudos voltados a região antártica são necessários para indicar a importância desse continente e medidas de conservação e tratados ambientais devem ser impostose respeitados para reduzir os impactos ambientais (Convey e Peck, 2019).

2.2. Descoberta de produtos naturais

Todas as formas de vida possuem a capacidade de produzir moléculas específicas. Esses metabólitos especializados, conhecidos como produtos naturais, permitem que os organismos se diferenciem uns dos outros, aumentam a chance de sobrevivência e possibilitam que o ser vivo enfrente os desafios no ambiente em que vive (Hooft *et al.*, 2020). As bactérias, principalmente os actinomicetos, continuam sendo as maiores produtoras de produtos naturais oriundos do metabolismo secundário (Genilloud, 2017).

O metabolismo primário inclui as moléculas que estão associadas as vias essenciais à vida, que podem gerar e estocar energia. Alguns exemplos são os ácidos nucléicos, proteínas, polissacarídeos e lipídeos essenciais. O metabolismo secundário pode estar presente em vias que ocorrem apenas em algumas células e alguns organismos. O metabolismo secundário facilita a interação e adaptação do micro-organismo com o ambiente (Seyedsayamdost, 2019).

Desde a descoberta da penicilina por Alexander Fleming em 1928 até os dias de hoje, muitas novas tecnologias distintas proporcionaram a descoberta de antibióticos e produtos naturais. Desde de 1950 a 2005 foram identificados cerca de dez mil produtos naturais derivados de origem microbiana (Berdi, 2005; Zhang e Straight, 2019). Durante os anos de 1940 a 1950 foram descobertos novos compostos antimicrobianos através do isolamento de micro-organismos do solo, esse período ficou conhecido como a “Era de Ouro” da descoberta de antibióticos (Lewis, 2013). Entre os anos de 1970 a 1990 apesar do aumento da descoberta

de novos produtos naturais, estes eram em sua maioria análogos de compostos conhecidos, e, além disso os compostos já identificados continuaram sendo isolados. Após 1990 houve um aumento na descoberta de metabólitos, sem atividade antibiótica. Isso foi ocasionado devido a necessidades de tratamento de vírus como HIV, cepas multirresistentes e novas necessidades na agricultura (Berdi, 2005).

O uso dos produtos naturais não se restringe apenas a área farmacêutica, apesar da necessidade de novos fármacos para doenças infecciosas, câncer e doenças negligenciadas, muitas moléculas são utilizadas na agricultura, indústria alimentícia, em cosméticos e diferentes tipos de produtos e processos industriais. Recentemente, uma nova área de interesse surgiu, os metabólitos especializados como um mediador de interações de microbiomas e sua função como uma linguagem química (Soldatou *et al.*, 2019; Hooft *et al.*, 2020).

Tradicionalmente, a descoberta de produtos naturais foi dirigida por ensaios guiados pela atividade biológica (*bioactivity-guided*), buscando o fracionamento de extratos de micro-organismos e plantas. Essa abordagem possibilitou a descoberta de milhares de novas moléculas, proporcionando o conhecimento para a descoberta de produtos naturais que existe atualmente. Porém muitas das moléculas conhecidas foram re-identificadas, tornando essa abordagem menos eficaz. Com o avanço de técnicas de sequenciamento de DNA, é possível identificar através da análise de genomas quais micro-organismos possuem os clusters gênicos biossintéticos (*Biosynthetic Gene Clusters* - BGCs) para a produção de metabólitos secundários. Em bactérias e fungos a maioria das vias biossintéticas são codificadas em BGCs. Além dos genomas, o avanço nas metodologias de metabolômica e análise de dados por espectrometria de massas em tandem (MS/MS) tem possibilitado a identificação e análise de produtos naturais em extratos complexos (Palazzotto e Weber, 2018; Soldatou *et al.*, 2019; Hooft *et al.*, 2020; Ziemert, Weber e Medema, 2020).

2.3. Classes de produtos naturais e biossíntese

As maiores classes de produtos naturais incluem os policetídeos (PK), peptídeos, flavonoides, terpenos e sacarídeos (Hooft *et al.*, 2020).

2.3.1. Policetídeos

Os produtos de policetídeos naturais são uma classe notável de compostos. Além de exibir uma gama surpreendente de diversidade estrutural e funcional, eles possuem uma riqueza de atividades medicinalmente importantes, incluindo antibióticos, anticancerígenos, antifúngicos,

antiparasitários e propriedades imunossupressoras (Staunton e Weissman, 2001). Uma vez que a biossíntese de muitos antibióticos é catalisada por PKS, a quantificação dos tipos de genes PKS, tipo I e II, pode ser utilizada para avaliar a probabilidade de produção de antibiótico natural a partir de amostras ambientais (Le *et al.*, 2014).

Os policetídeos apresentam cinco subclasses distintas: os policetídeos aromáticos, macrolactonas, policetídeos contendo decalina, polienos e poliéteres. A oxitetraciclina, xantona e urdamicina são representantes dos policetídeos aromáticos, eles são compostos por anéis aromáticos policíclicos. A eritromicina e a ivermectina são macrolactonas, que apresentam o anel macrolactâmico. A lovastatina é um exemplo de um policetídeo contendo decalina. A nistatina é um exemplo de polieno e a lasalocida é um exemplo de poliéter (Figura 1) (Walsh e Tang, 2017).

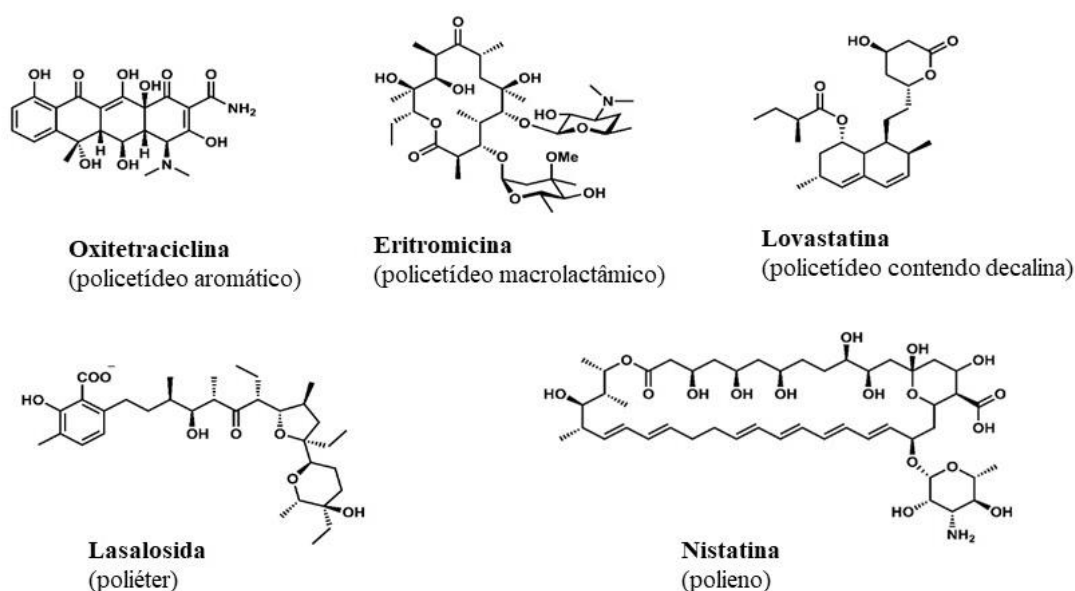


Figura 1. Sublasses de policetídeos: policetídeos aromáticos, macrolactonas, policetídeo contendo decalina, polienos e poliéteres (Walsh e Tang, 2017).

Os produtos dessas vias são muito diferentes quanto a estrutura e função, e apresentam semelhança colinear para permitir variabilidade de atividade enzimática, que ocorrem de uma maneira ordenada sobre proteínas multifuncionais. Estas enzimas estão organizadas de forma modular, e usam domínios específicos para sequencialmente catalisar a condensação de ácidos carboxílicos simples. Cada módulo em um *cluster* é responsável pela extensão da cadeia através do reconhecimento, ativação e incorporação de substratos específicos. A diversidade estrutural é introduzida através da variação das combinações e permutações de ambos os domínios (Salomon, Magarvey e Sherman, 2004).

Os PKs são sintetizados pelas enzimas policetídeos sintases (PKSs). Existem três tipos de PKSs conhecidos até o presente, os tipos I, II e III. A PKS tipo I corresponde a enzimas multifuncionais organizadas em módulos, onde cada um atua individualmente catalisando um ciclo de elongação da molécula. Esse tipo é mais encontrado nos fungos (Figura 2 A). O PKS tipo II são multienzimas complexas que carregam um único conjunto de atividades. Eles são encontrados predominantemente em bactérias e produzem policetídeos aromáticos (Figura 2 B). O PKS tipo III são enzimas homodiméricas que atuam como enzimas de condensação em ação conjunta e podem ter a ação de PKs intermediárias que atuam para cada tipo de molécula que será codificada, como flavonoides por exemplo (Figura 2 C). São principalmente encontrados em plantas. As PKS são formados pelos domínios cetoacil sintase (KS), acil transferase (AT), desidratase (DH) e ceto-redutase (KR), proteína carreadora de acil (ACP) e domínio terminal (TD) (Shen, 2003; Wang *et al.*, 2020).

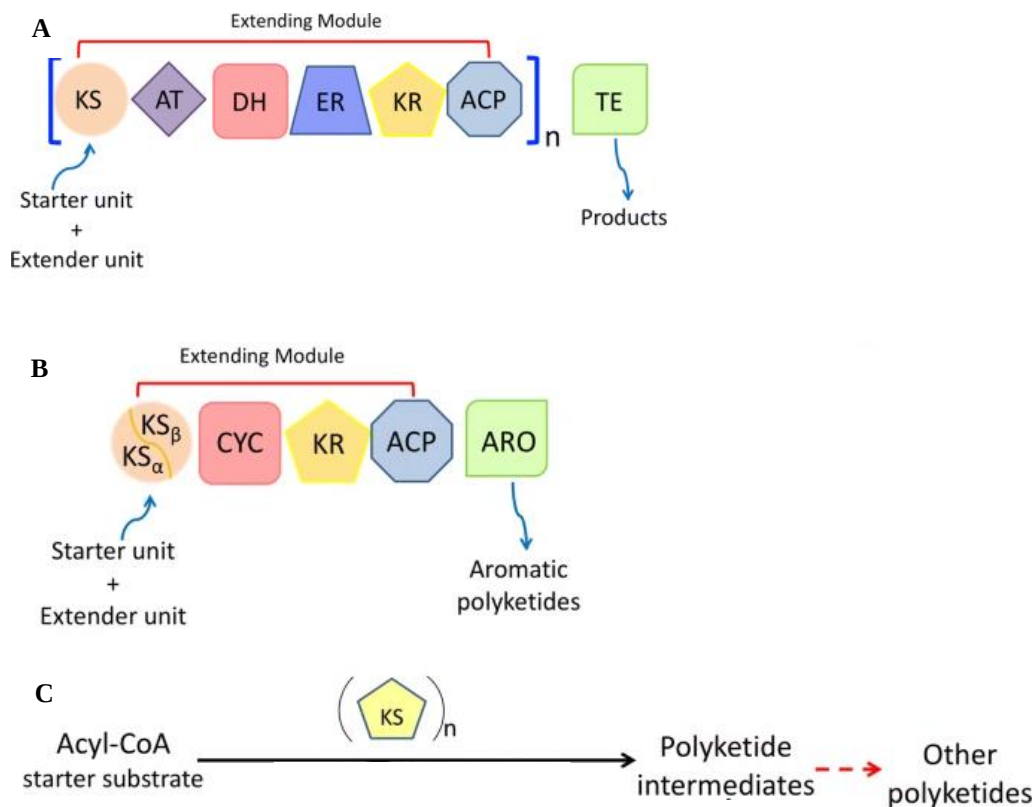


Figura 2. Subclasses de PKS de acordo com a estrutura e função. (A) PKS tipo I; (B) PKS tipo II; (C) PKS tipo III. Domínios cetoacil sintase (KS), acil transferase (AT), desidratase (DH) e ceto-redutase (KR), proteína carreadora de acil (ACP) e domínio terminal (TD) (Wang *et al.*, 2020 - modificado).

2.3.2 Peptídeos

Sobre os produtos naturais peptídicos podemos incluir dois tipos: os sintetizados via ribossomo, da classe dos peptídeos sintetizados via ribossomo e modificados pós-tradução (RiPPs) e os não sintetizados via ribossomo, a classe dos peptídeos não ribossomais (NRPs). Assim como os policetídeos, eles podem apresentar uma grande diversidade de atividades, incluindo antibiótica, antifúngica, anticâncer, entre outras (Singh, Chaudhary e Sareen, 2017; Walsh e Tang, 2017; Russell e Truman, 2020).

Os ribossomos são incríveis maquinarias de RNA que polimerizam monômeros de aminoácidos em taxas de 10 a 30 peptídeos por segundo. Para realizar essa ação, o RNAm é utilizado como molde. Os aminoácidos são selecionados pela enzima aminoacil RNAt sintetase e ativados pelas aminoacil-AMPs. As metades ativadas do aminoacil são transferidas ao RNAt em um sítio ativo de aminoacil-RNAt sintetase. Os aminoacil-RNAt carregados são estáveis o suficiente para serem carregados ao ribossomo para formar a elongação das pontes peptídicas em centros de peptidil transferase da subunidade 50S do ribossomo. Em contraste, a linha de produção da enzima peptídeo não-ribossomal sintetase é independente do molde do RNAm ou de qualquer RNA. A especificidade dos domínios de adenilação em cada módulo de NRPS indica qual aminoácido será selecionado e ativado (Walsh e Tang, 2017).

Assim como as PKSs, as NRPSs apresentam múltiplos módulos na sua maquinaria biossintética. Um módulo mínimo deve conter os domínios de adenilação (A) e tiolação (T), que ativa e contribui para a formação de um produto final. O domínio A é responsável pela seleção e ativação de substrato, que é então transferida para o domínio de tiolação. O domínio T contém um braço de fosfopanteteína que oscila entre a adenilação e domínio de condensação (C) e atua como um portador de o aminoacil / aril tio éster. O módulo de carregamento onde se inicia a montagem da molécula, não possui o domínio C. O processo de ativação e a condensação é repetida até o último módulo, que contém um domínio de tioesterase (TE) adicional no terminal C, para liberar a cadeia por hidrólise ou ciclização. A actinomicina, produzida pela *Streptomyces chrysomallus*, é formada por um BGC constituído por quatro genes NRPS acmA a acmD. São seis módulos na linha de montagem que catalisam uma lactona pentapeptídica 4-MHA, metade da molécula de actinomicina (Figura 3) (Singh, Chaudhary e Sareen, 2017).

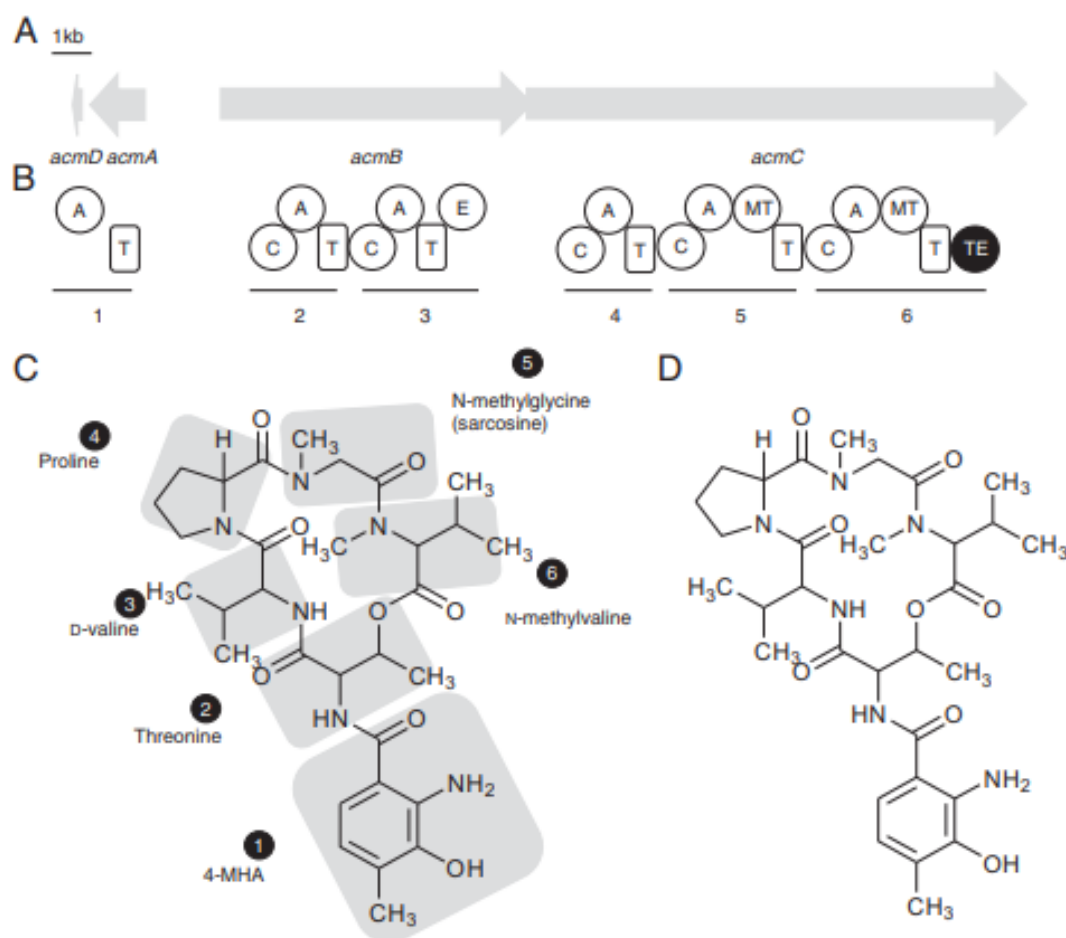


Figura 3. Organização modular do BGC da actinomicina. (A) BGC formado por quatro genes *acmD*, *acmA*, *acmB* e *acmC*; (B) Organização dos seis módulos (1-6) que catalisa a formação da 4-MHA pentapeptídeo lactona, com a representação de cada domínio; (C) Indicação de cada módulo 1-6 responsável por uma unidade da molécula; (D) Molécula de 4-MHA pentapeptídeo lactona que corresponde a metade da molécula de actinomicina. A, C e T são domínios de adenilação, condensação e thiolação, E – epimerase, MT – metiltransferase e TE – thioesterase (Singh, Chaudhary e Sareen, 2017).

Historicamente, os peptídeos sintetizados via ribossomos e modificados pós-tradução têm sido subdividido com base nos organismos produtores, como as microcinas produzidas por Gram-negativos, e a atividade biológica, como bacteriocinas. O termo RiPP foi apenas formalmente cunhado em 2013, mas a caracterização de membros desta classe de produtos naturais data de 1928, com a descoberta do lanthipeptídeo nisina, que é utilizado como conservante alimentar (Arnison *et al.*, 2013).

As subclasses de RiPPs incluem peptídeos contendo azolina linear, bottromicinas, tiopeptídeos, moléculas semelhantes à viridamida, lanthipeptídeos, cianobactinas, lasso peptídeos, sactipeptídeos (peptídeos com ligações cruzadas de enxofre para carbono) e

linaridinas. Estas moléculas exibem diversas bioatividades como o thiopeptídeo thiostreptona, derivado de *Streptomyces*, que possui atividade antibiótica e anticâncer (Russell e Truman, 2020).

A via biossintética geral para RiPPs inclui um peptídeo precursor que contém uma região central que é transformado no produto maduro. Muitas das modificações pós-tradução são guiadas pelo peptídeo líder e as sequências de reconhecimento, exclusiva para cada subclasse de RiPPs. Na maioria das subclasses de RiPPs, o peptídeo precursor. O peptídeo precursor modificado antes da remoção proteolítica do peptídeo líder pode ser abreviado como mXxxA (Figura 4) (Arnison *et al.*, 2013).

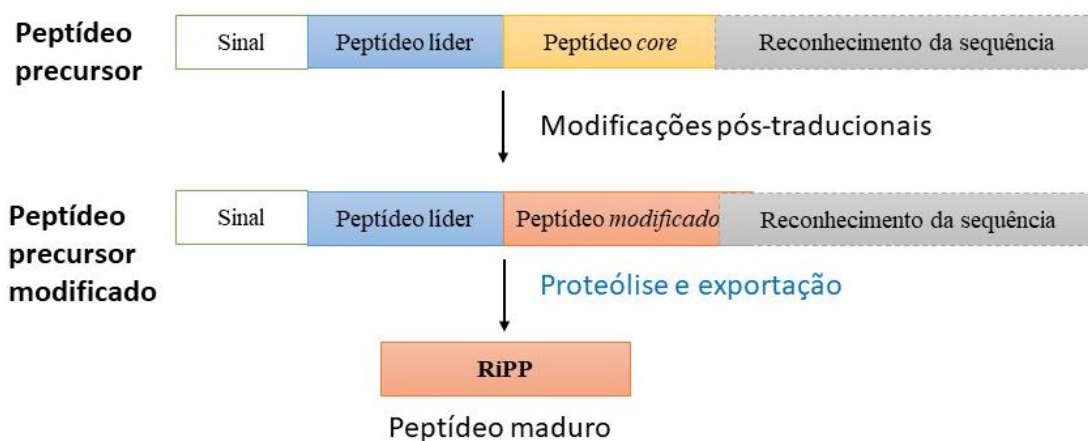


Figura 4. Via biossintética geral para RiPPs (traduzido e modificado de Arnison *et al.*, 2013).

2.4. Genome mining

Os produtos naturais apresentam uma enorme variedade estrutural, porém as enzimas associadas a biossíntese dos compostos são altamente conservadas. Antes da disponibilidade de baixo custo no sequenciamento dos genomas, era possível desenhar *primers* degenerados que se ligavam as regiões altamente conservadas. Com o avanço das técnicas de sequenciamento de genoma completo, é possível usar as características de conservação das enzimas biossintéticas para realizar a mineração do genoma (*Genome mining*), ou seja, a busca de BGCs através de sequências de genomas, especificamente, utilizando a mineração de sequências de regiões de enzimas biossintéticas conservadas para caracterizá-las quanto a classe de produto natural, e ao composto associado ao BGC (Palazzotto e Weber, 2018; Soldatou *et al.*, 2019).

As técnicas de sequenciamento de genoma completo mais utilizadas são as plataformas Illumina, PacBio e Oxford Nanopore MiniON. A plataforma Illumina entrega um alto número de sequências (*reads*) de pequenos tamanhos, de 75 a 300 pb, enquanto o PacBio e Nanopore obtém um menor número de sequências de tamanho maior, acima de 15.000 pb para o PacBio e 700 pb para Nanopore. Para o *genome mining*, cada plataforma apresenta suas limitações e vantagens. As vantagens de utilizar o Illumina consiste na alta precisão no sequenciamento dos *reads* e alto número de *reads*, além do custo ser menor. As desvantagens incluem uma montagem com grandes quantidades de *contigs*, principalmente para genomas mais complexos como de bactérias como *Streptomyces*. Neste último, a montagem de BGCs relacionados aos PKS e NRPS podem ficar fragmentadas em diferentes *contigs*, ou serem mal montados devido as sequências repetitivas. O PacBio tem como vantagem os *reads* longos obtidos no sequenciamento, porém a precisão do sequenciamento é baixa. O Nanopore também tem como vantagem os *reads* longos, porém muitas predições de BGCs apresentam baixa acurácia quando usado esse método de sequenciamento. Para corrigir os erros dos *reads* longos e obter menor quantidade de *contigs*, uma estratégia comum é associar tecnologias que obtém *reads* curtos (Illumina) com *reads* longos (Pacbio ou Nanopore) (Albarano *et al.*, 2020; Ziemert, Weber e Medema, 2020).

O *genome mining* é completamente dependente de tecnologias computacionais e da bioinformática, além de utilizar dados de sequências de DNA de bancos públicos. Uma vez que os genes presentes no genoma são identificados, eles podem ser comparados com genes dos bancos de dados. Muitas das sequências de proteínas, que codificam enzimas envolvidas na biossíntese de produtos naturais são depositados nesses bancos de dados, que pode permitir a identificação de genes homólogos e potenciais vias biossintéticas do genoma que está sendo analisado. Apesar de muitas enzimas serem similares quanto a sequência, é importante ressaltar que os processos químicos relacionados a elas podem ser diferentes, levando a uma nova via biossintética e um produto final distinto (Albarano *et al.*, 2020).

As maiores plataformas que realizam a análise de *genome mining* são antiSMASH (*antibiotics & Secondary Metabolite Analysis Shell*) e PRISM (*PRediction Informatics for Secondary Metabolomes*). O antiSMASH identifica BGCs de genomas de bactérias, fungos e plantas, e apresenta a possível estrutura predita do produto natural codificado pelo BGC (Blin, Shaw, Steinke, Villebro, Ziemert, Lee, Marnix H. Medema, *et al.*, 2019). O PRISM utiliza diferentes algoritmos para comparar a informação genética disponibilizada pelo usuário com 57 reações enzimáticas, que possibilita a correspondência entre produtos naturais conhecidos e possíveis novos (Skinnider *et al.*, 2017). O *The Secondary Metabolite Bioinformatics Portal*

(www.secondary-metabolites.org) (Weber e Kim, 2016) reúne diversas ferramentas de bioinformática que podem ser utilizadas para busca de produtos naturais em bancos de dados, para a análise de *genome mining* e informações específicas. Muitos dos bancos de dados estão relacionados, como por exemplo o MIBiG (*Minimum Information about a Biosynthetic Gene Cluster*) que está interligado ao antiSMASH, e possui o total de 1.923 clusters de metabólitos secundários catalogados. Desses, 799 são relacionados aos policetídeos, 605 a peptídeos não-ribossômicos e 258 a RiPPs (Kautsar *et al.*, 2020). Para produtos naturais, dois exemplos são o banco de dados StreptomeDB que é específico para produtos naturais identificados em estreptomicetos (Klementz *et al.*, 2016) e o NPAtlas que contém mais de 24 mil compostos de micro-organismos (van Santen *et al.*, 2019).

2.5. Combinação de abordagens ômicas para descoberta de produtos naturais

A integração de técnicas multi-ômicas, como genômica, transcriptômica, proteômica e metabolômica, tem cada vez sido utilizada na descoberta de produtos naturais. O uso de dados de sequência de genomas para prever os BGCs relacionados aos produtos naturais já existe através do *genome mining*. As sequências analisadas podem ser obtidas de genomas de bactérias isoladas ou metagenomas. Uma parte importante do processo de *genome mining* é prever as classes de produtos naturais relacionadas aos BGCs, além disso prever as possíveis estruturas relacionadas aos produtos naturais a serem expressos. O *genome mining* e a genômica comparativa trazem a possibilidade de realizar tais análises, e permitir a detecção de BGCs promissores para o desenvolvimento de novos produtos naturais. Após as análises genômicas é possível realizar a análise metabolômica de amostras relacionadas aos micro-organismos ou de extratos brutos obtidos da fermentação (Soldatou *et al.*, 2019; Ziemert, Weber e Medema, 2020). Através de análises estatísticas multivariadas, como análise do componente principal (PCA), regressão de quadrados mínimos parciais (PLSDA) e do banco de dados MS/MS do *Global Natural Product Social* (GNPS) é possível priorizar os dados de espectrometria de massas oriundas das amostras obtidas e reavaliar se há moléculas relacionadas as estruturas preditas (Albarano *et al.*, 2020; Hooft *et al.*, 2020). A engenharia genética, através da biologia sintética, auxilia no desafio de ativar BGCs silenciosos que foram identificados no genoma. Nesse sentido, a engenharia de vias biossintéticas e uso de cepas hospedeiras está disponível para realizar a expressão heteróloga de novos produtos naturais. Essa abordagem é ainda mais importante quando se trata de BGCs de bactérias não-cultiváveis (Albarano *et al.*, 2020; Ziemert, Weber e Medema, 2020). A transcriptômica pode revelar quais BGCs estão sendo

transcritos, essa metodologia pode se tornar eficiente no estudo de diferentes meios de cultivo e produções em co-cultivo para ativar diferentes BGCs ou mesmo aqueles silenciosos. A proteômica vem como uma abordagem complementar da transcriptômica e da genômica, uma vez que permite a comparação de níveis de proteína expressa mostrando quais vias estão sendo reguladas, sendo de extrema importância para entender a biossíntese de produtos naturais (Soldatou *et al.*, 2019; Albarano *et al.*, 2020; Hooft *et al.*, 2020; Ziemert, Weber e Medema, 2020). Por fim, a molécula precisa ser isolada e passa por elucidação da estrutura química, afim de poder descrever um novo produto natural (Figura 5) (Ziemert, Weber e Medema, 2020) .

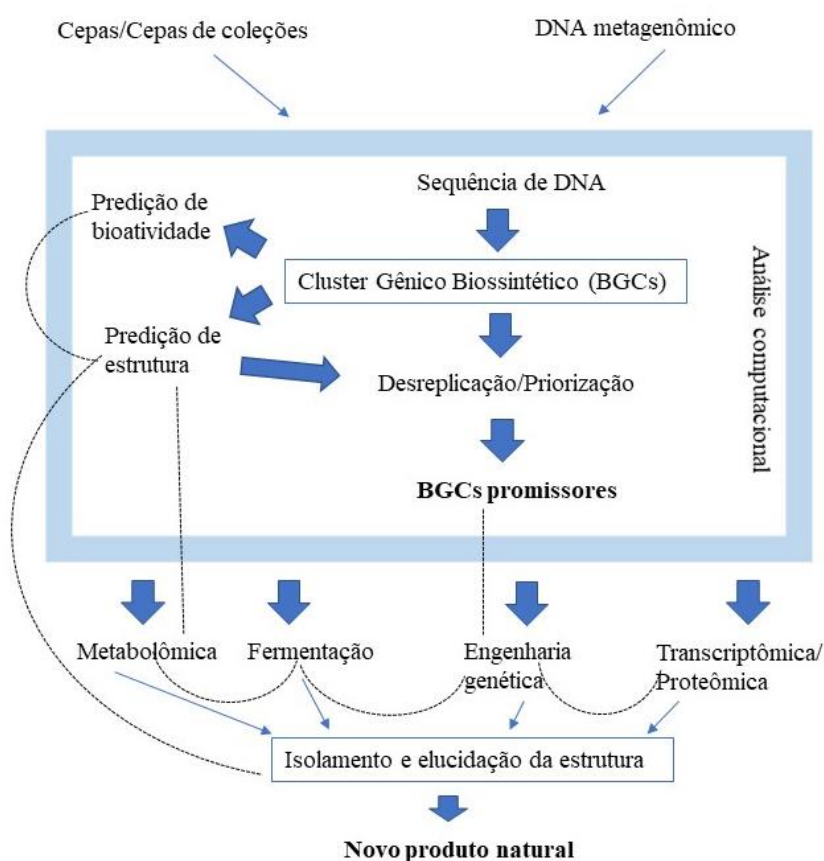


Figura 5. Esquema do processo de descoberta de novos produtos naturais envolvendo a identificação de BGCs pelo *Genome mining*, busca de novas moléculas pela metabolômica, engenharia genética de BGCs e uso de ferramentas de transcriptômica e proteômica (Ziemert, Weber e Medema, 2020 - traduzido e modificado).

2.6. A busca por novos produtos naturais

A pandemia do novo coronavírus no ano de 2020 (COVID-19) revelou a fragilidade da sociedade frente aos patógenos. Não há, até o momento, antiviral que seja eficaz ao tratamento do vírus e a corrida no desenvolvimento de uma vacina e de testes com fármacos, novos ou já implementados como lopinavir, está sendo um desafio da ciência contemporânea (Brüssow, 2020).

O surgimento e a propagação da resistência microbiana aos antibióticos apresentam um desafio único para a ciência e a medicina. Muitos patógenos têm produzido cepas resistentes em todo o mundo. Um exemplo são as cepas altamente resistentes da superbactéria MRSA (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) que inicialmente estava restrita a hospitais e agora está amplamente presente na comunidade. Outras cepas de patógenos humanos que desenvolveram resistência ao longo dos anos foram as bactérias *Acinetobacter baumannii*, que causam infecções por feridas e infecções supurativas, e cepas do agente da tuberculose, *Mycobacterium tuberculosis* (Lewis, 2012).

Atualmente, o problema está na disseminação de organismos multirresistentes denominados 'ESKAPE', que representam as iniciais dos micro-organismos *Enterococcus* spp., *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella* spp., *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter* spp. (Lewis, 2013; CDC, 2019).

Devido à resistência dos micro-organismos frente aos antibióticos, as doenças infecciosas continuam sendo uma das muitas causas de morte. De acordo com a Organização Mundial da Saúde, cerca de 440.000 novos casos de tuberculose multi-resistente (MSR-TB) são identificados anualmente, causando cerca de 150.000 mortes (Zhu, Sandiford e Van Wezel, 2014). De acordo com o relatório da CDC de 2019, mais de 2,8 milhões de infecções por micro-organismos resistentes foram causadas nos Estados Unidos a cada ano ocasionando mais de 35 mil mortes como resultado (CDC, 2019).

Os antibióticos possuem a função de desligar ou subverter as funções celulares essenciais dos micro-organismos, e os mecanismos de resistência exploraram todas as estratégias possíveis de prevenir uma droga de combater seu alvo. Os principais tipos de mecanismos de resistência clinicamente relevantes incluem destruição do antibiótico (por exemplo, por β -lactamase), modificação do sítio alvo (por exemplo, a mutação na proteína que confere resistência à estreptomicina); bem como a penetração restrita e/ou efluxo da droga (por exemplo, o efluxo de linezolida pela bomba multidroga AcrAB-TolC) (Lewis, 2013).

O principal responsável pela tolerância de agentes patogênicos aos antibióticos são as células persistentes. Esses não são mutantes, são variantes fenotípicas de células que se dividem ativamente sendo produzidos na população e a sua abundância relativa é de aproximadamente

1% na fase final do crescimento exponencial (Keren et al., 2004). Os persistentes também têm um importante papel no desenvolvimento de mutantes resistentes aos antibióticos convencionais. Esses patógenos são mortos lentamente e retomam o crescimento quando as concentrações de antibiótico diminuem. O resultado é uma infecção reincidente com um grande tamanho da população que favorece o desenvolvimento de resistência (Lewis, 2013). A busca de novas drogas continua sendo um caminho promissor para ajudar a resolver este e outros desafios que poderão surgir futuramente.

3. OBJETIVOS

Este estudo teve como objetivo principal a caracterização do potencial biossintético e metabólico de bactérias isoladas da Antártica.

3.1. Objetivos específicos

- Analisar o genoma completo de dois (2) isolados de bactérias para identificar cluster gênicos biossintéticos através de ferramentas de bioinformática;
- Avaliar a atividade antiproliferativa dos extratos brutos;
- Avaliar a expressão e recuperação de metabólitos secundários através de diferentes métodos de cultivo e extração.
- Correlacionar os dados obtidos do sequenciamento do genoma completo e dos extratos brutos, a fim de identificar as vias biossintéticas expressas e os possíveis metabólitos secundários das bactérias;
- Avaliar o uso de uma linhagem de *Burkholderia* não-patogênica como hospedeira para expressão heteróloga de um lasso peptídeo, cujo BGC foi unicamente identificado na bactéria *Streptomyces albidoflavus*.

**Capítulo 1. Sequenciamento e análise dos genomas das bactérias antárticas
Streptomyces albidoflavus ANT_B131 e *Marinobacter* sp. ANT_B65**

1. INTRODUÇÃO

Os produtos naturais bioativos representam a principal fonte de novos agentes terapêuticos, usados como guias de medicamentos para novos antibióticos e agentes anticâncer. A maioria desses produtos bioativos são derivados de bactérias e fungos, que representam uma importante fonte de medicamentos. Muitas bactérias provenientes de ambientes marinhos ou associados a invertebrados marinhos são capazes de produzir metabólitos secundários com potencial anticâncer devido suas propriedades citotóxicas (Albarano et al, 2020). O câncer continua sendo um dos mais sérios problemas de saúde humana. Métodos terapêuticos para o tratamento do câncer incluem cirurgia, radioterapia, quimioterapia e imunoterapia, que são técnicas usadas individualmente, e quando combinadas oferecem maior eficiência no tratamento do tumor (Gillet et al., 2007).

As bactérias do gênero *Streptomyces* são Gram-positivas e pertencem à família *Streptomycetaceae*, Filo Actinobacteria (Parte et al., 2020). Sua morfologia envolve a formação de uma camada de hifas que pode se diferenciar em uma camada de esporos. O desenvolvimento de filamentos ramificados que resulta em uma rede de hifas multicelulares são conhecidas como micélio do substrato. Após dias, os micélios do substrato produzem hifas aéreas especializadas, conhecidas como micélio aéreo. Tais hifas sofrem septação para se tornarem compartimentos uninucleóides, se diferenciando até se tornarem cadeias de esporos (Yagüe et al., 2014) (Figura 6).

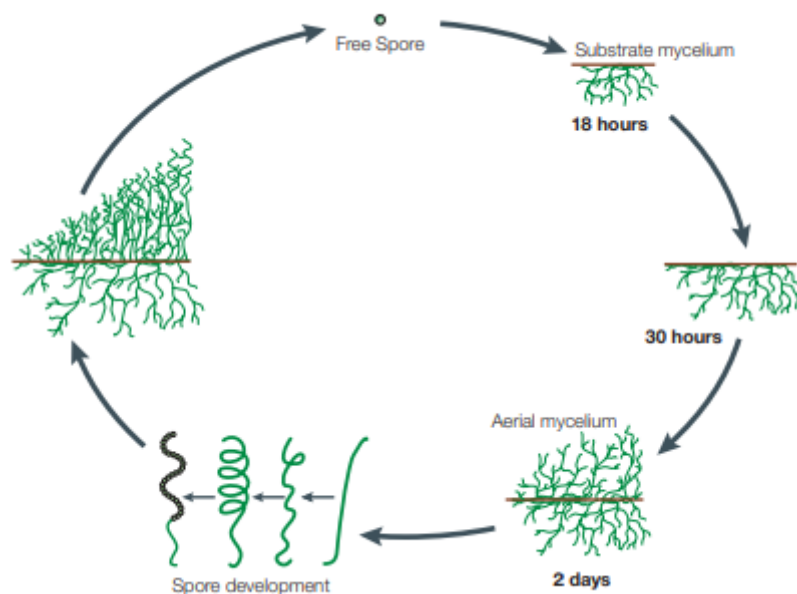


Figura 6. Ciclo de vida da *Streptomyces coelicolor* (Angert, 2005).

Estas bactérias são capazes de crescer em diversos ambientes, como patógenos de plantas como *Streptomyces scabei* (Lerat, Simao-Beaunoir e Beaulieu, 2009), o patógeno humano *Streptomyces somaliensis* (Hassan *et al.*, 2001), ambientes termofílicos como a *Streptomyces thermoalcalitolerans* (Kim *et al.*, 1999), ambientes marinhos como *Streptomyces marinus* (Khan *et al.*, 2010), e principalmente no solo, de onde o gênero é reconhecido por ter a habilidade de produzir metabólitos secundários.

Nos anos de 1950 a 1960 cerca de 70% dos antibióticos descobertos foram oriundos de espécies desse gênero. A descoberta de compostos como estreptomicina, cloranfenicol, tetraciclina e macrolídeos, voltou a atenção para as *Streptomyces*, bactérias produtoras de tais compostos. Porém, o interesse em fungos filamentosos passou a aumentar nos anos de 1990 a 2000 para a busca por novos metabólitos secundários com atividades biológicas, reduzindo a fração de compostos naturais oriundos de actinomicetos (Berdi, 2005).

Marinobacter é um gênero de bactérias Gram-negativas, pertencente a família *Alteromonadaceae* e filo Proteobacteria (-Gamma). As espécies descritas desse gênero foram geralmente isoladas de ambientes marinhos ou ambiente com alta salinidade, como *M. hydrocarbonoclasticus* (Gauthier *et al.*, 1992) isolada do mar mediterrâneo próximo a uma refinaria de petróleo, *M. profundus* isolado do sedimento do mar profundo (Cao *et al.*, 2018), *M. piscensis* isolada de peixes salgados (Anchovas) (Hedi, Luc e Fardeau, 2015) e a *M. antarcticus* isolada do sedimento arenoso da Antártica (Liu *et al.*, 2012).

Bactérias do gênero *Marinobacter* participam de importantes processos ambientais, como a ciclagem biogeoquímica. Pela flexibilidade metabólica e possibilidade de uso de diversas fontes de carbono e a interação com diversos tipos de metais, esse gênero foi chamado de “Oportunitrófico Biogeoquímico” (Singer *et al.*, 2011). As espécies *M. hydrocarbonoclasticus* e *M. aromaticivorans* são capazes de degradar hidrocarbonetos (Gauthier *et al.*, 1992; Cui *et al.*, 2016). *M. hydrocarbonoclasticus* produz um sideróforo, a petrobactina, que forma um complexo com Fe(III) provendo o ferro, que é essencial para a síntese de DNA e respiração celular, e que se apresenta em baixas concentrações no ambiente marinho (0.02 – 1 nM) (Barbeau *et al.*, 2002; Hickford *et al.*, 2004).

Outro importante composto ligado ao gênero são os ésteres de cera (*wax esters*), ácidos graxos de cadeia longa ligados a álcoois de cadeia longa. Em plantas, esses ésteres de cera são os constituintes das camadas cerosas das folhas, e funcionam como um agente hidrofóbico para evitar a perda de água. Devido às suas propriedades, os ésteres de cera tem se tornado alvo de interesse para a indústria cosmética, farmacêutica e alimentícia (Wahlen *et al.*, 2009; Bird *et al.*, 2018).

O aumento da resistência antimicrobiana e seu alto impacto na saúde humana exige a busca de novos produtos naturais para ajudar na solução deste problema. Após décadas de produção de novas moléculas por meio da química combinatória, o sequenciamento de genomas associado ao *genome mining* tem permitido uma nova abordagem de descoberta de produtos naturais. Neste contexto, esta etapa do estudo teve como objetivo o sequenciamento do genoma de duas bactérias para identificação de cluster gênicos biossintéticos relacionados a produtos naturais.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Reativação e manutenção das bactérias

Foram selecionados para este estudo bactérias isoladas da Antártica e avaliadas quanto ao potencial biotecnológico (França, 2015), resultando na seleção de duas (2) bactérias, *Streptomyces* sp. ANT_B131 e *Marinobacter* sp. ANT_B65 cujos extratos brutos apresentaram atividade antimicrobiana frente às bactérias Gram-positivas e/ou Gram-negativas e leveduras (Tabela 1).

A seleção da *Streptomyces* sp. ANT_B131 para este estudo ocorreu devido aos resultados da atividade antimicrobiana observada nos estudos prévios (França, 2015) (Tabela 1), o potencial de produção de produtos naturais de bactérias do gênero *Streptomyces* e poucos estudos de produção de produtos naturais de micro-organismos desse gênero oriundos da Antártica. Quanto a seleção da bactéria *Marinobacter* sp. ANT_B65 para este estudo, foi observada atividade antimicrobiana dos extratos brutos como pouco se conhece da produção de antimicrobianos para esse gênero, haveria uma nova oportunidade de estudos.

Os isolados foram obtidos durante expedição a Antártica pelo Programa Antártico Brasileiro no verão de 2010, os invertebrados marinhos foram coletados na Ilha do Rei George, Antártica, por Msc. Fernando S. Nobre e Prof. Dr. Eduardo Hadju (UFRJ). O isolamento bacteriano foi realizado pela Dr^a Cláudia Beatriz Afonso de Menezes.

A *Marinobacter* sp. ANT_B65 foi isolada de esponja marinha sem identificação taxonômica e *Streptomyces* sp. ANT_B131 foi isolada de uma salpa, *Salp* sp. (Tabela 2). Estas bactérias compõem o acervo de pesquisa da Divisão de Recursos Microbianos (CPQBA/UNICAMP) e estão preservadas pelo método de ultracongelamento a -80 °C (Hunter-Cevera e Belt, 1996).

2.2. Caracterização das espécies de bactérias

Em estudo prévio, o gênero dos isolados foi identificado através da análise filogenética da sequência parcial do gene RNA ribossomal 16S utilizando 1100 pb, utilizando a matriz de distância evolutiva calculada com o modelo de Kimura (Kimura, 1980) e a construção da árvore filogenética foi realizada a partir das distâncias evolutivas pelo método de Neighbor-Joining (Saitou e Nei, 1987). Os isolados também foram avaliados quanto ao potencial biotecnológico através da amplificação dos genes PKS-I, PKS-II (Metsä-Ketela *et al.*, 1999) e NRPS (Ayuso-Sacido e Genilloud, 2005), sendo que tais isolados possuem ao menos um dos genes amplificados (Tabela 2).

2.2.1. Identificação dos isolados por amplificação e sequenciamento do gene RNA ribossomal 16S

Visando uma análise mais acurada para identificação dos isolados em nível de espécie, uma segunda análise filogenética da sequência do gene RNA ribossomal foi feita utilizando *primers* para amplificação do gene completo

Tabela 1. Avaliação da atividade antimicrobiana, pelo Método de Micro-diluição, de extratos brutos obtidos por bactérias isoladas de ambientes extremos contra micro-organismos indicadores.

Micro-organismos testados		<i>Marinobacter</i> sp. ANT_B65	<i>Streptomyces</i> sp. ANT_B131
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	CIM*	-	2,00
	CBM**	-	-
<i>B. subtilis</i> ATCC 6051	CIM*	-	0,50
	CBM**	-	1,50
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 11775	CIM*	-	0,25
	CBM**	-	-
<i>Candida albicans</i> ATCC10231	CIM*	-	1,50
	CBM**	-	-
<i>N. meningitidis</i> B4	CIM*	n.t.	1,50
C2135	CIM*	-	2,00
YUSA	CIM*	2,0	2,00
W ATCC	CIM*	n.t.	2,00

* Concentração inibitória mínima (CIM) em mg. mL⁻¹ ** Concentração bactericida mínima (CBM) em mg.mL⁻¹ (n.t.) Não testado (-) Não houve inibição do micro-organismo indicador (+) Houve inibição no teste de halo de inibição

Tabela 2. Origem e local do isolamento de bactérias, presença de genes de potencial farmacológico e identificação em nível de gênero dos isolados.

Isolado	Identificação	Origem do isolado	Local de isolamento	Dados de GPS	Presença dos genes		
					PKS-I	PKS-II	NRPS
ANT_B65	<i>Marinobacter</i> sp.	Esponja marinha	Estação Brasileira Comandante Ferraz, Antártica	(62°05,130'S 58°23,356'W)	+	+	-
ANT_B131	<i>Streptomyces</i> sp.	Salpa (<i>Salp</i> sp.)	Punta Plaza, Antártica	Sem dados de GPS	-	+	+

(na) Não avaliado

Os isolados preservados foram reativados em meio Nutriente Ágar (NA, Difco) com água do mar artificial (ASW) (em g.L⁻¹, KBr 0,1; NaCl 23,48; MgCl₂-6H₂O 10,61; CaCl₂-2H₂O 1,47; KCl 0,66; SrCl₂ _ 6H₂O 0,04; Na²SO₄ 3,92; NaHCO₃ 0,19; H₃BO₃ 0,03) e incubados a 28 °C por 24 a 72 h. Após a incubação, duas a três colônias foram coletadas da placa e foram utilizadas para a extração de DNA genômico (van Soolingen *et al.*, 1991). O DNA extraído foi quantificado, armazenado em tubos de polipropileno e mantido a temperatura de -20 ° C.

A amplificação do gene RNA ribossomal 16S foi feita por meio de uma reação em cadeia da polimerase (PCR) com os *primers* 10f (5' AGTTTGATCCTGGCTCAG 3') e 1401r (AAGGAGGTGWTCCARCC) (Lane, 1991), homólogos às extremidades conservadas do gene RNA ribossomal 16S de bactérias e utilizando com molde o DNA genômico.

As seguintes condições foram utilizadas na reação de amplificação: usando 0,4 µM de cada primer específico, 1,0 mM de tampão 10x, 0,2 mM de dNTP's, 1,5 mM de MgCl₂, 2,5 U de Taq Polimerase (Invitrogen) e 50 ng de DNA, em um volume final de 25 µL de reação. Para a amplificação foi realizada uma desnaturação inicial de 95 °C por 2 min, seguida de 30 ciclos sendo: 94 °C por 1 min, 55 °C por 1 min, 72 °C por 3 min, extensão final de 3 min a 72 °C, em termociclador Eppendorf. O tamanho dos produtos de PCR foi confirmado através de eletroforese em gel de agarose 1,0%.

Para o sequenciamento automatizado, os produtos de PCR foram purificados utilizando-se mini-colunas (GFX PCR DNA e gel band purification kit, GE Health Care) e submetidos ao sequenciamento em sequenciador automático ABI3500XL Series (Applied Biosystems). As reações de sequenciamento foram realizadas com o kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems Life Technologies). Para a reação de sequenciamento foram utilizados *primers* 10f, 728r e 1401r para obtenção das sequências. Estas foram então processadas no programa phred/Phrap/CONSED versão Linux (Ewing e Green, 1998; Gordon, Abajian e Green, 1998) para a montagem dos contigs. As sequências com aproximadamente 1400 pb foram submetidas à comparação nos bancos de dados, Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), no Eztaxon-e (Yoon *et al.*, 2017) e Ribosomal Data Project II 9.0 (Wang *et al.* 2007). As sequências recuperadas dos bancos de dados foram alinhadas no programa CLUSTAL X (Thompson, Higgins e Gibson, 1994), editadas e as análises filogenéticas conduzidas utilizando o programa MEGA X (Kumar *et al.*, 2018). A matriz de distância evolutiva foi calculada com o modelo de Kimura (Kimura, 1980) e a construção da árvore filogenética a partir das distâncias evolutivas foi feita pelo método de Neighbor-Joining (Saitou e Nei, 1987), com valores de bootstrap calculados a partir de 1.000 repetições (Felsenstein, 1985).

2.3. Análises dos genomas bacterianos

2.3.1. Sequenciamento, montagem e anotação dos genomas

Os isolados de *Streptomyces* sp. ANT_B131 e *Marinobacter* sp. ANT_B65 foram reativados no meio NA-ASW, seguido pela extração de DNA genômico (van Soolingen *et al.*, 1991) e purificado com o kit UltraClean Microbial DNA Extraction Kit (Mo Bio Laboratories, Carlsbad, EUA). O sequenciamento de segunda geração foi realizado no Mr. DNA Lab. (Texas, EUA) utilizando a plataforma Illumina HiSeq 2500, formando bibliotecas paired-end, com reads de 251 pb. A qualidade dos reads foi determinada usando FastQC (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) e filtrada usando Trimmomatic 3.0 (Bolger, Lohse, e Usadel 2014). A montagem do genoma foi realizada utilizando o Software SeqMan NGen v 14.0 (DNASTAR Inc., WI, USA). Os dados das sequências foram submetidos à análise de qualidade utilizando o software Quast 4.0 (Gurevich *et al.*, 2013). A cobertura dos genomas foi estimada através da equação: $C = LN / G$, onde C é a cobertura do genoma (em vezes); L é o tamanho dos *reads* obtidos pelo sequenciamento; e N é o número de *reads*.

Os *contigs* foram realinhados usando MAUVE (Darling, Mau, e Perna 2010) e como referência foi usado o genoma da bactéria *Streptomyces albidoflavus* J1074 (número de acesso PRJNA180996) para *Streptomyces* sp. ANTB_131 e *Marinobacter antarcticus* CGMCC 1.10835 (número de acesso PRJEB18348) para *Marinobacter* sp. ANT_B65. Os genomas foram anotados utilizando o servidor *Rapid Annotation using Subsystem Technology* (RAST) (Brettin *et al.*, 2015), que utiliza como preditor de ORFs o Software GLIMMER 3 (Delcher *et al.*, 1999), PATRIC (Wattam *et al.*, 2017) e o NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP) (Tatusova *et al.*, 2016).

2.3.2. Multi-Locus Sequence Analysis (MLSA) para *Streptomyces* sp.

O estudo filogenético de *Multi-locus Sequence Analysis* (MLSA) aplicado para a linhagem *Streptomyces* sp. ANTB_131 utilizou cinco (5) genes *house-keeping* como recomendado por Labeda e colaboradores (2017). Os genes utilizados foram: *atpD* (ATP synthase F1, subunidade beta), *gyrB* (DNA gyrase subunidade B), *rpoB* (RNA polymerase subunidade beta), *recA* (recombinase A), and *trpB* (tryptophan synthetase, beta subunidade A) (Tabela 3). Utilizando a anotação dos genes, realizada através do PATRIC, foram selecionados os cinco genes *house-keeping*. A história evolutiva foi inferida usando o método de Neighbor-

Joining (Saitou e Nei 1987). A porcentagem de árvores replicadas nas quais os táxons associados se agrupam foi realizada pelo teste de bootstrap (1000 replicatas) (Felsenstein, 1985). A distância evolutiva foi computada usando o método de Kimura 2-parameter (Kimura, 1980). Todas as posições ambíguas foram removidas para cada par de sequências. Um total de 2525 posições no conjunto de dados foram utilizados na análise. As análises evolutivas foram conduzidas no programa MEGA X (Kumar *et al.*, 2018).

2.3.3. Hibridização DNA–DNA *in silico*

A hibridização DNA–DNA *in silico* (isDDH), alinhamento local pelo BLAST +, e a diferença no conteúdo de % G+C entre os genomas de *Marinobacter* sp. ANT_B65, *Streptomyces* sp. ANT_B131 e suas respectivas linhagens tipo mais próximas foram calculadas usando o Genome-to-Genome Distance Calculator (GGDC) (Meier-Kolthoff *et al.*, 2013; Meier-kolthoff, Klenk e Goker, 2014) e os valores de Average Nucleotide Identity baseado no BLAST+ (ANIb), Average Nucleotide Identity baseado no Mummer (ANIm), e Tetra Correlation Search (TETRA) foram calculados usando JSpeciesWS (Richter *et al.*, 2016).

As análises foram realizadas entre a linhagem *Streptomyces* sp. ANTB_131 e as cepas filogeneticamente próximas *S. albidoflavus* J1074 (número de acesso CP004370.1) e *S. albidoflavus* SM254 (número de acesso CP014485.1). Para *Marinobacter* sp. ANTB_65 as análises foram realizadas com as cepas filogeneticamente próximas *Marinobacter antarcticus* CGMCC 1.10835 (número de acesso NZ_FRAQ00000000.1), *Marinobacter psychrophilus* 20041 (número de acesso NZ_CP011494.1) e *Marinobacter hydrocarbonoclasticus aquaeolei* VT8 (número de acesso NC_008740.1).

Tabela 3. Número de acesso das sequências dos genes usados no *Multilocus Sequence Analysis*.

Nome	Cepa	Número de Acesso GenBank				
		<i>atpD</i>	<i>gyrB</i>	<i>recA</i>	<i>rpoB</i>	<i>trpB</i>
<i>Streptomyces daghestanicus</i>	NRRL B-5418	KJ137021	KJ137038	KJ137055	KJ137072	KJ137089
<i>Streptomyces albidoflavus</i>	NRRL B-1271	KT384451	KT384800	KT385148	KT388770	KT389120
<i>Streptomyces violascens</i>	NRRL B-2700	KT384752	KT385100	KT385454	KT389072	KT389421
<i>Streptomyces violaceochromogenes</i>	NRRL B-5427	KT384748	KT385096	KT385450	KT389068	KT389417
<i>Streptomyces purpurascens</i>	NRRL B-12230	KT384696	KT385046	KT385397	KT389017	KT389365
<i>Streptomyces luteogriseus</i>	NRRL B-12422	KT384632	KT384981	KT385332	KT388952	KT389301
<i>Streptomyces hawaiiensis</i>	NRRL B-1988	KT384592	KT384941	KT385290	KT388912	KT389261
<i>Streptomyces levis</i>	NRRL B-16370	KT384621	KT384970	KT385320	KT388941	KT389290
<i>Streptomyces violaceus</i>	JCM 4533	LC381981	LC381982	LC381983	LC381984	
<i>Streptomyces iakyrus</i>	NRRL B-3317	KT384600	KT384949	KT385298	KT388920	KT389269
<i>Streptomyces massasporeus</i>	NRRL B-3300	KT384636	KT384985	KT385336	KT388956	KT389305
<i>Streptomyces roseoviolaceus</i>	NRRL B-12177	KT384710	KT385060	KT385411	KT389031	KT389379
<i>Streptomyces janthinus</i>	NRRL B-3365	KT384604	KT384953	KT385303	KT388924	KT389273
<i>Streptomyces carpinensis</i>	NRRL B-16921	KT384503	KT384852	KT385200	KT388822	KT389172
<i>Streptomyces cinerochromogenes</i>	NRRL B-16928	KT384514	KT384863	KT385211	KT388833	KT389183
<i>Streptomyces parvulus</i>	NRRL B-1628	KJ196367	KJ196369	KJ196371	KJ196373	KJ196375
<i>Streptomyces muensis</i>	JCM 17576	KX784758		KX784760	KX784762	KX784764
<i>Streptomyces asterosporus</i>	NRRL B-24328	KT384471	KT384820	KT385168	KT388790	KT389140

2.3.4. Genome mining

Os genomas foram analisados quanto o potencial de produção de metabólitos secundários que podem ser preditos utilizando softwares baseados nas estruturas dos domínios das proteínas. O potencial genético foi analisado usando antiSMASH bacterial version 5.1.2 (Blin, Shaw, Steinke, Villebro, Ziemert, Lee, Marnix H. Medema, *et al.*, 2019) incluindo as análises pelo Cluster Blast e Cluster Pfam aos parâmetros padrões. A análise manual foi realizada através do BLAST (Basic Local Alignment Search Tool – NCBI/NIH), além de utilizar os BGCs obtidos pelo banco de dados MiBIG (Kautsar *et al.*, 2020) e alinhá-los com os genomas bacterianos através do MAUVE (Darling, Mau e Perna, 2010). Os genomas de *S. albidoflavus* J1074, *S. albidoflavus* SM254, *M. antarcticus* CGMCC 1.10835 e *M. hydrocarbonoclasticus* VT8 também foram avaliados pelo antiSMASH, seguindo as mesmas condições, e os BGCs foram comparados entre as cepas da mesma espécie.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Identificação dos isolados por amplificação e sequenciamento do gene RNA ribossomal 16S

As linhagens ANT_B65 e ANT_B131 foram reativadas em meio NA-ASW e, após o crescimento de colônias puras, foi realizada a extração de DNA seguido do protocolo para amplificação e sequenciamento do gene RNA ribossomal 16S. A análise filogenética realizada em estudo anterior, possibilitou a amplificação de 1100 pb para o gene, associando as linhagens ANT_B65 e ANT_B131 aos gêneros *Marinobacter* e *Streptomyces*, respectivamente.

Uma nova análise utilizando uma sequência de aproximadamente 1400 pb, não permitiu a definição da espécie para os isolados *Marinobacter* sp. ANT_B65 (Figura 7) e *Streptomyces* sp. ANTB_131 (Figura 8). A análise filogenética agrupou o isolado ANT_B65 juntamente com a linhagem tipo *Marinobacter antarcticus*, entretanto, o *bootstrap* de 64% permite a identificação da linhagem como *Marinobacter* sp. (Figura 7), sendo necessária outras análises incluindo todo o genoma, como a hibridização DNA-DNA *in silico* (isDDH) para definição da espécie. Do mesmo modo, a análise filogenética possibilitou relacionar o isolado ANT_B131 com espécies próximas, como *Streptomyces albidoflavus*, *Streptomyces hydrogenans*, *Streptomyces daghestanicus*, e *Streptomyces violascens*. De acordo com a LPSN (List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature) (Parte *et al.*, 2020) existem 660 espécies válidas de *Streptomyces* descritas. O sequenciamento do gene RNAr 16S tem um importante

papel na taxonomia *Streptomyces*, porém nem sempre é possível definir as espécies desse gênero utilizando apenas esse marcador (Labeda *et al.*, 2012). A fim de melhorar a resolução da análise taxonômica, escolhemos realizar a *Multilocus Sequence Analysis* (MLSA) utilizando genes *house-keeping* e com o sequenciamento do genoma completo foi possível realizar a *isDDH*. A MLSA permitiu melhorar a resolução taxonômica entre as espécies da família *Streptomycetaceae* (Labeda *et al.*, 2017) e a DDH é o padrão ouro para o delineamento de espécies (Meier-kolthoff, Klenk e Goker, 2014).

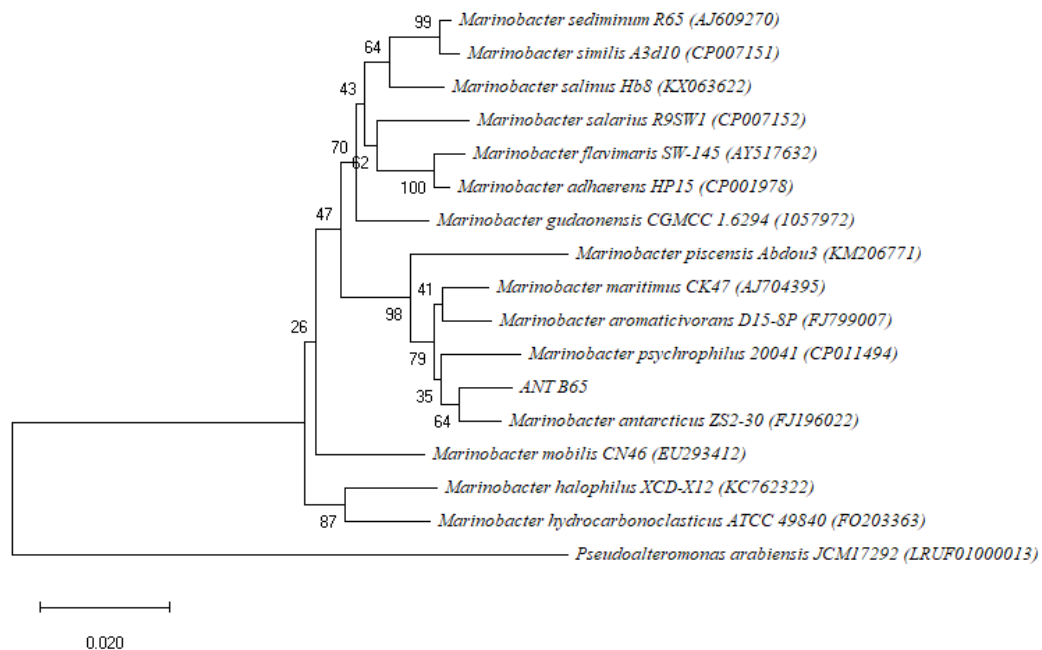


Figura 7. Árvore filogenética baseada na análise da sequência do gene RNA ribossomal 16S da bactéria ANT B65 isolada da Antártica e micro-organismos relacionados. Valores de *bootstrap* (1000 repetições, mostradas em %) estão listados. A barra de escala representa 2 substituições de nucleotídeos por posição em 100 nucleotídeos. *Pseudoalteromonas arabiensis* JCM17292 foi usado como outgroup.

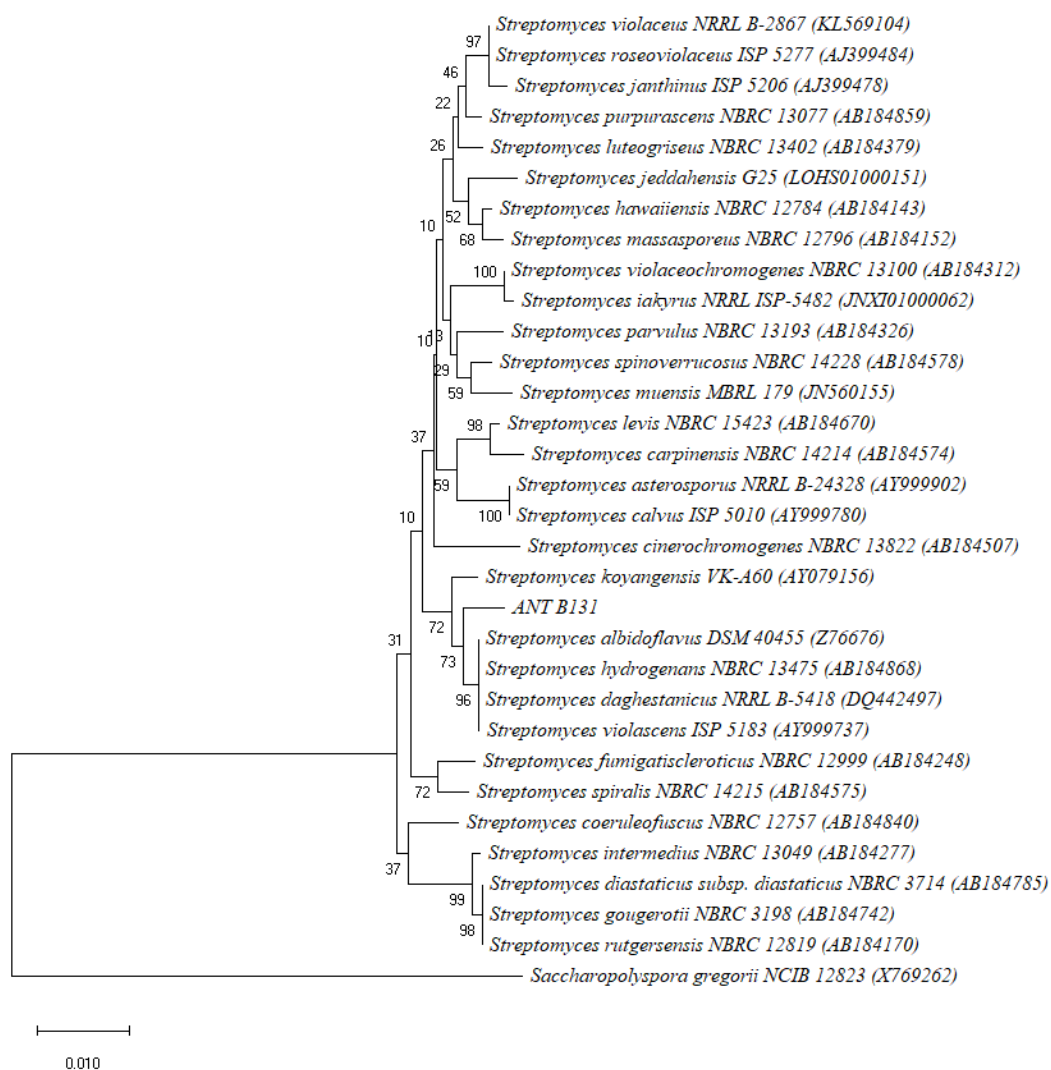


Figura 8. Árvore filogenética baseada na análise da sequência do gene RNA ribossomal 16S da bactéria ANTB_131 isolada da Antártica e micro-organismos relacionados. Valores de *bootstrap* (1000 repetições, mostradas em %) estão listadas. A barra de escala representa 1 substituição de nucleotídeo por posição em 100 nucleotídeos. *Saccharopolyspora gregorii* NCIB 12823 foi usado como outgroup.

3.2. Sequenciamento, montagem e anotação dos genomas

O sequenciamento dos genomas bacterianos permitiu a obtenção de 8.229.346 *reads* de 251 bp para *Marinobacter* sp. ANT_B65 e 8.075.192 *reads* para *Streptomyces* sp. ANT_B131. Para *Marinobacter* sp. ANTB_65, a montagem do genoma resultou em sequências de 4.173.840 pb em 8 *contigs* com N50 de 2.216.721 pb e conteúdo de GC de 53,7% e cobertura de 495 x. Para *Streptomyces* sp., a montagem do genoma resultou em sequências de 6.968.465 pb em 49 *contigs* com N50 de 236.213 pb e conteúdo de GC de 73,1%, com cobertura de 291 x.

Durante a anotação, pode-se notar diferença entre os números de CDSs (*Coding sequences*) e RNAs obtidos pelos diferentes tipos de anotação (Tabela 4). Durante a anotação, o RAST encontrou genomas mais relacionados as linhagens estudadas, *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* VT8 para a linhagem *Marinobacter* sp. ANT_B65 e *Streptomyces albidoflavus* J1074 para a linhagem *Streptomyces* sp. ANT_B131.

Tabela 4. Informações dos genomas de *Marinobacter* sp. ANT_B65 e *Streptomyces* sp. ANT_B131.

Informações do genoma	<i>Marinobacter</i> sp.				<i>Streptomyces</i> sp.		
	RAST	Prokka	PATRIC	PGAP	RAST	Prokka	PATRIC
coding sequences (CDSs)	3.959	3.817	3.940	3.801	6.547	6.110	6.459
tRNAs	45	25	44	44	65	7	65
rRNAs	12	5	8	12	16	75	16
tmRNA	-	1	-	-	-	1	-
miscRNA	-	25	-	-	-	50	-
Subsistemas	443	-	272	-	399	-	250

Para a linhagem *Marinobacter* sp. ANT_B65, entre as CDSs identificadas utilizando o PATRIC, 43% (1750) foram anotados em subsistemas, dos quais 1748 são CDSs não hipotéticas e duas (2) hipotéticas (Figura 9). Para *Streptomyces* sp. ANT_B131, 29% (1281) das CDSs estão anotados em subsistemas, dos quais 1279 são CDSs não hipotéticas e 2 hipotéticas (Figura 10). As Figuras 9 e 10 indicam quais são os grupos de subsistemas nos quais os genomas foram anotados para as duas bactérias estudadas.

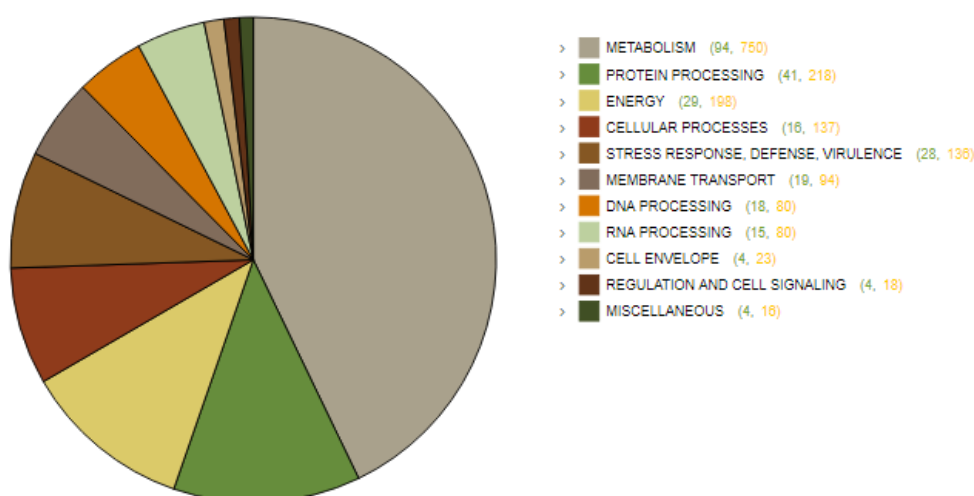


Figura 9. Distribuição das categorias de subsistemas pelo servidor PATRIC 3.6.7 de *Marinobacter* sp. ANT_B65, incluindo o total de 272 subsistemas e 1750 CDSs. Entre parênteses subsistemas em verde e genes em amarelo.

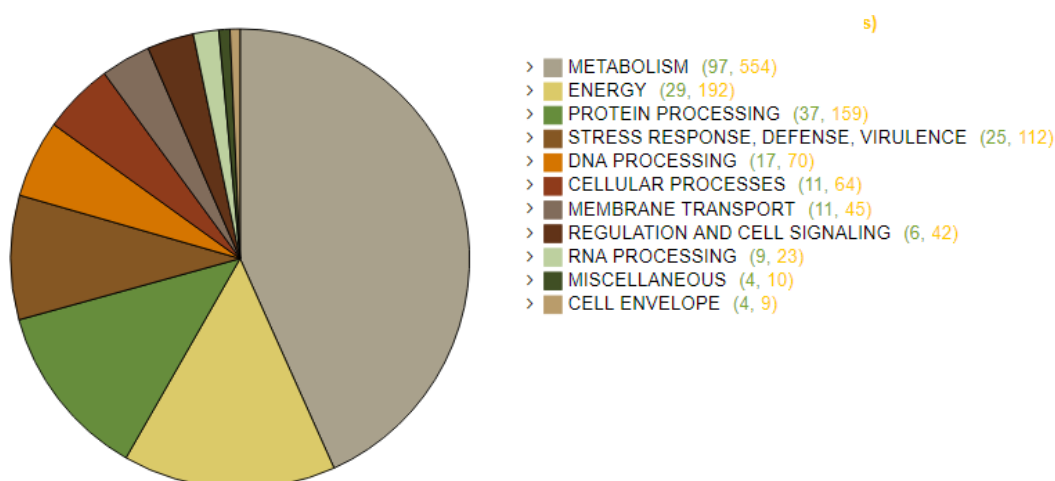


Figura 10. Distribuição das categorias de subsistemas pelo servidor PATRIC 3.6.7 de *Streptomyces* sp. ANT_B131, incluindo o total de 250 subsistemas e 1281 CDSs. Entre parênteses subsistemas em verde e genes em amarelo.

Na análise da categoria “Metabólitos Secundários” em *Marinobacter* sp. ANT_B65 três (3) CDSs foram associadas ao metabolismo de compostos aromáticos e um (1) CDSs foi associado a peptídeos sintetizados via ribossomo e modificados pós-tradução (RiPPs). Para *Streptomyces* sp. ANT_B131 foram encontradas 11 features, dos quais 7 estão associados no sistema de síntese de microcina modificada com Thiazole-oxazole (TOMM) e 4 estão associados a Lantonina Sintetase. Uma pequena porção dos produtos naturais faz parte das microcinas modificadas com tiazol/oxazol (TOMMs), que são peptídeos produzidos por

ribossomos. Esses compostos podem ter atividade antibiótica e atuar como fatores de virulência (Melby, Nard e Mitchell, 2011). Já as Lantioninas sintetases são enzimas responsáveis pela síntese de lanpeptídeos, entre eles destaca-se a nisina amplamente utilizada como antimicrobiano em alimentos (Zhang *et al.*, 2012).

3.3. *Multilocus Sequence Analysis (MLSA)*

O MLSA é uma técnica utilizada a fim de se obter uma alta resolução em relações filogenéticas entre espécies de um mesmo gênero ou entre gêneros de uma mesma família. Nessa análise utilizam-se sequências parciais de genes codificadores de proteínas com funções conservadas, os denominados “house-keeping genes”. O MLSA é amplamente utilizado na taxonomia de procarióticos e houve um período em que foi discutida a possibilidade dessa técnica substituir a hibridização DNA-DNA para delimitação de espécies (Glaeser e Kämpfer 2015).

Para membros da família *Streptomycetaceae*, especialmente do gênero *Streptomyces*, a análise filogenética de sequências do gene RNAr 16S não revela resolução suficiente para delimitação de espécie (Labeda *et al.*, 2012). O MLSA utilizando cinco *house-keeping genes*: *atpD* (ATP synthase, F1, subunidade beta), *gyrB* (DNA gyrase B subunidade), *rpoB* (RNA polymerase, subunidade beta), *recA* (recombinase A), e *trpB* (tryptophan synthetase, beta subunidade A) permitiu a descrição de novas espécies do gênero *Kitasatospora* e a reclassificação da cepa de *Streptomyces albus* J1074 como *Streptomyces albidoflavus* J1074 (Labeda *et al.*, 2017).

A técnica MLSA foi aplicada para a cepa de *Streptomyces* sp. ANT_B131 e utilizou sequências dos cinco *house-keeping genes* anotados através do servidor PATRIC (Anexo I). A técnica de MLSA utilizou sequências dos genes concatenados de cepas filogeneticamente próximas da *Streptomyces* sp. ANT_B131. Tais cepas foram selecionadas pela análise filogenética da sequência do gene RNAr 16S (item 3.1) e da análise da sequência no servidor EzBioCloud (Yoon *et al.*, 2017). Após a construção da árvore filogenética, a bactéria ANT_B131 foi relacionada à espécie *Streptomyces albidoflavus* com bootstrap de 100% (Figura 11). Esse resultado indica a resolução da análise para delimitação de espécie dentro do gênero *Streptomyces* permitindo a identificação da cepa. Além disso, o resultado mostra que a anotação da sequência do genoma completo reduziu o processo de análise, uma vez que para o método tradicional do MLSA são realizados amplificações e sequenciamento de cada gene. Nesse estudo, o sequenciamento do genoma favoreceu as análises taxonômicas.

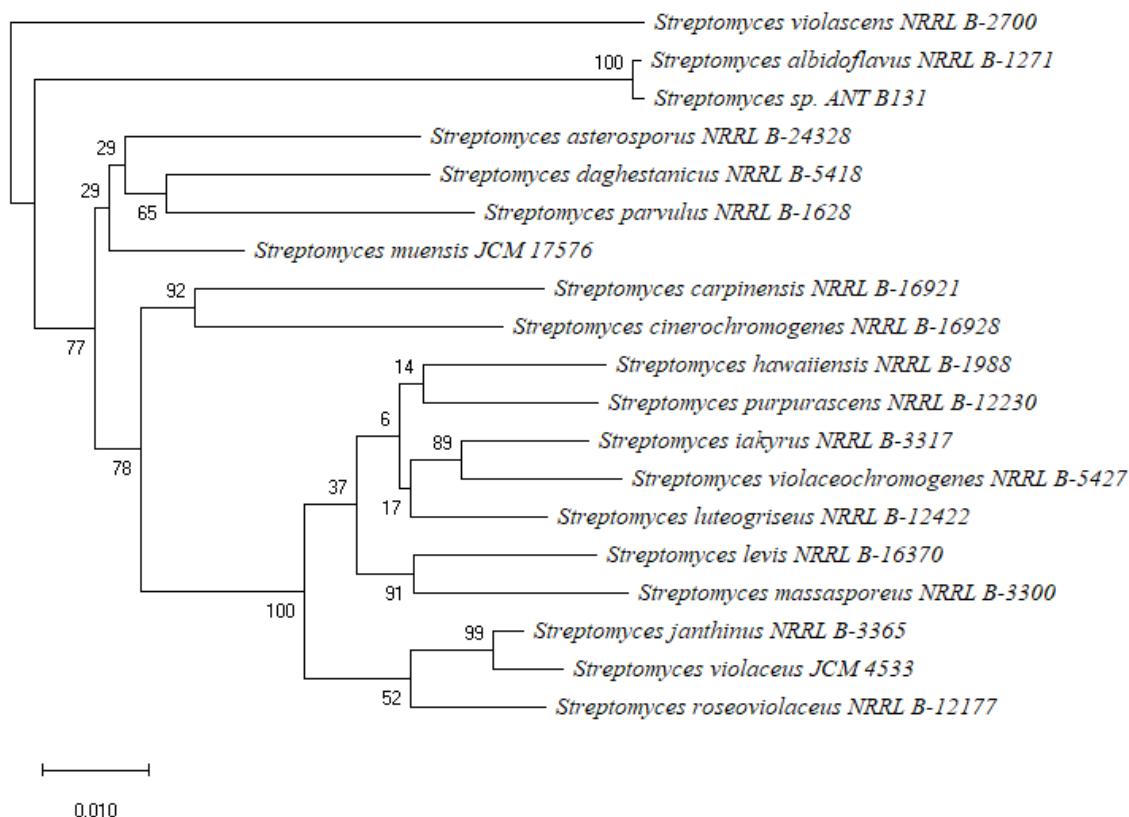


Figura 11. *Multilocus Sequence Analysis* (MLSA) da sequência dos genes *atpD* (ATP synthase, F1, subunidade beta), *gyrB* (DNA gyrase B subunidade), *rpoB* (RNA polymerase, subunidade beta), *recA* (recombinase A), e *trpB* (tryptophan synthetase, beta subunidade A) da bactéria ANT_B_131 isolada da Antártica e micro-organismos correlacionados. Valores de Bootstrap (1000 repetições, mostrados em %) estão listadas. Barra de escala representa 1 substituição de nucleotídeo por posições de 100 nucleotídeos.

Os resultados da análise do genoma da linhagem ANT_B_131 estão em convergência com as características dos genomas de *Streptomyces albidoflavus* reportados no NCBI. Existem atualmente 46 genomas relatados da espécie depositados no GenBank <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/genomes/32384>). O conteúdo de G+C varia de 72,3 a 73,6% e os tamanhos dos genomas de 6,52 Mb a 7,45 Mb. O tamanho médio total dos genomas é de 7.053.130 pb, a média de proteínas é 5.964 e a média do conteúdo de G+C é 73,4%.

3.4. Hibridização DNA-DNA

A hibridização DNA-DNA (HDD) ainda é considerada o padrão ouro na taxonomia de procariotos. Para realizar essa técnica sem os dados genômicos, é necessário inicialmente

estabelecer o conteúdo de guanina e citosina (G+C) presente no genoma do micro-organismo. Para isso, é necessário utilizar métodos como desnaturação termal ou temperatura de *melting*, recorrendo as técnicas de HPLC e PCR em tempo real. Essas são técnicas laboriosas, nas quais se necessita da cepa a ser avaliada e das linhagens Tipo filogeneticamente próximas para poder realizar o processo de hibridização entre a cepa a ser determinada como nova espécie e as linhagens Tipo (Meier-Kolthoff *et al.*, 2013; Meier-kolthoff, Klenk e Goker, 2014; Richter *et al.*, 2016).

Após o aumento do sequenciamento de genomas microbianos, o cálculo do conteúdo de G+C e a HDD podem ser realizados *in silico*, utilizando servidores *web based* como Genome-to-Genome Distance Calculator (GGDC), disponível pelo Leibniz Institute DSMZ (Meier-kolthoff, Klenk e Goker, 2014), e o JSpeciesWS (Richter *et al.*, 2016). São necessários os dados do sequenciamento do genoma completo da linhagem a ser estudada e dos genomas das linhagens Tipo correlacionadas para realizar a análise. A fim de confirmar a espécie das bactérias desse estudo, foram realizadas as análises de ANI (*Average Nucleotide Identity*) e TETRA (Tetranucleotídeos) através do JSpeciesWS e o %G+C e *isDDH* com o servidor GGDC.

O ANI e o TETRA correspondem a parâmetros derivados de sequências de genomas. Em análises de genomas em pares, o ANI representa uma avaliação entre os genes comuns e a porcentagem de DNA conservado, enquanto o TETRA indica a frequência de assinatura de oligonucleotídeos. Através de comparações com dados de HDD foi concluído que tanto o ANI, quanto o TETRA podem ser utilizados para substituir os valores de HDD para cepas que apresentam sequências de genoma disponíveis (Teeling *et al.*, 2004; Goris *et al.*, 2007; Richter *et al.*, 2016).

Para a linhagem *Streptomyces* sp. ANT_B131 o ANI baseado no BLAST + (ANIb) e a hibridização DNA–DNA *in silico* (*isDDH*) foram calculados entre a cepa e as linhagens filogeneticamente correlacionadas *S. albidoflavus* J1074 (ANIb 97,02%; *isDDH* 79,60%; Diferença de % G+C: 0,15) e *S. albidoflavus* SM254 (ANIb 97,41; *isDDH* 79,50%; Diferença de % G+C: 0,17) (Tabela 5). O ANI e *isDDH* estavam acima da linha de corte de >95% e >=70%, respectivamente, e a diferença de %G+C foi <1,0, esses resultados indicam que ANT_B131 pertence a mesma espécie que as linhagens testadas, SM254 e J1074 (Meier-kolthoff, Klenk e Goker, 2014; Richter *et al.*, 2016).

Para ANT_B65 o ANI e o *isDDH* foram calculados entre três cepas distintas *Marinobacter antarcticus* CGMCC 1.10835 (ANIb 82,09%; *isDDH* 26,10%; Diferença de % G+C: 0,15), *Marinobacter psychrophilus* 20041 (ANIb 73,51%; *isDDH* 19,90%; Diferença de

% G+C: 0,19), e *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* VT8 (ANIb 73,61%; isDDH 19,10%; Diferença de % G+C: 3,62) (Tabela 5). Nenhum dos parâmetros esteve acima da linha de corte, apenas a diferença na % G+C entre *M. psychrophilus* 20041 que estava abaixo de 1,0% e se tornou inconclusivo, porém em conjunto com os outros parâmetros de ANI, DDH, valor de Tetra inferior ao valor de corte de 0,989, permite inferir que a linhagem *Marinobacter* sp. ANT_B65 é uma possível nova espécie do gênero *Marinobacter*.

O uso da isDDH permitiu a descrição de uma nova espécie, a *Micromonospora zhangzhouensis*, produtora de um diterpenóide com atividade citotóxica (Fu *et al.*, 2020). Nesse estudo, além de atender aos critérios de taxonomia aplicados a sequências de genoma, foi possível correlacionar a bactéria ANT_B131 à espécie *Streptomyces albidoflavus* e inferir que a linhagem ANT_B65 é uma possível nova espécie do gênero *Marinobacter*, porém, uma análise polifásica é necessária para a descrição da nova espécie.

Tabela 5. Correlação de pares entre genomas completos de *S. albidoflavus* ANT_B131 e linhagens correlacionadas e *Marinobacter* sp. ANT_B65 e linhagens correlacionadas.

Correlação em pares dos genomas entre as linhagens mais próximas	ANIb (%)	ANI _m (%)	TETRA	isDDH	Diferença de %G+C
ANT_B131 x SM254	97.41	97.78	0.99961	79.50	0.17
ANT_B 131 x J1074	97.02	97.80	0.99952	79.60	0.15
ANT_B65 x CGMCC 1.10835	82.09	84.53	0.97526	26.10	1.21
ANT_B65 x 20041	73.51	74.51	0.81013	19.90	0.19
ANT_B65 x VT8	73.61	74.63	0.91585	19.10	3.62

SM254: *Streptomyces albidoflavus* SM254; J1074: *Streptomyces albidoflavus* J1074; CGMCC 1.10835: *Marinobacter antarcticus* CGMCC 1.10835; 20041: *Marinobacter psychrophilus* 20041; VT8: *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* VT8.

3.5. Genome mining

O *genome mining* das linhagens *Streptomyces albidoflavus* ANT_B131 e para a *Marinobacter* sp. ANT_B65 foi realizado utilizando o antiSMASH e curagem manual. Os resultados para cada linhagem foram apresentados e discutidos em tópicos distintos.

3.5.1. *Streptomyces albidoflavus* ANT_B131

O estudo do genoma da bactéria ANT_B131 revelou 24 BGCs. Os BGCs codificam policetídeos tipo I (5 de 24) e tipo III (1 de 24), peptídeos não-ribossomais (NRPs, 8 de 24), bacteriocinas (2 de 24), terpenos (4 de 24), sideróforos (2 de 24), compostos híbridos (4 de 24), ectoína, thiopeptídeo e lasso peptídeo (Figura 12; Tabela 6.).

Além da análise no antiSMASH, a curagem manual validou a identificação de três fragmentos de clusters relacionados à surugamida A/D (cluster 13, Tabela 6) e três relacionados a candicidina (cluster 19, Tabela 6). O cluster biossintético da surugamida A/D (Número de acesso MIBiG: BGC0001792) possui 82.441 pb e codifica os dois peptídeos não-ribossomais, surugamida A e surugamida D, que são moléculas descritas como antimicrobiana e antifúngica (Xu *et al.*, 2017). O BGC da candicidina (Número de acesso MIBiG: BGC0000034) possui 138.203 pb e seu metabólito correspondente mostrou atividade antimicrobiana frente à *Candida albicans* (Chen *et al.*, 2003).

As análises de bioinformática realizadas pelo antiSMASH, possibilitaram a predição de terpenos com alta similaridade de BGCs, como: hopeno (cluster 4, 100 % de similaridade), o composto volátil geosmina (cluster 8, 100 % de similaridade), o antibiótico sesquiterpeno albaflavenona (cluster 9, 100 % de similaridade), o carotenóide Isorenierateno (cluster 17, 75 % de similaridade), naringenina (cluster 18, 100 de similaridade) (Tabela 6). Albaflavenona e geosmina são responsáveis pelo forte odor nos estreptomicetos e estão relacionados à atividade antimicrobiana (Schöller *et al.*, 2002).

O antiSMASH identificou o cluster gênico de SGR PTMs (cluster 3, 100 % de similaridade) relacionado a macrolactama policíclica identificado inicialmente em *Streptomyces griseus*. Os clusters que codificam os metabólitos desferrioxamina B/E (cluster 15) e a ectoína (cluster 16) apresentaram 100% de similaridade entre os BGCs identificados com os bancos de dados. A desferrioxamine B é um agente quelante de Fe(III) e está associado a entrega de ferro para os micro-organismos (Raines *et al.*, 2015). Ectoína possibilita proteção contra o estresse osmótico (Prabhu *et al.*, 2004).

Também foram identificados clusters relacionados a antimicina (cluster 23, 80 % de similaridade). Este é um metabólito secundário produzido por diversas linhagens *Streptomyces* sp. e apresenta atividades citotóxica, antifúngica, antibiótica e anticâncer (Liu *et al.*, 2016). Os BGCs relacionados ao thiopeptídeos fluostatins M-Q (cluster 10) e PKS tipo I Pacificanona A (cluster 20) mostraram menos de 20 % de similaridade com as sequências dos bancos de dados.

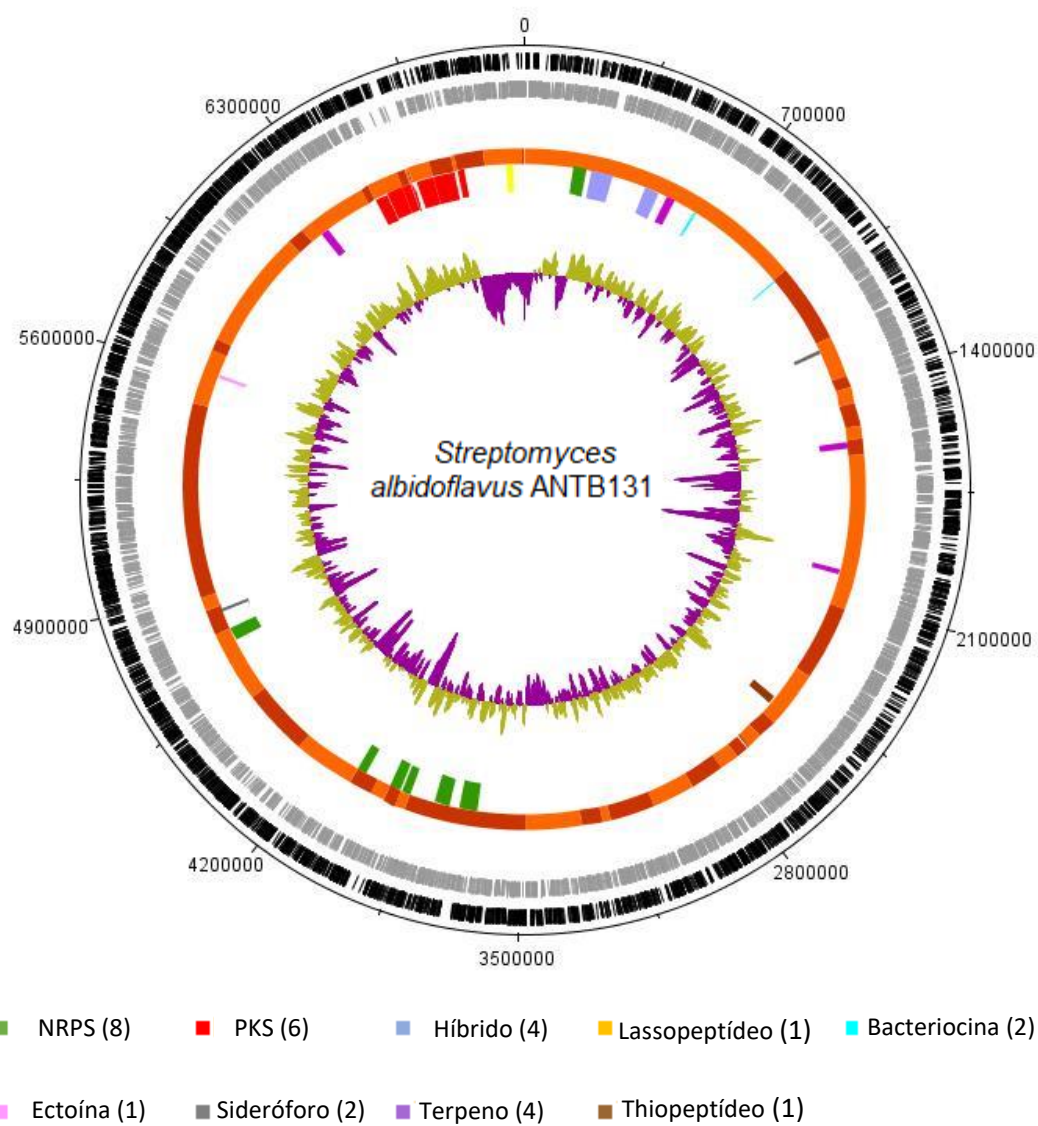


Figura 12. Genes relacionados aos metabólitos secundários preditos no genoma da *Streptomyces albidoflavus* ANT_B131. De fora para dentro: fitas de DNA *reverse* e *forward*; *contigs*; BGCs; Conteúdo de G+C. Tipos de BGCs são mostrados com diferentes cores de acordo com a legenda.

Tabela 6. BGCs identificados no genoma da *Streptomyces albidoflavus* ANT_B131.

Cluster	Localização do cluster	Tamanho do cluster (kb)	Tipo	Produto predito
1	Contig 79 (164714 a 210406)	45693	NRPS	Diisonitrile antibiótico SF2768
2	Contig 79 (229633a 304621)	74989	NRPS / Terpeno	Orfão
3	Contig 79 (423354 a 472764)	49411	NRPS / T1PKS	SGR PTMs
4	Contig 79 (503123 a 529681)	26559	Terpeno	Hopene
5	Contig 79 (608808 a 619023)	10216	Bacteriocina	Orfão
6	Contig 42 (6276 a 17604)	11329	Bacteriocina	Orfão
7	Contig 66 (20876 a 35889)	15013	Sideróforo	Orfão
8	Contig 104 (6303 a 28603)	22301	Terpeno / Outro	Geosmina
9	Contig 52 (386568 a 407620)	21053	Terpeno	Albaflavenona
10	Contig 2 (123277 a 155794)	32473	Thiopeptídeo	Fluostatinas M-Q
11	Contig 10 (163019 a 224651)	48914	NRPS	Orfão
12	Contig 10 (263300 a 313589)	62236	NRPS	Orfão
13	Contig 80 (1 a 29890)	29890	NRPS	Surugamida A / Surugamida D
	Contig 33 (1 a 41377)	41377	NRPS	Surugamida A / Surugamida D
	Contig 102 (46186 a 77679)	30893	NRPS	Surugamida A / Surugamida D
14	Contig 71 (189212 a 233561)	44395	NRPS	Orfão
15	Contig 83 (59655 a 71475)	11820	Sideróforo	Desferrioxamina B / Desferrioxamina E
16	Contig 81 (106501 a 116899)	10399	Ectoína	Ectoína
17	Contig 55 (39767 a 65616)	25849	Terpeno	Isorenieratena
18	Contig 85 (1860 a 42957)	41097	T3PKS	Naringenina
19	Contig 85 (47893 a 101940)	54047	T1PKS	Candacidina
	Contig 3 (1 a 22674)	22674	T1PKS	Candacidina
	Contig 25 (11507 a 70522)	59015	T1PKS	Candacidina
20	Contig 21 (1 a 31408)	31408	T1PKS	Pacificanona A
21	Contig 27 (1 a 5181)	5181	T1PKS	Orfão
22	Contig 40 (1 a 4749)	4749	T1PKS	Orfão
23	Contig 47 (1 a 74671)	74671	NRPS-T1PKS	Antimicina
24	Contig 22 (74379 a 96762)	22384	Lasso peptídeo	Orfão

Os dois genomas das linhagens relacionadas a *S. albidoflavus* ANT_B131, *S. albidoflavus* SM254 e *S. albidoflavus* J1074, estavam completos e montados em apenas um *scaffold*. Quando realizado o estudo dos genomas no antiSMASH, não houve nenhuma fragmentação de BGCs como pode ser observado no genoma da ANT_B131 que contém 49 *contigs*. Foram encontradas similaridades no número de BGCs e no tipo. A identificação de BGCs (Figura 13) indicou tipos comuns de clusters entre as três cepas, como NRPS, PKS, híbridos de PKS-NRPS, terpenos e sideróforos. Os metabólitos hopeno, geosmina, surugamida A/D, desferrioxamina B, candicina, ectoína, isorenieratene e SGR-PTM foram identificados em todos os genomas, com similaridade com o banco de dados acima de 75%.

BGCs relacionados a RiPPs, como lanthipeptídeos, thiopeptídeos e bacteriocinas também foram encontrados. Porém, a análise no BLAST não mostrou similaridade entre os RiPPs das três linhagens, indicando que são BGCs únicos para cada micro-organismo. Essa novidade pode revelar que os BGCs relacionados aos clusters órfãos de bacteriocinas, lasso peptídeo e thiopeptídeo (clusters 6, 10, 28, e 30) presentes no genoma da ANT_B131 podem codificar novas moléculas com atividades biológicas desconhecidas.

As três cepas mostraram uma porcentagem parecida do genoma atribuído aos clusters biossintéticos envolvidos na produção de metabólitos secundários. *Streptomyces albidoflavus* ANT_B131 possui 13,3% (925.376 pb) do seu genoma relacionado ao metabolismo secundário, *S. albidoflavus* SM254, tamanho do genoma de 7.170.505 pb, atribui 13,8% e *S. albidoflavus* J1074, tamanho do genoma de 6.841.649 pb, atribui 13,0% do seu genoma.

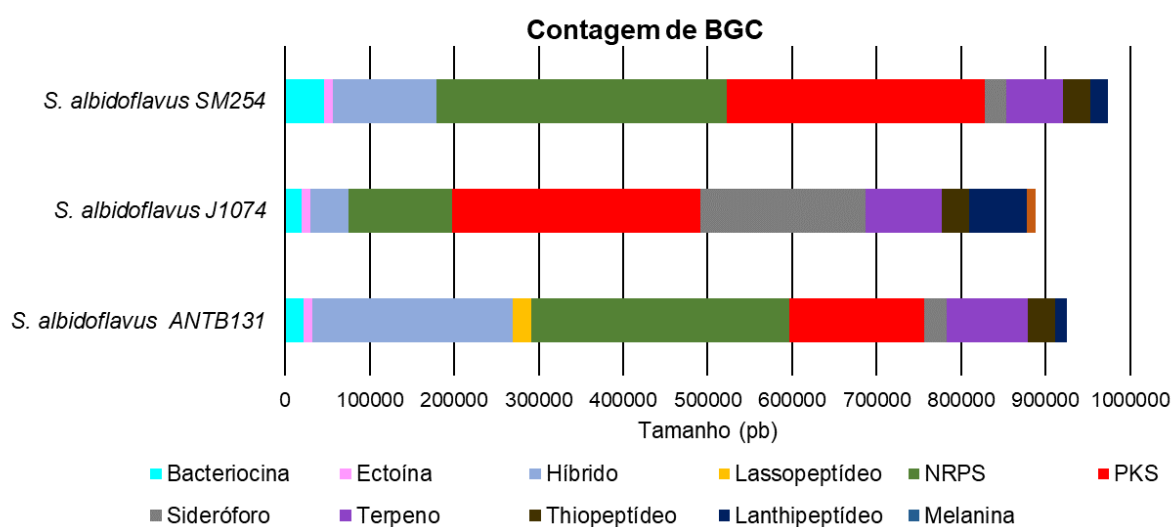


Figura 13. BGCs identificados nos genomas das linhagens de *Streptomyces albidoflavus* utilizando antiSMASH. Tipos de BGC identificado por diferentes cores.

3.5.2. *Marinobacter* sp. ANT_B65

O sequenciamento, montagem, anotação e análise de BGCs relacionados à produção de produtos naturais foi abordado no artigo publicado “Draft Genome Sequence of *Marinobacter* sp. Strain ANT_B65 Isolated from Antarctic Marine Sponge” (de França, Camilo e Fantinatti-Garboginni, 2018) (Anexo II).

A abordagem do *genome mining* da bactéria *Marinobacter* sp. identificou 3 BGCs, dentre os quais estão uma ectoína (cluster 1) e duas betalactonas (cluster 2 e cluster 3) (Tabela 7).

O cluster 1, identificado como uma ectoína, tem tamanho de 10396 pb e não apresentou similaridade com o banco de dados MiBIG (Figura 14 A). Porém, esse BGC apresenta similaridade de 100% com o BGC identificado no genoma da *M. antarcticus* CGMCC 1.10835 quando realizada a análise utilizando o ClusterBlast (Figura 14 B).

O cluster 2, identificado como uma betalactona, relacionou o produto do BGC com plipastatina, apresentando 15% de similaridade entre os clusters. Esse composto é um lipopeptídeo cíclico com atividade antifúngica, cujo BGC, de 49123 pb, foi descrito na bactéria *Bacillus subtilis* XF-1 (Li *et al.*, 2012) (Figura 14 C). Devido à baixa similaridade com o BGC da plipastatina, este foi considerado um cluster órfão.

O último cluster identificado no genoma da *Marinobacter* sp. ANT_B65, cluster 3, também se refere a uma betalactona e não apresentou similaridade com BGC relacionado a metabólitos secundários descritos na literatura. No gene relacionado ao transporte, foi anotada a presença do gene de resistência à antibióticos *msbA* (Figura 14 D). Esse é um gene que confere resistência através do mecanismo de efluxo do antibiótico, atuando principalmente na classe de antibióticos nitroimidazols (Li e Nikaído, 2009). A presença de um gene de resistência a antibióticos em um BGC se torna alvo de investigação, uma vez que para evitar a própria morte, uma bactéria produtora de antibióticos possui genes de resistência no próprio BGC responsável por codificar o antibiótico. Dessa forma, muitos servidores focados em anotar genes de resistência à antibióticos tem se unido à plataforma do antiSMASH (Alanjary *et al.*, 2017). A presença do gene *msbA* indica o potencial desse BGC como produtor de antibióticos. Além disso, o BGC apresentou similaridade inferior a 20% com outros BGCs de micro-organismos na análise do ClusterBlast, o que indica o potencial de ser um novo BGC que codifica um antibiótico desconhecido.

Tabela 7. BGCs identificados no genoma da *Marinobacter* sp. ANT_B65.

Cluster	Localização do cluster	Tamanho do cluster (pb)	Tipo	Produto predito
1	Contig 17 (319940 a 330335)	10396	Ectoína	Órfão
2	Contig 8 (283304 a 314662)	31359	Betalactona	Órfão
3	Contig 14 (1276098 a 1300106)	24009	Betalactona	Órfão

A análise comparativa de metabólitos secundários dos três genomas de *Marinobacter*, incluiu a linhagem desse estudo *Marinobacter* sp. ANT_B65, *M. antarcticus* CGMCC 1.10835 e *M. hydrocarbonoclasticus* VT8 (Figura 15). *M. antarcticus* e ANT_B65 apresentaram os mesmos tipos de clusters, uma ectoína e duas betalactonas. Apesar da análise do ClusterBlast não identificar similaridade entre as betalactonas identificadas nas linhagens, o tamanho dos clusters 2 e 3 com os clusters de betalactona variaram em 10 nucleotídeos, e não há registro de produtos naturais produzidos pela espécie *Marinobacter antarcticus*. Esta espécie é conhecida apenas como halotolerante (Liu *et al.*, 2012) e, apresenta proteção frente ao estresse osmótico (Prabhu *et al.*, 2004).

M. hydrocarbonoclasticus VT8 apresenta cinco BGCs, sendo três deles relacionados a ectoínas, uma betalactona e o sideróforo. Este último parece estar relacionado a produção de petrobactina (Barbeau *et al.*, 2002), porém não houve similaridade com o cluster descrito no MiBIG.

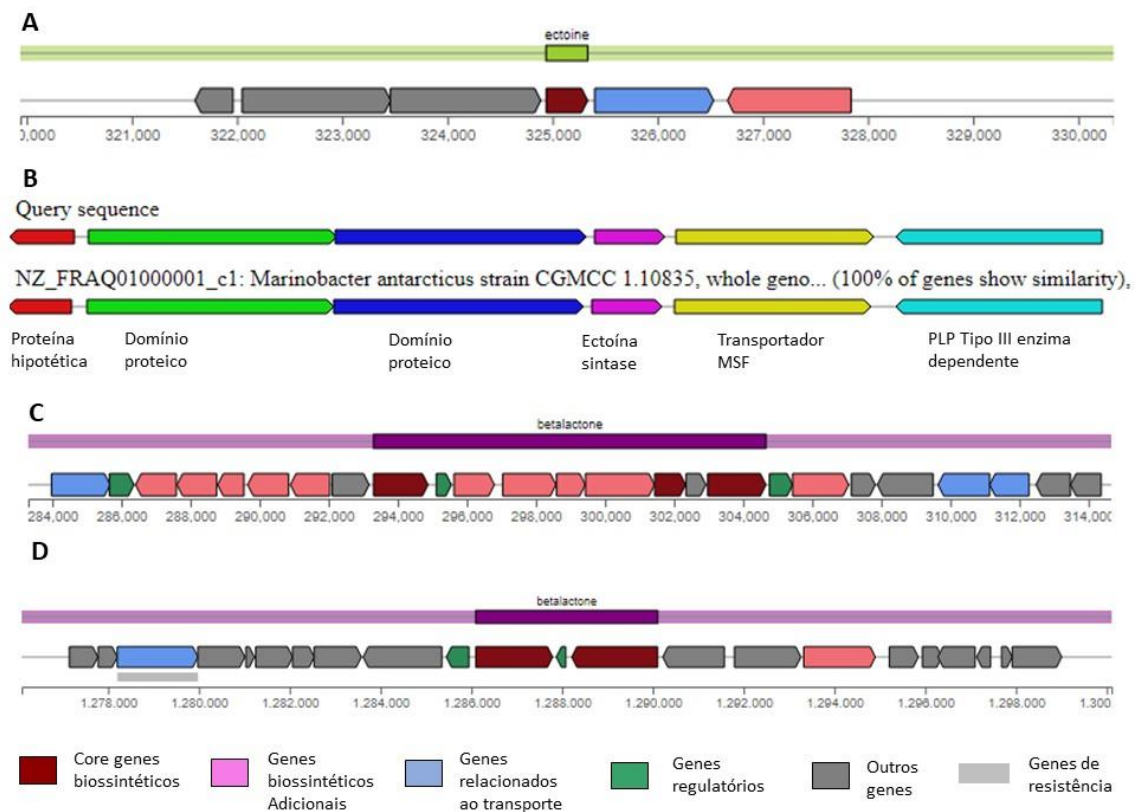


Figura 14. Clusters biossintéticos identificados no genoma da bactéria *Marinobacter* sp. ANT_B65. (A) Cluster 1 identificado como ectoína; (B) Cluster identificado na *M. antarcticus* CGMCC 1.10835 similar ao cluster 1 (C) Cluster 2 identificado como betalactona da ANT_B65 (D) Cluster 3 identificado como betalactona da ANT_B65.

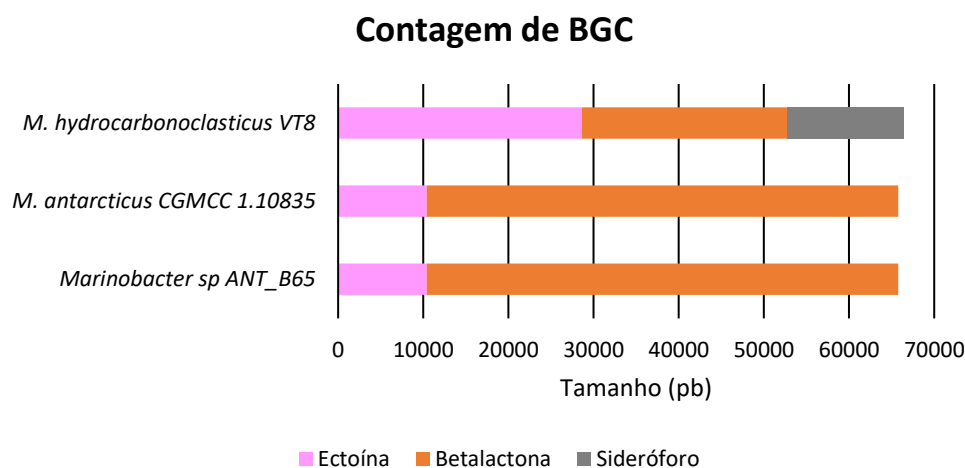


Figura 15. BGCs identificados nos genomas das linhagens do gênero *Marinobacter* utilizando antiSMASH. Tipos de BGC identificado por diferentes cores.

4. CONCLUSÕES

O estudo dos genomas das bactérias da Antártica permitiu uma análise taxonômica das linhagens e a exploração do potencial genômico para a produção de produtos naturais.

Na taxonomia, foi possível relacionar a bactéria ANT_B131 à espécie *Streptomyces albidoflavus* e através da *isDDH* foi possível confirmar essa análise. Também foi possível identificar que a bactéria ANT_B65 é uma possível nova espécie do gênero *Marinobacter* e que está mais proximamente relacionada à *M. antarcticus*. Dessa forma, o sequenciamento do genoma possibilitou que fossem realizadas anotações de genes além da *isDDH* que reduziu o tempo de bancada realizando técnicas laboriosas, como a hibridização DNA-DNA. Além disso, permitiu a comparação com outros genomas, apenas tendo o acesso a banco de dados de genomas.

A análise de BGCs relacionados à produção de metabólitos secundários foi promissora para as duas bactérias avaliadas. A *S. albidoflavus* ANT_B131 possui um genoma com diversas classes de BGCs (total 24) que codificam diferentes moléculas conhecidas, porém existe o potencial de descoberta de novos metabólitos secundários originados de RiPPs, além de diversos clusters órfão ou com baixa similaridade com BGCs conhecidos. Quanto à *Marinobacter* sp. ANT_B65, foram identificados três BGCs, que podem ser capazes de produzir novos produtos naturais bioativos.

Capítulo 2. Atividade antimicrobiana e antiproliferativa dos extratos brutos e frações de *Streptomyces albidoflavus* ANT_B131 e *Marinobacter* sp. ANT_B65.

1. INTRODUÇÃO

A instrumentação analítica, especialmente a Espectrometria de Massa (MS), tem permitido que extratos de metabólitos de alta complexidade sejam investigados. Como resultado, as tecnologias metabolômicas baseadas em MS têm sido amplamente aplicadas no campo de produtos naturais. No entanto, a complexidade química e a diversidade dos extratos de produtos naturais muitas vezes tornam a atribuição de informações estruturais a sinais metabolômicos (anotação de metabólitos) e a elucidação estrutural de metabólitos (identificação de metabólitos) processos muito desafiadores (Ernst *et al.*, 2019; Hooft *et al.*, 2020).

Em estudos de metabolômica baseados em espectrometria de massa, várias formas de aquisição de dados são possíveis, cada uma com suas próprias vantagens e desvantagens. Adquirir espectros de fragmentação de metabólitos (MS / MS ou modo MS em tandem) tem vantagens distintas para anotar e identificar metabólitos. Esses espectros MS/MS podem ser considerados como códigos de barras ou impressões digitais de metabólitos, e várias ferramentas de software foram desenvolvidas para explorar essas informações estruturais. Uma etapa inicial é geralmente comparar os espectros experimentais de MS/MS com os espectros da biblioteca para detectar metabólitos conhecidos, ou seus análogos, um processo também conhecido como desreplicação. A confiabilidade deste procedimento de correspondência é dependente de muitos fatores que incluem qualidade de dados experimentais e conteúdo de banco de dados espectral que difere de banco de dados para banco de dados. Portanto, é aconselhável verificar os resultados em vários bancos de dados. Além disso, embora as bibliotecas espectrais estejam crescendo atualmente, seus conteúdos estão longe de cobrir completamente o metaboloma do produto natural (Hooft *et al.*, 2020). Por exemplo, as bibliotecas espectrais GNPS atualmente contêm espectros de referência MS/MS para cerca de 2,5% dos produtos naturais conhecidos (Silva, Dorrestein e Quinn, 2015). Um único extrato pode conter milhares de metabólitos, com experimentos que consistem rotineiramente em centenas de amostras. Portanto, não é surpreendente que para a maioria desses metabólitos não haja dados de referência disponíveis, deixando muitos sinais metabolômicos incomparáveis. Portanto, apesar da riqueza de dados de MS não direcionados gerados, a anotação continua sendo um desafio. Na prática, menos de cinco por cento do total de entidades químicas em uma amostra pode ser anotado de forma confiável no nível estrutural (Palazzotto e Weber, 2018; Hooft *et al.*, 2020).

O Molecular Networking (Rede Molecular) realizado na plataforma *Global Natural Product Social* (GNPS) melhorou a comparação espectral dentro e entre as amostras. Metabólitos com uma arquitetura química semelhante produzem espectros de fragmentação semelhantes. A rede molecular agrupa íons pais (representados por nós) por semelhança de padrão de fragmentação (representada por *edges*) para formar famílias moleculares (MFs) de metabólitos relacionados. Isso facilita a análise de grandes conjuntos de dados, também em vários organismos, já que as redes moleculares podem ser usadas para encontrar metabólitos relacionados a uma molécula de interesse conhecida ou para correlacionar a presença de um MF a, por exemplo, uma atividade biológica (Wang *et al.*, 2016).

Nesta etapa do estudo foi proposto a produção de extratos brutos e frações, a partir do crescimento bacteriano, para avaliação da atividade antimicrobiana e antiproliferativa frente a diferentes linhagens de células humanas tumorais e a identificação de metabólitos ativos utilizando *Molecular Networking*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Produção de extratos brutos

Um pré-inóculo das bactérias foi obtido selecionando colônias puras e inoculando em 15 mL de meio Nutrient Broth (NB, DifcoTM) com ASW e incubado na temperatura de 28°C por 24 a 48 h sem agitação. Após o crescimento bacteriano, o volume total foi transferido para um Erlenmeyer contendo 80 mL do meio e mantido nas mesmas condições de cultivo. Novamente, 80 mL do crescimento bacteriano foram transferidos para os frascos contendo 500 mL de NB-ASW e mantido a 28 ° C por um período de sete (7) dias.

Ao crescimento bacteriano descrito anteriormente foram adicionados 300 mL de acetato de etila e agitados no ultra-turrax a 7.000 rpm durante 6 min. Os extratos brutos foram obtidos pelo método de separação líquido-líquido em funil de separação. Após a separação das fases orgânicas e aquosas, a fase orgânica foi transferida para um balão de fundo redondo de 1 L. Foram adicionados mais 300 mL de acetato de etila à fase aquosa e, repetido o processo de separação por duas vezes. Os extratos brutos foram concentrados em rotaevaporador (Rotavapor R-215 Buchi) a vácuo na temperatura de 35 °C, até completa secagem do solvente. Para a divisão do extrato bruto, foi adicionado o solvente e dividido em três frascos de vidro, os quais foram concentrados em rotaevaporador, sob as mesmas condições. As amostras foram encaminhadas para os testes de avaliação quantitativa de atividade antimicrobiana e atividade antiproliferativa frente às linhagens de células humanas tumorais.

2.2. Avaliação da atividade antiproliferativa dos extratos brutos

Os extratos brutos bacterianos produzidos pelas linhagens *Streptomyces albidoflavus* ANT_B131 e *Marinobacter* sp. ANT_B65 foram encaminhados para o ensaio de atividade antiproliferativa junto ao laboratório da Dra. Ana Lúcia Tasca Góis Ruiz pesquisadora da Faculdade de Farmácia, UNICAMP.

A atividade antiproliferativa foi realizada frente a um painel de células tumorais humanas de glioblastoma (U251), adenocarcinoma de mama humano (MCF-7), adenocarcinoma de ovário resistente à múltiplas drogas (NCI/ADR-RES), carcinoma de pulmão (NCI-H460), adenocarcinoma de rim (786-0), adenocarcinoma de próstata (PC-3), adenocarcinoma de cólon (HT-29), leucemia mieloide crônica (K-562) e célula não tumoral (HaCat, imortalizada de queratinócitos) conforme metodologia estabelecida no laboratório (Monks *et al.*, 1991).

As linhagens de células humanas tumorais cresceram no meio completo, RPMI 1640 suplementado com a mistura de 5% de soro fetal bovino e 1% de penicilina/estreptomicina (1,000 UI:1,000 µg. mL⁻¹), a 37 °C e 5% CO₂ em uma atmosfera umidificada. As células humanas tumorais e não-tumorais foram cedidas por Frederick Cancer Research & Development Center (National Cancer Institute, EUA), e Dr. Ricardo Della Colleta (UNICAMP).

Os extratos brutos das bactérias *Streptomyces albidoflavus* ANT_B131 e *Marinobacter* sp. ANT_B65 foram solubilizados em dimetilsulfóxido (100 mg. mL⁻¹) seguido pela diluição seriada em meio completo chegando nas concentrações finais de 0,25, 2,5, 25 e 250 µg.mL⁻¹. A doxorubicina foi diluída seguindo o mesmo protocolo e usada como controle positivo nas concentrações finais de 0,025, 0,25, 2,5 e 25 µg. mL⁻¹. O meio completo foi usado como controle negativo. O GI₅₀ indica a concentração (µg. mL⁻¹) em que o extrato bruto reduziu 50% da proliferação celular.

2.3. Avaliação da atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana dos extratos brutos e frações foi realizada afim de determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Bactericida Mínima (CBM) de acordo com o protocolo do Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI) (Rex *et al.*, 2008; Carpenter *et al.*, 2018; Weinstein *et al.*, 2018).

Os extratos brutos foram solubilizados em meio Muller-Hinton caldo (BD Difco™) e avaliados nas concentrações de 0,0078 a 2,0 mg. mL⁻¹. Os extratos bacterianos foram testados

frente às bactérias *Bacillus subtilis* ATCC 6051, *Micrococcus luteus* ATCC 4698, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 e frente ao fungo *Candida albicans* ATCC10231. As linhagens testadas foram cedidas pela Dr. Marta Cristina Teixeira Duarte, da Divisão de Microbiologia (CPQBA/UNICAMP). Os micro-organismos preservados em meios de cultura específicos foram repicados, em meio Mueller-Hinton para as bactérias e meio RPMI-1640 para a levedura, 24 h antes dos ensaios de atividade antimicrobiana e mantidos em estufa a 36 °C para crescimento.

A Concentração Bactericida Mínima (CBM) foi determinada ao avaliar o crescimento dos micro-organismos indicadores em meio de cultivo sólido, Mueller-Hinton Ágar para bactérias e meio Sabourad Dextrose Ágar para *C. albicans*. Após ser obtido o resultado da CIM, um conteúdo de cada poço foi coletado com alça de platina e semeado no meio de cultivo específico. Após 24 a 36 h, foi avaliado o crescimento dos micro-organismos em cada poço. O resultado foi obtido após verificar uma concentração mínima do extrato bruto do qual não foi observado o crescimento de micro-organismos.

O meio de cultivo foi utilizado como controle negativo. Os extratos brutos foram incubados sem micro-organismo para verificar qualquer tipo de contaminação e a viabilidade das células foi confirmada durante o ensaio. O ensaio foi realizado em triplicata.

2.4. Fracionamento de extratos brutos

Esta etapa foi realizada em colaboração do Prof. Dr. Marcos José Salvador no Departamento de Biologia Vegetal no Instituto de Biologia da UNICAMP.

Após a verificação da atividade biológica dos extratos bacterianos, o extrato bruto da *Streptomyces albidoflavus* ANT_B131 foi fracionado. O fracionamento se deu através de uma coluna cromatográfica a vácuo, empacotada de C18. O extrato bruto foi solubilizado em metanol.

As fases móveis utilizadas para o processo de fracionamento foram: água (H₂O); água: metanol (H₂O: MeOH) (1:1 v/v); metanol e ácido acético glacial (MeOH: AcOH) (9:1 v/v); e acetato de etila (AcOEt). As frações foram secas sob vácuo em rotaevaporador (Buchi® R-215) a 35 °C. Os extratos passaram por análise em LC-MS/MS e foram testados quanto atividade antimicrobiana.

2.5. Análise de Espectrometria de Massa e *Molecular Networking*

Esta etapa foi realizada em colaboração da Profa. Dra. Taícia Pacheco Fill no laboratório de Biologia Química Microbiana no Instituto de Química da UNICAMP.

Os extratos brutos foram diluídos em metanol e analisados por HPLC-ESI-MS / MS Agilent 6550 série Q-TOF (G6550A) Dual AJS ESI. Os parâmetros foram ajustados em modo positivo, voltagem capilar de 3,5 kV, temperatura capilar de entrada de 290 ° C. O método TIC (Total Ion Chromatogram) foi selecionado para uma varredura geral na faixa de massa de 100–1700 *m/z*. O volume de injeção das amostras foi de 2 µL. A fase estacionária utilizada foi coluna Agilent 1260 Infinity C18 (2,1 mm x 100 mm). A fase móvel: ácido fórmico 0,1% (A) e acetonitrila (B). O perfil de eluente (A: B) 0-11 min, em gradiente de 2:98 a 95: 5; mantida por 5 min. Taxa de fluxo: 0,3 mL min⁻¹. MS / MS foi realizado por dissociação induzida por colisão (CID) com intervalo *m/z* de 100-1500 e a energia de colisão de 30 V. Os dados foram processados com o software MassHunter Qualitative Analysis B.07.00.

Os dados adquiridos de ESI-MS / MS foram submetidos a msConvert (Chambers *et al.*, 2012) para converter os arquivos para o formato .mzXML e foram analisados por *Molecular Networking* no servidor *Global Natural Products Social Molecular Networking* (GNPS) (Wang *et al.*, 2016). Uma rede molecular dos extratos brutos e frações foi criada usando o fluxo de trabalho online (<https://ccms-ucsd.github.io/GNPSDocumentation/>) no site GNPS (<http://gnps.ucsd.edu>). Os espectros de MS/MS foram filtrados por janela escolhendo apenas os 6 íons de fragmento superiores na janela de +/- 50Da em todo o espectro. A tolerância de massa do íon precursor foi fixada em 0,02 Da e uma tolerância de fragmento de íon MS/MS de 0,02 Da. Uma rede foi criada onde as bordas foram filtradas para ter uma pontuação de cosine acima de 0,5 e mais de 5 picos correspondentes. Além disso, as bordas entre dois nós foram mantidas na rede se, e somente se, cada um dos nós apareceu nos respectivos 10 nós mais semelhantes. Finalmente, o tamanho máximo de uma família molecular foi definido como 100, e as bordas de pontuação mais baixas foram removidas das famílias moleculares até que o tamanho da família molecular estivesse abaixo desse limite. Os espectros na rede foram então pesquisados nas bibliotecas espectrais do GNPS. Os espectros da biblioteca foram filtrados da mesma maneira que os dados de entrada. Todas as correspondências mantidas entre espectros de rede e espectros de biblioteca deveriam ter uma pontuação acima de 0,5 e pelo menos 5 picos combinados (Wang *et al.*, 2016). As redes espectrais foram importadas e visualizadas usando Cytoscape 3.8.0 software (<https://cytoscape.org/>).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Atividade antiproliferativa

O extrato bruto da *Streptomyces albidoflavus* ANTB_131 apresentou atividade antiproliferativa frente à sete linhagens (Figura 16 A). A atividade citostática do extrato bruto foi observada contra as linhagens celulares: glioblastoma U251 (GI_{50} 17,2 $\mu\text{L.mL}^{-1}$), adenocarcinoma de mama humano MCF-7 (GI_{50} 195,3 $\mu\text{L.mL}^{-1}$), carcinoma de células do pulmão NCI-H460 (GI_{50} 0,35 $\mu\text{L.mL}^{-1}$), adenocarcinoma de rim 786-0 (GI_{50} 27,7 $\mu\text{L.mL}^{-1}$) e próstata PC-3 (GI_{50} 24,8 $\mu\text{L.mL}^{-1}$) (Tabela 8). O GI_{50} representa concentração, em microgramas por mililitros, de substância necessária para reduzir em 50% a proliferação celular. Os valores de GI_{50} obtidos pela doxorrubicina variaram de 0,025 a 0,41 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ (Tabela 8). Em comparação com a doxorrubicina (Figura 16 C), um composto isolado e purificado, o extrato bruto da ANT_B131 apresentou resultados promissores de GI_{50} , uma vez que um extrato bruto pode conter diversas moléculas agindo em sinergia para apresentar a atividade antiproliferativa observada, assim como uma ou mais moléculas diluídas na diversidade química pode ser encontrada em um extrato. Dessa forma, esforços foram realizados a fim de fracionar o extrato bruto da *Streptomyces albidoflavus* ANT_B131.

Cabe salientar que além da atividade antiproliferativa relatada neste estudo, o mesmo extrato bruto apresentou atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas, *Staphylococcus aureus* (CIM 2,0 mg.mL⁻¹), *Bacillus subtilis* (CIM 0,5 mg.mL⁻¹), *Micrococcus luteus* (CIM 0,25 mg.mL⁻¹), Gram-negativas *Neisseria meningitidis* (CIM 1,50 a 2,0 mg.mL⁻¹), e contra a levedura *Candida albicans* (CIM 1,50 mg.mL⁻¹) em estudos anteriores realizados pelo nosso grupo (Tabela 1).

Durante a análise de *genome mining* foram identificados possíveis BGCs que estariam relacionados às atividades antiproliferativa e antimicrobiana reveladas nos extratos brutos, como as surugamidas A e D, naringenina, antimicina e desferrioxamina B. A surugamida A foi reportada com atividade antifúngica contra *Saccharomyces cerevisiae* e expressa por *Streptomyces albidoflavus* J1074 (Xu *et al.*, 2017), também foi observada a atividade antibacteriana dessa molécula frente a *Staphylococcus aureus* (CIM 10 μM) (Wang *et al.*, 2014), além da inibição da catepsina B bovina (IC_{50} 21 μM) (Takada *et al.*, 2013). Essa é uma protease cisteína que implica na invasão em células tumorais metastáticas (Takada *et al.*, 2013). A surugamida D mostrou atividade frente a catepsina B bovina (IC_{50} 18 μM) (Takada *et al.*, 2013).

A naringenina é um flavonoide, originalmente descoberto em plantas cítricas, mas cujo BGC foi descrito em uma cepa de *Streptomyces* (Álvarez *et al.*, 2015), e teve investigado seu potencial de inibir o crescimento de linhagens de células humanas tumorais de mama, cólon, gástrico e próstata (Kim e Park, 2013). Estudos também mostraram o potencial da naringenina como um uso terapêutico para o mal de Alzheimer (Yang, Kuboyama e Tohda, 2017). A antimicina mostrou atividade antifúngica contra *Candida utilis* (Hosotani *et al.*, 2005). A atividade antimicrobiana da desferrioxamina B foi relatada contra *E. coli* inibindo a motilidade bacteriana (Maruyama *et al.*, 1975). A desferrioxamina E ou nocardamine possui fraca atividade antimicrobiana frente a *E. faecium* e *B. subtilis* e inibiu a formação de colônias em células de melanoma (IC₅₀ 12 a 18 µM) (Kalinovskaya *et al.*, 2011).

O extrato bruto da *Marinobacter* sp. ANT_B65 não apresentou atividade antiproliferativa frente as células humanas tumorais, não sendo possível observar a redução de 50% da proliferação celular (IG₅₀) (Figura 16 B) e determinar o valor do IG₅₀. (Tabela 8).

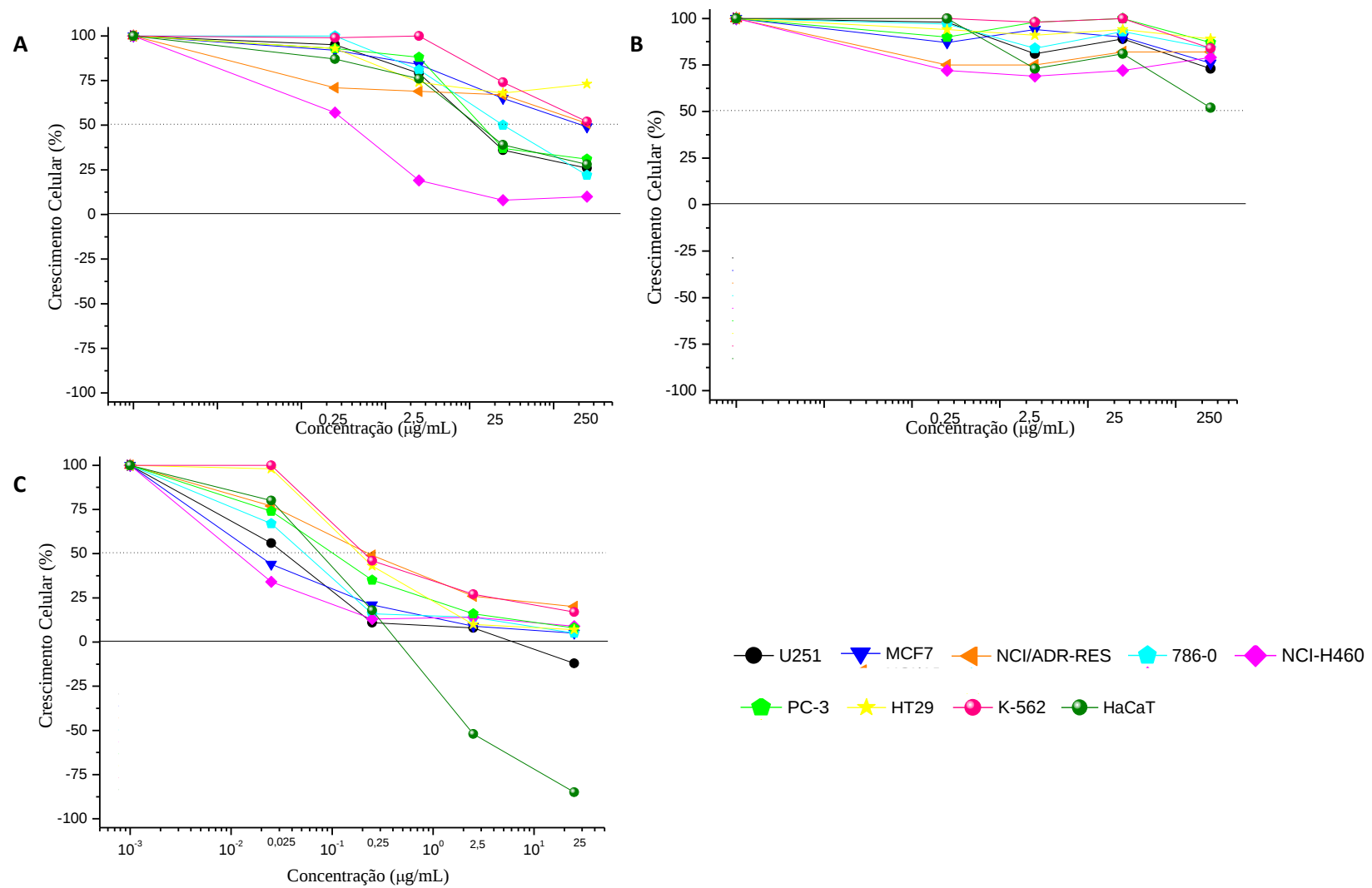


Figura 16. Atividade antiproliferativa em linhagens de células humanas tumorais. (A) Extrato bruto de *Streptomyces albidoflavus*. ANT_B_131 (B) Extrato bruto de *Marinobacter* sp. ANT_B_65 (C) Controle positivo doxorubicina.

Tabela 8. Atividade antiproliferativa dos extratos brutos de *S. albidoflavus* ANT_B131, *Marinobacter* sp ANT_B65 e do controle positivo doxorrubicina. Valores referentes a concentração efetiva (GI₅₀).

	U251	MCF7	NCI- ADR/RES	786-0	NCI- H460	PC-3	HT29	K562	HaCaT
Doxorrubicina	0,031	< 0,025	0,29	0,052	< 0,025	0,11	0,21	0,41	0,069
ANT_B131	17,2	195,3	>250	27,7	0,35	24,8	>250	>250	18,0
ANT_B65	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250

Linhagens humanas tumorais: U251 (glioma), MCF7 (mama); NCI-ADR/RES (ovário com fenótipo de resistência a múltiplas células); 786-0 (rim); NCI-H460 (pulmão tipo não pequenas células); PC-3 (próstata); HT29 (cólon); K562 (leucemia). Linhagem não tumoral humana: HaCaT (queratinócitos imortalizados). GI₅₀ (μg. mL⁻¹): concentração, expressa em microgramas por mililitros, de substância necessária para reduzir em 50% a proliferação celular.

3.2. Identificação de compostos químicos nos extratos brutos e frações

3.2.1. Extratos brutos

A análise do *Classical Molecular Networking* pelo GNPS permite a identificação de compostos relacionados aos extratos brutos. GNPS fornece os processamento, análise ou identificação de dados de espectrometria de massa (MS/MS) de um conjunto de dados e compara os dados com todos os dados disponíveis publicamente (Wang *et al.*, 2016). Para gerar redes, o Molecular Networking utiliza os dados MS/MS. Os nós (*nodes*), na rede, representam moléculas e as arestas (*edges*) representam similaridade espectral entre pares de moléculas (Ziemert, Weber e Medema, 2020).

O ensaio por LC-ESI-MS/MS do extrato bruto da *Marinobacter* sp. ANT_B65, foi realizado e constatou-se a presença de dois íons que se destacavam por aparecer com mais frequência: 685,4416 *m/z* e 629,3774 *m/z*. A análise no GNPS, disponível em [ProteoSAFe/status.jsp?task=49623493cc6b4096ac1f0c6df73fd797](https://proteosafe.status.jsp?task=49623493cc6b4096ac1f0c6df73fd797), possibilitou a obtenção de uma rede molecular com 1033 nós, sendo que três (3) deles apresentaram identificação através do GNPS. Dentre eles, destaca-se o composto **1**, [3-acetyloxy-6-[(5S,8R,9S,12S,14S,17R)-3,7-diacetyloxy-12-hydroxy-10,13-dimethyl-2,3,4,5,6,7,8,9,11,12,14,15,16,17-tetradecahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-17-yl]heptyl] acetate, (Figura 17 A e B), o único não encontrado no controle negativo, ou seja, no meio de cultivo sem crescimento bacteriano. O composto **1** (C₃₄H₅₄O₉) apresenta a *m/z* 606,3767 e o íon [M+Na]⁺ seria portanto 629,3665 *m/z*, dessa forma, o erro da massa fica acima de 5 ppm, impedindo que se confirme que se trata desse composto. De acordo com a literatura consultada, o composto **1** não tem nenhuma atividade biológica a ele associada.

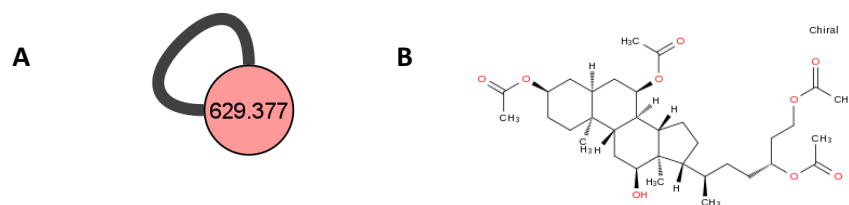


Figura 17. Molecular Networking realizado no servidor GNPS com dados de espectro de massas de LC-ESI-MS/MS do extrato bruto da *Marinobacter* sp. ANT_B65. (A) Nó do composto **1** identificado pelo GNPS; (B) Fórmula estrutural do composto **1**.

Para o extrato bruto da *Streptomyces albidoflavus* ANT_B131, análise no GNPS, disponível em ProteoSAFe/status.jsp?task=6adea4f132ef4389ab86f1fc4ad609c6 possibilitou a obtenção de uma rede molecular com 1798 nós, sendo que sete (7) deles apresentaram identificação através do GNPS. Três compostos foram identificados apenas no extrato bruto: o composto **1**, octadecanamida (Figura 18 A), o composto **2**, 4-(3,4-dihydroxyphenyl)-7-hydroxy-5-[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxychromen-2-ona (Figura 18 B), e o composto **3**, harmane (Figura 18 C). O MS/MS mirror match entre os espectros de massas do GNPS e do composto identificado no extrato bruto podem ser encontrados nos Anexos (III, IV, V) para os compostos **1**, **2** e **3**, respectivamente. De acordo com a literatura consultada, não há atividade biológica associada aos compostos listados.

Avaliando os dados de LC-ESI-MS/MS foi possível constatar o íon $[H+Na]^+$ 934,6146 m/z do composto predito pelo antiSMASH surugamida A (Figura 18 D). Devido à identificação desse íon, foi realizada uma nova análise no extrato bruto, utilizando o target dos íons da surugamida A $[H+Na]^+$ 934 m/z e $[H+H]^+$ 912 m/z . Nessa análise, foi possível identificar a surugamida A (Figura 19). Esse resultado indica que as condições de cultivo do meio NB-ASW possibilitaram obter a expressão desse BGC predito pelo antiSMASH e a extração líquido-líquido utilizando o acetato de etila como solvente, possibilitou a recuperação do composto.

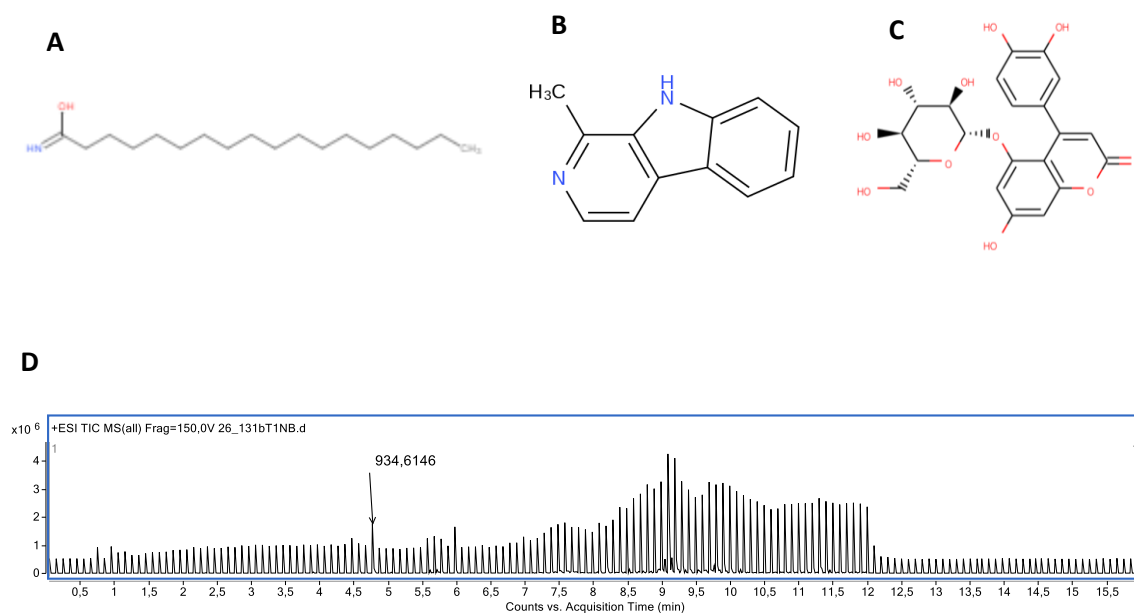


Figura 18. Desreplicação e Molecular Networking realizado no servidor GNPS com dados de espectro de massas de LC-ESI-MS/MS do extrato bruto da *Streptomyces albidoflavus* ANT_B131: (A) Fórmula estrutural do composto 1, (B) composto 2, e (C) composto 3 identificados pelo GNPS; (D) Espectro MS/MS mostrando a massa molecular 934,6146 m/z associada a surugamida A.

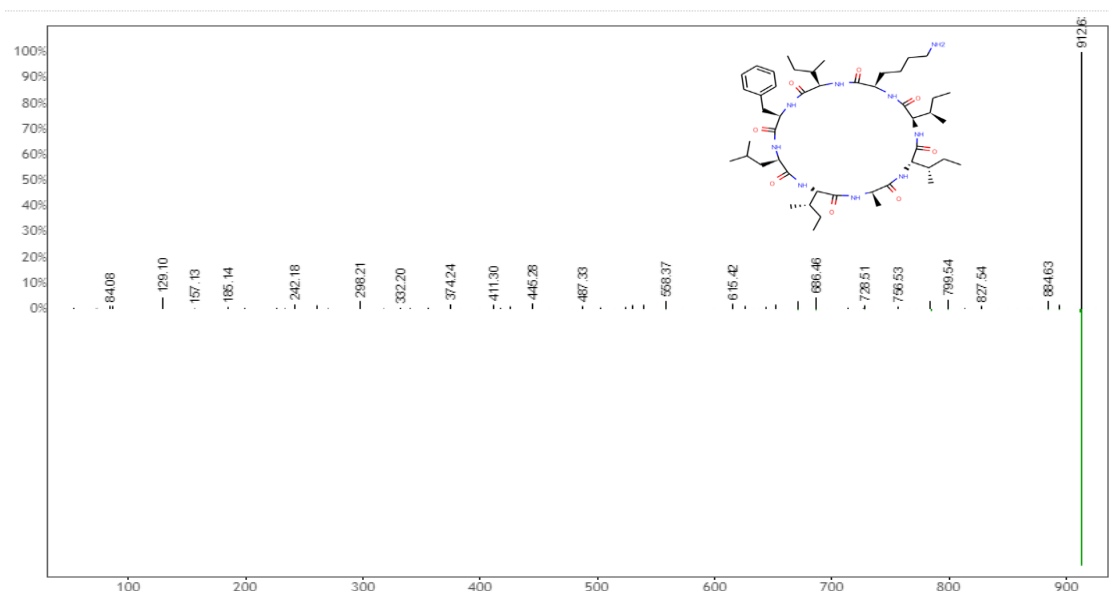


Figura 19. MS/MS mirror match da surugamida A entre a base de dados do GNPS (verde) e extrato bruto da *S. albidoflavus* ANT_B131 (preto).

3.2.2. Frações do extrato bruto de *Streptomyces albidoflavus* ANT_B131

As quatro frações obtidas foram avaliadas quanto à atividade antimicrobiana. Porém, a atividade frente aos micro-organismos indicadores foi menor do que a obtida pelo extrato bruto (Tabela 9). Essa resposta pode ser observada devido ao fato dos extratos brutos conterem centenas de moléculas que podem atuar em sinergia (Ernst *et al.*, 2019; Hooft *et al.*, 2020). Dessa forma, o processo de fracionamento pode separar os compostos, reduzindo a atividade que antes era conjunta. Porém, isso não indica que as moléculas isoladas não apresentem atividade, uma vez que o fracionamento realizado nesse estudo não permite a purificação das moléculas e, portanto, não permite afirmar que o composto presente em uma fração não possui atividade contra o micro-organismo indicador.

O fracionamento do extrato bruto da ANT_B 131 possibilitou identificar compostos que antes não foram possíveis avaliar no extrato bruto. Foram identificados quatro novos compostos enniantin B1 (**1**), surugamida A (**2**), surugamida D (**3**) e enniantin B (**4**) (Figura 20).

O composto **1** é um depsipeptídeo, assim como os outros três compostos encontrados. Esse composto, assim como as enniatinas são produzidas por fungos do gênero *Fusarium* e conhecidas como micotoxinas. Essas moléculas tem um potencial de atividade fitotóxica, anti-helmíntica, antibiótica, e citotóxica frente células tumorais. A Enniatina B1 possui atividade no transporte de cátions, antifúngica, além de atuar na inibição do efluxo de drogas (Firáková, Proksa e Šturdíková, 2007). Este foi identificado na fração acetato de etila (AcOEt). Os compostos **2** e **3** apresentam potencial antiproliferativo, como descrito no Capítulo 1, e o composto **2** apresenta atividade antimicrobiana. Ambos os compostos **2** e **3** foram identificados na fração aquosa (H₂O).

Tabela 9. Avaliação da atividade antimicrobiana, pelo Método de Micro-diluição, de extratos brutos e frações obtidos da bactéria *Streptomyces albidoflavus* ANT_B131 contra micro-organismos indicadores.

Micro-organismos testados		Extrato bruto	Frações			
			H ₂ O	H ₂ O: MeOH (1:1v/v)	MeOH: AcOH (9:1 v/v)	AcOEt
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	CIM*	2,00	2,00	2,00	-	2,00
	CBM**	-	-	-	-	-
<i>B. subtilis</i> ATCC 6051	CIM*	0,50	1,00	-	-	2,00
	CBM**	1,50	-	-	-	2,00
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 11775	CIM*	0,25	-	-	-	-
	CBM**	-	-	-	-	-
<i>Candida albicans</i> ATCC10231	CIM*	1,50	-	2,00	-	2,0
	CBM**	-	-	-	-	-

* Concentração inibitória mínima (CIM) em mg.mL⁻¹ ** Concentração bactericida mínima (CBM) em mg.mL⁻¹ (-) Não houve inibição do micro-organismo indicador.

O composto **4**, enniantin B, ENN B, que foi identificada nas frações de água: metanol (H₂O: MeOH) e acetato de etila (AcOEt). Esta é uma micotoxina produzida principalmente por fungos do gênero *Fusarium*, com atividade antibacteriana, antihelmíntica, antifúngica, herbicida, e inseticida descrita na literatura (Prosperini *et al.*, 2017). Essa molécula é um depsipeptídeo cíclico, oriundo de um cluster biossintético descrito de um fungo *Fusarium scirpi* (Haese *et al.*, 1993).

Observa-se que, após os estudos de fracionamento variando a polaridade dos solventes de água (mais polar, polaridade 9), água e metanol (polar, polaridade 6,6) e acetato de etila (média polaridade, 4,3) que não foi possível obter as mesmas identificações de moléculas que foram observadas no extrato bruto. Isso pode ter acontecido por que as moléculas não-identificadas estavam em baixas concentrações quando comparadas às outras identificadas e durante o processo de fracionamento, foram parcialmente isoladas, uma vez que a polaridade do soluto (metabólito) esteve relacionada com a polaridade do solvente utilizado (fase móvel). Essas interações ideais possibilitam a recuperação das moléculas durante o fracionamento (Martins, Lopes e Andrade, 2013).

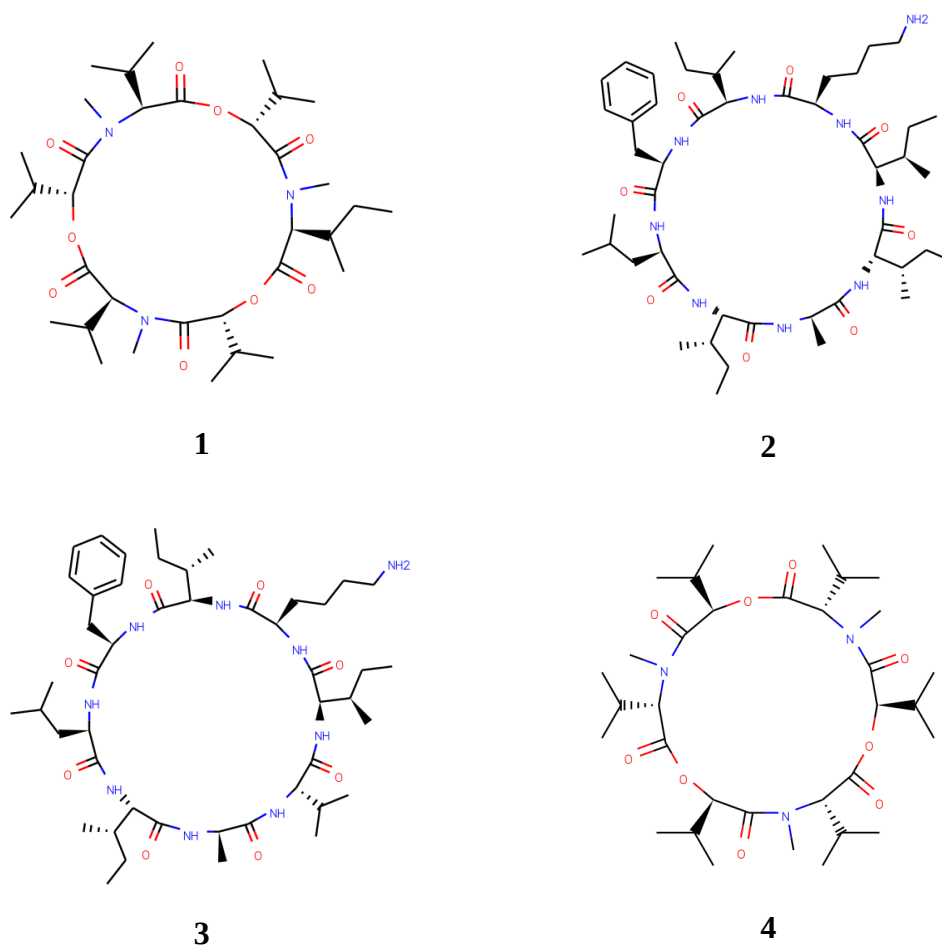


Figura 20. Estruturas de metabólitos secundários detectados durante o fracionamento do extrato bruto da *Streptomyces albidoflavus* ANT_B131. (1) enniantin B1; (2) surugamida A; (3) surugamida D; (4) enniantin B.

Na análise de Molecular Networking dos extratos brutos e das frações, verifica-se que foram obtidos mais de 1000 nós, dos quais, menos de 10 tem identificação com a base de dados do GNPS. Estudos revelam que de 2 a 5% das moléculas observadas podem corresponder com as moléculas depositadas no banco de dados de MS/MS, sendo que muitas moléculas não estão nos bancos de dados, ou não foram ainda identificadas (Silva, Dorrestein e Quinn, 2015). Esse resultado indica que há a possibilidade de descoberta de novas moléculas nos extratos brutos e frações das bactérias isoladas da Antártica.

Apesar da identificação dos depsipeptídeos, surugamida A e D, isso representa apenas 4,2% (1 de 24) dos clusters biossintéticos identificados no genoma da bactéria *S. albidoflavus* ANT_B131. A avaliação do fracionamento do extrato bruto poderia ser uma alternativa para identificar compostos que estavam em baixa concentração nos extratos brutos, como aconteceu com as surugamidas. Porém devido ao grande potencial biossintético revelado pelo estudo do

genoma da ANT_B131, experimentos adicionais foram pensados no sentido de estimular a expressão dos BGCs, dentre os quais inclui modificar os métodos de cultivo bacteriano. Portanto, a fim de possibilitar a recuperação de diversos metabólitos, métodos distintos de extração e solventes com diferentes polaridades foram utilizados para a continuidade deste estudo.

4. CONCLUSÕES

A bactéria *Streptomyces albidoflavus* ANT_B131 produz moléculas que apresentam tanto com atividade antimicrobiana, frente a bactérias e fungo, quanto as linhagens células humanas tumorais. Os compostos químicos identificados nos extratos e frações indicam a presença de depsipeptídeos cíclicos como as surugamidas A e D e a enniantin B e B1. Foi possível verificar diversas moléculas não identificadas nesse estudo, que podem ser novos metabólitos responsáveis pelas atividades biológicas identificadas.

Para *Marinobacter* sp. ANT_B65, não se observou atividade antiproliferativa, porém a análise do extrato bruto, assim como da ANT_B131, revela muitas moléculas não identificadas, abrindo um grande potencial para novas abordagens a partir dos resultados obtidos. Análises posteriores de fracionamento de extratos brutos e espectrometria de massas poderiam possibilitar a identificação de novas moléculas.

Capítulo 3. Análise dos metabólitos secundários produzidos pelas bactérias *Streptomyces albidoflavus* ANT_B131 e *Marinobacter* sp. ANT_B65.

1. INTRODUÇÃO

Os métodos baseados na genômica revelaram que a maior parte do potencial biossintético de micro-organismos cultiváveis e não-cultiváveis continuam inacessíveis. Muitos dos BGCs são silenciosos ou pouco expressos em condições laboratoriais. Isso acontece devido à dificuldade de entender e controlar o complexo mecanismo que controla a ativação da expressão dos BGCs (Zhu, Sandiford e Van Wezel, 2014; Ziemert, Weber e Medema, 2020).

Para determinar o que está presente nos complexos extratos obtidos de micro-organismos, a metabolômica mensura, em nível global, os metabólitos de baixo peso molecular, possibilitando a comparação entre amostras biológicas. Através dessa abordagem, é possível obter dados pertinentes a diferenças entre condições de cultivo e identificação de metabólitos de clusters órfãos (Palazzotto e Weber, 2018). O GNPS (*Global Natural Product Social*) através do Molecular Networking, tem aumentado a análise dos dados de espectrometria de massas permitindo uma rápida desreplicação e comparação com moléculas conhecidas do seu repositório público de espectros MS/MS (MassIVE). As moléculas que não são identificadas nas bases de dados, contam com algoritmos como o VarQuest, que possibilita a identificação de produtos naturais peptídicos (PNPs) e realiza uma anotação de possíveis variantes, através do Dereplicator (Gurevich *et al.*, 2018).

Através da união da abordagem genômica e metabolômica, surgiu a metabologenômica. Essa metodologia visa integrar esses dados complexos, criando relações entre as informações geradas (Hooft *et al.*, 2020). Os dados da genômica podem ser usados para questionar os dados da metabolômica e vice-versa (Palazzotto e Weber, 2018). Duas estratégias de metabologenômica são mais aplicadas, a integração baseada em correlação (*correlation-based*) e a integração baseada em características (*feature-based*). Na integração baseada em correlação, as análises são feitas separadamente, o *genome mining* e o molecular networking, e a correlação dos dois é feita posteriormente. Essa metodologia possibilitou a descoberta de um depsipeptídeo retamicina A, ligando-o ao BGC NRPS40 (Duncan *et al.*, 2015). A estratégia de integração baseada em características é mais utilizada para produtos naturais modulares, como os NRPs, devido aos seus blocos de construção bem definidos. Através do genoma é possível prever os monômeros como aminoácidos, bem como modificações enzimáticas como metilação e hidroxilação. Da mesma forma, as subestruturas podem ser previstas a partir do espectro de massas (Hooft *et al.*, 2020). Alguns métodos automatizados foram criados para essa estratégia. Eles envolvem peptídeos, como o NRPquest que é específico para peptídeos não-ribossômicos (NRPs) (Mohimani *et al.*, 2014) e MetaMiner (Cao *et al.*, 2019) e DeepRiPP

(Merwin *et al.*, 2020) que são específicos para RiPPs. Esta etapa do estudo o objetivo foi comparar os resultados de produção de metabólitos secundários das duas bactérias, *S. albidoflavus* ANT_B131 e *Marinobacter* sp. ANT_65 frente a três meios de cultivo e três métodos distintos de extração para análise de metabólitos secundários utilizando a estratégia de *Molecular Networking*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Cultivo bacteriano utilizando diferentes meios de cultura

As bactérias foram cultivadas em três tipos de meios de cultura com o objetivo de suportar a expressão de BGCs relacionados a metabólitos secundários. Os meios selecionados para *Streptomyces albidoflavus* ANT_B131 foram Nutriente caldo (NB, Oxoid™), ISP2 caldo (em g.L⁻¹; extrato de levedura 4,0; extrato de malte 10,0; dextrose 4,0; pH 7,2) e GYE caldo (em g.L⁻¹; glicose 15,0; extrato de levedura 5,0, CaCl₂.2H₂O 0,2; pH 7,0), preparado com ASW. Para *Marinobacter* sp. ANT_B65 foram usados Caldo Nutriente (NB, Oxoid™), GYE caldo e R2A caldo (Himedia) todos preparados com ASW.

Pré-inóculos (15 mL) das bactérias foi obtido selecionando colônias puras foram usadas para escalonar em direção a culturas de maior volume (100 mL) e incubadas a 28 ° C por 7 dias em condições estacionárias. O cultivo foi realizado em triplicata. Os controles negativos foram realizados com o meio de cultura sem o inóculo da bactéria.

2.2. Obtenção de metabólitos utilizando diferentes métodos de extração

Os extratos foram obtidos por três diferentes tipos de extrações orgânicas. Para cada bactéria, *Streptomyces albidoflavus* ANT_B131 e *Marinobacter* sp. ANT_B65, foram realizadas duas alíquotas de crescimento bacteriano (Figura 21).

No primeiro crescimento, aplicamos a separação líquido-líquido com acetato de etila. Ao crescimento bacteriano foram adicionados 80 mL de acetato de etila e agitados no ultra-turrax a 7.000 rpm durante 6 min. Os extratos brutos foram obtidos pelo método de separação líquido-líquido em funil de separação. Após a separação das fases orgânicas e aquosas, a fase orgânica foi transferida para um balão de fundo redondo de 1 L. Foram adicionados mais 80 mL de acetato de etila à fase aquosa e, repetido o processo de separação por duas vezes.

No segundo crescimento, separamos as células e extraímos os metabólitos intracelulares com metanol. Para isso, o crescimento bacteriano foi centrifugado por 10 min (5.000 rpm) e as

células foram separadas do meio de cultura, afim de reconhecer os metabólitos presentes dentro das células e os metabólitos que estavam disponíveis no meio de cultivo. 80 mL de metanol foram adicionados às células, levados ao banho ultrassônico por 40 min, e a fase orgânica foi coletada. Ao meio de cultura foi adicionado o adsorvente XAD-2 (Sigma-Aldrich), mantido sob agitação (150 rpm) por 3 h, e o metanol foi utilizado para recuperar os metabólitos adsorvidos no XAD-2.

Os extratos brutos foram secos em um evaporador rotativo (Buchi® R-215) sob vácuo a 40 ° C e 80 rpm. Os extratos brutos foram armazenados a -20 °C até o uso nos ensaios. O experimento foi realizado para todos os meios de cultura e avaliados em triplicata. Os controles negativos foram realizados com o meio de cultura sem o crescimento da bactéria.

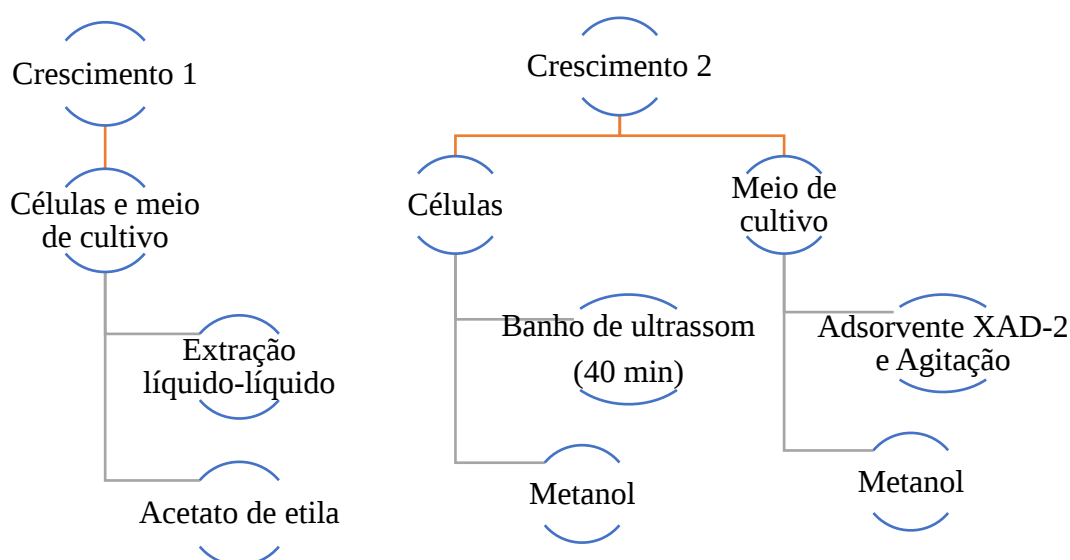


Figura 21. Esquema representativo de métodos de obtenção de extratos brutos a partir de dois crescimentos bacterianos para *Streptomyces albidoflavus* ANT_B131 e *Marinobacter* sp. ANT_B65.

2.3. Análise de espectrometria de massas e *Molecular Networking*

Os extratos brutos foram diluídos em metanol e analisados por HPLC-ESI-MS / MS Agilent 6550 série Q-TOF (G6550A) Dual AJS ESI. Os parâmetros foram ajustados em modo positivo, voltagem capilar de 3,5 kV, temperatura capilar de entrada de 290 ° C. O método TIC (Total Ion Chromatogram) foi selecionado para uma varredura geral na faixa de massa de 100–1700 m/z . O volume de injeção das amostras foi de 2 μ L. A fase estacionária utilizada foi coluna Agilent 1260 Infinity C18 (2,1 mm x 100 mm). A fase móvel: ácido fórmico 0,1% (A) e acetonitrila (B). O perfil de eluente (A: B) 0-11 min, em gradiente de 2:98 a 95: 5; mantida por 5 min. Taxa de fluxo: 0,3 mL min⁻¹. MS / MS foi realizado por dissociação induzida por colisão (CID) com intervalo m/z de 100-1500 e a energia de colisão de 30 V. Os dados foram processados com o software MassHunter Qualitative Analysis B.07.00.

Os dados adquiridos de ESI-MS / MS foram submetidos a msConvert (Chambers *et al.*, 2012) para converter os arquivos para o formato .mzXML e foram analisados por Molecular Networking no servidor Global Natural Products Social Molecular Networking (GNPS) (Wang *et al.*, 2016). Uma rede molecular dos extratos brutos e frações foi criada usando o fluxo de trabalho online (<https://ccms-ucsd.github.io/GNPSDocumentation/>) no site GNPS (<http://gnps.ucsd.edu>). Os espectros de MS/MS foram filtrados por janela escolhendo apenas os 6 íons de fragmento superiores na janela de +/- 50Da em todo o espectro. A tolerância de massa do íon precursor foi fixada em 0,02 Da e uma tolerância de fragmento de íon MS/MS de 0,02 Da. Uma rede foi criada onde as bordas foram filtradas para ter uma pontuação de cosine acima de 0,5 e mais de 5 picos correspondentes. Além disso, as bordas entre dois nós foram mantidas na rede se, e somente se, cada um dos nós apareceu nos respectivos 10 nós mais semelhantes. Finalmente, o tamanho máximo de uma família molecular foi definido como 100, e as bordas de pontuação mais baixas foram removidas das famílias moleculares até que o tamanho da família molecular estivesse abaixo desse limite. Os espectros na rede foram então pesquisados nas bibliotecas espectrais do GNPS. Os espectros da biblioteca foram filtrados da mesma maneira que os dados de entrada. Todas as correspondências mantidas entre espectros de rede e espectros de biblioteca deveriam ter uma pontuação acima de 0,5 e pelo menos 5 picos combinados (Wang *et al.*, 2016). As redes espectrais foram importadas e visualizadas usando Cytoscape 3.8.0 software (<https://cytoscape.org/>). Para *Marinobacter* sp., a análise de Molecular Networking foi anotada com a DEREPLICATOR (Gurevich *et al.*, 2018), usando o método padrão, apenas selecionando a opção de busca por análogos com VarQuest.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Esta sessão está dividida entre os resultados observados para cada bactéria.

3.1. Expressão de BGCs por *Streptomyces albidoflavus* ANT_B131

Os espectros de MS/MS de extratos de *S. albidoflavus* ANTB_131 foram identificados como um hit no banco de dados GNPS (Anexos VI - IX) e quatro metabólitos foram identificados: surugamida A (**1**), surugamida D (**2**), desferrioxamina B + Al (**3**) e desferrioxamina E (**4**). Além disso, com base nos espectros de MS/MS e comparação com outros bancos de dados (METLIN e MassBank da América do Norte), o metabólito ectoína (**5**) foi identificado manualmente no extrato de ANT_B131. Os compostos identificados foram detectados apenas nos extratos bacterianos e ausentes nos controles (extratos dos meios de cultura) (Figuras 22-26). Os dados de MS dos metabólitos detectados apresentam erros de massa abaixo de 5 ppm e são mostrados na Tabela 10.

O íon $[M + H]^+$ de 912,6294 m/z foi identificado como o composto **1**. O espectro de MS/MS deste íon rendeu a fragmentos em m/z 261,1602, 298,2084, 374,2498, 539,3926, 652,4693 e 884,6316, fragmentos típicos para a estrutura de **1** (Figura 22 E) e já relatado na literatura (Thankachan *et al.*, 2019). Além disso, a surugamida **2** foi identificada como íon $[M + H]^+$ em m/z 898.6116. A fragmentação de **2** estava perto da fragmentação de **1** devido à similaridade de estruturas (Figura 22 E e Figura 23 E) e rendeu aos fragmentos 261,1600, 374,2493, 638,4719 e 785,5196. A surugamida A foi identificada como metabólito intracelular e extracelular. O Composto **1** foi encontrado no micélio e no meio de dois meios, NB-ASW e GYE-ASW, quando aplicado metanol como solvente do extrato. No entanto, o composto **2** foi identificado apenas como metabólito intracelular de todos os meios de cultura avaliados, também recuperado por extração com metanol (Figura 27).

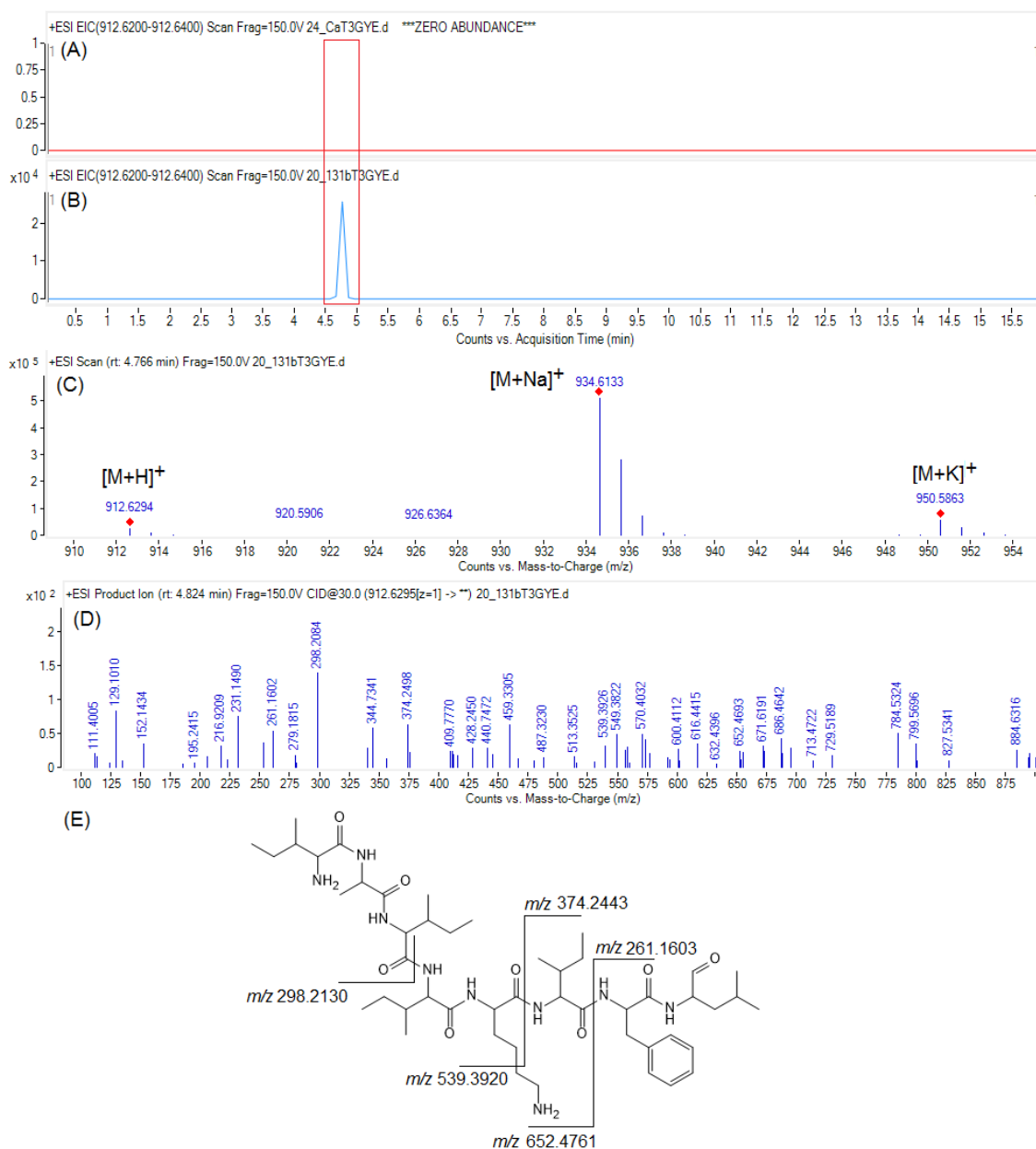


Figura 22. Cromatograma de íons totais de 912,62 m/z para (A) meio de cultura (controle) e (B) *S. albidoflavus* ANT_B131. (C) Espectro de massa obtido da surugamida A. (D) Espectro MS/MS do íon [M+H]⁺ de 912,6295 m/z. (E) Típica massa de fragmentos da surugamida A.

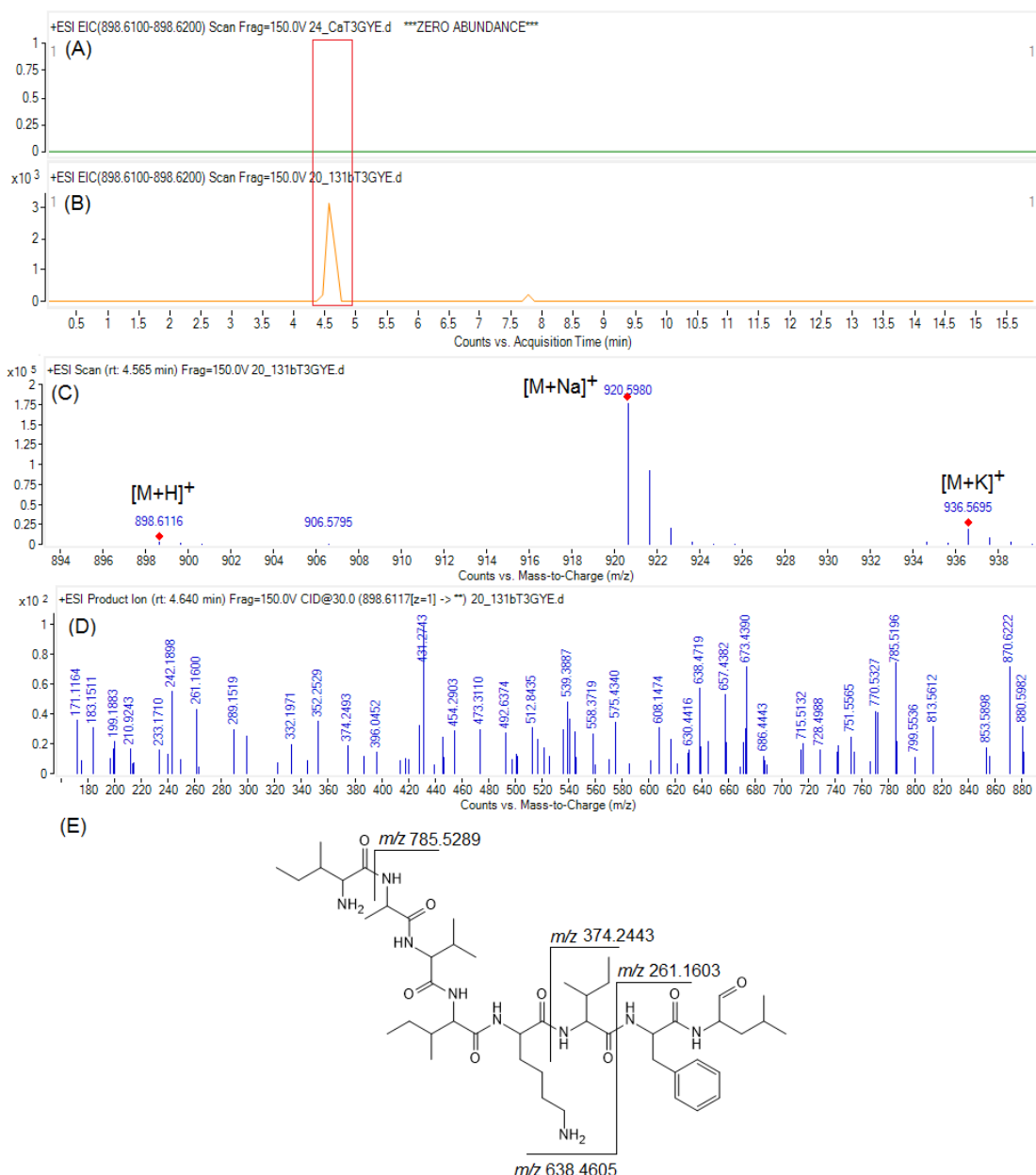


Figura 23. Cromatograma de íons totais de 898,61 m/z para (A) meio de cultura (controle) e (B) *S. albidoflavus* ANT_B131. (C) Espectro de massa obtido da surugamida D. (D) Espectro MS/MS do íon $[M+H]^+$ de 898,6117 m/z . (E) Típica massa de fragmentos da surugamida D.

O banco de dados GNPS identificou íons $[M-2H+Al]^+$ de 585,3202 m/z e $[M+Na]^+$ de 623.3404 m/z como desferrioxaminas B e E, respectivamente. Espectro de MS/MS de **3** rendeu a fragmentos de 385,2015, 425,1973, 467,2067 e 568,2982 m/z , padrão de fragmentação típico para a estrutura da desferrioxamina B complexada com Al (III) (Figura 24 E). Para o composto **4**, a fragmentação em massa produziu fragmentos de 423,2225 e 223,1101 m/z , este padrão de fragmentação corresponde às perdas neutras típicas de moléculas de succinilcadaverina (200,1160 Da) (Figura 25 C) (Angolini *et al.*, 2016). Os compostos **3** e **4** foram recuperados

usando todos os tipos de métodos de extração quando o meio GYE-ASW foi usado para o crescimento bacteriano. Os compostos também foram identificados como metabólitos intra e extracelulares do meio ISP2-ASW, recuperados por extração com metanol. O composto **3** foi identificado como em meio NB-ASW usando metanol como solvente de extração (Figura 27).

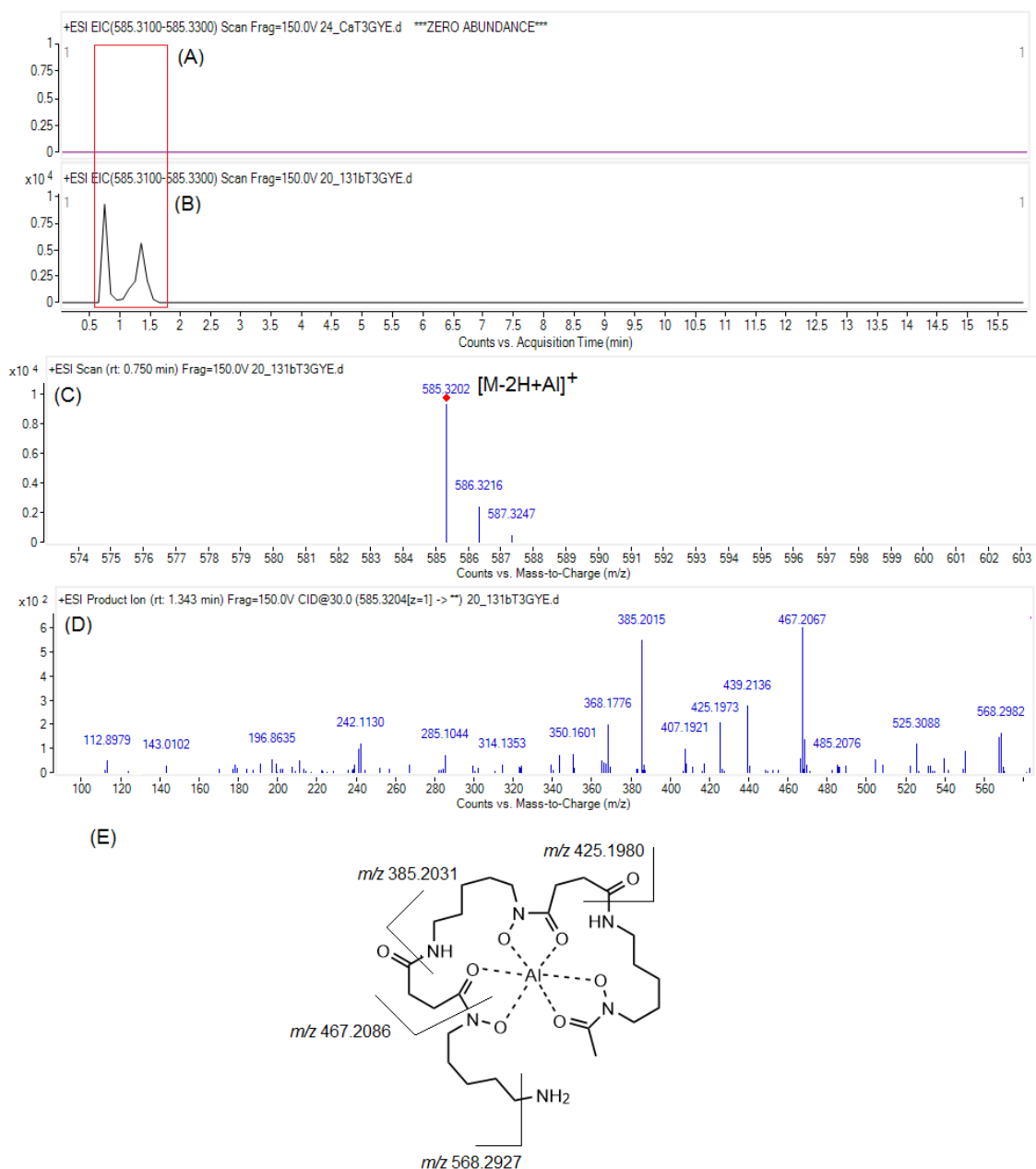


Figura 24. Cromatograma de íons totais de 585,32 m/z para (A) meio de cultura (controle) e (B) *S. albidoflavus* ANT_B131. (C) Espectro de massa obtido da desferrioxamina B (D) Espectro MS/MS do íon $[M+H]^+$ de 585,3204 m/z. (E) Típica massa de fragmentos da desferrioxamina B.

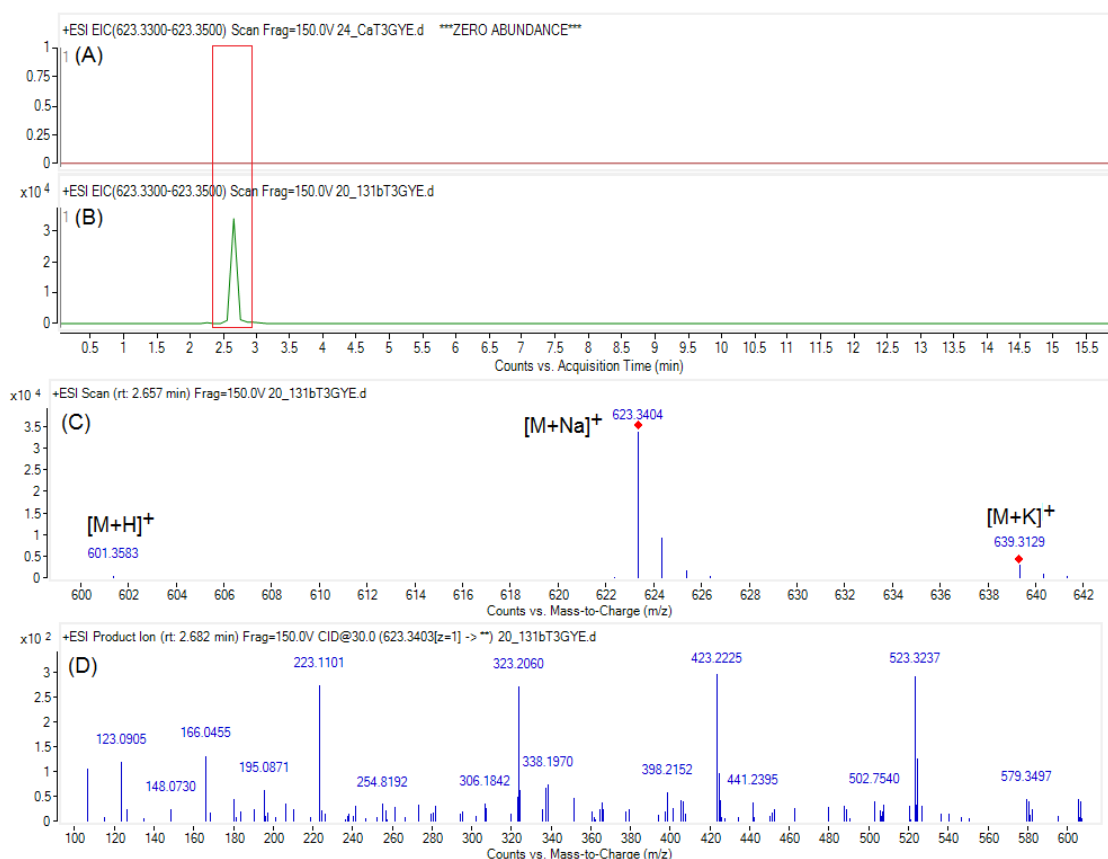


Figura 25. Cromatograma de íons totais de 623,34 m/z para (A) meio de cultura (controle) e (B) *S. albidoflavus* ANT_B131. (C) Espectro de massa obtido da desferrioxamina B (D) Espectro MS/MS do íon $[M+Na]^+$ de 623,3403 m/z .

Os íons $[M+H]^+$ de 143,0818 m/z foram identificados como composto 5 e renderam os fragmentos de 101,0706 e 113,5968 m/z . Os espectros de MS/MS de ectoína nos bancos de dados METLIN e MassBank da América do Norte mostraram um padrão de fragmentação próximo, com o fragmento de 101,0709 m/z como um dos fragmentos principais para o composto 5 (Figura 26). O composto 5 foi identificado como metabólito intracelular no extrato metanólico de todos os meios de cultura. Além disso, o composto pode ser identificado no meio de cultura NB-ASW como um metabólito extracelular recuperado por extração de metanol (Figura 27).

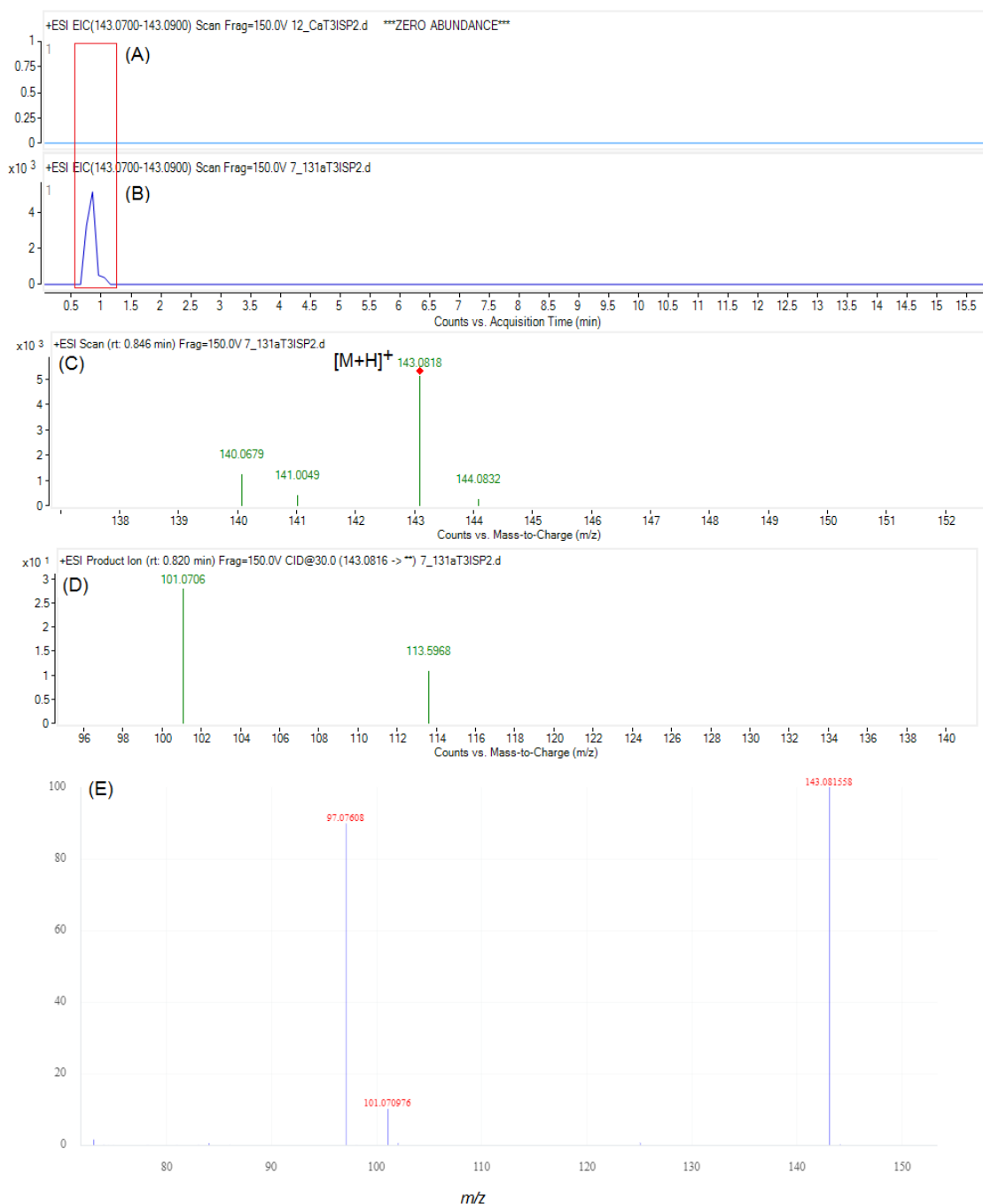


Figura 26. Cromatogramas de íons totais de 143,08 m/z para (A) meio de cultura (controle) e (B) *S. albidoflavus* ANT_B131. (C) Espectro de massa obtido da ectoína (D) Espectro MS/MS do íon $[M+H]^+$ de 143,0816 m/z . E) Espectro MS/MS da ectoína no Mass MassBank of North America database (adaptado de <https://mona.fiehnlab.ucdavis.edu/spectra/display/CCMSLIB00005435933> – acesso em 10 de setembro de 2020).

O extrato bruto do meio NB-ASW extraído com acetato de etila foi o extrato utilizado para os ensaios biológicos, antiproliferativos e antimicrobianos. No entanto, o banco de dados GNPS não correlacionou nenhum metabólito secundário a este extrato bruto. Porém, no capítulo

anterior foi possível observar a presença dos metabólitos surugamida A e D e Enniatin B e B1 nas frações.

Tabela 10. Características dos compostos identificados nos extratos brutos da bactéria *Streptomyces albidoflavus* ANTB_131.

Composto	Íon	Fórmula	<i>m/z</i> calculado	<i>m/z</i> experimental	Erro (ppm)
Surugamida A	[M+H] ⁺	C ₄₈ H ₈₂ N ₉ O ₈	912,6286	912,6294	0,9
Surugamida D	[M+H] ⁺	C ₄₇ H ₈₀ N ₉ O ₈	898,6129	898,6116	-1,4
Desferrioxamina B + Al	[M-2H+Al] ⁺	C ₂₅ H ₄₆ N ₆ O ₈ Al	585,3192	585,3202	1,7
Desferrioxamina E	[M+Na] ⁺	C ₂₇ H ₄₈ N ₆ O ₉ Na	623,3380	623,3404	3,8
Ectoína	[M+H] ⁺	C ₆ H ₁₁ N ₂ O ₂	143,0820	143,0818	-1,4

Esses resultados revelaram que o uso de diferentes meios de cultura possibilitou que a *Streptomyces albidoflavus* ANTB_131 expressasse os BGCs relacionados aos metabólitos secundários. Além disso, os diferentes métodos de extração e solventes permitem a recuperação desses compostos. Neste estudo, pudemos expressar 20,8% dos BGCs identificados pelo antiSMASH (5 de 24). Estudos conduzidos em *Streptomyces fildesensis* S013.3, isolada da Antártica, e *Pseudoalteromonas luteoviolacea* mostraram a expressão de zero e 10% dos BGCs identificados, respectivamente (Maansson *et al.*, 2016; Núñez-Montero *et al.*, 2019). Portanto, a abordagem utilizada nesse estudo possibilitou a maior expressão de clusters biossintéticos.

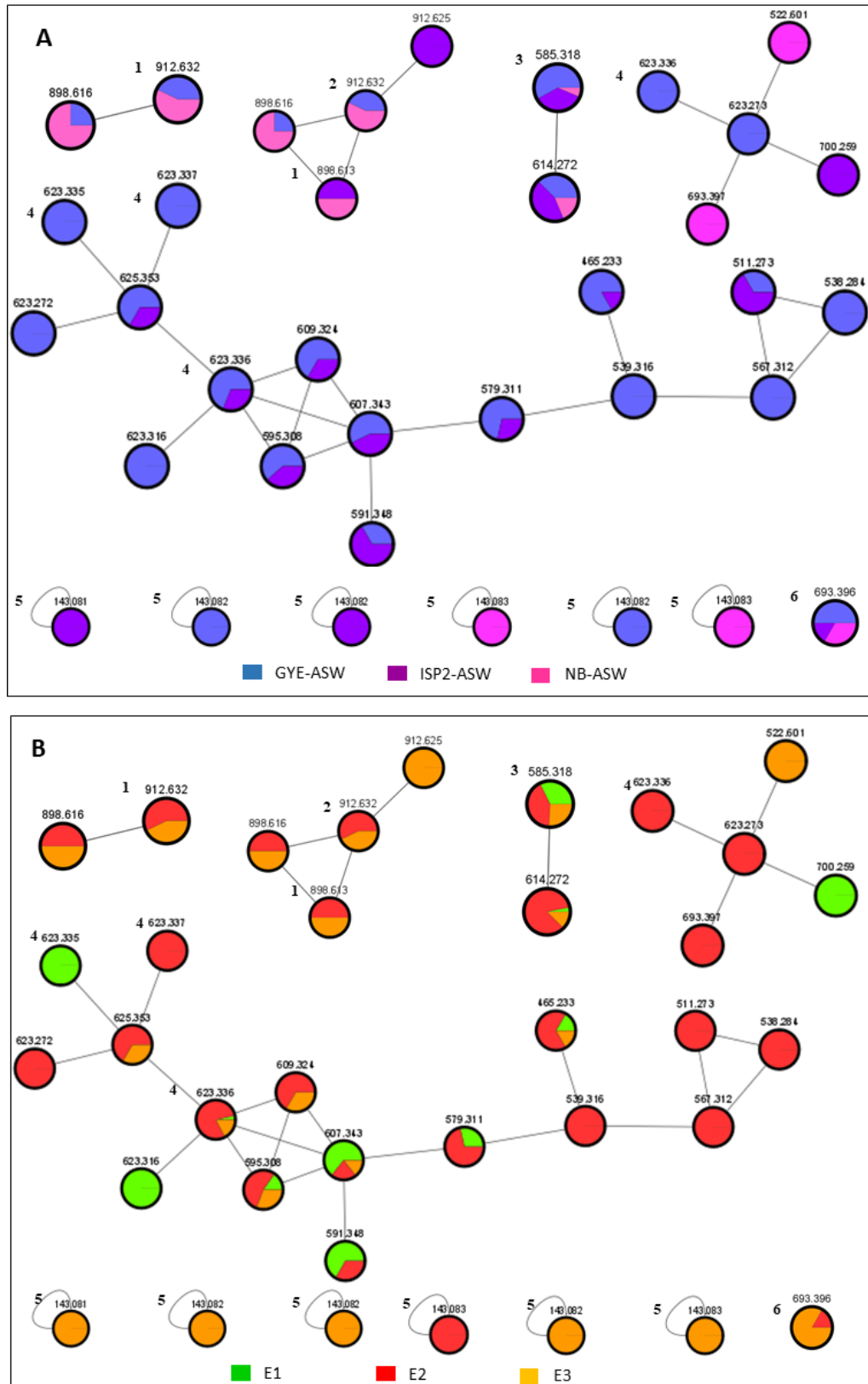


Figura 27. Rede molecular (*Molecular Networking*). de *S. albidoflavus* ANT_B_131 Composto 1 (surugamida A), 2 (surugamida D), 3 (desferrioxamina B + Al), 4 (desferrioxamina E), 5 (ectoina) foram identificadas em três diferentes meios de cultivo. (A) e três diferentes métodos de extração (B). E1;

extração líquido-líquido com acetato de etila; E2; extração no meio de cultura usando metanol; E3; extração intracelular usando metanol. Massa precursora é mostrada acima dos nós.

3.2. *Marinobacter* sp. ANT_B65 produz possíveis análogos de peptídeos detectados em esponjas

A análise de *Molecular Network* resultou na identificação de três compostos, dos quais apenas um estava relacionado ao meio NB-ASW extraído com acetato de etila. O resultado pode ser encontrado em [ProteoSAFe/status.jsp?task=49623493cc6b4096ac1f0c6df73fd797](https://proteosafe.org/status.jsp?task=49623493cc6b4096ac1f0c6df73fd797). O íon $[M+Na]^+$ 629,3774 m/z foi identificado pelo GNPS como o composto (3R,6R)-6-((3R,5S,7R,8R,9S,10S,12S,13R,14S,17R)-3,7-diacetoxy-12-hydroxy-10,13-dimethylhexadecahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-17-yl)heptane-1,3-diyl diacetate. Porém, o erro da massa é maior que 17 ppm, uma vez que o íon do composto na biblioteca é de $[M+Na]^+$ 629,366 m/z . Portanto, essa identificação não é validada. Em busca na literatura, não há atividade biológica descrita para o composto identificado.

Uma anotação adicional dos extratos brutos foi realizada. Ao utilizar a análise do *Molecular Networking*, foi realizada a anotação com o *Dereplicator*. O resultado está disponível em [ProteoSAFe/status.jsp?task=18a3bef8b25e4ba69ea794bebc220535](https://proteosafe.org/status.jsp?task=18a3bef8b25e4ba69ea794bebc220535).

O *Dereplicator* utiliza a comparação entre as moléculas semelhantes, focando na classe de produtos naturais peptídicos (PNPs). Ele utiliza a análise inicialmente feita pelo *Molecular Networking*, para iluminar componentes da rede, mesmo que sejam apenas variantes de moléculas conhecidas (Gurevich *et al.*, 2018).

O *Dereplicator* indicou sete (7) compostos com a taxa de falsa descoberta (FDR) de 0,00% e *P-value* que variou de $2,7^{-25}$ a $4,0^{-11}$. Nesse estudo, revelamos o composto **1**, que apresenta uma variante do composto euryjanicin B, composto **2**, uma variante do composto wainunamide, e composto **3**, que é uma variante do composto hymenamide D.

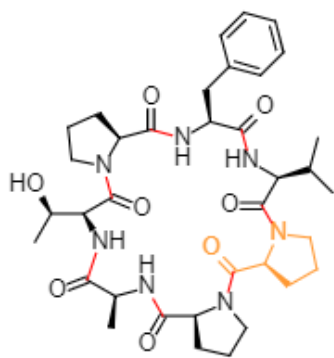
De acordo com a anotação do *Dereplicator*, o composto **1** (Figura 28 A) pode ser um variante do euryjanicin B, $C_{36}H_{51}N_7O_8$, (Figura 28 B) que foi identificado do íon $[M+H]^+$ 659,3455 m/z no meio R2A-ASW extraído do meio de cultivo com metanol e extraído do mesmo meio com acetato de etila. Essa massa resulta da anotação da fragmentação (Tabela 11) comparada à fragmentação de MS/MS da euryjanicin B resultando na perda de C_5H_7NO (Figura 28 B – área laranja). O valor de *P-value* foi $2,7^{-25}$.

A euryjanicin B é um peptídeo cíclico isolado da esponja marinha de Porto Rico *Prosuberites laughlini*. A estrutura do peptídeo foi confirmada como ciclo-(–Ala-Thr-Pro-Phe-

Val-ProPro-) (Vera, Vicente e Rodríguez, 2009). Entre os animais marinhos, as esponjas têm sido alvo de interesse para a prospecção de novas moléculas, uma vez que são uma rica fonte de compostos antibacterianos, antifúngicos e antivirais. Diversas classes de peptídeos são derivados dessas esponjas (Vitali, 2018). Assim como outros animais marinhos, as esponjas são hospedeiros de diversas espécies de bactérias, que são cerca de 50-60 % da biomassa do organismo (Wang, 2006). Esse tipo de relação simbiótica entre bactéria e esponja levou a indicar que alguns metabólitos inicialmente descritos como produzidos por esponjas, eram na verdade produzidos pela bactéria simbiótica (Thomas, Kavlekar e LokaBharathi, 2010). O estudo de Gurevich e colaboradores (2018) sugere que os BGCs evoluem constantemente para gerar produtos naturais peptídicos que variam entre as espécies. Além disso, bactérias relacionadas são susceptíveis a produzir similares PNPs variantes ao invés de produzir PNPs idênticas (Gurevich *et al.*, 2018).

Não há atividade microbiana conhecida pelo composto euryjanicin B, porém os extratos metanólicos e de acetato de etila da esponja apresentaram fraca atividade antiproliferativa contra linhagens de células tumorais (Vera, Vicente e Rodríguez, 2009).

A



B

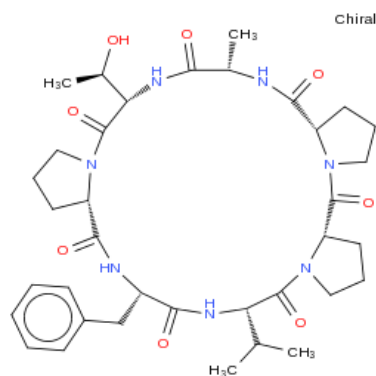


Figura 28. Fórmula estrutural de (A) composto 1 anotado pelo Dereplicator e (B) euryjanicin B.

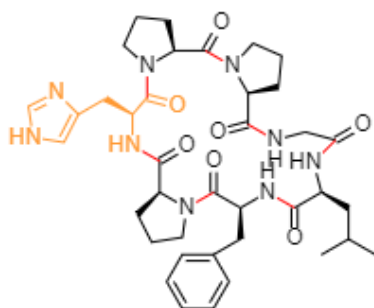
Tabela 11. Picos anotados pelo Dereplicator para o composto 1.

<i>m/z</i> experimental (íon [M+H] ⁺)	Erro (Da)	Intensidade
102,056	0,001	2,313
169,099	0,002	95,062
199,109	0,001	32,308
245,131	0,003	22,335
247,132	-0,012	18,188
316,170	0,014	23,115
344,185	-0,012	291,297
413,220	0,011	10,110
491,252	-0,004	45,423
514,277	0,011	5,275
560,283	0,005	2,673
588,311	0,002	9,944

O composto 2 (Figura 29 A) é um variante da wainunuamide, C₃₈H₅₁N₉O₇ (Figura 29 B), de acordo com a anotação do Dereplicator. O íon [M+H]⁺ 741,3981 *m/z* no meio R2A-ASW extraído do meio de cultivo com metanol. Essa massa resulta da anotação da fragmentação (Tabela 12) comparada à fragmentação de MS/MS da wainunuamide resultando na perda de C₆H₇N₃O (Figura 29– área laranja). O valor de *P-value* foi 1,7⁻¹⁸.

Wainunuamide também é um peptídeo cíclico isolado da esponja marinha de Fiji *Stylotella aurantium*. Esse peptídeo produz três resíduos de prolina e um de histidina, que são características de peptídeos isolados de cianobactérias, sugeridas como fonte do composto. Atividade anticâncer foi detectada na fração de diclorometano com atividade frente a linhagens de ovário e leucemia (Tabudravu *et al.*, 2001).

A



B

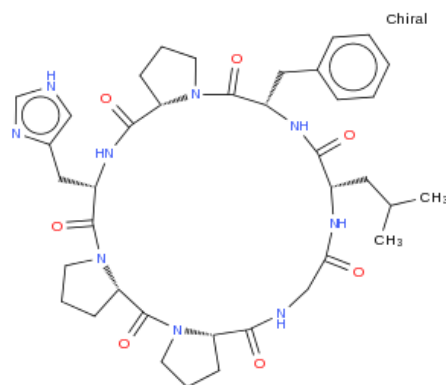


Figura 29. Fórmula estrutural do (A) composto 2 anotado pelo Dereplicator e (B) wainunuamide.

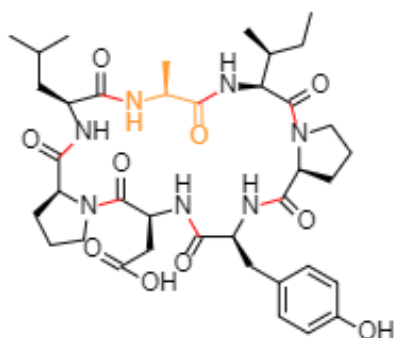
Tabela 12. Picos anotados pelo Dereplicator para o composto 2.

m/z experimental [M+H] ⁺	(íon Erro (Da)	Intensidade
155,083	0,001	7,787
230,115	-0,004	126,617
252,136	0,002	5,360
358,205	-0,008	5,280
365,220	0,002	30,711
497,280	0,003	7,823
512,289	0,002	83,185
594,327	-0,003	12,271
609,338	-0,001	5,229

O composto 3 (Figura 30 A) é um variante da hymenamide D, C₃₈H₅₅N₇O₁₀ (Figura 30 B), de acordo com a anotação do Dereplicator. O íon [M+H]⁺ 751,3713 m/z foi identificado no meio R2A-ASW extraído do meio de cultivo e das células com metanol. Essa massa resulta da anotação da fragmentação (Tabela 13) comparada a fragmentação de MS/MS da wainunamide resultando na perda de C₃H₅NO (Figura 29— área laranja). O valor de *P-value* foi 1,5⁻¹⁶.

Assim como os outros metabólitos, a hymenamide D também foi isolada de uma esponja marinha *Hymeniacidon* sp. da região de Oknawa (Tsuda *et al.*, 1993). Não foi relatada atividade biológica a molécula na literatura.

A



B

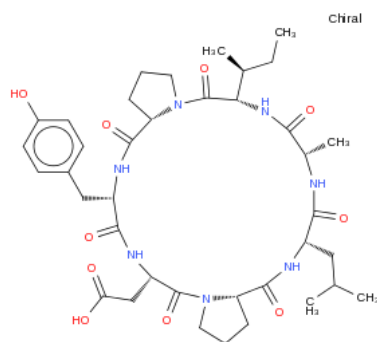


Figura 30. Fórmula estrutural de (A) composto 3 anotado pelo Dereplicator e (B) hymenamide D.

Tabela 13. Picos anotados pelo Dereplicator para o composto 3.

m/z experimental [M+H]⁺	(íon Erro (Da)	Intensidade
166,087	-0,004	61,567
261,125	0,002	47,850
263,140	-0,004	130,519
326,174	0,003	52,114
489,237	0,003	143,361
491,242	-0,013	12,403
586,307	0,020	3,332
588,310	0,002	14,855

Em busca ao banco de dados de BGCs MIBiG (Kautsar *et al.*, 2020), não foi encontrado BGC relacionado aos compostos euryjanicin B, wainunamide e hymenamide D, o que pode significar que ainda não há descrição do BGC associado ao peptídeo. Os SMILES (Anexo X) obtidos dos compostos não tiveram identificação no PubChem (Kim *et al.*, 2019), indicando que essas variantes pode não ser conhecida.

A *Marinobacter* sp. ANT_B65 foi isolada de uma esponja na Ilha do Rei George, Antártica. Observar a presença de peptídeos variantes de compostos produzidos por esponjas nos extratos brutos da ANT_B65, pode indicar duas possibilidades. Inicialmente que euryjanicin B, wainunamide e hymenamide D são produzidos por bactérias simbiotes de esponjas, uma vez que muitos dos compostos produzidos por esponjas são na verdade produzidos por bactérias (Thomas, Kavlekar e LokaBharathi, 2010). E que a *Marinobacter* sp. ANT_B65 recebeu esse BGC de alguma bactéria relacionada, já que quando observada a diversidade de PNPs foi sugerido que os BGCs em vários microrganismos evoluem constantemente para gerar um espectro único de variantes que diferem dos PNPs em outras espécies (Gurevich *et al.*, 2018).

Os compostos variantes, 1, 2 e 3 devem ser confirmados quanto a sua estrutura molecular e ensaios biológicos podem ser realizados para verificar a atividade biológica associada a esses compostos, que como variantes, pode ser diferente do composto original.

4. CONCLUSÃO

O uso de diferentes meios de cultivo e de diferentes abordagens de obtenção dos extratos brutos possibilitou a expressão de 20,8% dos BGCs identificados para *Streptomyces albidoflavus* ANT_B131. Para *Marinobacter* sp. ANT_B65 o uso de novas abordagens de cultivo de extração possibilitou identificar compostos variantes a compostos inicialmente

identificados em esponjas. Isso mostra o potencial das duas espécies quanto a expressão de metabólitos secundários em condições de laboratório.

Capítulo 4. Expressão heteróloga do cluster gênico biossintético do lasso peptídeo identificado no genoma da bactéria *Streptomyces albidoflavus* ANT_B131 em *Burkholderia* sp. FERM BP-3421

1. INTRODUÇÃO

O primeiro cluster gênico de lasso peptídeo foi sequenciado em 1999 e se referia a ao metabólito microcin J25 (MccJ25) encontrado no plasmídeo da *E. coli* (Solbiati *et al.*, 1999). Após a descoberta da atividade antimicrobiana da MccJ25 (Adelman *et al.*, 2004), aumentou o interesse sobre a molécula e também ao BGC à ela relacionada. Estudos indicaram que os genes da MccJ25 poderiam ser encontrada em outros genomas de diversos tipos de bactérias, surgindo assim as primeiras evidências de *genome mining* para lasso peptídeos (Cheung-Lee e Link, 2019). Os lasso peptídeos recebem esse nome devido a estrutura de laço que é definida por uma ligação isopeptídica entre a α -amina N-terminal e o carboxilato da cadeia lateral de um resíduo Asp ou Glu, com a cauda linear C-terminal enroscada através do anel macrolactâmico resultante (Chekan *et al.*, 2016).

Com o aumento do sequenciamento dos genomas, novas ferramentas de mineração de RiPPs foram desenvolvidas, entre elas, BAGEL (de Jong *et al.*, 2006), RiPPER (Santos-Aberturas *et al.*, 2019), RiPPMiner (Agrawal *et al.*, 2017). Outras plataformas como antiSMASH (Blin, Shaw, Steinke, Villebro, Ziemert, Lee, Marnix H. Medema, *et al.*, 2019), PRISM (Skinnider *et al.*, 2017) e RODEO (Tietz *et al.*, 2017) utilizam os dados do genoma para fazer a mineração não apenas de RiPPs, mas de outras classes de produtos naturais.

O *genome mining* de lasso peptídeos é realizado através da identificação dos genes B e C. O gene B codifica a cisteína peptidase e o gene C codifica a asparaginase sintetase. Identificando os dois genes, é possível buscar por ORFs vizinhas aos genes que codificam tais enzimas, determinando quais são os genes A, ou seja, os genes precursores e criar o score do precursor (Figura 31) (Cheung-Lee e Link, 2019). Em contrapartida, a obtenção (ou expressão) de lasso peptídeos em condições de laboratório são mais laboriosas. A simulação de crescimento bacteriano próximo das condições de crescimento possibilita o aumento significativo da descoberta de produtos naturais (Hertweck, 2009). Para bactérias que produzem diversos tipos de produtos naturais, como as *Streptomyces*, se torna difícil a obtenção de moléculas como os lasso peptídeos. Nesses casos, utilizar ferramentas como a expressão heteróloga tem sido útil para permitir a produção de clusters gênicos biossintéticos expressos em condições limitadas ou que são silenciosos (Maksimov, Pelczar e Link, 2012). Na última etapa deste estudo foi utilizada a bactéria *Burkholderia* não-patogênica, como hospedeira, para expressão heteróloga de um lasso peptídeo, cujo BGC foi unicamente identificado na *S. albidoflavus* ANT_131.

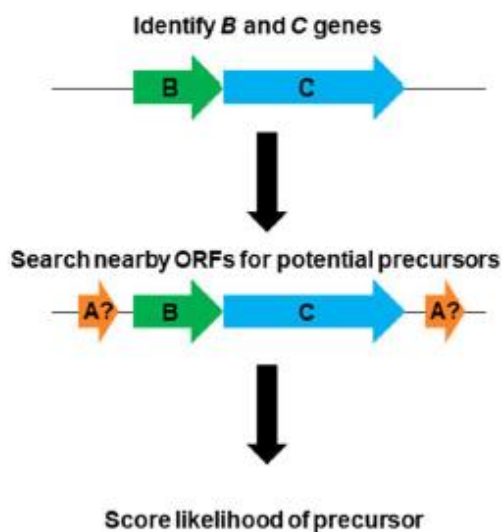


Figura 31. Abordagem de *genome mining* dos lasso peptídeos (Cheung-Lee e Link, 2019).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Procedimentos Gerais

No Capítulo 1 o genoma da bactéria *S. albidoflavus* ANT_B131 foi avaliado quanto a presença de BGCs. O Cluster 24, Contig 22 (74379 a 96762), foi identificado como lasso peptídeo. Análises comparativas utilizando o ClusterBlast e entre as linhagens de *S. albidoflavus* J1074 e SM254 indicaram que o BGC relacionado ao lasso peptídeo era único para a linhagem ANT_B131. Portanto, um estudo foi relacionado a fim de realizar a expressão heteróloga do BGC relacionado ao Cluster 24 identificado nesse estudo. O BGC foi analisado no preditor de lasso peptídeos RiPPMiner (Agrawal *et al.*, 2017) para predição do core peptídeo e possíveis estruturas e massas da molécula.

A expressão heteróloga do lasso peptídeo foi realizada sob supervisão da Prof^a. Dr^a. Alessandra S. Eustáquio no Colégio de Farmácia da University of Illinois at Chicago nos Estados Unidos.

2.2. Amplificação do BGC

A bactéria *S. albidoflavus* ANT_B131 foi reativada em meio Ágar Nutrient (NA, Difco) a 28 °C por 48 h e o DNA genômico foi extraído (van Soolingen *et al.*, 1991). Foram desenhados primers para o BGC do lasso peptídeo. O primer PgeneA_foward

(ATGACAGAGCTCGCAGCACCGTCAACCACTC) foi desenhado com sítio de restrição para a enzima *SacI* e o primer *PgeneD_reverse* (CCGGAATTCAACGCGCGGAATCGATCAG) foi desenhado com sítio de restrição para a enzima *EcoRI*, utilizando o software Geneious Prime (<https://www.geneious.com/>), ambos os *primers* foram sintetizados pela Sigma Aldich. As reações de cadeia de polimerase (PCR) foram realizadas com Phusion High-Fidelity DNA polymerase (Thermo Fisher) nas condições descritas na Tabela 14. Foi utilizado 10 ng do DNA como molde e o volume final da reação foi de 50 µL. Os produtos amplificados foram analisados em gel de agarose 1% em tampão TAE a 110 V, 400 A, por 60 min.

Tabela 14. Condições de PCR para amplificação do BGC do lasso peptídeo da *S. albidoflavus* ANT_B131.

Passo		Temperatura (°C)	Tempo
Desnaturação inicial		98	30 segundos
30 ciclos	Desnaturação	98	10 segundos
	Anelamento	72 - 68	30 segundos
	Extensão	72	2 minutos e 20 segundos
Extensão final		72	2 minutos

2.3. Construção do plasmídeo

Para a construção do plasmídeo foi utilizado o vetor pSK019, que utiliza o promotor *araC/P* (Kunakom e Eustaquio, 2020). Os produtos de PCR e o vetor foram digeridos usando as enzimas *EcoRI*-HF e *SacI*-HF, nas condições de ativação a 37 °C por duas h e inativação a 65 °C por 20 min, utilizando tampão *cutsmart*. A digestão foi analisada em gel de agarose 1% em tampão TAE a 110 V, 400 A, por 60 min.

A ligação vetor e inserto foi realizada utilizando a enzima T4 ligase e o tampão T4 10x ligase, seguindo as indicações do fornecedor (Thermo Scientific) e incubando a temperatura ambiente por 2 a 3 h.

Para confirmar se vetor e inserto foram ligados de forma correta, uma nova digestão foi realizada utilizando as enzimas de restrição *NcoI* e *AatII*. Para isso, o DNA plasmidial foi extraído usando o kit Zymo Research plasmid miniprep (D4016) de acordo com as instruções do fabricante. A digestão foi realizada nas condições de ativação a 37 °C por 2 h e inativação a

80 °C por 20 min, utilizando tampão *cutsmart*. A digestão foi analisada em gel de agarose 1% em tampão TAE a 110 V, 400 A, por 60 min.

A fim de aumentar o número de plasmídeos para transformar o vetor de expressão, *E. coli* DH5 α competentes foram transformadas com os plasmídeos (vetor e inserto ligados). Para transformação foi utilizado 12 μ L da reação de ligação e 50 μ L das células de *E. coli*. O método de *heat-shock* (1 min da mistura a 42 °C e 1 min no gelo) foi utilizado para transformar as células. Os clones cresceram em meio LB ágar contendo kanamicina (50 μ g. mL⁻¹), por 18 a 24 h (Kunakom e Eustaquio, 2020).

2.4. Eletroporação do plasmídeo na *Burkholderia* sp. FERM BR-3421

Uma alíquota de 20 μ L de um criostoque de FERM BP-3421 foi inoculado em 5,0 mL de LB e incubado a 30 °C, 180 rpm, por 24 h. 1,0 mL desta cultura foi adicionada em 50 mL de caldo LB, e incubado a 30 °C a 180 rpm até o atingir OD600. As células foram então colhidas por centrifugação a 4 °C a 4000 rpm durante 5 min. O pellet celular foi lavado duas vezes com tampão HEPES 1 mM pH 7,0 (Sigma-Aldrich), com 50 mL e 25 mL de tampão. O pellet celular foi suspenso no tampão e células eletrocompetentes de FERM BP-3421 (50 μ L) foram eletroporadas com até 500 ng de DNA de plasmídeo (pUCP_neo ou pPF002) em cubeta de eletroporação gelada 0,2 cm usando um micropulsor Bio-Rad definido para 2,5 kV e de acordo metodologia desenvolvida na University of Illinois at Chicago. Após a eletroporação, as células foram então semeadas em LB ágar contendo Kanamicina 500 μ g. mL⁻¹ para selecionar o plasmídeo de entrada. As placas foram incubadas a 30 °C por 3-5 dias. Após esse período, as colônias foram recuperadas e preservadas em -20 °C (Kunakom e Eustaquio, 2020).

A transformação foi confirmada realizando PCR da colônia de FERM BP-3421 obtidas, utilizando os primers descritos no item 2.2.

2.5. Cultivo da FERM BP-3421 para produção do lasso peptide

Uma alíquota de 5,0 mL de meio seed (peptona 2,5 g.L⁻¹, extrato de levedura 1,25 g.L⁻¹, e cloreto de sódio 1,25 g.L⁻¹) foi inoculado com 20,0 μ L de um estoque criogênico da cepa FERM BP-3421 contendo pUCP_neo (controle negativo) ou pPF002 e incubado a 30 °C a 200 rpm durante 3 dias. As células foram cultivadas em frasco Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio de produção 2S4G (glicerol 20 g.L⁻¹, peptona Hy-soy 10 g.L⁻¹, sulfato de amônio 1,0 g.L⁻¹, sulfato de magnésio 0,03 g.L⁻¹ e carbonato de cálcio 1,0 g.L⁻¹). As culturas foram

suplementadas com kanamicina 500 $\mu\text{g. L}^{-1}$ e 50mM de L-arabinose (Sigma-Aldrich) e incubado a 30 °C a 200 rpm por 5 dias.

2.6. Extração do lasso peptídeo

As culturas foram centrifugadas por 10 min a 4000 rpm. As células foram descartadas e o sobrenadante foi misturado com 5% resina XAD-16 (Alfa Aesar), seguido de agitação por 1 h a 500 rpm. A resina foi separada do meio por centrifugação de 5 min a 4000 rpm e lavada com um volume de água. A água foi removida por centrifugação (5 min, 4000 rpm) e o metabólito foi extraído da resina em um volume de metanol 5,0 mL em agitação por 30 min a 500 rpm. O extrato de metanol foi seco sob rotavaporador.

2.7. Análise de MALDI-TOF MS

As medições MALDI-TOF MS foram realizadas em um espectrômetro de massa Autoflex Speed LRF (Bruker Daltonics) equipado com um laser Smartbeam Spectra utilizando reflectron de modo positivo (total de 1000 tiros; tensão da fonte de íons: 19 kV; fonte de íons 2 tensão: 16,61 kV; tensão do refletor 1: 20,86 kV; refletor 2 tensão: 9,71 kV; tensão da lente: 8,3 kV, faixa de massa: 200–3500 Da; extração de íons pulsados: 200 ns). As aquisições de dados foram realizadas usando o software FlexControl v. 3.4.135.0 (Bruker Daltonics) e o software FlexAnalysis v.3.4.

2.8. Análise de UHPLC-MS

A análise de UHPLC-MS (*Ultra-high pressure liquid chromatography-mass spectrometry*) foi realizada no Thermo Scientific QExactive® Hybrid Quadrupole-Orbitrap Mass Spectrometer. Os parâmetros utilizados foram: modo positivo, voltagem do capilar a +3.5 kV, temperatura do capilar a 250 °C, S-lens a 50 V, e a fonte de ionização foi HESI (*Heated Electrospray Ionization*). O método SIM (*Selected Ion Monitoring*) para selecionar íons de 1888,3000 a 1889,3000 m/z , que depois foram fragmentados em um alcance de 150,00 – 20000,00 m/z . O volume de injeção foi de 3 μL e a análise do espectro foi conduzida usando o Xcalibur software 3.0.63 (Thermo Fisher Scientific).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Predição do lasso peptídeo no RiPPMiner

A identificação do Cluster 24 pelo antiSMASH (Figura 32), no Capítulo 1, indicou que se trata de um novo BGC, cuja produção de metabólitos secundários através dessa via, pode resultar em um lasso peptídeo desconhecido.

O BGC de 22.384 pb foi identificado pelo antiSMASH (Anexo XI). Os genes relacionados a ORF_87 estava relacionada com o domínio CapB, identificado pelo PRISM como homólogo da enzima Lasso peptide transglutaminase, enquanto a ORF_88 foi relacionada do domínio CapC, homólogo da enzima Lasso peptide asparagine sintase e as ORFs 89 e 90 foram relacionados a genes de precursores de lasso peptídeo (Figura 32).

A sequência do lasso peptídeo foi determinada como:

MQNIAIETTAPEVPALAIIEPVDEITL – GRQSFNDSDKSNYFEN

sendo a parte destacada em vermelho, o possível anel macrolactâmico. O antiSMASH também previu *in silico* a massa molecular como 1889,9 Da.

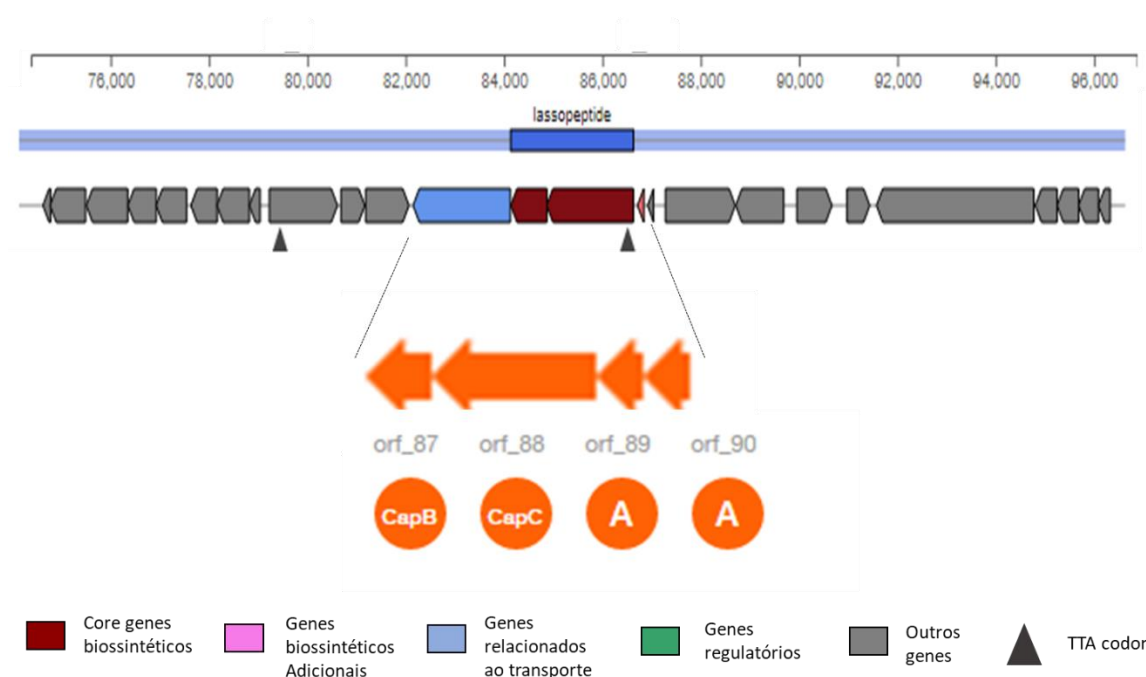


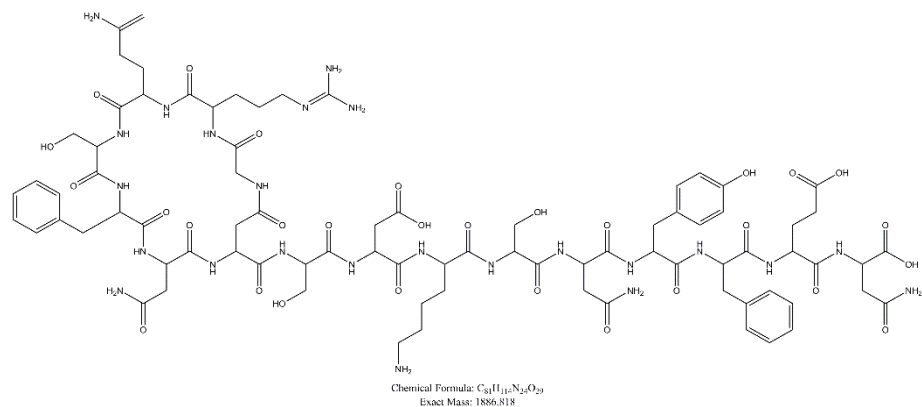
Figura 32. BGC de lasso peptídeo, Cluster 24, identificado pelo antiSMASH e PRISM, oriundo de *Streptomyces albidoflavus* ANT_B131.

Afim de simular a fórmula estrutural, a molécula e o *core peptide*, foi utilizado o RiPPMiner, que realiza as predições específicas para diversas classes de RiPPs. Através dele foi possível gerar três modelos de fórmula estrutural e molecular para o lasso peptídeo (Figura 33): Modelo 1 ($C_{81}H_{114}N_{24}O_{29}$) massa exata de 1886,818 Da; Modelo 2 ($C_{80}H_{112}N_{24}O_{30}$) massa

exata 1888,789 Da; Modelo 3 ($C_{44}H_{59}N_{11}O_{16}$) massa exata 997,414 Da. Em cada um dos modelos é possível identificar o local na sequência de peptídeos onde está predita a formação do anel macrolactâmico.

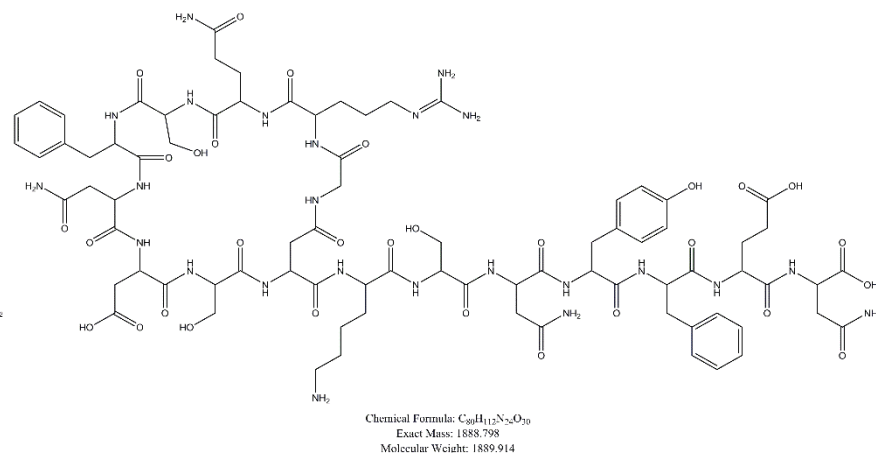
3.2. Amplificação do BGC

Para a amplificação do BGC foram utilizados os genes de transporte de core genes e os primers desenhados nas regiões homólogas a eles. A temperatura de anelamento foi estimada em 72 °C, porém, testes foram feitos com as temperaturas de 72 °C, 71,4 °C, 70,4 °C e 68 °C. O produto de PCR de tamanho 4783 pb, que foi observado em gel de agarose para todas as temperaturas (Figura 34).

Modelo 1

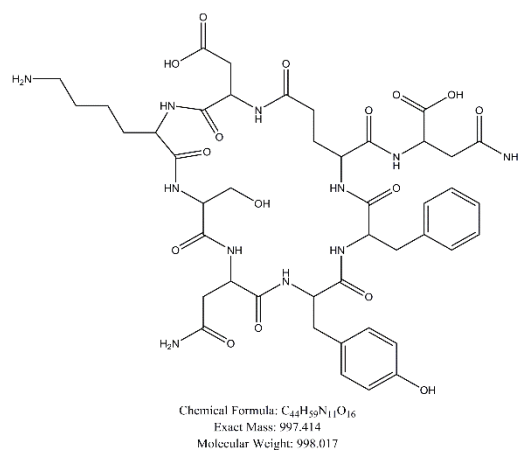
G R Q S F N D S D K S N Y F E N

| _ _ _ _ _ |

Modelo 2

G R Q S F N D S D K S N Y F E N

| _ _ _ _ _ |

Modelo 3

D K S N Y F E N

| _ _ _ _ _ |

Figura 33. Modelos de estrutura molecular preditas pelo RiPPMiner.

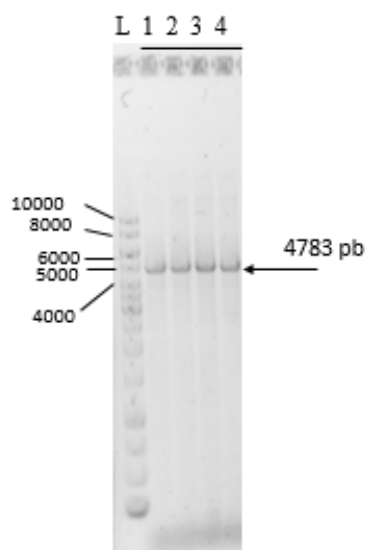


Figura 34. Amplificação por PCR do BGC do lasso peptídeo, analisado em gel de agarose a 1% em tampão TAE, 110 V, 400 A, por 60 min. (L) 1kb ladder; (1) Temperatura de anelamento de 72 °C (2) Temperatura de anelamento de 71,2 °C; (3) Temperatura de anelamento de 70,4 °C; (4) Temperatura de anelamento de 68 °C. Tamanho do produto amplificado de 4783 pb.

3.3. Construção do plasmídeo e obtenção de clones de *E. coli*

O plasmídeo foi construído através da digestão e posterior ligação do vetor pSK019 e dos produtos de PCR obtidos no item 3.2 desse capítulo. O vetor possui um tamanho de aproximadamente 7 kb e sítios de restrição para as enzimas EcoRI e SacI (Figura 35). Após a digestão do produto de PCR, eram esperados três tamanhos de produtos 400 pb, 4.700 pb e 1.000 pb. Para o vetor eram esperados produtos de aproximadamente 480 pb e 7.043 pb. Esses produtos foram obtidos e confirmados em gel de agarose.

A ligação entre vetor e plasmídeo possibilitou a obtenção do plasmídeo de 11.828 pb (Figura 36). O tamanho do plasmídeo foi confirmado em gel de agarose.

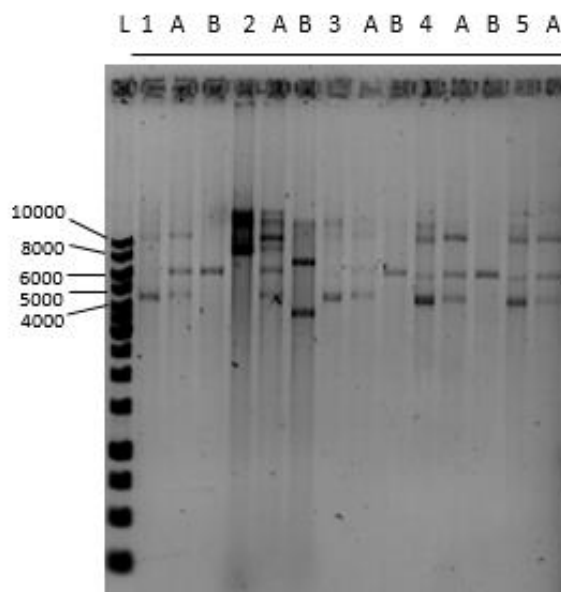


Figura 37. DNA e DNA digerido analisado em gel de agarose 1% em tampão TAE, 110 V, 400 A, 60 min; L- DNA ladder 1 kb; 1, 2, 3, 4, 5 – clones de *E. coli* (tamanho esperado 12 kb); A- plasmídeo digerido com enzima AatII; B-plasmídeo digerido com enzima NcoI.

3.4. Transformação da FERM BP-3421 e expressão do lasso peptídeo

A eficiência de transformação foi calculada durante duas transformações da *Burkholderia* sp. FERM BP-3421 realizadas. A primeira resultou em uma eficiência menor de 64922^{-1} transformantes/ μ L de DNA e a segunda em 48868^{-2} transformantes/ μ L DNA. No total, 10 clones transformados com o plasmídeo pPF002 foram obtidos.

PCR realizadas diretamente da colônia indicaram que os clones 4, 5 e 10 poderiam ter o BGC (Figura 38), porém apenas o sequenciamento da região poderiam garantir que, tanto o plasmídeo quanto o hospedeiro de expressão, apresentaram o BGC.

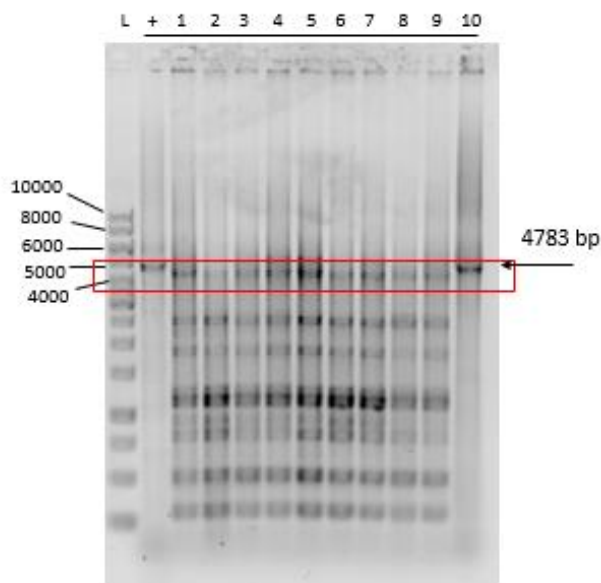


Figura 38. Produtos amplificados do BGC do lasso peptídeo da *Burkholderia* sp. FERM BP-3421 transformada, analisada por gel de agarose 1% em tampão TAE, 110 V, 400 A por 60 min, L- DNA ladder de 10 kb

Os ensaios de expressão seguiram com os clones 4, 5 e 10, além de realizar o controle negativo (meio de cultivo) e fizemos o mesmo ensaio utilizando o *wild type* (WT) da *Burkholderia* sp. FERM-BP 3421 e da *Streptomyces albidoflavus* ANT_B131.

A *Burkholderia* é um gênero membro do Filo Proteobacteria (*-gamma*) e apesar de muitos membros desse gênero serem patogênicas a humanos, este grupo de bactérias é considerada uma importante fonte de produtos naturais (Kunakom e Eustáquio, 2019). Foram isolados desse gênero classes de produtos naturais como policetídeos, como o antimicrobiano lagriamida (Flórez *et al.*, 2018), peptídeos não-ribossomais como o antifúngico gramibactina (Hermenau *et al.*, 2018), RiPPs como o antibacteriano capistriun (Knappe *et al.*, 2008), híbridos PK-NRP como a thailandamida (Ishida *et al.*, 2010), entre outros.

A *Burkholderia* sp. FERM BP-3421 é uma linhagem não patogênica que foi biossinteticamente engenheirada para obter maior rendimento do metabólito nativo thailanstatina A, de até 6 g.L⁻¹ (Eustáquio *et al.*, 2016). Ela foi escolhida como hospedeiro para ser utilizada na expressão do lasso peptídeo capistriun, produzido por uma *Burkholderia* (Knappe *et al.*, 2008). Através desse hospedeiro foi possível obter a expressão do lasso peptídeo de 65 a 580 vezes mais do que o reportado utilizando a *E. coli* como hospedeiro de expressão (Kunakom e Eustáquio, 2020).

A *Streptomyces albidoflavus* ANT_B131 pertence ao Filo Actiobacteria distinto da FERM BP-3421. Além disso, a *Burkholderia* apresenta um alto conteúdo de G+C no seu DNA

(cerca de 67%), assim como as actinobactérias, quando comparado a outros hospedeiros como, por exemplo, *E. coli* (cerca de 50%) (Kunakom e Eustáquio, 2019). Apesar dessa diferença, o BGC mantém regiões conservadas que podem ser expressas independente do hospedeiro. Além disso a possibilidade de validar a FERM BP-3421 como um novo hospedeiro de alto rendimento de produção para um gênero como a *Streptomyces* que é conhecido por produzir diversos metabólitos secundários, é de grande interesse para a pesquisa e desenvolvimento de produtos naturais.

3.5. Análise dos extratos brutos por MALDI-TOF MS e UHPLC MS/MS

Os extratos obtidos dos clones 4, 5 e 10 foram analisados em MALDI-TOF MS e as massas comparadas com as massas dos WT da FERM BP-3421 e com os extratos obtidos das células e do meio de cultivo da ANT_B131.

Não foi possível identificar nenhum das massas previstas de 1886.818 m/z para o modelo 1; 1888.789 m/z para o modelo 2; e 997.414 m/z para o modelo 3, nos clones 4, 5 (Figura 39) e 10 (Figura 40).

Porém, seguiu-se com uma nova análise química com o extrato do clone 10, utilizando o UHPLC-MS/MS com a análise de íons selecionados (SIM) para a faixa de 1888,3000 a 1889,300 m/z . Com essa análise foi possível encontrar diversas massas como a 1888,59 (Figura 41).

Essa análise indica que a massa do modelo 2 foi expressa através da expressão heteróloga no clone 10, porém não confirma que esse seja o lasso peptídeo. Testes adicionais para purificação e identificação química, como a determinação da estrutura por ressonância nuclear magnética (NMR), devem ser realizadas com a finalidade de caracterizar a molécula. Outros testes adicionais, como ensaios antimicrobianos, antivirais e antiproliferativos podem ser realizados para determinar a atividade biológica da molécula purificada.

O *genome mining* tem favorecido o processo de descoberta de novos lasso peptídeos como o chaxapeptin. Esse metabólito é produzido pela *Streptomyces leeuwenhoekii* C58 isolada do Deserto do Atacama e foi isolada e caracterizada utilizando espectrometria de massas e ressonância nuclear magnética (Elsayed *et al.*, 2015). A abordagem de *genome mining* e expressão heteróloga também possibilitou a identificação do lasso peptídeo humididicin, da *Streptomyces humidus* CA-100629. Esse metabólito possui atividade anti-HIV e antifúngica (Marina, Martín e Genilloud, 2020).

4. CONCLUSÃO

Os resultados indicam um grande potencial de expressão da molécula predita pelo modelo

2. Se o lasso peptídeo for expresso no hospedeiro *Burkholderia* sp. FERM BP-3421, haverá a validação do hospedeiro de expressão para um gênero alvo para produção de produtos naturais.

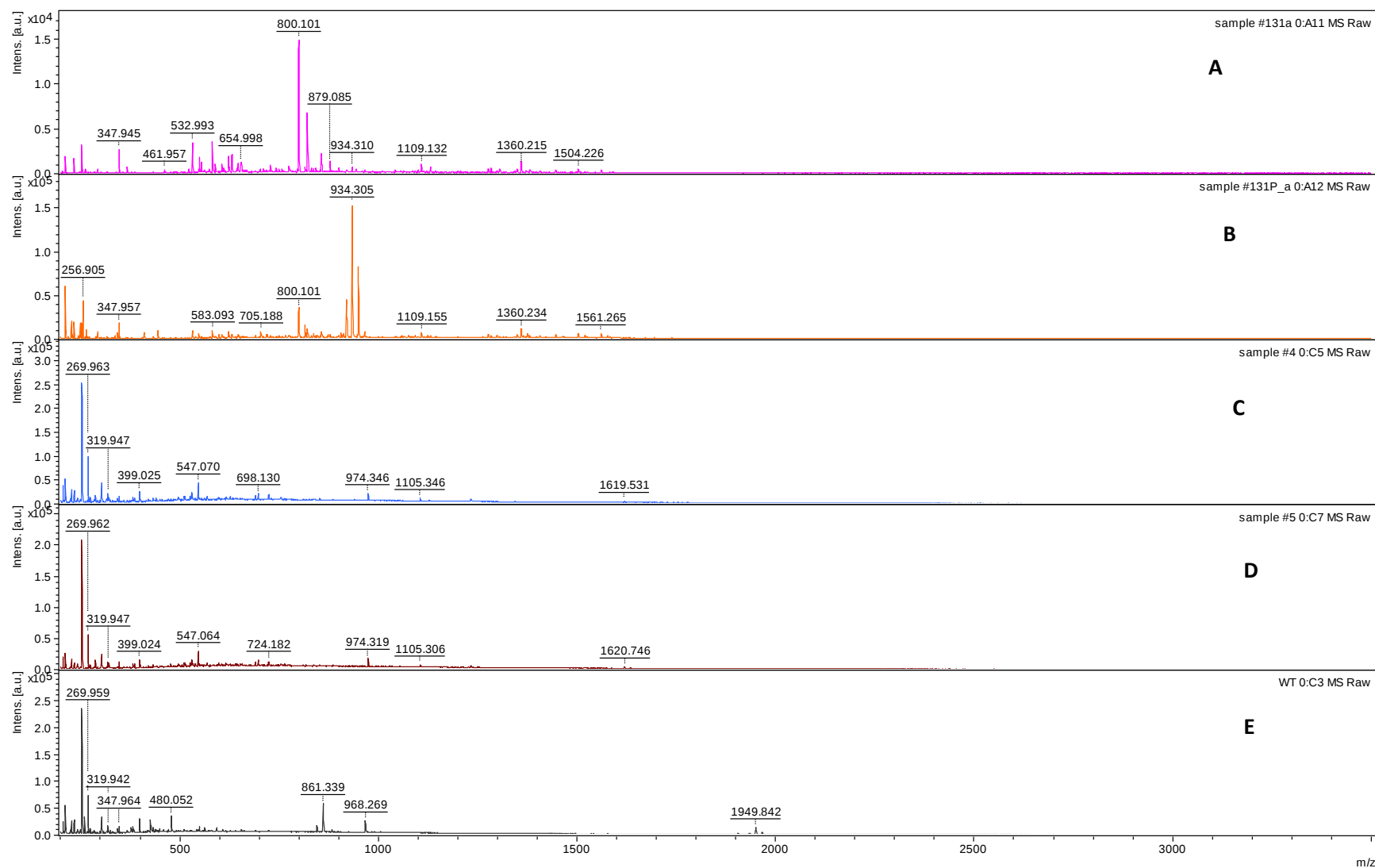


Figura 39. Análise de MALDI-TOF MS dos extratos obtidos de (A) células de ANT_B131, (B) sobrenadante do ANT_B131, (C) clone 4 da FERM BP-3421, (D) clone 5 da FERM BP-3421, e (E) WT da FERM BP-3421.

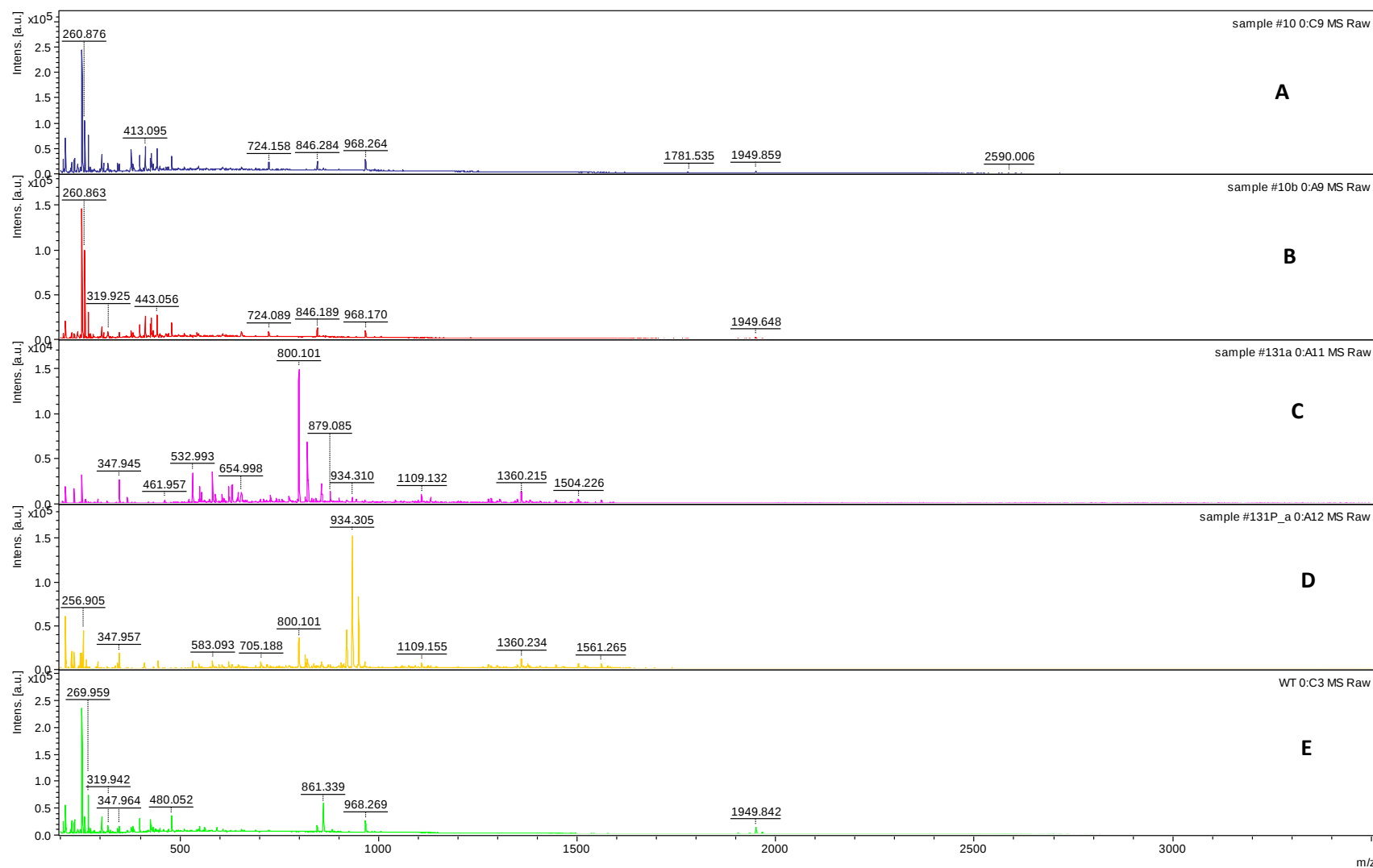


Figura 40. Análise de MALDI-TOF MS dos extratos obtidos de (A) clone 10 da FERM BP-3421, (B) clone 10 da FERM BP-3421 (C) células de ANT_B131, (D) sobrenadante do ANT_B131 e (E) WT da FERM BP-3421.

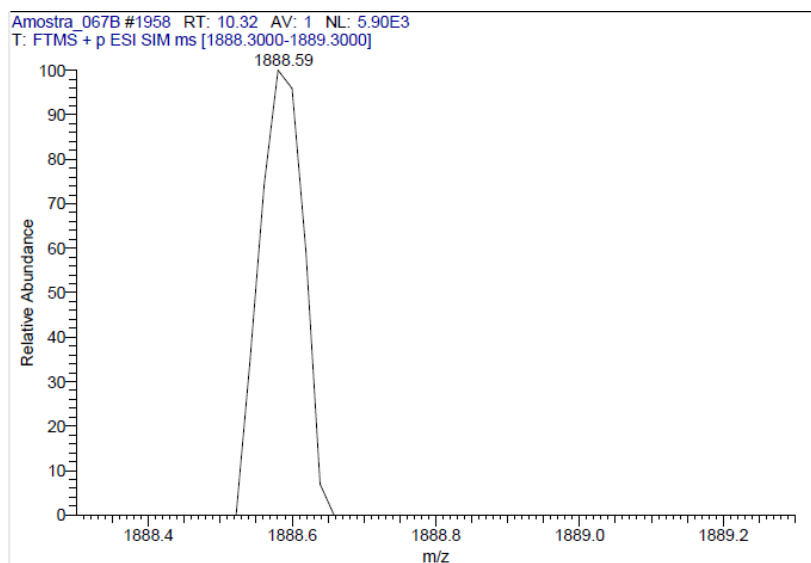


Figura 41 UHPLC-MS/MS do extrato obtido do clone 10 da FERM-BP-3421; Íon selecionado (SIM) de 1888,59 m/z .

DISCUSSÃO FINAL

O presente estudo revelou o potencial das bactérias *Streptomyces albidoflavus* ANT_B131 e *Marinobacter* sp. ANT_B65 como produtoras de metabólitos secundários bioativos. O sequenciamento do genoma completo permitiu que fossem realizadas análises taxonômicas de MLSA e isHDD relacionando a linhagem ANT_B131 a espécie *S. albidoflavus*. A isHDD indicou que a linhagem ANT_B65 é uma possível nova espécie do gênero *Marinobacter*, que está em processo de descrição. Além disso, a análise de *genome mining* revelou o potencial biossintético de 24 BGCs para *S. albidoflavus* ANT_B131 e 3 BGCs para *Marinobacter* sp. ANT_B65. A identificação de BGCs através da técnica de *genome mining* e da curagem manual depende da disponibilidade de sequências de DNA em banco de dados como NCBI e MIBiG (Kautsar *et al.*, 2020), e de atualizações de plataformas de análises de domínios conservados de classes de produtos naturais. Um exemplo disso, é a análise de *genome mining* da *Marinobacter* sp. ANT_B65, que até a última atualização da plataforma antiSMASH, que ocorreu em 2019 (Blin, Shaw, Steinke, Villebro, Ziemert, Lee, Marnix H Medema, *et al.*, 2019), apresentava a identificação de apenas um BGC, da ectoína, e após a inclusão de detecção de domínios de betalactona foi possível detectar mais dois domínios, que ainda não são possíveis detectar em plataformas como PRISM (Skinnider *et al.*, 2017).

Muitos autores relatam como a abordagem de *genome mining* é recente e ainda está em fase de desenvolvimento, depende de um robusto banco de dados e sequenciamento e montagem de genomas adequados para que os BGCs não fiquem fragmentados (Albarano *et al.*, 2020; Hooft *et al.*, 2020; Ziemert, Weber e Medema, 2020). Apesar das limitações atuais, a técnica tem causado impacto na descoberta de novos produtos naturais e potenciais BGCs. O *genome mining* possibilitou a descoberta de um cluster relacionado a um PKS tipo I relacionando com seis novos alcaloides argimicins P, alguns deles com atividade antibiótica (Ye *et al.*, 2017). Novos montanastatinas e valinomicinas ciclodepsipeptídeos derivados da *Streptomyces* sp. CBMAI 2042 foram revelados pelas análises de *genome mining* e molecular networking (Paulo *et al.*, 2019).

A atividade antiproliferativa e antimicrobiana de extratos brutos bacterianos e frações foi observada nesse estudo. Destacaram-se os extratos brutos da bactéria *S. albidoflavus* ANT_B131 cujos extratos brutos apresentaram atividade antimicrobiana frente bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungo e atividade antiproliferativa frente a quatro células humanas tumorais. Mais da metade dos antibacterianos recentemente aprovados nas últimas quatro décadas são produtos naturais ou seus derivados sintéticos, conhecidos como antibióticos e

grande parte deles produzido por estreptomicetos, principalmente aqueles do gênero *Streptomyces* (Newman e Cragg, 2020). Um exemplo disso é a base de dados StreptomeDB é uma base de dados pública que explora a presença de mais de 6.524 compostos oriundos de estreptomicetos, relacionando com as referências e atividades, e a rota biossintética, quando descrita (Klementz *et al.*, 2016). No banco de dados NPAtlas (van Santen *et al.*, 2019) é possível fazer uma busca específica para o gênero *Marinobacter*. Atualmente estão descritos 14 compostos associados ao gênero, dos quais atuam como siderófos. São eles: a petrobactina e seus derivados (Barbeau *et al.*, 2002; Hickford *et al.*, 2004), aquachelin A-C (Martinez *et al.*, 2000) marinobactin A-E (Martinez e Butler, 2007) . O que mostra que o gênero produz metabólitos secundários bioativos, e existe ainda um potencial a ser explorado.

A análise de *Molecular Networking* possibilitou avaliar a presença de metabólitos secundários nos extratos bacterianos. associados a atividade antiproliferativa e antimicrobiana nos extratos da bactéria *Streptomyces albidoflavus* ANT_B131. No estudo de Purves e colaboradores (2016) foram isoladas 85 bactérias dos Filos Firmicutes e Actinobacteria isolados de sedimentos da Antártica e da Escócia e os extratos brutos, analisados por *Molecular Networking*, revelaram a presença de antimicinas e potenciais metabólitos relacionados a atividade antiproliferativa (Purves *et al.*, 2016). Para a bactéria isolada da Antártica *S. fildesensis* So13.3 foram obtidos 42 BGCs na análise de *genome mining* dos quais não foi possível obter a expressão de nenhum deles em condições de cultivo laboratoriais, quando analisado o extrato pelo método de *Molecular Networking* (Núñez-Montero *et al.*, 2019). Em nosso estudo, o uso de diferentes meios de cultivo e diferentes técnicas de obtenção de extratos brutos possibilitou a expressão de 20,8% dos BGCs identificados nos extratos brutos da *S. albidoflavus* ANT_B131 através do *Molecular Networking*. Isso revela como muitos clusters se mantêm silenciosos e não são expressos em condições laboratoriais, porém o uso de diferentes métodos de cultivo e extração podem auxiliar no processo de expressão de BGCs. Além disso, o uso de expressão heteróloga para expressão de BGCs é uma abordagem a ser utilizada em casos de genes silenciosos ou órfãos, no qual se desconhece o produto a ser expresso.

O estudo desenvolvido com a bactéria *S. albidoflavus* ANT_B131 deu origem ao artigo submetido intitulado “Genome mining reveal secondary metabolites of antarctic bacteria *Streptomyces albidoflavus* ANT_B131 related to antimicrobial and antiproliferative activities”.

Por fim esse estudo abordou a expressão heteróloga de um lasso peptídeo, que não era expresso em condições de cultivo normais, conforme ilustrado nas análises de MALDI-TOF. O uso de um hospedeiro como uma *Burkholderia* sp. não patogênica, e que possibilita a

produção do lasso peptídeo em larga escala (Kunakom e Eustaquio, 2020), favorece a produção de um produto natural para estudos posteriores. O estudo da elucidação química da molécula está em andamento.

A Antártica é conhecida como o continente mais frio, seco, com mais vento e mais inacessível da Terra (Bratchkova e Ivanova, 2011). Ambientes extremos se tornaram alvo de interesse na busca por antimicrobianos e outros metabólitos secundários (Ivanova *et al.*, 2013; Lavin *et al.*, 2016; Lamilla *et al.*, 2017; Danilovich *et al.*, 2018; Núñez-Montero *et al.*, 2019). As linhagens ANT_B131 e ANT_B65 foram isoladas durante o verão antártico de invertebrados marinhos filtrantes uma *Salp* sp., tunicado planctônico, e uma esponja, respectivamente. O mecanismo de filtragem fornece o contato entre micro-organismos associados ao invertebrado, nutrientes, sal e outros micro-organismos (Iguchi e Ikeda, 2004). Nesse contexto, os antimicrobianos têm um importante papel ecológico na regulação da população de micro-organismos. Os micro-organismos produtores podem ter uma vantagem na sobrevivência contra os micro-organismos vizinhos, inibindo-os ou matando-os (Mullis *et al.*, 2019). Em ambientes extremos, o metabolismo único pode ser essencial para a sobrevivência, resultando na produção de moléculas ainda desconhecidas. Nesse sentido, esta pesquisa mostra o potencial genético e metabólico das bactérias antárticas, especialmente *Marinobacter* sp. ANT_B65 e *Streptomyces albidoflavus* ANTB_131.

CONCLUSÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

Este estudo caracterizou os BGCs das bactérias *Streptomyces albidoflavus* ANT_B131 e *Marinobacter* sp. ANT_B65, indicando clusters gênicos relacionados a produtos naturais descritos na literatura, assim como clusters gênicos órfãos. Além disso, foi possível identificar, através de espectrometria de massas, metabólitos secundários expressos por 20,8% dos BGCs identificados em *Streptomyces albidoflavus* ANT_B131.

Marinobacter sp. ANT_B65 é uma possível nova espécie do gênero, e testes de taxonomia polifásica devem ser realizados a fim de descrever a espécie. Os resultados observados nesse estudo indicam um importante potencial a ser explorado na descoberta de duas betalactonas associadas aos BGCs da ANT_B65, podendo ser realizados através de expressão heteróloga. A presença das moléculas homólogas à metabólitos de esponjas, observadas nos extratos brutos, podem ser confirmadas através de análises de química analítica.

Para *Streptomyces albidoflavus* ANT_B131, 15 BGCs (de 24) ainda podem ser estudados quanto ao potencial de produzirem novos produtos naturais, deles 10 são órfãos. Ainda existe um grande potencial inexplorado de uma diversidade de classes de produtos naturais inclusos nesses BGCs, como policetídeos, peptídeos não-ribossomais e RiPPs. Estudos futuros podem abordar a descoberta de novos produtos naturais oriundos desses clusters gênicos, incluindo a relação com o potencial antimicrobiano e antiproliferativo abordado nesse estudo.

A caracterização química, através de técnicas de Ressonância Nuclear Magnética, é o próximo passo para finalizar o estudo do lasso peptídeo. Estudos adicionais de atividade antimicrobiana, antiviral e antiproliferativa, podem ser realizados a fim de caracterizar a atividade biológica da molécula.

REFERÊNCIAS

- Adelman, K. *et al.* (2004) “Molecular Mechanism of Transcription Inhibition by Peptide Antibiotic Microcin J25”, *Molecular Cell*, 14, p. 753–762.
- Agrawal, P. *et al.* (2017) “RiPPMiner: A bioinformatics resource for deciphering chemical structures of RiPPs based on prediction of cleavage and cross-links”, *Nucleic Acids Research*, 45(W1), p. W80–W88. doi: 10.1093/nar/gkx408.
- Alanjary, M. *et al.* (2017) “The Antibiotic Resistant Target Seeker (ARTS), an exploration engine for antibiotic cluster prioritization and novel drug target discovery”, 45(May), p. 42–48. doi: 10.1093/nar/gkx360.
- Albarano, L. *et al.* (2020) “Genome Mining as New Challenge in Natural Products Discovery”, *Marine Drugs*, 18(199), p. 1–17. doi: doi:10.3390/md18040199.
- Álvarez, R. Á. *et al.* (2015) “Molecular genetics of naringenin biosynthesis , a typical plant secondary metabolite produced by *Streptomyces clavuligerus*”, *Microbial Cell Factories*. BioMed Central, p. 1–12. doi: 10.1186/s12934-015-0373-7.
- Angert, E. R. (2005) “Alternatives to binary fission in bacteria”, *Nature Reviews Microbiology*, 3(3), p. 214–224. doi: 10.1038/nrmicro1096.
- Angolini, C. F. F. *et al.* (2016) “Genome mining of endophytic streptomyces wadayamensis reveals high antibiotic production capability”, *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 27(8), p. 1465–1475. doi: 10.5935/0103-5053.20160180.
- Arnison, P. G. *et al.* (2013) “Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptide natural products: overview and recommendations for a universal nomenclature”, *Natural Product Reports*. The Royal Society of Chemistry, 30(1), p. 108–160. doi: 10.1039/C2NP20085F.
- Ayuso-Sacido, A. e Genilloud, O. (2005) “New PCR primers for the screening of NRPS and PKS-I systems in actinomycetes: Detection and distribution of these biosynthetic gene sequences in major taxonomic groups”, *Microbial Ecology*, 49(1), p. 10–24. doi: 10.1007/s00248-004-0249-6.
- Barbeau, K. *et al.* (2002) “Petrobactin, a photoreactive siderophore produced by the oil-degrading marine bacterium *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*”, *Journal of the American Chemical Society*, 124(3), p. 378–379. doi: 10.1021/ja0119088.
- Berdi, J. (2005) “Bioactive microbial metabolites”, *J Antibiotics*, 58(1), p. 1–26. Available at: <https://0-www-nature-com.pugwash.lib.warwick.ac.uk/articles/ja20051.pdf>.
- Bird, L. J. *et al.* (2018) “Development of a Genetic System for *Marinobacter atlanticus* CP1 (sp. nov.), a Wax Ester Producing Strain Isolated From an Autotrophic Biocathode”, *Frontiers in Microbiology*, 9(December), p. 1–13. doi: 10.3389/fmicb.2018.03176.
- Blin, K., Shaw, S., Steinke, K., Villebro, R., Ziemert, N., Lee, S. Y., Medema, Marnix H, *et al.* (2019) “antiSMASH 5.0: updates to the secondary metabolite genome mining pipeline”, *Nucleic Acids Research*, 47(W1), p. W81–W87. doi: 10.1093/nar/gkz310.
- Blin, K., Shaw, S., Steinke, K., Villebro, R., Ziemert, N., Lee, S. Y., Medema, Marnix H., *et al.* (2019) “AntiSMASH 5.0: Updates to the secondary metabolite genome mining pipeline”,

Nucleic Acids Research. Oxford University Press, 47(W1), p. W81–W87. doi: 10.1093/nar/gkz310.

Bolger, A. M., Lohse, M. e Usadel, B. (2014) “Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data”, *Bioinformatics*, 30(15), p. 2114–2120. doi: 10.1093/bioinformatics/btu170.

Bratchkova, A. e Ivanova, V. (2011) “Bioactive Metabolites Produced by Microorganisms Collected in Antarctica and the Arctic”, *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. Taylor & Francis, 25(sup1), p. 1–7. doi: 10.5504/BBEQ.2011.0116.

Brettin, T. *et al.* (2015) “RASTtk: A modular and extensible implementation of the RAST algorithm for building custom annotation pipelines and annotating batches of genomes”, *Scientific Reports*, 5. doi: 10.1038/srep08365.

Brüssow, H. (2020) “The Novel Coronavirus – Latest Findings”, *Microbial Biotechnology*, 13(4), p. 819–828. doi: 10.1111/1751-7915.13592.

Cao, J. *et al.* (2018) “*Marinobacter profundus* sp. nov., a slightly halophilic bacterium isolated from a deep-sea sediment sample of the New Britain Trench”, *Antonie van Leeuwenhoek*. Springer International Publishing, 8. doi: 10.1007/s10482-018-1176-8.

Cao, L. *et al.* (2019) “MetaMiner: A Scalable Peptidogenomics Approach for Discovery of Ribosomal Peptide Natural Products with Blind Modifications from Microbial Brief Report MetaMiner: A Scalable Peptidogenomics Approach for Discovery of Ribosomal Peptide Natural Products wi”, p. 1–9. doi: 10.1016/j.cels.2019.09.004.

Carpenter, D. E. *et al.* (2018) “Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria.”, *Clinical and Laboratory Standards Institute*, 9, p. 1–64. Available at: www.clsi.org.

CDC (2019) “Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2019”, *Centers for Disease Control and Prevention Services, U.S Department of Health and Human*, p. 1–150. Available at: https://www.cdc.gov/drugresistance/biggest_threats.html.

Chambers, M. C. *et al.* (2012) “A cross-platform toolkit for mass spectrometry and proteomics”, *Nature Biotechnology*, 30(10), p. 918–920. doi: 10.1038/nbt.2377.

Chekan, J. R. *et al.* (2016) “Structure of the Lasso Peptide Isopeptidase Identifies a Topology for Processing Threaded Substrates”, *Journal of the American Chemical Society*. 2016/12/07, 138(50), p. 16452–16458. doi: 10.1021/jacs.6b10389.

Chen, S. *et al.* (2003) “Organizational and Mutational Analysis of a Complete FR-008/Candicidin Gene Cluster Encoding a Structurally Related Polyene Complex”, *Chemistry & Biology*, 10(11), p. 1065–1076. doi: 10.1016/j.chembiol.2003.10.00.

Cheung-Lee, W. L. e Link, A. J. (2019) “Genome mining for lasso peptides: past, present, and future”, *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. Springer International Publishing. doi: 10.1007/s10295-019-02197-z.

Convey, P. e Peck, L. S. (2019) “Antarctic environmental change and biological responses”, *Science Advances*, 5(11). doi: 10.1126/sciadv.aaz0888.

Cui, Z. *et al.* (2016) “*Marinobacter aromaticivorans* sp. nov., a polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacterium isolated from sea sediment”, p. 353–359. doi: 10.1099/ijsem.0.000722.

- Danilovich, M. E. *et al.* (2018) “Antarctic bioprospecting: in pursuit of microorganisms producing new antimicrobials and enzymes”, *Polar Biology*. Springer Berlin Heidelberg, 41(7), p. 1417–1433. doi: 10.1007/s00300-018-2295-4.
- Darling, A. E., Mau, B. e Perna, N. T. (2010) “ProgressiveMauve: Multiple genome alignment with gene gain, loss and rearrangement”, *PLoS ONE*, 5(6). doi: 10.1371/journal.pone.0011147.
- Duncan, K. R. *et al.* (2015) “Molecular networking and pattern-based genome mining improves discovery of biosynthetic gene clusters and their products from *salinispora* species”, *Chemistry and Biology*, 22(4), p. 460–471. doi: 10.1016/j.chembiol.2015.03.010.
- Elsayed, S. S. *et al.* (2015) “Chaxapeptin, a Lasso Peptide from Extremotolerant *Streptomyces leeuwenhoekii* Strain C58 from the Hyperarid Atacama Desert”, *The Journal of Organic Chemistry*. American Chemical Society, 80(20), p. 10252–10260. doi: 10.1021/acs.joc.5b01878.
- Ernst, M. *et al.* (2019) “Molnetenhancer: Enhanced molecular networks by integrating metabolome mining and annotation tools”, *Metabolites*, 9(7). doi: 10.3390/metabo9070144.
- Eustáquio, A. S. *et al.* (2016) “Biosynthetic engineering and fermentation media development leads to gram-scale production of spliceostatin natural products in”, *Metabolic Engineering*. Elsevier, 33, p. 67–75. doi: 10.1016/j.ymben.2015.11.003.
- Ewing, B. e Green, P. (1998) “Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities”, *Genome Research*, 8(3), p. 186–194. doi: 10.1101/gr.8.3.186.
- Felsenstein, J. (1985) “Confidence Limits on Phylogenies: an Approach Using the Bootstrap.”, *Evolution*, 39(4), p. 783–791. doi: 10.1080/00837792.1905.10669550.
- Firáková, S., Proksa, B. e Šturdíková, M. (2007) “Biosynthesis and biological activity of enniatins”, *Pharmazie*, 62(8), p. 563–568. doi: 10.1691/ph.2007.8.7600.
- Flórez, L. V *et al.* (2018) “An antifungal polyketide associated with horizontally acquired genes supports symbiont-mediated defense in *Lagria villosa* beetles”, *Nature Communications*. Springer US, 9(2478), p. 1–10. doi: 10.1038/s41467-018-04955-6.
- França, P. (2015) *Investigação genética e funcional da produção de compostos antimicrobianos por bactérias oriundas da Antártica*. Universidade Estadual de Campinas. Available at: <http://www.repositorio.unicamp.br/handle/REPOSIP/316713>.
- de França, P., Camilo, E. e Fantinatti-Garboginni, F. (2018) “Draft Genome Sequence of *Marinobacter* sp. Strain ANT_B65, Isolated from Antarctic Marine Sponge.”, *Genome announcements*, 6(1). doi: 10.1128/genomeA.01404-17.
- Fu, G. *et al.* (2020) “*Micromonospora zhangzhouensis* sp. nov., a Novel Actinobacterium Isolated from Mangrove Soil, Exerts a Cytotoxic Activity in vitro”, *Scientific Reports*. Springer US, 10(1), p. 1–12. doi: 10.1038/s41598-020-60677-0.
- Gauthier, M. *et al.* (1992) “*Marinobacter hydrocarbonoclasticus* gen. nov., sp. nov., a New, Extremely Halotolerant, Hydrocarbon-Degrading Marine”, *Int J Syst Bacteriol.*, 42(4), p. 568–576.
- Genilloud, O. (2017) “Actinomycetes: still a source of novel antibiotics”, *Natural Product Reports*. The Royal Society of Chemistry, 34(10), p. 1203–1232. doi: 10.1039/C7NP00026J.

- Glaeser, S. P. e Kämpfer, P. (2015) “Multilocus sequence analysis (MLSA) in prokaryotic taxonomy”, *Systematic and Applied Microbiology*. Elsevier GmbH., 38(4), p. 237–245. doi: 10.1016/j.syapm.2015.03.007.
- Gordon, D., Abajian, C. e Green, P. (1998) “Consed: A graphical tool for sequence finishing”, *Genome Research*, 8(3), p. 195–202. doi: 10.1101/gr.8.3.195.
- Goris, J. *et al.* (2007) “DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities.”, *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. England, 57(Pt 1), p. 81–91. doi: 10.1099/ijs.0.64483-0.
- Gurevich, A. *et al.* (2013) “QUAST: Quality assessment tool for genome assemblies”, *Bioinformatics*, 29(8), p. 1072–1075. doi: 10.1093/bioinformatics/btt086.
- Gurevich, A. *et al.* (2018) “Increased diversity of peptidic natural products revealed by modification-tolerant database search of mass spectra”, *Nat Microbiol.*, 3(3), p. 319–327. doi: 10.1038/s41564-017-0094-2.Increased.
- Haese, A. *et al.* (1993) “Molecular characterization of the enniatin synthetase gene encoding a multifunctional enzyme catalysing A⁺ methydepsipeptide formation in *Fusarium scirpi*”, 7, p. 905–914.
- Hassan, A. M. E. *et al.* (2001) “The immunopathology of actinomycetoma lesions caused by *Streptomyces somaliensis*”, *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 95(1), p. 89–92. doi: 10.1016/S0035-9203(01)90346-3.
- Hedi, A., Luc, J. e Fardeau, N. S. M. (2015) “*Marinobacter piscensis* sp. nov., a Moderately Halophilic Bacterium Isolated from Salty Food in Tunisia”, p. 544–549. doi: 10.1007/s00284-014-0754-x.
- Hermenau, R. *et al.* (2018) “Gramibactin is a bacterial siderophore with a diazeniumdiolate ligand system”, *Nature Chemical Biology*. Springer US, p. 1–3. doi: 10.1038/s41589-018-0101-9.
- Hertweck, C. (2009) “Hidden biosynthetic treasures brought to light.”, *Nature chemical biology*. United States, p. 450–452. doi: 10.1038/nchembio0709-450.
- Hickford, S. J. H. *et al.* (2004) “Petrobactin sulfonate, a new siderophore produced by the marine bacterium *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*”, *Journal of Natural Products*, 67(11), p. 1897–1899. doi: 10.1021/np049823i.
- Hooft, J. J. J. Van Der *et al.* (2020) “Linking genomics and metabolomics to chart specialized metabolic diversity”, *Chem. Soc. Rev.* Royal Society of Chemistry, 49, p. 3297–3314. doi: 10.1039/d0cs00162g.
- Hosotani, N. *et al.* (2005) “Antimycins A10-A16, seven new antimycin antibiotics produced by *Streptomyces* spp. SPA-10191 and SPA-8893”, *Journal of Antibiotics*, 58(7), p. 460–467. doi: 10.1038/ja.2005.61.
- Hunter-Cevera, J. e Belt, A. (1996) *Maintenance Cultures for Biotechnology and Industry*. Academic P. London.
- Iguchi, N. e Ikeda, T. (2004) “Metabolism and elemental composition of aggregate and solitary forms of *Salpa thompsoni* (Tunicata: Thaliacea) in waters off the Antarctic Peninsula during

- austral summer 1999”, *Journal of Plankton Research*, 26(9), p. 1025–1037. doi: 10.1093/plankt/fbh093.
- Ishida, K. *et al.* (2010) “Induced Biosynthesis of Cryptic Polyketide Metabolites in a *Burkholderia thailandensis* Quorum Sensing Mutant”, *J Am Chem Soc*, 132, p. 13966–13968.
- Ivanova, V. *et al.* (2013) “Structure elucidation of a new natural diketopiperazine from a *Microbispora aerata* strain isolated from Livingston Island, Antarctica.”, *Natural product research*, 27(2), p. 164–70. doi: 10.1080/14786419.2012.665911.
- de Jong, A. *et al.* (2006) “BAGEL: a web-based bacteriocin genome mining tool”, *Nucleic Acids Research*, 34(suppl_2), p. W273–W279. doi: 10.1093/nar/gkl237.
- Kalinovskaya, N. I. *et al.* (2011) “Marine isolate *Citricoccus* sp. KMM 3890 as a source of a cyclic siderophore nocardamine with antitumor activity”, *Microbiological Research*. Elsevier GmbH., 166(8), p. 654–661. doi: 10.1016/j.micres.2011.01.004.
- Kautsar, S. A. *et al.* (2020) “MIBiG 2.0: a repository for biosynthetic gene clusters of known function”, *Nucleic Acids Research*, 48(D1), p. D454–D458. doi: 10.1093/nar/gkz882.
- Khan, S. T. *et al.* (2010) “*Streptomyces tateyamensis* sp. nov., *Streptomyces marinus* sp. nov. and *Streptomyces haliclona* sp. nov., isolated from the marine sponge *Haliclona* sp.”, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60(12), p. 2775–2779. doi: 10.1099/ijs.0.019869-0.
- Kim, B. *et al.* (1999) “Classification of thermophilic streptomycetes, including the description of *Streptomyces thermoalcalitolerans* sp. nov.”, *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49(1), p. 7–17. doi: 10.1099/00207713-49-1-7.
- Kim, S. *et al.* (2019) “PubChem 2019 update: improved access to chemical data”, *Nucleic Acids Research*, 47(D1), p. D1102–D1109. doi: 10.1093/nar/gky1033.
- Kim, S. e Park, T. I. (2013) “Naringenin: A partial agonist on estrogen receptor in T47D-KBluc breast cancer cells”, *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 6(10), p. 890–899.
- Kimura, M. (1980) “A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences”, *Journal of Molecular Evolution*, 16(2), p. 111–120. doi: 10.1007/BF01731581.
- Klementz, D. *et al.* (2016) “StreptomeDB 2.0--an extended resource of natural products produced by streptomycetes.”, *Nucleic acids research*, 44(D1), p. D509-14. doi: 10.1093/nar/gkv1319.
- Knappe, T. A. *et al.* (2008) “Isolation and Structural Characterization of Capistruin , a Lasso Peptide Predicted from the Genome Sequence of *Burkholderia thailandensis* E264”, *J Am Chem Soc*, 130(17), p. 11446–11454.
- Kumar, S. *et al.* (2018) “MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms”, *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), p. 1547–1549. doi: 10.1093/molbev/msy096.
- Kunakom, S. e Eustaquio, A. S. (2020) “Heterologous Production of Lasso Peptide Capistruin in a *Burkholderia* Host”, *ACS Synthetic Biology*, 9(241), p. 248. doi:

10.1021/acssynbio.9b00438.

Kunakom, S. e Eustáquio, A. S. (2019) “Burkholderia as a Source of Natural Products”, *J Nat Prod*, 82(7), p. 2018–2037. doi: 10.1021/acs.jnatprod.8b01068.Burkholderia.

Labeda, D. P. *et al.* (2012) “Phylogenetic study of the species within the family Streptomycetaceae”, *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 101(1), p. 73–104. doi: 10.1007/s10482-011-9656-0.

Labeda, D. P. *et al.* (2017) “Phylogenetic relationships in the family Streptomycetaceae using multi-locus sequence analysis”, *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*. Springer International Publishing, 110(4), p. 563–583. doi: 10.1007/s10482-016-0824-0.

Lamilla, C. *et al.* (2017) “Bioprospecting for extracellular enzymes from culturable Actinobacteria from the South Shetland Islands, Antarctica”, *Polar Biology*, 40(3), p. 719–726. doi: 10.1007/s00300-016-1977-z.

Lane, D. (1991) “16S/23S rRNA sequencing”, in *Goodfellow M, Stackebrandt E (eds) Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. John Wiley. Chichester, p. 115–147.

Lavin, P. L. *et al.* (2016) “Isolation and characterization of Antarctic psychrotroph *Streptomyces* sp. strain INACH3013”, *Antarctic Science*, 28(6), p. 433–442. doi: 10.1017/S0954102016000250.

Le, T.-H. *et al.* (2014) “Quantification of polyketide synthase genes in tropical urban soils using real-time PCR”, *Journal of Microbiological Methods*, 106, p. 135–142. doi: <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2014.08.010>.

Lerat, S., Simao-Beaunoir, A. M. e Beaulieu, C. (2009) “Genetic and physiological determinants of *Streptomyces scabies* pathogenicity”, *Molecular Plant Pathology*, 10(5), p. 579–585. doi: 10.1111/j.1364-3703.2009.00561.x.

Lewis, K. (2012) “Antibiotics: Recover the lost art of drug discovery.”, *Nature*. England, 485(7399), p. 439–440. doi: 10.1038/485439a.

Lewis, K. (2013) “Platforms for antibiotic discovery”, *Nature Reviews Drug Discovery*, 12(5), p. 371–387. doi: 10.1038/nrd3975.

Li, X. *et al.* (2012) “ESI LC-MS and MS / MS Characterization of Antifungal Cyclic Lipopeptides Produced by *Bacillus subtilis* XF-1”, p. 83–93. doi: 10.1159/000338530.

Li, X. e Nikaido, H. (2009) “Efflux-Mediated Drug Resistance in Bacteria: an Update”, *Drugs*, 69(12), p. 1555–1623. doi: 10.2165/11317030-000000000-00000.Efflux-Mediated.

Liu, C. *et al.* (2012) “*Marinobacter antarcticus* sp. nov., a halotolerant bacterium isolated from Antarctic intertidal sandy sediment”, p. 1838–1844. doi: 10.1099/ijs.0.035774-0.

Liu, J. *et al.* (2016) “Antimycin-type depsipeptides: Discovery, biosynthesis, chemical synthesis, and bioactivities”, *Natural Product Reports*. Royal Society of Chemistry, 33(10), p. 1146–1165. doi: 10.1039/c6np00004e.

Maansson, M. *et al.* (2016) “An Integrated Metabolomic and Genomic Mining Workflow To Uncover the Biosynthetic Potential of Bacteria”, *mSystems*, 1(3), p. 1–14. doi:

10.1128/msystems.00028-15.

Maksimov, M. O., Pelczar, I. e Link, A. J. (2012) “Precursor-centric genome-mining approach for lasso peptide discovery.”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(38), p. 15223–15228. doi: 10.1073/pnas.1208978109.

Marina, S., Martín, J. e Genilloud, O. (2020) “Identification and Heterologous Expression of the Biosynthetic Gene Cluster Encoding the Lasso Peptide Humidimycin , a Caspofungin Activity Potentiator”, *Antibiotics*, 9(2), p. 1–15. doi: doi.org/10.3390/antibiotics9020067.

Martinez, J. S. *et al.* (2000) “Self-assembling amphiphilic siderophores from marine bacteria.”, *Science (New York, N.Y.)*. United States, 287(5456), p. 1245–1247. doi: 10.1126/science.287.5456.1245.

Martinez, J. S. e Butler, A. (2007) “Marine amphiphilic siderophores: marinobactin structure, uptake, and microbial partitioning.”, *Journal of inorganic biochemistry*, 101(11–12), p. 1692–1698. doi: 10.1016/j.jinorgbio.2007.07.007.

Martins, C. R., Lopes, W. A. e Andrade, J. B. (2013) “Solubilidade das substâncias orgânicas”, *Quim. Nova*, 36(8), p. 1248–1255.

Maruyama, H. B. *et al.* (1975) “Desferrioxamine B, an inhibitor of Escherichia coli motility, reversing the stimulating effect of cyclic adenosine 3',5' monophosphate”, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 7(3), p. 377–380. doi: 10.1128/AAC.7.3.377.

Meier-Kolthoff, J. P. *et al.* (2013) “Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions”, *BMC Bioinformatics*, 14. doi: 10.1186/1471-2105-14-60.

Meier-kolthoff, J. P., Klenk, H. e Goker, M. (2014) “Taxonomic use of DNA G + C content and DNA – DNA hybridization in the genomic age”, p. 352–356. doi: 10.1099/ij.s.0.056994-0.

Melby, J. O., Nard, N. J. e Mitchell, D. A. (2011) “Thiazole/oxazole-modified microcins: complex natural products from ribosomal templates.”, *Current opinion in chemical biology*, 15(3), p. 369–378. doi: 10.1016/j.cbpa.2011.02.027.

Merwin, N. J. *et al.* (2020) “DeepRiPP integrates multiomics data to automate discovery of novel ribosomally synthesized natural products”, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(1), p. 371 LP – 380. doi: 10.1073/pnas.1901493116.

Metsa-Ketela, M. *et al.* (1999) “An efficient approach for screening minimal PKS genes from Streptomyces”, *FEMS Microbiol Lett.*, 180, p. 1–6.

Mohimani, H. *et al.* (2014) “NRPquest: Coupling Mass Spectrometry and Genome Mining for Nonribosomal Peptide Discovery”, *Journal of Natural Products*. American Chemical Society, 77(8), p. 1902–1909. doi: 10.1021/np500370c.

Monks, A. *et al.* (1991) “Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines”, *Journal of the National Cancer Institute*, 83(11), p. 757–766. doi: 10.1093/jnci/83.11.757.

Mullis, M. M. *et al.* (2019) “Diversity, Ecology, and Prevalence of Antimicrobials in Nature”, *Frontiers in Microbiology*, 10(November). doi: 10.3389/fmicb.2019.02518.

- Newman, D. J. e Cragg, G. M. (2020) “Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019.”, *Journal of natural products*. United States, 83(3), p. 770–803. doi: 10.1021/acs.jnatprod.9b01285.
- Núñez-Montero, K. *et al.* (2019) “Antarctic *Streptomyces fildesensis* So13.3 strain as a promising source for antimicrobials discovery”, *Scientific Reports*, 9(1), p. 1–13. doi: 10.1038/s41598-019-43960-7.
- Palazzotto, E. e Weber, T. (2018) “Omics and multi-omics approaches to study the biosynthesis of secondary metabolites in microorganisms”, *Current Opinion in Microbiology*. Elsevier Ltd, 45, p. 109–116. doi: 10.1016/j.mib.2018.03.004.
- Parte, A. C. *et al.* (2020) “List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ”, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, p. 0–5. doi: 10.1099/ijsem.0.004332.
- Paulo, B. S. *et al.* (2019) “New Cyclodepsipeptide Derivatives Revealed by Genome Mining and Molecular Networking”, *ChemistrySelect*. John Wiley & Sons, Ltd, 4(27), p. 7785–7790. doi: 10.1002/slct.201900922.
- Prabhu, J. *et al.* (2004) “Functional expression of the ectoine hydroxylase gene (thpD) from *Streptomyces chrysomallus* in *Halomonas elongata*”, *Applied and Environmental Microbiology*, 70(5), p. 3130–3132. doi: 10.1128/AEM.70.5.3130-3132.2004.
- Prosperini, A. *et al.* (2017) “A Review of the Mycotoxin enniatin B”, 5(November), p. 1–11. doi: 10.3389/fpubh.2017.00304.
- Purves, K. *et al.* (2016) “Using Molecular Networking for Microbial Secondary Metabolite Bioprospecting.”, *Metabolites*, 6(1). doi: 10.3390/metabo6010002.
- Raines, D. J. *et al.* (2015) *Siderophores, Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering*. doi: 10.1016/B978-0-12-409547-2.11040-6.
- Rex, J. H. *et al.* (2008) “Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts.”, *Clinical and Laboratory Standards Institute*, 28(14), p. 1–46. Available at: https://clsi.org/media/1461/m27a3_sample.pdf.
- Richter, M. *et al.* (2016) “JSpeciesWS: A web server for prokaryotic species circumscription based on pairwise genome comparison”, *Bioinformatics*, 32(6), p. 929–931. doi: 10.1093/bioinformatics/btv681.
- Russell, A. H. e Truman, A. W. (2020) “Genome mining strategies for ribosomally synthesised and post-translationally modified peptides”, *Computational and Structural Biotechnology Journal*. The Authors, 18, p. 1838–1851. doi: 10.1016/j.csbj.2020.06.032.
- Saitou, N. e Nei, M. (1987) “The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees.”, *Molecular biology and evolution*, 4(4), p. 406–425. doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454.
- Salomon, C. E., Magarvey, N. A. e Sherman, D. H. (2004) “Merging the potential of microbial genetics with biological and chemical diversity: an even brighter future for marine natural product drug discovery.”, *Natural product reports*. England, 21(1), p. 105–121. doi: 10.1039/b301384g.

- van Santen, J. A. *et al.* (2019) “The Natural Products Atlas: An Open Access Knowledge Base for Microbial Natural Products Discovery.”, *ACS central science*, 5(11), p. 1824–1833. doi: 10.1021/acscentsci.9b00806.
- Santos-Aberturas, J. *et al.* (2019) “Uncovering the unexplored diversity of thioamidated ribosomal peptides in Actinobacteria using the RiPPER genome mining tool”, *Nucleic Acids Research*, 47(9), p. 4624–4637. doi: 10.1093/nar/gkz192.
- Schöller, C. E. G. *et al.* (2002) “Volatile metabolites from actinomycetes”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(9), p. 2615–2621. doi: 10.1021/jf0116754.
- Seyedsayamdost, M. R. (2019) “Toward a global picture of bacterial secondary metabolism”, *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 46(3), p. 301–311. doi: 10.1007/s10295-019-02136-y.
- Shen, B. (2003) “Polyketide biosynthesis beyond the type I, II and III polyketide synthase paradigms”, *Current Opinion in Chemical Biology*, 7(2), p. 285–295. doi: 10.1016/S1367-5931(03)00020-6.
- Silva, R., Dorrestein, P. C. e Quinn, R. A. (2015) “Illuminating the dark matter in metabolomics”, *PNAS*, 112(41), p. 12549–12550. doi: 10.1073/pnas.1516878112.
- Silva, T. R. *et al.* (2018) “Bacteria from Antarctic environments: diversity and detection of antimicrobial, antiproliferative, and antiparasitic activities”, *Polar Biology*. Springer Berlin Heidelberg, 41(7), p. 1505–1519. doi: 10.1007/s00300-018-2300-y.
- Singer, E. *et al.* (2011) “Genomic potential of *Marinobacter aquaeolei*, a biogeochemical ‘Opportunitroph’”, *Applied and Environmental Microbiology*, 77(8), p. 2763–2771. doi: 10.1128/AEM.01866-10.
- Singh, M., Chaudhary, S. e Sareen, D. (2017) “Non-ribosomal peptide synthetases: Identifying the cryptic gene clusters and decoding the natural product”, *Journal of Biosciences*, 42(1), p. 175–187. doi: 10.1007/s12038-017-9663-z.
- Skinninger, M. A. *et al.* (2017) “PRISM 3: expanded prediction of natural product chemical structures from microbial genomes”, *Nucleic Acids Research*, 45(W1), p. W49–W54. doi: 10.1093/nar/gkx320.
- Solbiati, J. O. *et al.* (1999) “Sequence analysis of the four plasmid genes required to produce the circular peptide antibiotic microcin J25.”, *Journal of bacteriology*, 181(8), p. 2659–2662. doi: 10.1128/JB.181.8.2659-2662.1999.
- Soldatou, S. *et al.* (2019) “Linking biosynthetic and chemical space to accelerate microbial secondary metabolite discovery”, *FEMS Microbiology Letters*. Oxford University Press, 366(13), p. 1–8. doi: 10.1093/femsle/fnz142.
- van Soolingen, D. *et al.* (1991) “Occurrence and stability of insertion sequences in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: evaluation of an insertion sequence-dependent DNA polymorphism as a tool in the epidemiology of tuberculosis”, *Journal of clinical microbiology*, 29(11), p. 2578–2586. doi: 10.1128/JCM.29.11.2578-2586.1991.
- Staunton, J. e Weissman, K. J. (2001) “Polyketide biosynthesis: A millennium review”, *Natural Product Reports*, 18(4), p. 380–416. doi: 10.1039/a909079g.

Tabudravu, J. *et al.* (2001) “Wainunuamide, a histidine-containing proline-rich cyclic heptapeptide isolated from the Fijian marine sponge *Stylotella aurantium*”, *Tetrahedron Letters*, 42(52), p. 9273–9276. doi: 10.1016/S0040-4039(01)01993-1.

Takada, K. *et al.* (2013) “Surugamides A – E, Cyclic Octapeptides with Four D-Amino Acid Residues, from a Marine *Streptomyces* sp.: LC–MS-Aided Inspection of Partial Hydrolysates for the Distinction of D- and L-Amino Acid Residues in the Sequence”, *The Journal of Organic Chemistry*, 78, p. 6746–6750.

Tatusova, T. *et al.* (2016) “NCBI prokaryotic genome annotation pipeline”, *Nucleic Acids Research*, 44(14), p. 6614–6624. doi: 10.1093/nar/gkw569.

Teeling, H. *et al.* (2004) “Application of tetranucleotide frequencies for the assignment of genomic fragments.”, *Environmental microbiology*. England, 6(9), p. 938–947. doi: 10.1111/j.1462-2920.2004.00624.x.

Thankachan, D. *et al.* (2019) “A trans-Acting Cyclase Offloading Strategy for Nonribosomal Peptide Synthetases”, *ACS Chemical Biology*. American Chemical Society, 14(5), p. 845–849. doi: 10.1021/acscchembio.9b00095.

Thomas, T. R. A., Kavlekar, D. P. e LokaBharathi, P. A. (2010) “Marine drugs from sponge-microbe association - A review”, *Marine Drugs*, 8(4), p. 1417–1468. doi: 10.3390/md8041417.

Thompson, J. D., Higgins, D. G. e Gibson, T. J. (1994) “CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice”, *Nucleic Acids Research*, 22(22), p. 4673–4680. doi: 10.1093/nar/22.22.4673.

Tietz, J. I. *et al.* (2017) “A new genome-mining tool redefines the lasso peptide biosynthetic landscape”, *Nature Chemical Biology*, 13(5), p. 470–478. doi: 10.1038/nchembio.2319.

Tsuda, M. *et al.* (1993) “Hymenamides C ~ E, new cyclic heptapeptides with two proline residues from the okinawan marine sponge hymeniacidon sp.”, *Tetrahedron*, 49(31), p. 6785–6796. doi: 10.1016/S0040-4020(01)80422-1.

Vera, B., Vicente, J. e Rodríguez, A. D. (2009) “Isolation and Structural Elucidation of Euryjanicins B–D, Proline Containing Cycloheptapeptides from the Caribbean Marine Sponge *Prosuberites laughlini*”, *J Nat Prod*, 72(9), p. 1555–1562. doi: 10.1021/np9004135.

Vitali, A. (2018) “Antimicrobial peptides derived from marine sponges”, *American Journal of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 1(1), p. 1006.

Wahlen, B. D. *et al.* (2009) “Purification, characterization, and potential bacterial Wax production role of an nadph-dependent fatty aldehyde reductase from *Marinobacter aquaeolei* VT8”, *Applied and Environmental Microbiology*, 75(9), p. 2758–2764. doi: 10.1128/AEM.02578-08.

Walsh, C. T. e Tang, Y. (2017) *Natural Product Biosynthesis: chemical logic and enzymatic machinery*. The Royal Society of Chemistry.

Wang, G. (2006) “Diversity and biotechnological potential of the sponge-associated microbial consortia”, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 33(7), p. 545. doi: 10.1007/s10295-006-0123-2.

- Wang, J. *et al.* (2020) “Biosynthesis of aromatic polyketides in microorganisms using type II polyketide synthases”, *Microbial Cell Factories*. BioMed Central, 19(1), p. 1–11. doi: 10.1186/s12934-020-01367-4.
- Wang, M. *et al.* (2016) “Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking”, 34(8), p. 828–837. doi: 10.1038/nbt.3597.
- Wang, Q. *et al.* (2007) “Naïve Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy”, *Applied and Environmental Microbiology*, 73(16), p. 5261–5267. doi: 10.1128/AEM.00062-07.
- Wang, X. *et al.* (2014) “Mullinamides A and B, new cyclopeptides produced by the Ruth Mullins coal mine fire isolate *Streptomyces* sp. RM-27-46”, *J Antibiotics*, 67(8), p. 571–575. doi: 10.1038/ja.2014.37.
- Wattam, A. R. *et al.* (2017) “Improvements to PATRIC, the all-bacterial bioinformatics database and analysis resource center”, *Nucleic Acids Research*, 45(D1), p. D535–D542. doi: 10.1093/nar/gkw1017.
- Weber, T. e Kim, H. U. (2016) “The secondary metabolite bioinformatics portal: Computational tools to facilitate synthetic biology of secondary metabolite production.”, *Synthetic and systems biotechnology*, 1(2), p. 69–79. doi: 10.1016/j.synbio.2015.12.002.
- Weinstein, M. P. *et al.* (2018) “Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically”, *Clinical and Laboratory Standards Institute*, 12, p. 1–112. Available at: www.clsi.org.
- Xu, F. *et al.* (2017) “Discovery of a Cryptic Antifungal Compound from *Streptomyces albus* J1074 Using High-Throughput Elicitor Screens”, *J Am Chem Soc*, 139(27), p. 9203–9212. doi: 10.1021/jacs.7b02716.
- Yagüe, P. *et al.* (2014) “New insights on the development of *Streptomyces* and their relationships with secondary metabolite production”, *Curr Trends in Microbiol*, (8), p. 65–73.
- Yang, Z., Kuboyama, T. e Tohda, C. (2017) “A systematic strategy for discovering a therapeutic drug for Alzheimer’s disease and its target molecule”, *Frontiers in Pharmacology*, 8(JUN), p. 1–13. doi: 10.3389/fphar.2017.00340.
- Ye, S. *et al.* (2017) “Identification by Genome Mining of a Type I Polyketide Gene Cluster from *Streptomyces argillaceus* Involved in the Biosynthesis of Pyridine and Piperidine Alkaloids Argimycins P”, *Frontiers in Microbiology*, 8, p. 194. doi: 10.3389/fmicb.2017.00194.
- Yoon, S. H. *et al.* (2017) “Introducing EzBioCloud: A taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies”, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67(5), p. 1613–1617. doi: 10.1099/ijsem.0.001755.
- Zhang, C. e Straight, P. D. (2019) “Antibiotic discovery through microbial interactions”, *Current Opinion in Microbiology*. Elsevier Ltd, 51, p. 64–71. doi: 10.1016/j.mib.2019.06.006.
- Zhang, Q. *et al.* (2012) “Evolution of lanthipeptide synthetases”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012/10/15. National Academy of Sciences, 109(45), p. 18361–18366. doi: 10.1073/pnas.1210393109.

Zhu, H., Sandiford, S. K. e Van Wezel, G. P. (2014) “Triggers and cues that activate antibiotic production by actinomycetes”, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 41(2), p. 371–386. doi: 10.1007/s10295-013-1309-z.

Ziemert, N., Weber, T. e Medema, M. H. (2020) *Genome Mining Approaches to Bacterial Natural Product Discovery*. 3^o ed, *Comprehensive Natural Products III*. 3^o ed. Elsevier Inc. doi: 10.1016/b978-0-12-409547-2.14627-x.

ANEXOS

Anexo I. Sequências dos *house keeping* genes utilizados no MLSA.

Sequência do gene ATP synthase beta chain de *S. albidoflavus* ANT_B131

atgaccaccactgttgagacggccgttgccacgggcccgcgtcgcccggtcatcgcccggtcgtcgacgtggagttccccgtcgac
gcatgcccggagatctacaacgcgtgaccgtcgaggtcgccgacccggctcaggagggcgcgctcaagacgctgacctcgagg
tcgccagcacctgggtgacggcctggctccgcgccatctcgatgcagcccaccgacggcctggccagggccccgggtgaccga
cacgggaggggcatcaccgtcccggctggcgacttcaccaagggaagggtgttaacaccctcggcgaggtgctgaacaagccc
gaggagaacgccaacatcggcgagcgctggcgcatccaccgcaaggcgccgggcttcgaccagctcgagtcgaagaccgagatg
ttcgagaccggcatcaaggtcatcgactgctgaccccgatcgtaaggggcggaagatcggtctgttgggtgggtgcccgtgctggca
agaccgtgctgatccaggaaatgatctaccgcgtcgccaacaaccacgacgggtgtgtcggtgttcgcgggcgctcggtgagcgtaccc
gtgaggggaacgacctcatcgaggagatggcggagtcggcgatcgcagaagaccgcgctggtcttcggccagatggacgagcc
cccgggacccgtctgcgcgtcgcgctggccggcctcacatggccgagtgacttcgcgacgtccagaagcaggacgtgctgttctt
catcgacaacatcttcgcttcacgcaggccgggttcgaggtctccacgctgctcgcccgcatgccgtccgcgggtgggtaccagccg
aacctggccgacgagatgggctctccaggagcgcatcacctcgacgctgggtcactcgatcacctcgatgcaggcgatctacgtc
cccgggacgacctgaccgacccggctccggccaccaccttcgcccacctggacgacgaccaccgtgctgtcgcgcccgatctcgg
agaagggtcatctaccggcggtggaccgcgtggactcgacgtccgcacgtctggaccgcggtacatcgcaaggaccactacga
ggccgcgatgcgcgtcaagggtatctccagaagtaacaggacctccaggacatcatgccatcctcggtatggacgagctcgccg
aggaggacaagctcgtcgtcacgcgtgcccgtcgtgtagcgcttctcgcagaacaccacgctcgccaagcagttaccgggtg
tggacgggtcggacgtgcccgtcgacgagtcgatcgccggttaacgcgatctgcgacggcgagtagaccacttccccgagcag
gcgttctcctcgtcggtggcatcgaggacctgaaggccaacgccaaggagctgggcgtctcctga

Sequência do gene DNA gyrase subunit B de *S. albidoflavus* ANT_B131

gtggccgattccggcaacccaacgagaacatcccgtccaccggcccgggagaggagacgcgtccggcaccgccagacagc
ggagtcggctcgtcgccgacccgagggcgccgcatcgaggcgcccgtgtcgtacgacgccagtgcatcacggctctggaggg
cctggacgcggctccgcaagcgcccggtcatgacatcggtcgaccggtagcgccgctgcaccacatggtccaggaggtcgtc
gacaactccgtcgacgaggcgctggccggccacgcggacttcacgacgtgacgatcctggccgacggcgccgctccgcgtcatcg
acaacggccgtggcatcccggtcggtcatgctccctccgaggggaagccggccgctcgaggtcgtctcaccgtgtgcacgcggg
cggcaagttcggcgccggcggtacgcgggtctccggcggtctgcacggcgctcggtcgtctccgtggtaacgcgctctcgacgcgcg
tcgcccgtggagatccgcaccgacggccaccactgggtccagagctacgagcgccgctccgaccgcgcccgtcgcggggcg
aggccaccgaggagaccggcacctcggtcaccttctgggcccactcctcgatcttcgagaccaccgactactccttcgagacgtctc
ccggcgcttcaggagatggccttctcaacaaggccctcacatcaagtcaccgacgagcgccctccgccaaggcgaccgcc
ggcgccgactcgacgagggccacggcgggcgagcccaggagccgcgacccgtcacgtaccactacgaaggcgggcatcgtcga
cttcgtgacgtacctcaactcccgaaggcgaggtcattcacccgacgggtgatcgacatcgaggcgaggacaaggaccggctcct
ctccgtcgaggtcgcgatgcagtggaacggcggttacagcgagggggtctactccttcgccaacaccatccacaccacgagggcg
gcaccacgaggagggcttcggcgcgctgaccacctgggtcaacaagtaccccgggaccgcaagctgctgcgcgacaagg
acgacaacctaccggcgacgacatccgcgagggcctgacggcgatcatctccgtcaagctcggcgagccgcagttcgaggcca
gaccaagaccaagctgggcaacaccgaggccaagaccttcgtgcagaagggtggtctacgacacctcgccgactgggtcagccgg
aaccgcaacgagggccgacatcatccgaaggcgatcgccgccaccgcccgcgtggcgcccgcaaggcgcgacact
gaccgcccgaagggtctgctggagaccgcctcgtcctccggcaagctctcggaactgccagtcgaacgacccgaccaagtgcgag
atcttcacgtcgagggcgactcgccggcggtcctccgaagtcggccggtgaccgatgtaccaggccatcctcgccatccgcgg
caagatcctgaacgtcgagaaggcccgatcgacaagatcctgcacaaccaggagatccaggcgctcatctcgcccttcggcaccg
gggtccacgaggacttcgacatcgagaagctccgctaccacaagatcatctgatggccgacggcgacgtcgacggccagcacatc
aacacctgctgctgaccttctctccgctcatgcccgcgtggtcgagggggccacgtcttctctccgcccgcgctgtacaa
gatcaagtggaccgggacgactccagtagcctactccgaccgcgagcgcgacgcgtgatcgccctcgcccgagcagggc
aagcgcatccgcgacgactcgggtccagcgcttcaagggtctcggtgagatgaacccgaggagctgcgcatcaccacgatggacca
ggagcaccgctcctcgccagggtcacctggacgacggcccaggccgacgaccttctcgtcctcatggggcgaggacgtcg
aggcccgcgccaagttcatccagcgcaacgccaaggacgtccgcttctcgacatctga

Sequência do gene *recA* protein de *S. albidoflavus* ANT_B131

atggctggaaccgaccgcgagaaggcgctcgacgccgcgtcgacagattgaacggcagttcggcaaggggcgccgtcatgcgta
tgggcgagcggccgaacgagcccgtcgaggtgatccccaccggctcgaccgcgtggacatcgccctcggcgtggcgccgctgc

cccgcggccgctcgtcaggtctacggcccggagtcctccggcaagacgaccctgaccctgcacgccgtggccaacgcgcagaa
 ggccggcggccaggtggccttcgtcgacgcggagcacgcgctcgaccggagtagccaagaagctcggcgtcgacatcgacaa
 cctcatctgtcccagccggacaacggcgagcagggcgtggagatcgtcgacatgctggctccgctccggcgcgctcgacatgatgt
 catcgactccgtcgccgccctgggtgccgcgggcccagatcgagggcgagatgggcgactcccacgtgggtctccaggcccgctg
 atgagccaggcgctccggaagatcaccagcgcgctcaaccagccaagaccacggcgatcttcatcaaccagctccgcgagaagat
 cggcgtgatgttcggctccccggagacgacgaccgggtggccgcgcctgaagttctacgctcgggtccggatcgacatccgcgcat
 cgagacgctcaaggacggcacggacgcggtgggcaaccgcacccgctgcaagggtggtcaagaacaaggctgccccgccttcaa
 gcaggccgagttcgacatcctctacggccacggcatcagccgcgagggcgccgctgatcgacatgggctggagcacggcttcgtcc
 gcaaggccggcgctgtgtacacctacgagggcgaccagctggggcgagggcaaggagaacgcccgaacttctcaaggacaacc
 ctgacctggccgacgagatcgagcgcaagatcaaggagaagctcggcgctcggcgtcgggcccgcgagccgggttccgagggcg
 ccgccgactccgcagccaccgaggaggccaaggaggccaagtccgtgctcgtcggcgcccaaggcgacccggcgaccaag
 gccgcggcgccgaagggtga

Sequência do gene RNA polymerase beta subunidade de *S. albidoflavus* ANT_B131

ttggccgcctcgcgactgctccgcgaattcgaacaacggcgccagcaccgccccgctgcgatttctttgaaaagatcaaggag
 cccctcgaggttccgaacctccttgcctccagaccgagagcttcgactggctgctcggcaacgacgcttggaaggcccggtcgag
 gcggtcttgacagcggacaggtccccaccaagtccgggtcgaggagatcttcgaggagatccccgatcgaggacttctcc
 gggctgatgtcgtgaccttccgcgaccaccgcttcgagccccgaagaactccatcgacgagtgaaggagcgcgacttcaccttc
 gccgcgccgctcttcgtcaccgccgagttcaccaacaacgagaccggcgagatcaagtcccagacggtcttcatggcgacttccc
 ctcatgaccaacaagggcaccttcgtcatcaacggcaccgagcgtgtcgtcgtgtcgcagctggtccgctcgccggcgcttacttcg
 actctccatcgacaagacgtccgacaaggacatcttctccgccaagatcatccccctccgggggtgcttgggtggagatggagatcga
 caagcgcgacatgggtggcgctccgcatcgaccgcaagcgcaagcagtcctgcaccgtcctcctcaaggctctcggctggacgaccg
 agcagatcctcgaggagttcggcgagtagtcgatgcgcgccacctggagaaggaccacaccagggccaggacgacgcgc
 tgctcgacatctaccgcaagctgcgcccggcgagccgcccacgcgtgaggccgcgagacgctgctggagaaccttacttcaac
 cccaagcgtacgacctcgccaaggtcgggccgctacaaggtgaacaagaagctcggcgggcgacgcgcccctggacgcccgcgtg
 ctaccaccgacgacgtcatcgccaccatcaagtacctgtgaagctgcacgccggcgagaccgagacgaccggcgagaacggca
 cccagatcgtcgtcgagaccgacgacatcgaccacttcggcaaccgcccgtctgcgcaacgtcggcgagctgatccagaaccagggtc
 cgtacgggtctcgcctgatggagcgcgtcgtgagcgcatgaccaccaggacgtcgaggcgatcacgccgagaccctgat
 caacatccggccggctgctgcctccatcaaggagttcttcggcaccagccagctgtcgcagttcatggaccagaacaaccgctctcg
 ggtctcaccacaagcgccgtctgtcggcgctcggccccgggtggtctctcgcgtgagcgggcccggcttcgaggtccgtgacgtgcac
 cctcgcactacggccgcatgtgcccgatcgagacgctgaaggcccgaacatcgggctgatggctcgtcgcctctacggccg
 ggtcaacgccttcggcttcgtcgagacgcctaccgcgggtcaccgacggcatcgtcaccgacgaggtcgactacctgaccgccg
 acgaggaggaccgcttcgtcatcgcccaggccaacgcggcctgaccgaggacctccacttcgccgaggaccgcgtcctggtccg
 ccgccgtggcgagaggtcgactacgtccccggggacgacgtcgactacatggacgtctcgcgcgacagatgggtgcggctgcg
 accgccatgatccccttctcgagcacgacgacgccaaccgtgccctcatgggcgcgaacatgatgcgccaggcggtcccgtcatc
 aagagcgaggccccgctcgtcggcaccggcatggagtagcgtgtgccaccgacgcggcgacgtgtgaaggcggagaaggac
 ggtgtggtccaggaggtctccgcggactacatcaccaccaccaacgacgacggcacgtacaccagtagccctcgccaagtctcc
 cgctcgaaccaggggcacctcggtcaaccagaaggctcgtcgtcgacgagggcgaccggatcatcgagggccagggtgctcgccgacg
 gtcccgcgaccgagctcggcgagatggcgctcggcaagaacctcctcgtggcggttcatgtcgtgggagggccacaactacgaggac
 gcgatcatctgtcgcagcgctcgtccaggacgacgtcctcctcgtgatccacatcgaggagcacgaggtcgacgcccgtgacacc
 aagctcggccccgaggagatcaccgggacatcccgaacgtctccgaggaggtcctcgccgacctgatgagcgcggcatcatcc
 gcatcggtgcccagggtcgacgccgggacatcctggtcggcaagggtcacgccaagggtgagaccgagctgaccccgaggagc
 gcctgctccgcgcgatcttcgggtgagaaggcgcgcgaggtccgcgacacctcgtgaagggtccgcacggcgagaccggcaagg
 catcgccgtgctcgtcttcgaccgcgaggagggcgacgagctcccccggtgtcaaccagctggtccgcgtctacgtggccaga
 agcgcaagatcaccgacgggtgacaagctcgcggccgtcacggcaacaaggcgctcatctcgaagatcctgcccgatcgaggacat
 gccgttctggaggacggcacccccgtcgacatcatcctcaaccgctcggcggtgccgtcccgaatgaaccgggacaggtcatgg
 agatccacctggctggctcgccagccagggtgggacatctccgggtgacacccgagtgggccagcggtccagtcgatcggc
 atcgaccgggtcgagccgggtaccaacgtcgccacccccggtgttcgacggcaccccgagggacgagctggccggcctgatcgacc
 acaccatcccaaccgcgacgggtgagcggatggtgcagtcctcgggcaaggcgcggtcttcgacggccgctccggcgagccgtt
 cccggacccgggtcgtcgggtacgtgatcatcctcaagctgcaccacctggtcgacgacaagctgcacgcgcgtcgaccggctcc

gtactcgatgatcacccagcagccgctgggtggtaaggcccagttcgggtgggtcagcgcttcgggtgagatggaggtgtgggctgga
 ggcttacggcgccgcgtacgcccctccaggagctgctgacgatcaagtccgacgacgtgaccggccgtgtgaaggtctacgaggcca
 tcgtcaagggcgagaacatccccgagcccgcatccccgagtcctcaaggtcctcatcaaggaaatgcagtcgctctgcctcaacgt
 ggaggtgctgtcctcggacggcatgtccatcgagatgcgcgacaccgacgaggacgtctccgcgcggcgaggagctcggtatcg
 acctgtcccggcgcgagccgagcagcgtcgaagaggtctga

Sequência do gene Tryptophan synthase beta chain de *S. albidoflavus* ANT_B131

atgccacgcgagtagtacttctccccgaccccgagggggtcagccccgacgcccggggctacttcggcccccttcggcggcaagttcatc
 ccggaggcgctggctcgccgccgtggacgaggtcgccgtcagtagacaaggcgaagtccgacccggccttcgcccggcaactg
 gacggctctgctcgtccactacaccggccgccccagccccctcaccgaggtgcgccgcttcgcccagacgcccggggagccccgg
 gtcttctcaagcgcgaggacctcaaccacaccgggtcgcacaagatcaacaacgtgctggggccaggcgctgctgaccgccgcat
 gggcaagaccgggtcatcgccgagaccgggtgccggccagcacggcggtggccaccgccaccgcctgcgcccctcttcggcctgga
 ctgcaccatctacatgggcgagatcgacaccgagcgccaggcgctcaacgtcgcccggtatgcggatgctggcgccgaggtggc
 gccgtgaagtccggcagccgcaccctcaaggacgccatcaacgaggcggtccgtgactgggtcgccaacgtcgactccaccacta
 cctcttcggcaccgtcgccgggcccgcaccccttccccgcatgggtccgcgacttcaccgggtcatcggcgtcgaggccccgccc
 aggtcctggagcgcgccggggcggtgccccgacgccgccgtggcctgcgtcgccggcggtccaacgccatcggcctcttcacgc
 ctcttcgcccgcacccggcgtccgcctcatgggtgagcccgccgggacggcggtggagaccggcgagcacgccccacccctc
 accgccggcgagcccgcatcctgcacgggtcccgtcctacgtcctccaggacgaggagggccagatcacccagccctactcgat
 ctccgccgggctcgactaccgggcatcgccccgagcacgccacctaaggacaccggacgcggcgagtaccggggccgtcac
 cgacgccggcccatggaggcgctgcggtgctgtgcgcaccgagggtcatcatccggccatcgagagcgccacgccctcgc
 cggcgccctcgacgtgggcccgtgaactcgccccgagggcggtgatcgtcgtcaacctctccggacgcggggacaaggacatggac
 accgccggccggtagtctcgggctgtacgacgtggacgccgaggtcgcgggccgacgaggagggcaccaagtga

Anexo II. Artigo publicado intitulado “Draft Genome Sequence of *Marinobacter* sp. ANT_B65, Isolated from Antarctic Marine Sponge.



Draft Genome Sequence of *Marinobacter* sp. Strain ANT_B65, Isolated from Antarctic Marine Sponge

Paula de França,^{a,b} Esther Camilo,^c Fabiana Fantinatti-Garboginni^a

^aMultidisciplinary Center for Chemical, Biological and Agricultural Research, University of Campinas, Paulínia, São Paulo, Brazil

^bGraduate Program in Genetics and Molecular Biology, Institute of Biology, University of Campinas, Campinas, São Paulo, Brazil

^cMotiva Bioinformática ME, Sertãozinho, São Paulo, Brazil

ABSTRACT *Marinobacter* sp. strain ANT_B65 was isolated from sponge collected in King George Island, Antarctica. The draft genome of 4,173,840 bp encodes 3,743 protein-coding open reading frames. The genome will provide insights into the strain's potential use in the production of natural products.

The genus *Marinobacter* comprises 41 species of Gram-negative bacteria isolated from marine and saline environments. *Marinobacter* species can survive in different conditions, such as oil-polluted saline soil (1) and hydrothermal sediment (2), and they can be psychrotolerant (3) or psychrophilic (4).

Marinobacter sp. strain ANT-B65 was isolated from sponge collected in Admiralty Bay, King George Island, Antarctica (62°05'130'S 58°23'356'W), during an expedition in the austral summer of 2010. Strain ANT_B65 was isolated using M1 medium (10 g · liter⁻¹ soluble starch, 4 g · liter⁻¹ yeast extract, 2 g · liter⁻¹ peptone, and 15 g · liter⁻¹ agar) prepared with artificial sea water (0.1 g · liter⁻¹ KBr, 23.48 g · liter⁻¹ NaCl, 10.61 g · liter⁻¹ MgCl₂·6H₂O, 1.47 g · liter⁻¹ CaCl₂·2H₂O, 0.66 g · liter⁻¹ KCl, 0.04 g · liter⁻¹ SrCl₂·6H₂O, 3.92 g · liter⁻¹ Na₂SO₄, 0.19 g · liter⁻¹ NaHCO₃, and 0.03 g · liter⁻¹ H₃BO₃) at the Multidisciplinary Center for Chemical, Biological and Agricultural Research, University of Campinas (Campinas, São Paulo, Brazil).

A paired-end library was sequenced using the HiSeq 2500 system and yielded 8,229,346 reads of 251 bp. The reads were assembled with SeqMan NGen version 14.0 software (DNASTAR, Inc., WI, USA), resulting in a total genome length of 4,173,840 bp in 8 contigs, with an *N*₅₀ of 2,216,721 bp and a GC content of 53.7%.

The genome was annotated using Prokka (5), the NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP), and the Rapid Annotations using Subsystems Technology (RAST) server version 4.0 (6, 7). Prokka identified 3,817 coding sequences (CDSs), 25 tRNAs, 5 rRNAs, and 25 miscellaneous RNAs. PGAP identified 3,743 protein-coding genes, 44 tRNAs, 12 rRNAs, and 580 pseudogenes. RAST identified 3,959 CDSs, 45 tRNAs, 12 rRNAs, and 443 subsystems and predicted that 3 proteins are phage components.

RAST and the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) identified secondary metabolites related to an auxin biosystem. The antiSMASH v.4.0 (8) analysis revealed one known secondary metabolite cluster, an ectoine. This is a natural compound used by the microorganism to survive in osmotic stress and found mainly in halophilic bacteria (9, 10). The NaPDos (11) analysis revealed four gene clusters related to the ketosynthase domain, three gene clusters related to fatty acid synthesis, and one gene cluster related to a spinosad. This cluster was associated with a macrolide produced by *Saccharopolyspora spinosa* (12) and used in agriculture as a potent insecticide.

The genome of *Marinobacter* sp. ANT_B65 provides insights into its potential use in the production of natural products.

Accession number(s). This whole-genome shotgun project has been deposited at DDBJ/ENA/GenBank under the accession number [NXGV00000000](#). The version described in this paper is the first version, NXGV01000000.

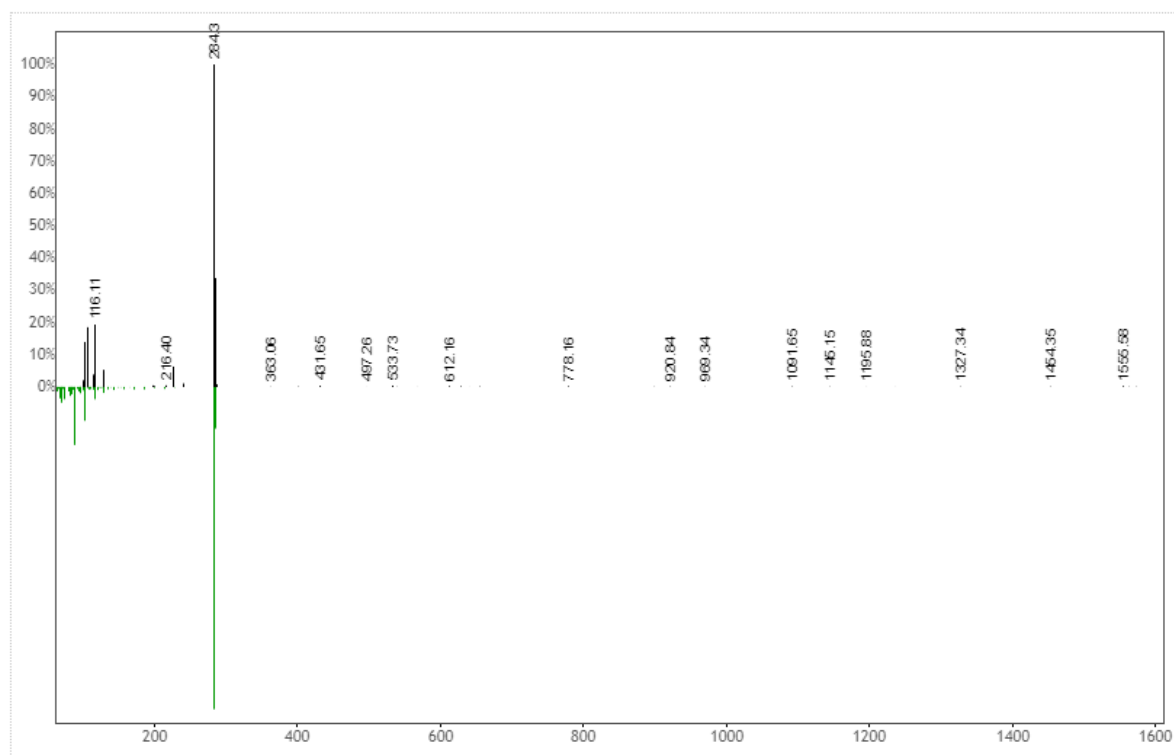
ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by the São Paulo Research Foundation (FAPESP), PROANTAR Program, and Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES).

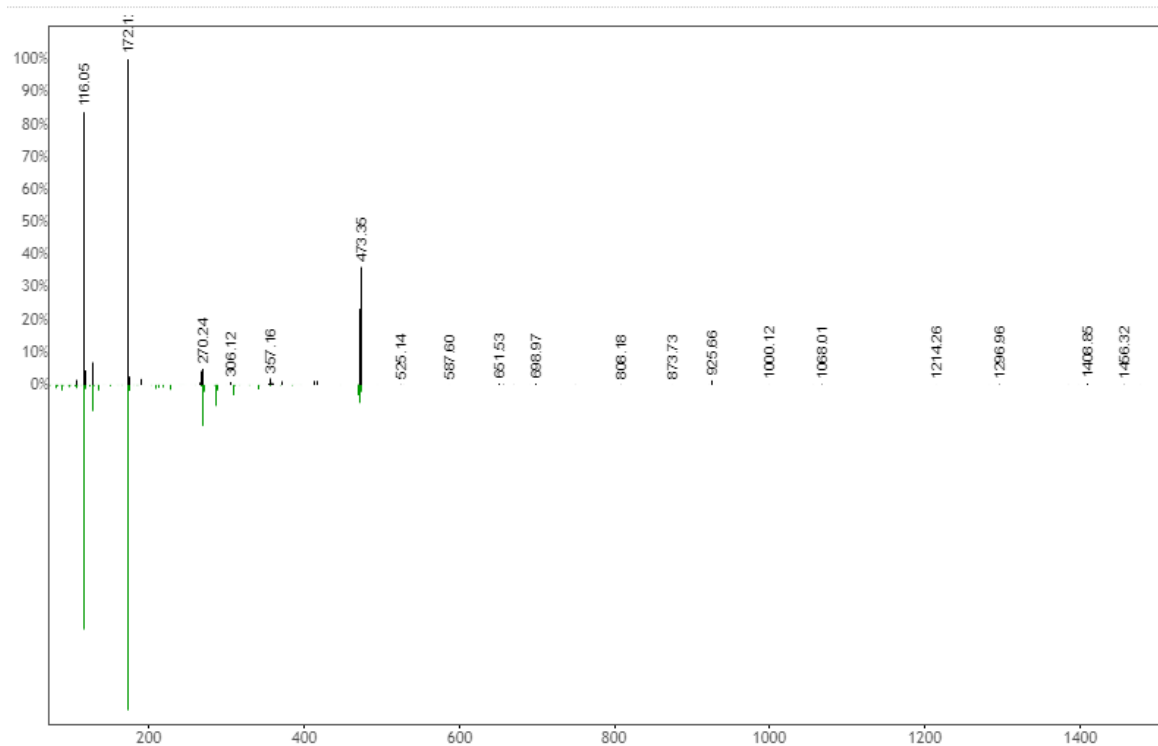
REFERENCES

- Gu J, Cai H, Yu SL, Qu R, Yin B, Guo YF, Zhao JY, Wu XL. 2007. *Marinobacter gudaonensis* sp. nov., isolated from an oil-polluted saline soil in a Chinese oilfield. *Int J Syst Evol Microbiol* 57:250–254. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64522-0>.
- Handley KM, Héry M, Lloyd JR. 2009. *Marinobacter santoriniensis* sp. nov., an arsenate-respiring and arsenite-oxidizing bacterium isolated from hydrothermal sediment. *Int J Syst Evol Microbiol* 59:886–892. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.003145-0>.
- Shivaji S, Gupta P, Chaturvedi P, Suresh K, Delille D. 2005. *Marinobacter maritimus* sp. nov., a psychrotolerant strain isolated from seawater off the subAntarctic Kerguelen Islands. *Int J Syst Evol Microbiol* 55:1453–1456. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63478-0>.
- Zhang DC, Li HR, Xin YH, Chi ZM, Zhou PJ, Yu Y. 2008. *Marinobacter psychrophilus* sp. nov., a psychrophilic bacterium isolated from the Arctic. *Int J Syst Evol Microbiol* 58:1463–1466. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65690-0>.
- Seemann T. 2014. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics* 30:2068–2069. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu153>.
- Aziz RK, Bartels D, Best AA, DeJongh M, Disz T, Edwards RA, Formsma K, Gerdes S, Glass EM, Kubal M, Meyer F, Olsen GJ, Olson R, Osterman AL, Overbeek RA, McNeil LK, Paarmann D, Paczian T, Parrello B, Pusch GD, Reich C, Stevens R, Vassieva O, Vonstein V, Wilke A, Zagnitko O. 2008. The RAST server: Rapid Annotations using Subsystems Technology. *BMC Genomics* 9:75. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-75>.
- Overbeek R, Olson R, Pusch GD, Olsen GJ, Davis JJ, Disz T, Edwards RA, Gerdes S, Parrello B, Shukla M, Vonstein V, Wattam AR, Xia F, Stevens R. 2014. The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST). *Nucleic Acids Res* 42:D206–D214. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1226>.
- Blin K, Wolf T, Chevrette MG, Lu X, Schwalen CJ, Kautsar SA, Suarez Duran HG, de los Santos ELC, Kim HU, Nave M, Dickschat JS, Mitchell DA, Shelest E, Breitling R, Takano E, Lee SY, Weber T, Medema MH. 2017. antiSMASH 4.0—improvements in chemistry prediction and gene cluster boundary identification. *Nucleic Acids Res* 45:W36–W41. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx319>.
- Zaccari G, Bagyan I, Combet J, Cuello GJ, Demé B, Fichou Y, Gallat FX, Galvan Josa VM, von Gronau S, Haertlein M, Martel A, Moulin M, Neumann M, Weik M, Oesterhelt D. 2016. Neutrons describe ectoine effects on water H-bonding and hydration around a soluble protein and a cell membrane. *Sci Rep* 6:31434. <https://doi.org/10.1038/srep31434>.
- Bernard T, Jebbar M, Rassouli Y, Himdi-Kabbab S, Hamelin J, Blanco C. 1993. Ectoine accumulation and osmotic regulation in *Brevibacterium linens*. *J Gen Microbiol* 139:129–136. <https://doi.org/10.1099/002221287-139-1-129>.
- Ziemert N, Podell S, Penn K, Badger JH, Allen E, Jensen PR. 2012. The natural product domain seeker NaPDoS: a phylogeny based bioinformatic tool to classify secondary metabolite gene diversity. *PLoS One* 7:e34064. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034064>.
- Waldron C, Matsushima P, Rostek PR, Jr, Broughton MC, Turner J, Madduri K, Crawford KP, Merlo DJ, Baltz RH. 2001. Cloning and analysis of the Spinosad biosynthetic gene cluster of *Saccharopolyspora spinosa*. *Chem Biol* 8:487–499. [https://doi.org/10.1016/S1074-5521\(01\)00029-1](https://doi.org/10.1016/S1074-5521(01)00029-1).

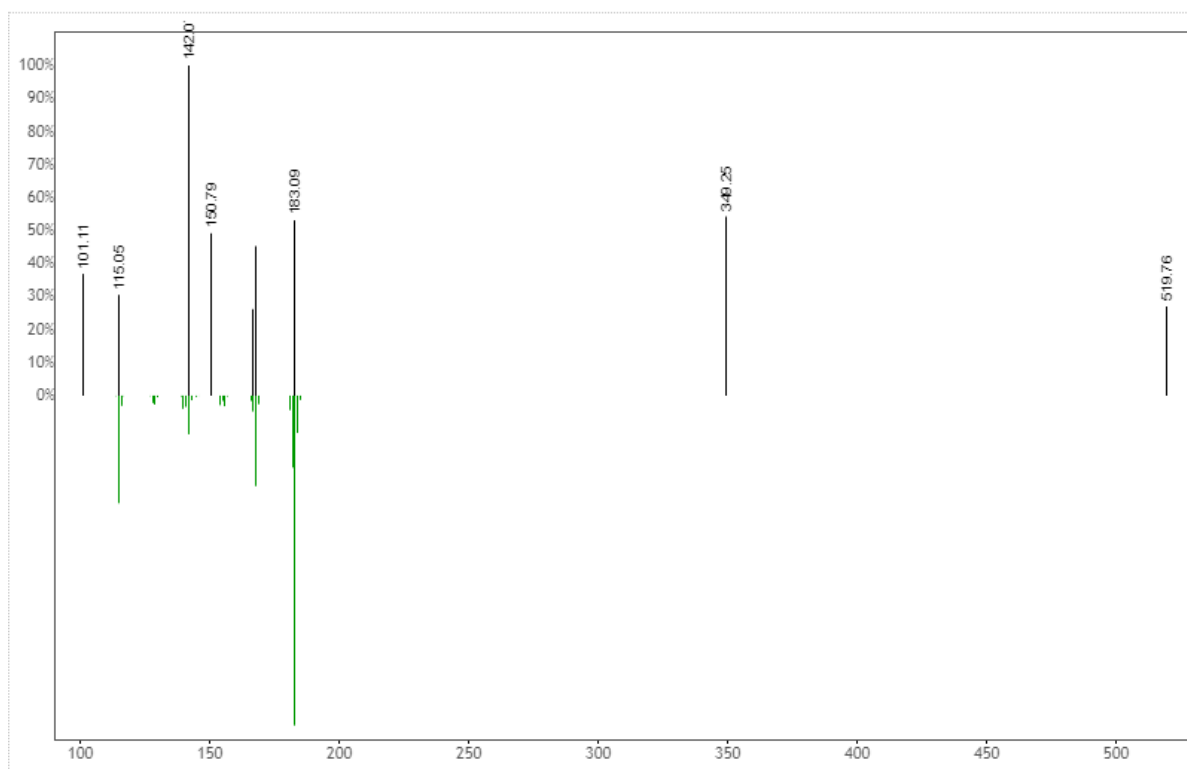
Anexo III. MS/MS mirror match da octadecanamida entre a base de dados do GNPS (verde) e extrato bruto da *S. albidoflavus* ANT_B131 (preto).



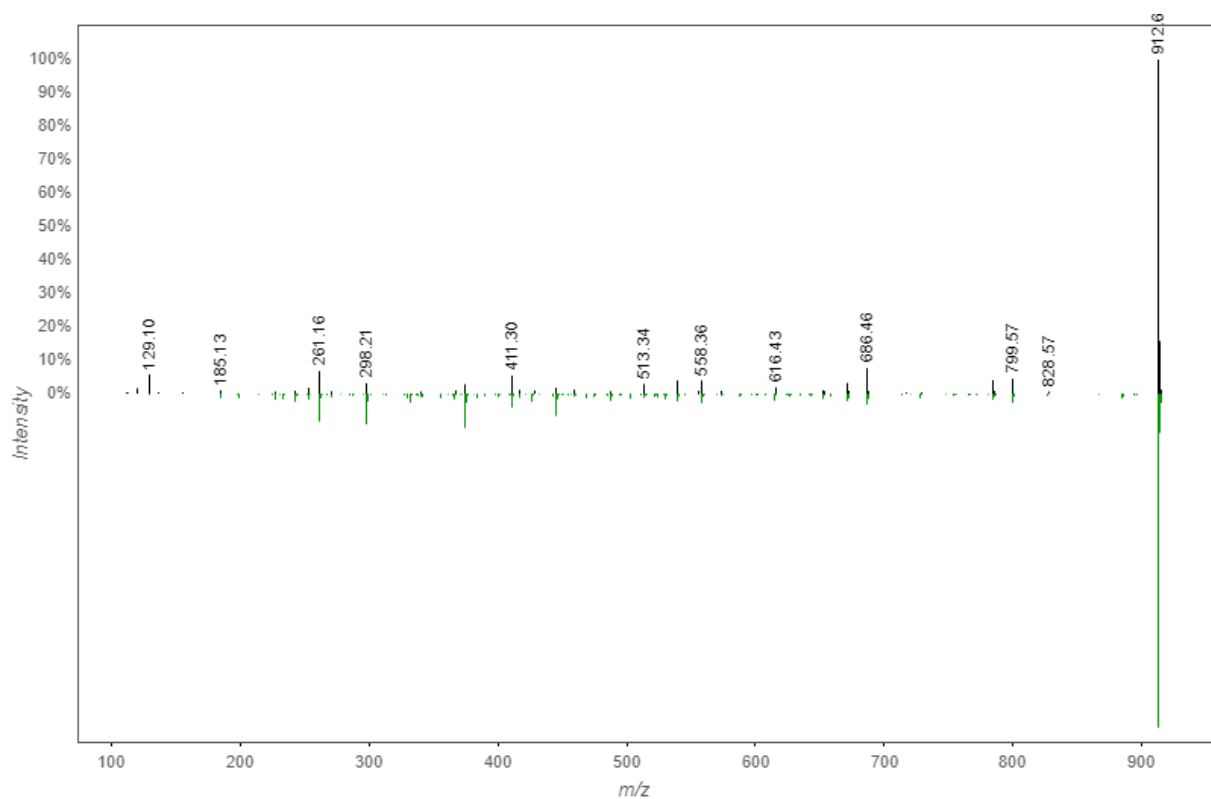
Anexo IV. MS/MS mirror match da 4-(3,4-dihydroxyphenyl)-7-hydroxy-5-[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxychromen-2-ona entre a base de dados do GNPS (verde) e extrato bruto da *S. albidoflavus* ANT_B131 (preto).



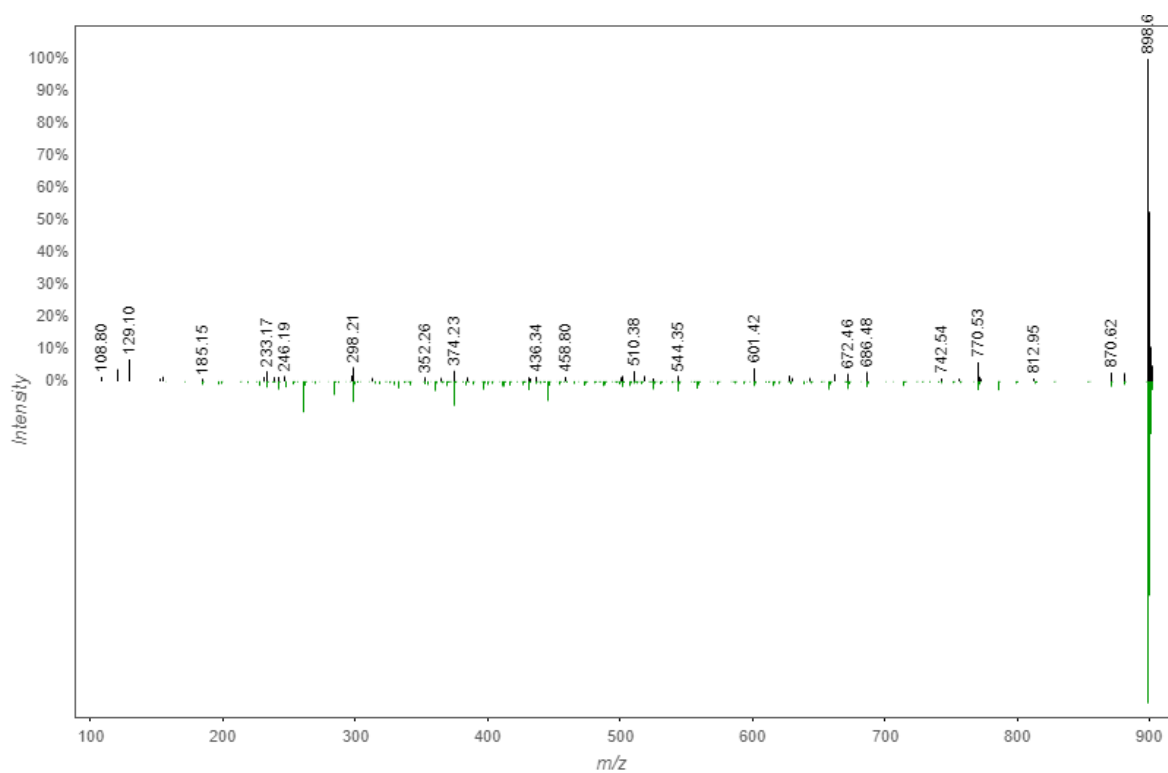
Anexo V. MS/MS mirror match da Harmene entre a base de dados do GNPS (verde) e extrato bruto da *S. albidoflavus* ANT_B131 (preto).



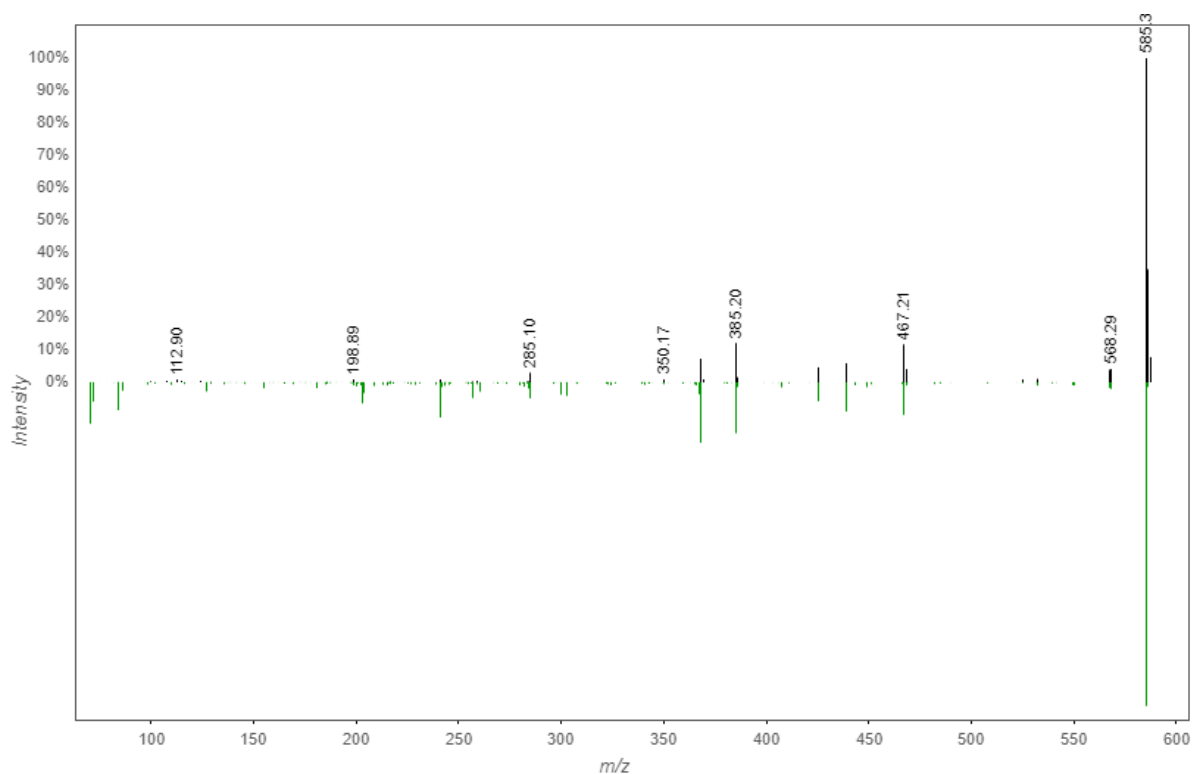
Anexo VI. MS/MS mirror match da surugamida A entre a base de dados do GNPS (verde) e extrato bruto da *S. albidoflavus* ANT_B131 (preto).



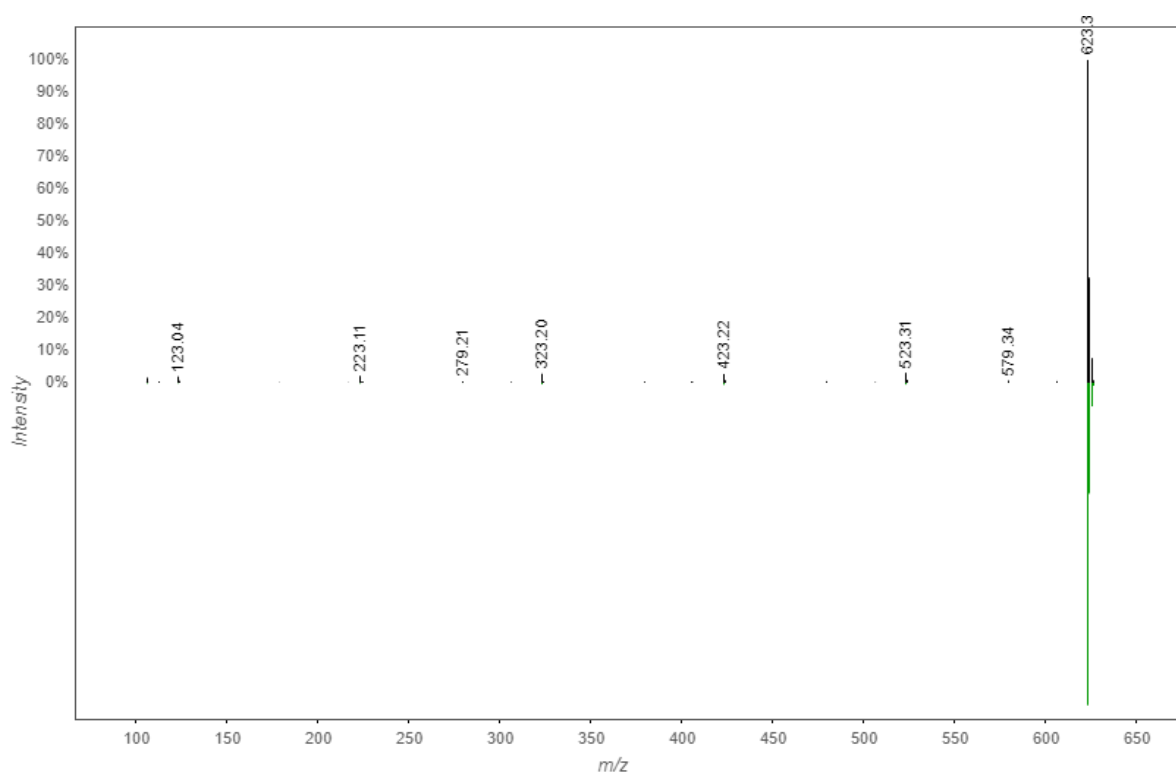
Anexo VII. MS/MS mirror match da surugamida D entre a base de dados do GNPS (verde) e extrato bruto da *S. albidoflavus* ANT_B131 (preto).



Anexo VIII. MS/MS mirror match da desferrioxamina B entre a base de dados do GNPS (verde) e extrato bruto da *S. albidoflavus* ANT_B131 (preto).



Anexo IX. MS/MS mirror match da desferrioxamina E entre a base de dados do GNPS (verde) e extrato bruto da *S. albidoflavus* ANT_B131 (preto).



Anexo X. Smiles obtidos dos compostos **1**, **2** e **3**, identificados pelo Dereplicator para *Marinobacter* sp. ANT_B65.

composto **1**:

[C@@H]1([C@@H](C)O)NC(=O)[C@@H](NC(=O)[C@H]2N(C(=O)[C@H]3N(C(=O)[C@@H](NC(=O)[C@@H](NC(=O)[C@H]4N(C1=O)CCC4)Cc1cccc1)C(C)C)CCC3)CCC2)C)

composto **2**:

(N12[C@@H](CCC1)C(=O)N1[C@@H](CCC1)C(=O)NCC(=O)N[C@H](C(=O)N[C@H](C(=O)N1[C@@H](CCC1)C(=O)N[C@H](C2=O)Cc1nc[nH]c1)Cc1cccc1)CC(C)C)

composto **3**:

([C@@H]1(C(=O)N[C@H](C(=O)N[C@H](C(=O)N2[C@H](C(=O)N[C@H](C(=O)N[C@H](C(=O)N3[C@H](C(=O)N1)CCC3)CC(=O)O)Cc1ccc(cc1)O)CCC2)[C@H](CC)C)C)CC(C)C)

Anexo XI. Sequência de DNA do BGC do lasso peptídeo (22.384 pb) identificado no genoma da *Streptomyces albidoflavus* ANT_B131.

gggggacgaaggtgtcggcctcgggctggccggtctgcttggggcgggggtagagcgtgccgcggtatccgacgacgggcgct
cgtggacgcgcagcacgacgtggccggcacgaaggagggggaggtgcccagaacacggtcgaggcaggtctcgagatgggc
ggcacctcggcatagacgccctcccaggtgggcgcgggcggtggggggcggcgaggacccatggcacgcccgcgaggccgccc
gggcgggcgggccgactctgcgcaccacaggtgttccatggcgctcgcgctgccgcccgggggtggagcgggtcgccgtgcacggg
cgggcccgtcggcggggtccgggtgcctgccacaggacgctgtcatgtcgcgcacacggcggtgtgaaaggcgctcggtgtagcgga
cgccgtcatcgtcgaccttgatggcgaggggcagcggtgtctctcggcgcgccgggcgcgctacgtcatctcgtagcccttctg
gcggccggtgtcttctcgttctccgcgcgggcccacggcgcgccacgagcgcggcgaaacgcgccaggagcgccaggggcgatcgt
gccgccgatgccaggccgaggaccaggggcggttttctgtctaccgggcatcgcgctggacctcgcgagttccagggtccccggcg
agggcccgggcccgttccgaggggaggacgggtctcgtacgtggccgtggtgcatgcgcctgcgggggtggcgctcggtgaccgcc
tcaccccgggttcggccaggagctgggtcgacggcgggcgcgagagcgagagacgacccctggtcgccgtcgcgaggaagtccg
cggccgcgatgcagctctccgcgaccagccgtggctgggtgccacctggacgggtgcaggcggtgctgatccgaggaggagaa
gggagagcaggccccgggtgtcgaggcgccgaccggaccttctcgcgggacgggctcggtgggacggccagccccacg
gtgcgcaggggcgacctggagacagagcagcgcgcgggcggggttcgtccagggtgggtgtaggcgagttgcgcgagccgcgcgtca
tcggcccgggcgacgggtgagctcgaccgtggacgctcccgggtccatcgccgcagcttcgcccgggggaatctcggtggtgagctg
ccggctcagttcctcgccgggactgtcgagtcacccactccgaacaggggcccgcagcagggtcccggttcggcgcgggaccttg
tgaactggccgtccccggcgagctctggaggccgtcgggcgggaggagacgccgaaggacgtccgtggcggtcatcggttcat
gtacgggattctgtcaacgggtggtgcgggggagaggcggtgcggcgcgacgacctggccaccggggcccaggcggtccgga
gtcggcgaaagctgatgacgccgttacagcggtcctccacccttctcggagtgggtcgaccaggagctcgccgcgtcggcgctcg
gggcgggcggggtccgggcagcggggcttgtgcgggacccgccagcccggcccgcacaccgcttgacatcgcccgtactgtct
cggccagtagctcggcgcttctcggggggcccggcggttcgcggatctgctccagccagccgaggacgtcgggcccgcgaga
gatcggcgatctcgcgcaccgacggcccgatgtcgtgcgcaggaaccgccagccctctgtggcggtggttagagcgtgacccgctc
gcgtccggcgaggcttcgggtcccggcagggaacgggcggtattccagtttgccgagcgtgatcagggtccgcaggtagtcgatctgc
cgcaggagggtcgagccgctgctcgggtcgggctgggcaaggtagtgcgacgggtcgccggttccctgtgcaggagaaacgcgt
gggcgagggtgcgggggtgggctaccagtgagcagcgcgaccgggtggtgggtgcgcacggccagagcgaggcgacgcg
cgagcgcgcccaggtgtggtacggcggtggcggtatcggcgcgggaccgtcaggctcaccacctcgatctggggggagcc
gggtgtccagggtccgcacctcggccaggccgagcgtcgtcttaccgcgggacgggacgggtggagccggggccgaacggggc
agtgaaggccatgggttactccggggagacgctgttgagggtgggtgcggagcatgaccgcgccggtgaagtcgggaagcgcgggcg
cgttcgaactcgggtgaaggcgccgacagcggtggtgcgggtacccggggacacggcggtgacctcgtggaggcggtcgtagacca
ggagcggggtccgcgtcgccgctctgtagtagccgtgagccgctcgagggtggccggtcgggcggtcggtcgggcaccaggt
ggaagaccagccgctcacggcggtatctgacagagcatgaacctgagctggccggcgatcatgtaccggtcggtcgttaccggc
gccaggcgagccgcgttgaggaccgacaccggcgcggtaccagtgcaccaccgctccggacctctacacagggccggcgggg
ggcggtccgggtcatcgggtgcgcggcccaggaccggaagtcgggacagccacatcgccggcgggggcagacagacctgcacgggtg
tcgatccgcaccgagcccgttccaccgctgcacggccggccacggcacggcctgttcgacggcgatcatgctggcggtgctcac
gaggccgtcccctgctcccgggctcggccgaggggcgccggccgacagcagcgccgtggtgagccgggtcggtcgtgacc
gtcaactcgacgtgaagcccccgagggggtgcccgtgatctcgaccgggtcggttccgtggccgtgacgatgcgcgggagga
agtgcagtgagcggggaggatgtccacgggtgacggcgcccggccgggtacgaggtggcgctgacgtcggtccttccggggcccc
taccggcgaaaggcgctgatagcgtcgccagacgaagcgcgggcgccgtcgcgctcggtgagcgcgctcagcacacggcgcg
ccaggggcccggggcggtcgtcgcagggcgaggtcaccacggcagcctccggtcccaggccatcacacgcaccacg
gcgaccgggtccacaccagcagctccagcagcactcgggagaggtctccaccggggcccggacgtacggccagcgcggtc
cggtcgaggcgcgccacgacgttcggcggttccgaacccgcgatgttgcgttgcgaggcgggcggtctcagagccctgccgag
gaggaagggggcggggtggtccatgggggtgggcttccagttgggactcccggcccgggggacgtccgacggggggacg
gaggcggtcgaacggggggccgggaggtcaggaggggctgatggtgatagcccgtggcgggcgacgcggtcgtggggcggc
ggcgggccgtactcgggtgagcagcggccgacggccggggcgccacccgctgcgcggaggcgaaaggggcgcccgccagtagg
ggccggggggccgagtcggcgccccggcgggcagctgtaccgcgtacggggcgccgacgacagcgccggccgggtgtccgggtc
cagccggcgggcggtaccggggcgccacgaccacagcagcagggcggggtcgggacggccgaccacggcgccgtgacgcct
ggacctcgtccatcgcgcgagagcccggggcgggccatgccgtcgaggtgaccaccaggtcgaacgtcccgcggaggggga
tcggggcccgcctccccggcgcttctcgtcgccagcagagcgggatcagcgtgagcaggtgccgggtcctcccgtcctcgt

gacgccggctgggtcgccgggtgaacgcggcagcggctccggcgctcgccatcagcgcgggtcacatcagccgccagtcgaccggcg
 ggtgctgaaggaagaagccgggcccctcagctggtcgaggcgggcccctgtacgcggcgggcggtgccgcgacgttctcggggga
 gagcgccacgatgccgtggcgagaccgcgctgcaccggcgagcgcctcttcgagctggtccctggagcggggctgggtccac
 aggttgccgacgacctgaaccggcccctcggaccacatccgcaggtggggccagcgtcctggtcgggccgggttcagcgtgctctgac
 gctggcctggggcgtagagaatgaccggcgggcggtgcgaactggccccgcggttctcgtacagccgggttcggcgccgacgcagg
 tgccagtgtcgacggggccgcactcgtccagctctgcggggccgacccctcgcacagcggcgggccgggtcagcaccgggtgc
 cggaggcgacggaaccggcagccggggcttcagccctaccaggccccggcgctcgccctaccgtcgaccagcttgacctgtgct
 ccgctcaggagcgcgctgaccaactgctcgtccgcctccgacagcgtggggcggtcgtacagcgggacggcgctcactggccgagt
 gacggcaccggggccattggagctgctgcggtgccatcaccgtccgacccccagggacggccagacggcgacgagcgccttgga
 gccggcctcgaaggagctggtgtccagctcgcggacgaccgcgctgcttccctcggacggcgctgggtctgggtcgtggcgcg
 tgggggagtcgctgacaaagcgagtgctccatctcggctatcgcgacgacggatcgacagagataggggccagggggagacgcat
 gacacaactcctgaagggataaggccaagtggggagagctacgctgaagaagccgacggcagaccagtaggctgggtgattcgg
 ccgctacgttgagcgaaccctgaaaagctgtcaggaggttaggtccgggggccgccaaggccgcaaaagcgccaaagatcattc
 ggaacagaggggtagccatggcccgtgagcgcaacctgtctcgcgcgctcctgcggaagcaggctggttctcagcctcaagcg
 gcggccgcggttgccgagtggtgcggaaagtgggtgtgctgaactggagaacatctccgctcacacatctccatgtgggttctgg
 gcacgaaccggagcggggcgagcgcgccatctcgtcgcgagacgttgctccgcaggctcggccgcccactcacctggccgacct
 cgggttaagggaagaagcagcctccgcccgatccagcccggactggaccgtcgatcctctgactgcgctggccgagatgggaagc
 gacgacctggacatgacccgacgcaactgctggcgaccgcccactactccgcccggcctcgcgctgccacgaccgctggt
 ggtcagccgctccagccacagcagccagccgtacccgggtctccgcccggctgggtcactcaggcggtatcgacgatgtccgcgac
 ctacgagcttctactcggcgcgatcagcagcgcgaggagccgcccggacgcacggccctggccgggtcaccttcgcgacgaag
 cggggccccctcctcggcaggcgcttcgcacggaacagcaacgcaggggacgcgtactccgcccgtcgcgagatgacgtacctggc
 cggttgatggccttcgacgctccgagcaccgcacggcccagcgatactcatcgcgcccaccacatcgcggcagaagccggg
 gacggccccctcgcggacacatctccgagcgtcgcgcaccaagcagttgatcttgggacccccgaaaggcgctcgaactggc
 cgacgctccatgtcccgtgaccgctacgggcaggccagccagcgcgagaaggcttactggcgatgttcacgcacgggcgctcg
 ccgccgatggcgaccggcccggcaccatcgcggccatcaatcgagccgaacgggacctcgcgcgagctgacggcgaggcgggca
 ccgagccgctggacttctccaagaagcctcccttcccacgagaccgctgcgcttgcgggacatggggcaatcgccgacgc
 ggagatccacttccgcccggagcgttgccacgcgcccgaagcagcagtagccccgcacccacagcgtcacctcgggtacctcggc
 gccatccagggtcgaacaggggccgctcgcaggaagcatgtgccacctggcgagggtctcgcagccatgaccggagtccattcggg
 ccgctcgcgggacgtcatcgtccgaatgcagagcgaccttccgcccgtccggcagcgcgagggtgtcacgtagtcgaactggacc
 gccgggaggggagatgctccgggcataggtgactccggcgccggcccgatgcttctcgggcccgggtaccggacagcgcttc
 gaaggagagggccgaacgccatggtgacaatcgagggtgaaccgctgcgaaccgtgggtcggggggcatcttcacgtccaggacga
 ctaccaggcgggcgctcaagtcgatcatcaggatcaacgagaagtaccccccttgagacactgcaagggtacgaggagttctccacct
 gctggtgctgtggcacttccacctggcacggccggaggatattcaactgcacgcacgtagccccgaggaaacgcgcggtggccgg
 cgaccgggagcttctcactgcaaccaccgagggcccaatcaacttgggaccagcaccgggaactgctggagctggatggccg
 ggatctcctggtgacgggctggacccgtcgcgggacgcccacgtggacgtgaagccgtacatgcttcagttcgcctcgcctgcccc
 tgagaaggtccgtcaaccagcgtggccaggtgagatgctggccgattactggcgggacgcacgaacgcccgtgaagcggggagg
 cgccccatgattccgacctcaccagctcctccgagcagccgcgagcgcggcctgccccctccgcgccccgggaagccctgc
 gcctggccgagaacgaagtctggcagctgcccggcctgggggtcgctcgggtggcccgcgcccggcaggaggacgcggccgcg
 cgggaggtgaggggtggccgggtggctggccgatcacgagataccggcggtgcggccgctgcccgtcgaccagccgggtgacaacc
 ggggacggccggccgggtgaccttctgggaggagctgcccagcaccagcaggggcagcctcgcgaagtcgcgacgctcgtacgt
 aggtgcaccagctcccggcgccccggccgagctgggtctcggccgttgacccttcgtccgggtcgaggaaacgcacgacg
 ccgcgacgacgtccccggccgaggaccggcggtggctcgggaccactacgcgcccgtccaggctgcctgggagggagctgccc
 gagggcatgccgaccgagcgtaccaggggacgctggccgggcaacctggtggccaccgcgcggggggccgctggtgatgga
 cctggagcggttcggtcgggccccgggaatgggatctgctcgtgggtggcgatccgcacgaccaccacggagtcagcaccgagt
 ccgagtacgcggagtagctgacggcgtaggggtgggacgtccgcgagtgaggagggtacgagaccatcgcccgggcccgcgag
 ctgctgatggtgacgtacgggtcagcacgcccgcgacccgcctgggaggaggagggcgagcaccgggtcgactgcgtt
 cgccggcgggcgccggccgaggccgtggcgctggaccggcatcatgtgagttggcctgcgcccagagacggccgggaacgcgcg
 gaatcgatcagcgccctccgagcgggacgttgaacaccgaacgggtgttcacgggaccagttcggttcgcttggagttggttag
 ctggcggaagcggctgccgggctggtgtagaaactgctcgtatgttcggactcggtagcgccccgtgggtggaggaccactacgc
 ggtcggcgatgcgggctgaggcgaggcggtgggtgacgaagaggccggcgcggtcgtcagtgaggggcgccgaagcgctggag

gacttgatgttcagcgcgggctgcagggctgctgtgggctcgtcagggatgtggacgggggctcggcgtggaaggagcgggcg
 agggcgaggcgttgccattggccgaggagaggtcgtgtccgcccaccatgagcgtgccaggagaggtgtccaggccctggggga
 gtgctgcgaggacgggtgcggcgccggaggcgtgggaggcttccatgacggcgttggtcgccttctggccgggggtgtccgaggtgg
 atgttctccggggcggtgaggggcccagcgggtgtagtctgggggggtgagggccagtttcgcccagacgcttgccgggtcgacgtc
 ggccaggtcgaggccgtcccagcgcaccgcgccggtgtccgggaggtagaggccggtgaggagctgaacgagggtggatttgc
 cgcgccgttttcccatgactgcgacgagttcggcgagcggaggctgaagtcaagttgggtccaggcgggccgggtcgcccccg
 ggtaggtgaaggatgattgcgggagggtgatgagcgtgggtgggtccggcggggagctggagggttctctcggggtcggtggtgg
 tcggcgtcgggtgaggaaggcgccagtcgtccaggtagaggccggtgcggaagacgcgggcgggcgggcggggtgagcgtggt
 caggcgggctgaggcggtacggaggcggaaggggcggttctgcggcgggcaggtcgtatgcggccggcggtgacctaccagg
 tgaggcgggcgaagcagccggcgaggggcgagggaaggagggcggtcgcgggtgagctgcacgcgaggagcggaggggcg
 gcggtgagcacgtcgtgttcgaggcggtcggagacctgcgggtagcgggtgctgagggaaggggcccattggcgaggcgcggtt
 cggcgggcggtgttcgggtcggtgctgtagccgcgagggactccggaggcgggagtcggcgcggggaggtgtggacggcgggcg
 tgttcgaggcgggcgggcgcgaggagggcgacggcgcggggtgctgcccgtgaggaggagcaggcgaggagggatcggtcgga
 gcgtggcgacgaccaggccgacggctgcgaggcgggcggtggttcgagatgaggctctgggctcgcgaccagggtcgcgagcg
 ctctcgcgcccttgcctgcggcgctcgagagcgtcttcgaagccggggtgctcgtaggcgtacagctcgacgcgggcgggcggtc
 gaggacctggagggtcggttcgcgtgagcacttcgggcccaggcggggtgcggccgcggggcgggcggtcgcgaggggcg
 ctccggcgagcgcgaggaccagggtgacgcagggcagggccgcccagagcagggggtgcaacgggcccggcctgtggagt
 ggcggtgacctatgcgagcccggctgcgagcacggcggttgcgcgggtcaggcgagcgcgcgagggcgggcgggccgtgacct
 gtgcgacacctatgcagaccacggctggcggtcggcgcgccaggcgaggcgggcggtgcgggcccaggacggcgggcatccg
 ccgggcggttggcctatccgggtggggcggtctcgtcgccaggcgcatgacggggacgacggggcggggtgggtgtgtc
 actctccgggtgacggcgggccggtggcgccgcccacggggattgcctgcgggtgtgtacagatccgaggccaacccccgagag
 cgtcaacatggcgcttacggttacccttccgggtgtgcgggtacgggaggtgcggcgaggcgccgaccaggggcgggcggggg
 tcggggcggtcgcggccggacagcccgaatgcgccgttctcggtccacaccacgcatgtgcctcggtgggcaactgcgtgcgcc
 cagcaccagtgggcccgcggccgacagtgccaggggcgaggacctgcgcgagcagatttccatgcaggcgatacggccccg
 gtaccaggccggggcggtatgcgggtacggcgccgagacggcgccggccagagcggggggaagcagcgggaagcaccgcgag
 agggcgccagcgcggcaaccgacacctaaggcgcggtcatcaggatcagggaagcgcagcccgggtccggggcagccagc
 gcaccggggcgggacggggcccgttcgggtcccgcggcgccgacgcgaacatcgggcatctgctcaggcagtgcccggagcccc
 ggcccggcgacgggtgaggtaccggcgacggagcgtggtcgtatggtggtcgggacctgtgtcgcggccttctcgcgtggcctt
 ggcgggcgagcgtcgcgatgagggtgtccaccggccctcgacggcgggccgcccagatccgggtcgggtgagcgggcttgccacatc
 cacgttccgggtcgttcgttcaggaccgcaccgtctcgcggcagttccggccggtgcactcccggcgggacctcagcatcgggcac
 cggcccgggtcggcagccggccgctggacggggaggccgtacttcagccaccagggtggtgatgaggaaatctcgaccgcccgtat
 cgggggtcggccgacgcctcccgcggcgccgaggtcagctgaacgcggcgggcggtcgaacagaccgcagcgcacgagc
 gcgtctgtccacgagggggtggaggccgtagtggttcgggtcagccccgcatggagcaggggggagaagctgcccttcgtac
 gccggtccgtgagccagctcggcaggtccggcgggcgccgcccagcagggggtgtacgcgggatctgcgcgctcggtg
 ccgggatccagggcagggcccgcacgacctcgttgcaggtaggggggagaccgggttaccggaggtggggaagagggggc
 gcgtgtcgcggacggccgcgggtgtaccgagggccgcccagtcgtccattcggcgccctctgggcgccgacctgtggg
 cggactcagcagcagggccggcagctcgtcggcgccgagatcggtcagccagcgggtggcgggcccgactgcgcaccagctcc
 acagccggagtgcggcgctgacttgaccattcgcgacctggtctgcggccctctccagtgccttgcggggcgccccgggagcctccc
 gtatgcccttgaggagcgggcccgggagccggtgacgcgcgcgctgctcgggtgggttcccggcgggctcgtcgcgttcaccg
 gcctggggccatcgtgtgtagccgcccaggacactccagcaccacatctccaccgtgcccggtgaggtgacccgcccagacatc
 acgtgcaggaggcaggtatccaggctcagcgggtgagaactgaccgcgaggacggggcgctaggggcgccacctccggccagt
 ggggtgaagtgacctgtggtggcgtggcgccggcgctcagatggtgctcagcggccacgtactcagatacacgaccggccagccg
 cgtgtcctggcatccgacggctcgtacgtacggccagcagctcggcgaccgacgcggccgcccaccacagccgtcgag
 gagtccaggccaccggacaggtccgcgctcacacggccgcccggccagctggcgtgggctcgtcgcacgcccacagcgcctc
 cccacggcgggcagcgccttctcgtatgctcggactcggtgcgtcggcgggccatccaccgtcttcgacccctgcggtcgaggac
 gaggacgggtcgcccgggccaccgggacacccgcgcccacaccgaacggtccggccagtgtcagccgtcccagccgactctg
 agccgcccagcatgtccaggctcggggctcgcgcgggtcagctccgcgagcaggtccgcggggtggcccagaccgggcccgtcg
 cgtgcggggcgtagaacaccgcgcggacttcggccaggtctccggacaccacgggtcggcgccgtgccgctatggacgacaagc
 cagtacgagccgtccatcagggaagccgctcgaaccgtccctcgacagcggctgcggcggtgtcgtatgatctcgcgggcccgg
 cgcggcaggcaccgcccaccagcacgctcatgtcgagcggccacctcccggactaacgccccttcgggatccacaccccgcc

cgtccgcaccgccccggggcgggcgcgaaaggccccgatgccagccacatgtccatgcttctccctctccctcggtcacgtgcccc
 ggacgcgcccaggggggcgggacggccacccgccccctcgagtgccgatcagttctgaagtagttcgaactgtccgagtcg
 ttgaagctctggcgccgagggtgatctcgtccaccggctcgatggccagcgccggaacctcgggagcgggtggtctgatggcgat
 gttctgcatggcgtcctcatctctgagtggtgacgggtgctgccggatggcgccaccggacatcccgcggggcgggggaggagctg
 ctagaccatgtcgtaggtgtgggtggcctcgcgggtctccgtcccgccagggtcacctcgtcgaccggctcgggtgtgcagcag
 cggcacgctgtcgtggtatctccggcgtcatcgccgctcctcttgtgtcgcgggtgtgcccggcgacaccacagcacaccc
 gttcggagacctgagcgggaatccggcgccgaccgggtgaacggcgggggtcacgccccccaagaaccgggtgtggtccggcg
 gctgaccgggtgcctgcccgggtgcttccgggtgaattactgccgtccgcagccgagttggagcacgcgtactacctgaagggtccacat
 ctacggaggaccagcatggggccggccccgctcaaccagcagcggaaacacgctgctggagcactggatgaaccgctgcggactgt
 cgaacggggcagctgcacggctcgtcaacgcccgcgcacaggacgagggcgtcacggggctcggtagccagcagagccgcgta
 cgggcctggcgcaaagggaccgtgccccgcccgcgggtgccccggctgatcgcggacgttctacctcgtatgtccggcacatcact
 cagctgcgaggacatcgccctaccggcgaccacggggccgtcgggggggttcgggttgccgtggaccgcacaagcgcgctcac
 cgctcagccaaatcatccggagcgagatgatgctgcccagataccgaaccgagcccgaagcggcccgctccacaccgcccac
 aacctctcgcacccctccagcagtgggccctagccaccccaacgaccccgacgcccctacgaaaaacccaccggacgcgca
 tcggagcctccgacgtcagggcgtacggcaaaccaccgcgaccttcgcgacctggacaaccggagaggcggcggtcgtccc
 gcacggccgtcctcggccaagccgacaccgtgatggccatgctgcgaaccggcacctacaccgaacacgtaggccgcgaccttcc
 gccgcgcagccgacctcggcagcgtcgggtggtgatgagcttcgacgcccggccgacgcccgcgcccagcgcacatctcatct
 ccgcactccacgcccaccgaagcccaggaccgcgccccctcggcgcgcacatcctccagtgcattggcccgcagatgtcccacct
 cgtatgcccacaggacgcccctgaactcgtcgcgtcgcagtagggcgcccgaaccagatgacccccgccaccgcccgcg
 cctcggccctggaggcacgcttctcgtccatcctcggccgacccgcagaaagctgtgcccagcggggccgcgcaagaccac
 ttcgaccgctcgaccaggacaacgagtcaccgcacatggcgtacttcgacctccccgagctgtacgccaccatcggtatggcacac
 cagatcgtgccaagcacctcacggggacggaaacgctccgcccggggccgctgcttcgaggagctgattctcgagccctcgtga
 ccgcccggagcaccgccaacgctccaaggcattcgaccacctgggcttgcggcaccacctggctcgggggaagtcgaaggc
 gcggccgaggaaacctcccaatgccttcagctgatgggagcggtggactcgcggcgaatcagcgaccgctcggcgagctgtacc
 aagaggccgccccgttcgaggcacccccgcagggcgtgatctgcgggaagagatccacagccgactcgtggctgaacggcgat
 caggacagagggggcaccgcacccgggggaaggtcgtcacgaagccggatgaagcgaccgggtgcccgtaccggcctgctgc
 gtccaccgaggtgtcggcgacacctcggcgacaagggccggattacggggacgtgcccagcggcatccgctccccagcc
 ggccgagaactgcacgcccgtgccacgggtggtcgtcgcggccgcccgtgaggcgggcgccgacctccccgggtgctgggtggccg
 agagcggcgtcgtccggcgatcctgaagcgcgctcggcgtcccagcggccgagcagcagggtgtccgggtccgagacgg
 gccgggtcacgcgcccaccacgcccctcgggtggactcccgcgcccgcacctccaccagccgcccctcggggccggtagccggc
 gccggccgggttaccaccacccccctcaacaccggccccgccccagtcggggtccatccaggccagcggccggtcccgtccgtc
 gtggacccaccaaggcccagcggccgcccagcacccccctcggcgacgagcgcctccaggcgcgcccaccgctctcggtagggg
 gcggcccatcagtagcttctccgtcggcctccagcaggtcgaaggcgacaacgtgcgctggcgtcgaccggccggccgagcgggc
 gcgatagcccgtcagccgggcccgtgctgcaacgcccgaagtccagcctccctccttgaggacacaacgagttcgccgtcagga
 ccaggtccatgccgacgtcggcgggcggtcggagctcagggaagtgcgcgggtgaggtcggctccgggtgcccggactggaggtgca
 ggcgcccgcggaagggaaggccaggaccgggtaccgctcagcttctgctgacagtaggctgggtggcgccccgcgcccgcg
 gaagcgtggggcgccctcggcgcatcgggcgatcgagggttcagcacgtctcatgctccgtgagttcgctccggaagc
 cgtccgacaccacggacctgcgggtgaatcccgttccggggcgattggccgaccaggctccggcgaccggggggccgcccgcg
 gctctgccaagttgacggcattcgccgtgccagcaccgcagttgggacatttccctgcccgtatcctggccgggggacactcgtt
 gtacgggcgggcgccgaccggcccgtctccgcgctgcacagcgaaggatgcccatgcccaggagaaagacgtcgcc
 accgaggatcacgtccgggtgcgagtggtcgactgaccaccgtcttcgagtcctcggggccgagcaccaggcggttggtggccga
 agcggagaagacctcgtgtcggagcgccgaggcaccgtgactcgcattgatgaggagatcgccagacagccgcacggtctcct
 cctccatcatcagctggccaccgtacgcggactcgtgacctcgacatccgccagcagttctccatggatgctgagggctgtgacta
 cagtcctcgtgtatctgaccagccccctcaggtgtgctgcacgacatcgcaattaccttgaggaggccgctgagacgctgggccc
 ggcgtacaagccgaccaagaagtatcccggcctggcggtggcacgctgcccctcggcagatgaagctgggttctccagcctgctgc
 agcgtggagcgtgtgtgacccgatctccacgcacgatctgaggtgaccgaggatcacacttccactaggcggttctgactgag
 tggaggaccgggtgtgccccaccatccctagtcagagcgccggcccgagcgggaagtcgtcacggcgatccgcgccaacc
 cggcggttgcggagcgccgctgcccgcgtggcgaggctcggcggtcccgtccggccgccccttggaactgcgtccctctgagat
 caggccccgcatctccgggaggtgtgaaccgatctgggctggcctcggtcggccgtggggggggcgcccttgccggggctgc
 gctgagccgggttcccccgggactacgggtggtcgccaggagcgcgcagacgggtgcggcctccggagagcaggccggagccccca

cgccgaggaccaagacacgccgctcttcgatgacgagtggtggcgccgcccagccaggggatgacgaggcagaatcg
 gcagcgcgctaacttcgggctgaaggccgaccgaccgaggggaacagcgatggcgacgaccgacctgctcatcaaccccaac
 caccagaccaccggtctgcatctccccgacaaggcgagaccaggtcgggtgctccgggagaagattggcgggcacgctgaatc
 aagggatctaccaccgagggcagttcttcatacgcgcaaaacggcgctcgaggggcctgcccggcgaacctggtgtctggggcg
 tcgccagtgcctggcgcgcatcccccttaccgatcgccggccccgctgcatcaccggccccgacggacctgacggctatctcg
 acatcgacgaggacctgcgcccaggcgaggatgtcgcgtggccgtccaggagacgacctcagctggcgccagcagcgcc
 cgcaatccgaggacgagcggtcgaagcaattctcgcttgcgcccaacgggtcgtgtccgcgcccagctgccaggacgcacgatga
 caacaggtgtccgatcgaccctggtgatcgtctgagaacggggaaaccgagagctggtgtggcgtagaagcgagggggaatctcc
 cacgctggtggcgccgatgacgggcttcggcgccacctggcgggagaccggctacacgaacgcccggcccgaagtccgagcac
 tatccgctggcctcgctgagtcctgagtgagcgaagcgatcaactcctccgtctcgggctccagcgcgagtcacaaccgcccgcgag
 cctgttggggcccgctgatcgcggtgcgaaggccgtgccgggtgccggcctcgtgctcggtacgcatccagtcccgggtacagcagct
 cggccgtgctctcgacctcaaggccgatcatgatcgctgtcgagccgctcgaggctcgtgtgccggccccgggacgggtccgcagc
 acggcgacacagtgcgcgatgtcgatgatccgggagatcatccgctgctgctgggggagtgcccagccgaagtcccggcccga
 gaggggcgcccgcgaccagcgagagcgcgctctccagtccggaagtcttcggagccgtctgcggcgagaccggcgggcggtc
 gttcctcgaaccaggcccagtcgcaggtcagcgagggagacaggcggtacggcgagtccttccggaacggcgagacgtagggg
 gttccgctggggctgctgcgagccggtccgaagtcacggacacgctggtgaggggtggcgggggaccaggggctcgttcggg
 cccatggcctcgacaggggtctccgggtcccttcggggacggaagaacagcaggggagccagcgcgccagcttcggcgccctgc
 tcgtggtctccaggccgggtcagctcgacggtccccatcactcgagctggggctcggcgggggcgctcggccttctcggcggtccgcg
 agggcggaagccggctcgacgtcggcggaagcgctcgaagacggctcactcagctcgtgttctccacgaggggccggcggaag
 ttcgggctccgtcggcggtggcggtgtccccatccgggtcgggggtctgcggccgcttaccaggggcggaacggcggttgc
 cggttcggctcgccctcgccgtcctcgggcagcttctcgggctcgccccctcgccggcggtgtcctcgggcggttcgtcgacgacctggtc
 ccagggggcttccgcccgtcagccggctcgtcgtggtcgacaaggcgctcagcagatcctggtagtccgtggacgacatgcgt
 ggaggacgaggtccttctcgacatcctcgatcagctgctcgacgtcggggggcgcatcccagacttggccgccccggggaagaccgc
 gccacagcttgcgggagggaccatcgcgaccttgcctccggggcgccgcccagggcctcggcgagctgccaagcctcgtcgtg
 gtcaccgagtcagcgagaccagcagccacgactcgtgctcgggccccagggtctgatccgctccaggagccactcgcccaggtc
 gcggggcgccgcccggcggtcggggacgtgacgcaaccgcgggctggcatcaggcgcgggcagctcccggcccgaagccacg
 gcgagaacctccgctgctccgcccacgggtcatggccacctccaggacgagcgaggtgcacacctcgcgacctcgagcgag
 atccggagagcagtagcagctcgctcgacggcagattcagcaggacgatggaccgctcaccgtcgggccccagcggtcaccagccc
 cgggtacggacagggagttgcagcggcacctcggcggtgaggagttctgcgccagggggcagcgaccaccagagccctccgg
 ctcggcggtgaacggcttgaccggctcaccgggatcagggggaagaacccggatcgtgcggcggggtaccatcgcgcccttgagc
 gcggggacgtcgatccggcctcgcccgcgcgggccatgctgcgacgcggtgtcgagggcggtcaccgcccggcggtcc
 gcgtcctcgacgaggcgctgctcggtcgtgctggcctccggagccatcgcgatcagctcgccggcttcggcgccgctgctgag
 ccgcccggcgaccgcccaggccggcgacgacgaccgcgggcggtgagcgcggtgacccccgagccgtacgcacggccgcccgg
 ggtcgccggcgaggtctcctccggctggactgtcgtcgccgtagagggtgaggagactcgggagccgtggtgtcggcgaggg
 ctggcgacttccgtgcgggacggagccggggctcggtcgtcctcggtcgtcctcgggcgggcggtcgggggtgcgga
 ctcttcgggggagcaggaggggttctcgggctgggtgctctccgtccgagggcagcaccaggcgctgcccggggacgatctgat
 cggcgctcggtgagccgttgacctcgcgagtcggggcccccggttcaggtcgaagatctcggggtaccggtccgctccccaac
 ttgtcctcgggcagcttctgagaggggtgtccccggggggcgaccgtcacagcgcgggggcgcaaccgctcaccggaaggagcatcg
 accgcccgccttccccaccctcactcctcggaagcagcagttcccagcctggccggatgtccccggcggaacgaaccgcgagcc
 gtcgaccatgacccggccctcgttcagctcggtcgtcgtgaactgggccccgctcgccgtacagttctcggcgatgctccacagg
 ctctggggcgggcggggtgtcgcgcaccgtgtacgtcggggcgggcacggggggcctcgtccgctgctcggtgcttccgctcatg
 gccacgctcgccggtcgcgaggagccgctgggtgacctggcttggggccggctcgccctccgctcgcgggcggaaccggcgga
 gggcgccgcccagggcgaggtgtgctgctcagcaccgagcagcggcgtaccagcaccggcgccgcccgtggtcgaagcg
 gaggcccgagcgaaccaccggcgggcggaacctgcgcccgcacctcgaccaggagcgcgacggcggaaggtgatccatg
 ccagccagccgacagcgaggatcaccagcagtagcggtcgcggtgtcctgacgcgacagcaggtgcccacgtcgtccagac
 cgtagggccccaccgcccgggtcgctgccagcaggtacggggccccggcccccaacagggggatgccagcagctcccta
 cggcgcgccgagcaccgaaccgcttgcagcaccatcagctcctcagcccttccgggtcgtgatccgtgcagcaacggcg
 cccgggagggagccgtccacgggtccacgacatcggtgtgaacctcctgtatagctggtggtcacggtagctcagcagcagtgcca
 cctccaccaggtcaccgtccccgacacggcccttcgcgaggtacgcctggccggccgagcagcaccggcggtcgccg
 acgaaggcgtccccggcaccgcttaccagatcgatggcctgctcgcggccccgggtgctcctccgtcgccagggtacccgcc

gctcatgggccccagcaccggaaggagtcgaccgcgaacagcccggcgagcgcgacgagggggatcgagatgatcgagcg
gagagggcgacacctccccggctcgtccagccgggactgccaggcccacctgctcgcctgtccatcagcgtccccggtaggcgctcg
acgacgggaggtgaaactccgctgacgggtccgcactccggggcccccaaggaggaggagatccccgatggccacgggtgcac
tccaccgtcacgggtgacctcgagacctgccccaccggcaccgccagccccccgggtgtccgcctccaccgagtagggcggtgcagct
ctgcgaccgctggggcgagcgcggcgccgcccggcgagcctcggcctgcgccgcgcccggcgtagcgccaaggacgcg
gcccgcgcgcccggcttcggcgccgcgtcggcttctgggaggccaaggccaccggcgcccgcgaggaaacagcagtcccagg
gccagcaggacggggcagcacgatcgccgcctcgatgccatggccccccggtcggcgaccggcgccgggtcccgctgcctcacc
gagcaccgcccggcggtggtccagcgctcgaccgggcccggagaccgaggcagacaccgcgacaccgggagggcccggcagcat
cgacaccgtgcggccccctcacctggaccgtcacttctcggcgccccggagaccgacacctctggtccacgatcaacgttccacc
gagcgaggcgagagcggccccgcgcttcgcgggcgccgtcctgcgcgtcgcgccgttcatccggccccgagacgccttcgcgc
gccgcggtgtgcaccgtggcggttggtgtagggccaccaggaagccctggaccagcagcagtgtgaacagcagcacgaagggcagc
acgatcgccgcctcgacggcggtgccccctgtctgtgcttccctcctcgggtggatcatcagaactcgacgtcgttgaccttgccg
gcaccttgccgtacaggcttgcgattgcgaccacgatgactgccgtcccgccaggaccgcaatggtaatgatcaccattcgagtg
aactcgcgccccgggtcccgccccgtgcggtcggacaggtgcgggtgcgcggcgccggccccggcggtgccgtacggctcccagca
gcgagagggtaccgacagcttgagaaatgtattactcatgacaaaagtcgccttctgtgtcaaatggtgaacaggggactgcacagca
ggaaaggcgacaaggacgatcaccagcacagcgaccaaggcggtgggaaccgacatcttctcgctcgctggttggtgctcgcgt
ttctccagccagaagtgcgttggttcaggccggctgctcgattgcgcagcgtgtctgata

Anexo XII. Declaração de que o trabalho não versou sobre pesquisa envolvendo seres humanos, animais, patrimônio genético ou temas afetos a biossegurança.



COORDENADORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
INSTITUTO DE BIOLOGIA
Universidade Estadual de Campinas
Caixa Postal 6109. 13083-970, Campinas, SP, Brasil
Fone (19) 3521-6378. email: cpgib@unicamp.br



DECLARAÇÃO

Em observância ao **§5º do Artigo 1º da Informação CCPG-UNICAMP/001/15**, referente a Bioética e Biossegurança, declaro que o conteúdo de minha Tese de Doutorado, intitulada ***“Do genoma aos produtos naturais: um estudo do potencial bio sintético e metabólico de bactérias da Antártica”***, desenvolvida no Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular do Instituto de Biologia da Unicamp, não versa sobre pesquisa envolvendo seres humanos, animais ou temas afetos a Biossegurança.

Assinatura: Paula de França
Nome do(a) aluno(a): Paula de França

Assinatura: Fabiana Fantinatti Garboggini
Nome do(a) orientador(a): Fabiana Fantinatti-Garboggini

Data: 06 de novembro de 2020

Anexo XIII. Declaração de que a dissertação ou tese não infringe os dispositivos da lei nº 9610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **Do genoma aos produtos naturais: um estudo do potencial biossintético e metabólico de bactérias da Antártica**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 06 de novembro de 2020.

Assinatura : 
Nome do(a) autor(a): **Paula de França**
RG n.º 40649947-0

Assinatura : 
Nome do(a) orientador(a): **Fabiana Fantinatti-Garboggini**
RG n.º 16.973.966-1