

PARTE III

BIOPROSPECÇÃO E BIOTECNOLOGIA AMBIENTAL

*"A natureza não faz
nada em vão"*
Aristóteles

BIOPROSPECÇÃO DE MICRORGANISMOS COM POTENCIAL DE USO NA AGRICULTURA

Itamar Soares de Melo, Rodrigo Mendes, Kátia de Lima Nechet, Gileno Lacerda Vieira Junior, Danilo Tosta Souza, Juliane Fontana Koba e Vanessa Nessner Kavamura Noguchi

INTRODUÇÃO

Na agricultura moderna, práticas intensivas que garantem altos rendimentos requerem o uso extensivo de fertilizantes químicos e de agrotóxicos sintéticos que, associados aos impactos ao meio ambiente, têm onerado os custos de produção. De modo a suprir a carência de produtos fitossanitários de pragas, doenças e plantas invasoras, as indústrias têm intensificado seu foco na busca de bioinsumos, à base de microrganismos antagonistas, assim como microrganismos solubilizadores de nutrientes.

Nesse sentido, faz-se necessária a adoção de programas bem planejados de bioprospecção de novos microrganismos que realmente possam ser utilizados com eficiência em condições naturais de campo. É crucial a investigação de linhagens superiores com novos mecanismos de ação e que sejam altamente competitivas e que novos habitats sejam explorados para o isolamento de novas espécies. É importante que essa busca seja feita em ambientes onde as funções almejadas sejam um produto da evolução natural.

Esta pesquisa utiliza a bioprospecção, que é uma ferramenta de exploração e utilização de recursos biológicos que tem sido utilizada há muito tempo, permitindo a sobrevivência, a adaptação e a evolução da humanidade. Os microrganismos são excelentes recursos, uma vez que, dada sua ampla capacidade metabólica, podem adaptar-se a várias condições, possibilitando sua existência em vários ambientes, desde a interação com diversos hospedeiros (plantas e animais) até a colonização de ambientes considerados extremos do ponto de vista humano. Essa versatilidade possibilitou a divergência e a colonização de diferentes nichos, tornando-os um grupo extremamente diverso. Eles desempenham papel importante na sustentação da vida, desde a participação nos ciclos biogeoquímicos, interagindo com seu hospedeiro e impactando sua saúde e desenvolvimento, funcionando como minifábricas para produção de compostos de interesse farmacêutico, industrial e agrícola.

Embora seja um mercado promissor, os bioinsumos ora no mercado restringem-se a poucos gêneros/espécies de fungos e de bactérias. Como exemplo, podem-se citar aqueles voltados ao controle de insetos-praga: *Metarhizium*, *Beauveria*, *Entomophthora*, *Neozygites*, *Hirsutella*, *Isaria*, *Paecilomyces* e *Bacillus thuringiensis*. Para o biocontrole de doenças de plantas, citam-se: *Trichoderma*, *Clonostachys*, *Bacillus amiloliquefaciens*, *Paenibacillus* e *B. cereus*. Igualmente, poucas bactérias têm sido usadas para melhorar a produtividade, incluindo *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Paenibacillus* e *Burkholderia* (Rodríguez; Fraga, 1999). Em estudo recente, pesquisadores da Universidade de Indiana, nos Estados Unidos, estimaram que a Terra pode conter cerca de 1 trilhão (10^{12}) de espécies microbianas, das quais 99,99% permanecem desconhecidas (Locey; Lennon, 2016). Como se percebe, ainda há muito a se descobrir, e essa grande biodiversidade propicia a oportunidade de explorá-la com sustentabilidade em benefício da sociedade.

Assim, a biodiversidade deve ser explorada como fonte de novos genes, enzimas, moléculas, agentes de controle biológico, pesticidas, inseticidas, inoculantes, entre outros, que possam ser aplicados nos mais diversos setores da economia. Pensando nisso, nos últimos anos, a Embrapa Meio Ambiente tem se destacado na bioprospecção de microrganismos dos mais diversos ambientes (Antártica, manguezais, Caatinga, Amazônia, Cerrado, Mata Atlântica e marinhos) na busca por novos compostos e microrganismos que possam ser utilizados para o desenvolvimento de novas tecnologias com potencial uso na agricultura.

A BIODIVERSIDADE COMO RECURSO PARA DESCOBERTA DE NOVOS BIOINSUMOS

Os insumos biológicos, em sua maioria, são derivados de microrganismos e seus metabólitos e recaem nas seguintes categorias: biopesticidas, bioestimulantes e biofertilizantes. Embora tenham ocorrido avanços extraordinários no uso de agentes de biocontrole que garantem uma agricultura menos dependente de agrotóxicos, ainda há muito a se avançar na busca de novos agentes microbianos e na descoberta de novos biofertilizantes. A demanda por bioestimulantes deve aumentar, haja vista a escassez de água e irregularidades da precipitação anual, além de aumento das temperaturas e salinidade dos solos. Por sua vez, os biopesticidas à base de microrganismos vivos também devem merecer atenção no sentido de bioprospectar novas espécies com características superiores. A diversidade de espécies microbianas ora no mercado ainda é muito reduzida, com uma base genética estreita e, há muito, sendo subcultivada. Contudo, é preciso estudar a estabilidade genética dessas linhagens. Para ter uma visão global sobre a reduzida diversidade de organismos no mercado de bioinseticidas,

há os seguintes gêneros: *Bacillus thuringiensis*, *B. sphaericus*, *Beauveria*, *Metarhizium*; para os *biofungicidas*, *Bacillus*, *Clonostachys* e *Trichoderma*. Nesse sentido, a exploração da biodiversidade visando a novos agentes biológicos deve ser dirigida baseando-se nas interações ecológicas, em que o caráter tenha surgido como uma evolução natural, e as buscas devem priorizar o isolamento de novas espécies/gêneros e, portanto, de novos clusters gênicos e novas substâncias bioativas.

A maioria dos microrganismos permanece desconhecida, e vários habitats, inexplorados. Grande parte desses microrganismos ainda não são cultivados em meios de cultivo tradicionais, necessitando de estudos para acessar alguns grupos específicos. Diversos fatores contribuem para esse viés metodológico, como o fato de esses microrganismos frequentemente existirem em conjuntos interdependentes que funcionam como unidades metabólicas, já que esses cenários, até então, não podem ser replicados em condições de laboratório (Ainsworth et al., 2010). Ademais, os microrganismos em seus ambientes naturais existem em relações altamente específicas com seus hospedeiros, e a ausência de fatores-chave como metabólitos produzidos por outros membros da comunidade também dificulta o cultivo (Handelsman, 2004). É possível que muitos desses organismos sejam, de fato, mutantes auxotróficos, necessitando de requisitos nutricionais específicos.

Menos de 0,1% do total de espécies microbianas têm sido caracterizadas (Alain; Querellou, 2009). Portanto, buscar estratégias de isolamento em meios de cultivo considerando a fisiologia dos microrganismos presentes naquele ambiente é de suma importância. Uma estratégia para ampliar a diversidade de microrganismos cultiváveis é aumentar a diversidade de meios de cultivo para isolamento, que devem contemplar meios complexos, ricos em macro e micronutrientes, como também meios que sejam oligotróficos, principalmente para o isolamento de microrganismos extremofílicos. Bactérias psicrófilicas e bactérias do filo plano, por exemplo, devem ser isoladas em meios de cultivo diluídos. Assim, os meios de crescimento devem incluir baixas concentrações de sais minerais ou até mesmo a adição de extratos da própria planta hospedeira. As técnicas de isolamento baseadas em enriquecimento têm sido utilizadas no sentido de tornar as condições de crescimento mais favoráveis aos organismos de interesse, ao passo que desfavorecem o crescimento de quaisquer competidores. Igualmente, sugere-se a exploração de microrganismos com base nos critérios de quimiotaxonomia, a exemplo do que já se exercita com plantas, embora linhagens microbianas filogeneticamente próximas possam apresentar distintos perfis químicos quando os metabólitos secundários são levados em consideração. Uma abordagem inovadora refere-se à bioprospecção baseada no genoma do organismo de interesse, proporcionando a descoberta de genes que codificam a biossíntese de novas substâncias bioativas. Ademais, a abordagem metagenômica pode garantir acesso àquelas populações de microrganismos que não podem ser cultivadas em laboratório.

Reforça-se a importância da descoberta de novas espécies para o controle de nematoides, novos antibióticos naturais produzidos por fungos e bactérias para o controle de fitobactérias e plantas daninhas, novos bioestimulantes para proteção de plantas contra seca e salinidade e novos biofertilizantes envolvidos na solubilização de fosfato e de potássio.

ESTRATÉGIAS DE BIOPROSPECÇÃO DE MICRORGANISMOS

Embora seja possível a exploração de microrganismos de diversos ambientes para uso agrícola, aqueles associados às plantas parecem oferecer efeitos superiores à saúde da planta, por colonizar suas respectivas plantas hospedeiras, inibir o ataque de pragas e produzir substâncias bioativas, como antibióticos voláteis e não voláteis e enzimas hidrolíticas, e soma-se a isso o fato de já serem adaptados à própria planta hospedeira. Os microrganismos que interagem e estão associados, simbiótica ou assimbioticamente, incluem os microrganismos da filosfera e da rizosfera e os endofíticos (Figura 16.1), pertencendo aos três domínios: arqueias, procaríotos e eucariotos.

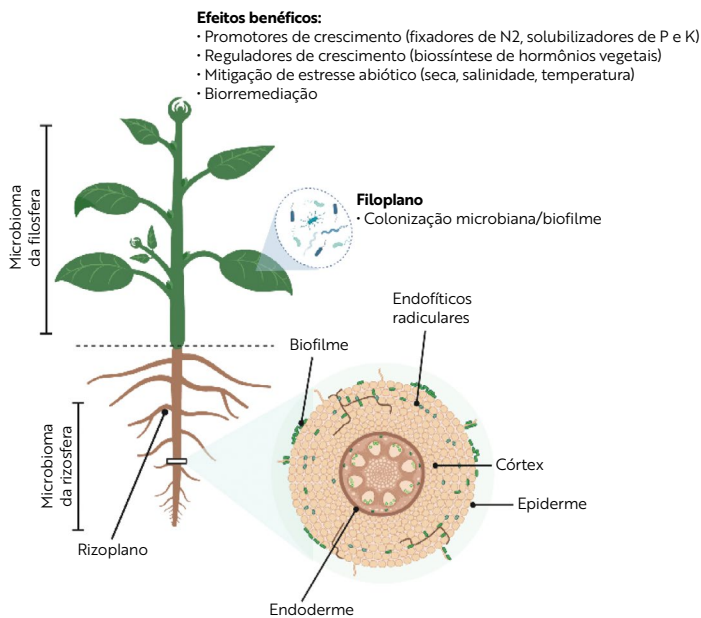


Figura 16.1. Microbiomas da filosfera, da rizosfera e do interior dos tecidos vegetais (endofíticos). A imagem mostra os diferentes micro-habitats relativos a cada um desses *hot spots*, com suas funções essenciais ao crescimento e ao desenvolvimento de plantas e proteção contra pragas e estresses abióticos.

A exploração de agentes microbianos ou de seus metabólitos para uso agrícola tem sido realizada há décadas, com relativo sucesso a partir de fontes naturais, como o próprio solo. Recentemente, outros ambientes, muitos deles ainda pouco explorados, como ambientes marinhos ou até mesmo ambientes extremos, têm sido fontes de descoberta de novos organismos. Mais de 50% de todos os produtos no mercado são originários de produtos naturais.

Microorganismos da filosfera

A filosfera é um dos ambientes mais hostis para o crescimento de microrganismos. É um ambiente extremo para grande parte dos microrganismos associados, pois os nutrientes na superfície foliar (filoplano) são extremamente escassos, e a exposição à dessecação e à radiação UV é igualmente extrema. A superfície foliar é quase duas vezes maior que a superfície da Terra, representando um habitat para microrganismos benéficos de importância para a agricultura, por exemplo, microrganismos tolerantes à radiação ultravioleta, e estresses osmóticos, sendo a maioria deles bactérias pertencentes a poucos grupos filogenéticos, incluindo as classes *Alphaproteobacteria* e *Gammaproteobacteria*. As bactérias são os organismos predominantes com uma densidade de $10^6 - 10^7$ (Vorholt, 2012; Bringel; Cauée, 2015). É um habitat também para arqueias, fungos filamentosos e leveduras. A maioria das bactérias habitando a filosfera ocorre em grandes agregados, principalmente em micronichos, onde formam os biofilmes à base de substâncias poliméricas extracelulares. Alguns grupos são ubíquos simbiossiontes que colonizam a maioria das espécies vegetais, e certas espécies podem exibir determinadas características de importância à agricultura, como fixação de nitrogênio, produção de fito-hormônios, substâncias bioativas contra doenças e pragas. Bactérias metilotróficas, por exemplo, constituem os simbiossiontes predominantes no filoplano, os quais colonizam a maioria das espécies vegetais e têm demonstrado efeitos benéficos quanto à promoção do crescimento de plantas e, portanto, apresentam grande potencial de uso agrícola. Entre tantos atributos benéficos, as metilotróficas apresentam vantagem competitiva no filoplano, pois colonizam e competem na superfície foliar, toleram radiações, altas temperaturas, estresse hídrico e liberam substâncias bioativas de importância para o controle de fitopatógenos. Tem sido relatada a presença de bactérias fixadoras de nitrogênio na filosfera de muitas espécies de plantas agrícolas (Miyamoto et al., 2004). Na mesma linha de estudo, Mwijita et al. (2013) descobriram que mais de 50% das linhagens bacterianas isoladas da filosfera de arroz foram capazes de solubilizar fosfato. Desse modo, por sua natureza simbiótica e por serem bons colonizadores e tolerantes aos estresses abióticos intrínsecos à filosfera, atuam como excelentes probióticos à saúde da planta.

As buscas por microrganismos da filosfera para uso agrícola não têm recebido incentivos quando comparadas com as pesquisas voltadas aos organismos da rizosfera. O uso de antagonistas microbianos isolados do filoplano tem sido considerado uma das mais importantes alternativas de controle de doenças que ocorrem em pós-colheita. Os mecanismos de ação envolvidos no biocontrole incluem competição por espaço e nutrientes, micoparasitismo, liberação de substâncias bioativas, incluindo compostos voláteis e indução de resistência da planta hospedeira. No entanto, em virtude das propriedades benéficas, do caráter de adaptabilidade e de se requererem baixas doses de células, essa linha de pesquisa deve merecer atenção de pesquisadores e de produtores. É perfeitamente possível o uso combinado de linhagens com funções diversas, incluindo agentes promotores de crescimento de plantas e de agentes de controle biológico alinhados a doses adequadas de agrotóxicos.

Microrganismos da rizosfera

A rizosfera foi definida no início do século XX, por Hiltner (1904), como o volume de solo que recebe influência das raízes das plantas, e, desde então, esse termo vem sendo cada vez mais investigado, sendo constituído por três unidades interagindo entre si: a planta, o solo e os microrganismos (Lynch, 1990). É uma área densamente colonizada por raízes que devem competir por água, espaço e nutrientes com as raízes de plantas vizinhas, além de ter de competir com os microrganismos presentes no solo (Ryan; Delhaize, 2001). Apresenta intensa atividade microbiana, decorrente da secreção de compostos denominados de exsudatos, pelas raízes, como íons, enzimas, mucilagem e diversos outros metabólitos (Bais et al., 2006). A composição da estrutura microbiana da rizosfera pode ser influenciada por inúmeros fatores, como a quantidade e o tipo de exsudatos radiculares, a espécie e a idade da planta, as condições do solo e as condições impostas pelo ambiente, sendo o efeito da planta altamente seletivo (Rovira, 1965; Marschner et al., 2004).

Microrganismos endofíticos

São considerados microrganismos endofíticos aqueles que habitam o interior das plantas, podendo estabelecer relações simbióticas, neutras ou antagonistas com os hospedeiros (Petrini; Fisher, 1988). Os microrganismos endofíticos podem colonizar o interior das plantas em alguma fase de seu ciclo de vida, sendo encontrados em diversos órgãos e tecidos vegetais, como folhas, ramos e raízes, aparentemente, sem causar dano à planta hospedeira. Os endofíticos, assim como os fitopatógenos, apresentam a capacidade de penetrar a planta e se disseminar sistematicamente, habitando ativamente o apoplasto do hospedeiro. Entretanto, algumas contribuições significativas

para a viabilidade do vegetal foram atribuídas a esses microrganismos, que podem atuar como agentes de biocontrole de fitopatógenos e de insetos, na proteção da planta contra herbívoros, na produção de fito-hormônios e, ainda, atuar como otimizadores de crescimento e enraizamento da planta hospedeira, assim como elevar sua resistência a estresses bióticos e abióticos (Azevedo et al., 2000; Hallmann et al., 1997). A comunidade endofítica exerce esses efeitos favoráveis na planta porque é capaz de produzir compostos químicos como enzimas, alcaloides, antibióticos e diferentes metabólitos, os quais favorecem a adaptação da planta em condições adversas. A síntese dessas substâncias é induzida por condições de estresse da planta hospedeira, como falta de água, presença de substâncias tóxicas ou ataque de patógenos ou insetos, que afetam a interação da planta com o meio ambiente.

A constatação de comunidades microbianas endofíticas em tecidos de plantas saudáveis tem sido relatada para a maioria das espécies vegetais cultivadas. Fungos e bactérias são os endofíticos mais comumente isolados, contudo, outros grupos microbianos, como arqueias, têm sido isolados mais recentemente (Ma et al., 2013). Os gêneros mais comumente isolados incluem alguns pertencentes ao filo Ascomycota e outros gêneros, como *Colletotrichum*, *Xylaria*, *Phomopsis*, *Fusarium*, *Pestalotiopsis*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Pseudomonas* e *Xantomonas* (Rodrigues et al., 2000; Zou et al., 2000; Jacobs et al., 1985; McInroy; Kloepper, 1995). O número de espécies de microrganismos endofíticos isolados de determinada planta está diretamente associado à parte do hospedeiro que é utilizada no isolamento. Diferenças nas flutuações populacionais de endofíticos têm sido associadas ao genótipo das plantas, às condições ambientais e a seus locais de origem.

ETAPAS DECISIVAS PARA A SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS COM POTENCIAL DE USO NA AGRICULTURA

Uma etapa crucial na exploração de linhagens superiores para uso no controle biológico e/ou promotores do crescimento de plantas é o *screening* de bons candidatos. O objetivo focal da busca deve guiar os métodos de seleção. Para o controle biológico de doenças de plantas, por exemplo, é fundamental o conhecimento acurado do patossistema a ser estudado. Entretanto, todas as fases de bioprospecção são igualmente importantes, desde as coletas, métodos de isolamento e de *screening*, até testes toxicológicos e de estabilidade genética e desenvolvimento de formulações apropriadas (Figura 16.2). Recentemente, a combinação de avanços em edição genômica, como o *clustered regularly interspaced short palindromic repeats* (CRISPR), engenharia metabólica e metabolômica conduz à descoberta de novos compostos e expressões fenotípicas de mecanismos para os mais diversos usos de táxons ainda não explorados (Cortes et al., 2021; Carrol; Zhou, 2017).

A bioprospecção de agentes de controle biológico costuma ser baseada na busca por microrganismos que apresentam alta produção de estruturas reprodutivas e/ou metabólitos secundários. Os fungos estão entre os principais agentes de controle biológico de patógenos e insetos-praga, amplamente estudados e, em alguns casos, comercialmente explorados como bioprodutos (Hyde, 2019; Jaber; Ownley, 2018). Outros táxons também são extensivamente estudados, como as bactérias, principalmente as do gênero *Bacillus* (Ongena; Jackes, 2008), e as actinobactérias, que são reconhecidas por seu amplo espectro de produção de metabólitos secundários (Jose et al., 2021).

Antagonistas com potencial para controle de doenças foliares ou que ocorrem em pós-colheita podem ser obtidos do próprio habitat onde se pretende aplicá-los, já que esses organismos podem apresentar vantagens competitivas. As leveduras constituem bons antagonistas para doenças pós-colheita, pois apresentam inúmeros mecanismos de ação, incluindo competição por espaço e por nutrientes, liberação de enzimas hidrolíticas que favorecem a lise de fungos fitopatogênicos e formação rápida de biofilmes (Wisniewski et al., 2007). Além desses atributos, as leveduras são organismos extremamente tolerantes aos estresses abióticos prevalentes na filosfera. Do mesmo modo, para doenças radiculares e doenças vasculares, uma boa estratégia de busca pode ser a partir de solos supressivos, caso esse fenômeno ocorra em áreas próximas e/ou adjacentes onde ocorrem as doenças. Geralmente, quando a doença se estabelece, causa baixo dano e com tendência de redução dessa incidência a cada ciclo de cultivo mesmo na presença do patógeno, hospedeiro suscetível e ambiente favorável (Schlatter et al., 2017). As doenças vasculares causadas por fungos dos gêneros *Verticillium* e *Fusarium*, por exemplo, são de difícil controle, já que suas estruturas de dormência permanecem viáveis por longos períodos no solo. Uma vez que tenham infectado os tecidos vasculares, a planta inicia o processo de murcha e, portanto, o controle é bastante difícil. Nesse caso, o controle deve ser voltado à redução das fontes de inóculo presente no solo, sendo uma estratégia promissora que os antagonistas atuem por antibiose e micoparasitismo e que colonizem os micro-habitats de infecções do patógeno, ao tempo que podem, adicionalmente, proteger a planta por aumentar a resistência induzida. Alguns fungos e bactérias antagonistas têm sido aplicados com sucesso visando ao controle das murchas de *Verticillium* e *Fusarium*. Bactérias dos gêneros *Bacillus* e *Streptomyces* são agentes de controle de fitopatógenos pela produção de uma variedade de moléculas bioativas antagonônicas e pela capacidade de produzir esporos que permitem a adaptação a diversos ambientes, aumentando a probabilidade de seus estabelecimentos nos solos supressivos (Nwokolo et al., 2021).

Não existem protocolos-padrão para bioprospectar linhagens superiores a partir da biodiversidade, mas os testes iniciais de triagem são considerados cruciais para obtenção de inoculantes eficazes em condições de campo. É importante obter o máximo de informações possíveis sobre as coletas, como latitude, longitude e altitude, e

relacionar dados sobre o clima e análises físico-químicas do solo. Se as coletas forem realizadas em campos agrícolas, é preciso relacionar as práticas agrícolas adotadas, como fertilizantes e agrotóxicos.

Para isolamento de microrganismos, é essencial recuperar novos gêneros/espécies adotando certos procedimentos para maximizar a diversidade daqueles organismos raros ainda não cultiváveis. Alguns procedimentos de isolamento têm apresentado sucesso em isolar tais organismos, incluindo, por exemplo, baixas concentrações de nutrientes, moléculas sinalizadoras ou inibidores de organismos não desejáveis (Stevenson et al., 2004). Adicionalmente, aconselha-se estender a incubação por longos períodos, às vezes por até meses, para isolamento de bactérias oligotróficas.

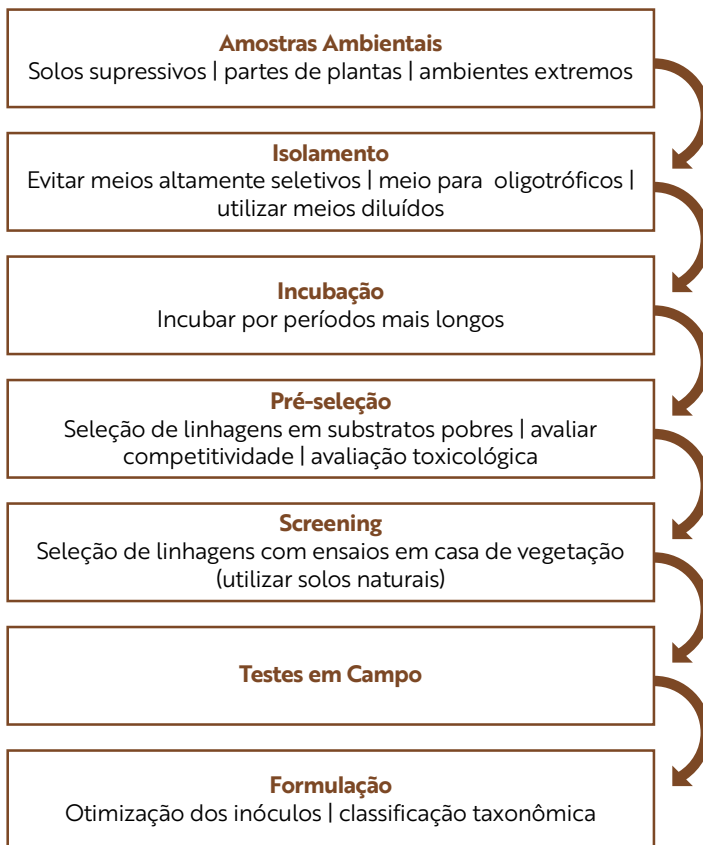


Figura 16.2. Etapas cruciais envolvidas na busca de agentes de controle biológico a partir de amostras ambientais.

O princípio básico para isolamento é proceder à simulação do ambiente natural daqueles organismos a serem estudados, no sentido de estimular o crescimento. A maioria dos meios-padrão de cultivo geralmente utilizados, são extremamente ricos em nutrientes e, assim, estimulam o crescimento de microrganismos de rápido crescimento. Tem-se verificado que muitas bactérias de amostras ambientais têm sido isoladas em meios diluídos. Uma estratégia interessante é proceder à autoclavagem do ágar separadamente do fosfato que compõe o meio de cultivo. Durante a autoclavagem, produtos do ágar reagem com o fosfato produzindo peróxido de hidrogênio, que inibe o crescimento de bactérias que não produzem catalase (Tanaka et al., 2014).

Outra estratégia para maximizar o isolamento de novas espécies é suprir os meios de cultivo com cofatores e fatores de crescimento. Alguns microrganismos requerem, para seu crescimento e desenvolvimento, nutrientes específicos que estão presentes em seus ambientes naturais como cofatores. Desse modo, bactérias previamente não cultiváveis foram isoladas de solos e água (Stewart, 2012). Outro procedimento que tem sido empregado com sucesso é o cocultivo com outras bactérias. Em ambiente naturais, os microrganismos não existem isoladamente, e muitos destes, que ainda não têm sido cultivados em laboratório, devem ser isolados e cultivados em conjunto com outros microrganismos, porque alguns microrganismos dependem de substâncias produzidas por outros microrganismos para seu crescimento.

Uma técnica mais inovadora de isolamento que tem sido utilizada com bastante sucesso é o cultivo de alto rendimento, que emprega microcápsulas de agarose para encapsular células individualizadas diretamente de amostras ambientais. A técnica consiste em transferir as microcápsulas para colunas de minifermentadores para crescimento e desenvolvimento de microcolônias. A coluna do fermentador é, então, suprida com o meio de cultura que contém concentrações de nutrientes similares àqueles encontrados no ambiente do qual as células foram coletadas. Geralmente, essa técnica favorece o crescimento de espécies de crescimento lento. A técnica tem sido muito utilizada para cultivo de microrganismos produtores de substâncias bioativas (Keller; Zengler, 2004).

Se, por um lado, o controle biológico de doenças e insetos-praga tem extensa variedade de estudos, com resultados conhecidos e, em alguns casos, até mesmo bioprodutos comercializados, o desenvolvimento de bio-herbicidas ainda apresenta muitos desafios para ser inserido como estratégia de manejo integrado de plantas daninhas nos sistemas de produção. Embora existam várias pesquisas na literatura científica para diferentes plantas-alvo, poucos bio-herbicidas foram registrados e estão comercialmente em uso na agricultura mundial, em função de vários obstáculos para seu desenvolvimento (Westwood et al., 2018; Morin, 2020). A seleção de potenciais mico-herbicidas é feita pela identificação de microrganismos associados à planta-alvo em condições naturais, isolamento e cultivo em meio seletivo, determinação de condições favoráveis ao desenvolvimento da doença e posterior desenvolvimento de uma formulação.

Na Embrapa Meio Ambiente, as cordas de viola (*Ipomoea* spp.) vêm sendo investigadas como plantas-alvo para estudos de controle biológico com o uso de fungos fitopatogênicos. Essas espécies são importantes invasoras em áreas de cana crua, uma vez que apresentam capacidade de germinar sob a camada de palha que se forma em áreas de cana-de-açúcar manejadas sem queima (Correia; Kronka, 2010). Em levantamento da microbiota associada às cordas de viola, Nechet et al. (2019) identificaram 17 associações de fungos restritas aos gêneros *Bipolaris*, *Colletotrichum* e *Cercospora*, causando manchas foliares e *Alternaria*, causando amarelecimento e queima foliar. A patogenicidade dos isolados foi verificada em *Ipomoea hederifolia*, *I. nil*, *I. quamoclit* e *I. grandifolia*, e um isolado de *Cercospora* aff. *canescens* (CMAA 1444) foi selecionado por causar mancha foliar (cercosporiose), seguido de desfolha em *I. hederifolia*, *I. nil* e *I. grandifolia*.

As condições necessárias para o desenvolvimento da cercosporiose foram identificadas e uma suspensão de 2×10^7 conídios.mL⁻¹ nos estádios fenológicos de 3-5 folhas, flores abertas e plantas com frutos, e um período de molhamento foliar de 24 horas induzem maior incidência da doença e posterior desfolha em *I. Nil*. Nas outras espécies, embora tenha ocorrido incidência da doença, a desfolha não foi a mesma, e é necessária a continuidade dos estudos explorando outros aspectos, como o uso de adjuvantes e a tecnologia de aplicação (Nechet; Halfeld-Vieira, 2019).

Complementar ao uso direto do patógeno, a equipe da Embrapa Meio Ambiente visa, também, à identificação de metabólitos secundários no processo otimizado, os quais podem aumentar a infectividade do inóculo produzido e, também, resultar na obtenção de produtos naturais de ação herbicida que podem ser utilizados diretamente no controle das plantas. O gênero *Cercospora* é conhecido pela produção da fitotoxina cercosporina, do grupo químico perylenequinonas, que desempenha papel fundamental no processo de infecção do patógeno em plantas (Daub, 1982). As fitotoxinas são determinantes em algumas interações patógeno e hospedeiro e podem ser específicas ao hospedeiro, como a AAL-toxin de *Alternaria alternate*, ou não específicas, como as produzidas pelo gênero *Fusarium* (Bo Bo et al., 2020).

A demanda por métodos alternativos aos herbicidas químicos aumenta a cada ano com o aparecimento de biótipos resistentes e de difícil controle nos sistemas convencionais e com o aumento de cultivos agroecológicos e orgânicos que não têm opção de controle de plantas daninhas.

Identificação de microrganismos selecionados

Atualmente, a identificação de microrganismos segue um padrão mais completo de métodos de análises que permitem assegurar com maior precisão a identidade do organismo. O gene 16S rRNA, por exemplo, tem sido considerado o mais fiel para medir as relações evolucionárias de bactérias e de arqueias. Assim, ao classi-

ficar um novo táxon, é essencial descrever com precisão as informações fenotípicas, genotípicas e filogenéticas. Essas informações constituem o que se chama de abordagem polifásica da taxonomia, que envolve os seguintes métodos de análises: i) métodos fenotípicos (taxonomia numérica, composição de parede, análises de ácidos graxos, análises de proteínas, caracterização de colônias, estudos fisiológicos e bioquímicos); e ii) métodos genotípicos [16S rRNA, conteúdo de bases (%G + C), hibridização DNA-DNA, RFLP, ribotipagem e análises de genomas]. Os genes rRNA são os melhores alvos para os estudos filogenéticos, pois apresentam um mosaico de domínios variáveis e altamente conservados. O sequenciamento direto de genes que codificam para pequenas (16S rRNA) e grandes (23S rRNA) moléculas por PCR tem fornecido as bases da filogenia. Na prática, é muito difícil descrever uma espécie de procarioto sem sequenciar o gene 16S rRNA. A porcentagem de hibridização DNA-DNA é um parâmetro indireto da similaridade das sequências entre dois genomas, sendo um dos métodos primordiais para o delineamento de espécies. Por sua vez, as informações filogenéticas são obtidas a partir dos estudos das sequências dos genes 16S rRNA ou 23S rRNA no caso de bactérias e, 18S rRNA no caso de fungos. Já a quimiotaxonomia, por exemplo, é uma ferramenta essencial que vem sendo utilizada na classificação de bactérias. Está relacionada à distribuição de substâncias químicas específicas da célula, tais como aminoácidos, açúcares, lipídeos polares, menaquinonas, ácidos graxos etc. Para alguns gêneros de actinobactérias, por exemplo, a análise da composição de ácido micólico é especialmente necessária.

A composição em bases nucleotídicas, expressa pela porcentagem molar do conteúdo em guanina e citosina [%mol (G+C)], é uma das características requeridas para descrever espécies ou gêneros de microrganismos procarióticos. Quanto maior for o conteúdo em (G+C), maior a quantidade de energia térmica requerida para separar as duas cadeias de DNA. O conteúdo em %mol de (G+C) pode variar entre 24 e 86%, dependendo do grupo de microrganismos (Madigan et al., 2015). Normalmente, o conteúdo em %mol de (G+C) de estirpes que constituem uma espécie filogeneticamente coerente não difere mais de 3%, podendo apresentar maior variação entre diferentes espécies de um gênero.

Além desses métodos, tem-se introduzido na classificação de novas espécies a análise genômica, incluindo de multilocos. Entretanto, diversos comitês de taxonomia microbiana vêm recomendando a inclusão da análise genômica para classificação e caracterização de novos microrganismos, sendo essa estratégia nomeada taxono-genomics (Ramamamy et al., 2014). Os principais métodos que utilizam o genoma na afiliação taxonômica são a análise de multilocos, a análise comparativa entre os genomas totais, avaliando a frequência de tetra-nucleotídeos, e a identidade média dos nucleotídeos (*average nucleotide identity* – ANI) (Ramamamy et al., 2014).

EXTREMÓFILOS COMO FONTE DE BIOPROSPECÇÃO

Certas características multifuncionais dos microrganismos extremófilos, comumente raras, tornam esses organismos excelentes fontes para descoberta de novos produtos com aplicações em diversas áreas, incluindo agricultura, meio ambiente, medicina, farmacologia e indústria. Extremófilos são microrganismos que habitam condições extremas do planeta, tais como pH (acidófilos, alcalinófilos), temperatura (psicrófilos, termófilos), radiação (tolerância à radiação), salinidade (halófilos), pressão (piezófilos). Microrganismos extremófilos benéficos são também utilizados na indústria de processamento de alimentos, já que produzem uma variedade de compostos bioativos, metabólitos secundários, vitaminas e corantes (Barcelos et al., 2020). Por exemplo, *Streptomyces thermonitrificans*, *Streptococcus* sp. NTU-130 e *Aspergillus fumigatus*, isolados de composto, foram utilizados na produção de biofertilizantes que contribuíram para aumento da qualidade do produto usado na agricultura (Chen et al., 2007). Nessa mesma linha de investigação, Chang e Yang (2009) reportaram o desenvolvimento de um biofertilizante à base de um consórcio de microrganismos termotolerantes envolvidos na solubilização de fosfato. Os microrganismos que compunham esse biofertilizante produziram diversas enzimas, incluindo lipase, celulase, amilase, quitinase, pectinase, protease e nitrogenase, que contribuíram para melhorar a qualidade do biofertilizante.

Há inúmeros relatos de aplicações desses organismos na agricultura, e um grupo de pesquisa da Embrapa vem, há anos, monitorando a biodiversidade de bactérias e fungos e prospectando novas espécies microbianas isoladas de ambientes extremos para aplicações biotecnológicas. Diversos trabalhos – possivelmente, as primeiras pesquisas no Brasil – envolvendo bactérias halófilas de manguezais foram realizados na Embrapa Meio Ambiente em conjunto com outras instituições, como USP, Unicamp, Cena/USP e Instituto Butantan, por meio do projeto temático financiado pela Fapesp para acessar a biodiversidade dos manguezais do estado de São Paulo. Florestas de mangue são ecossistemas tropicais e subtropicais situados em zonas costeiras e, portanto, ambientes salinos, onde plantas e microrganismos são tolerantes à alta salinidade. Alguns gêneros, como a *Avicenia*, excretam o excesso de sal via glândulas da folha (Figura 16.3).



Figura 16.3. Eletromicrografia de varredura da superfície foliar do mangue *Avicennia* exsudando cristais de sais.

Novos gêneros/espécies de bactérias, incluindo cianobactérias de manguezais, que foram descritas nesse projeto contribuíram para os estudos da biodiversidade desse importante ecossistema. Entre os novos gêneros de cianobactérias descobertos estão *Phyllonema avicenniicola* gen. nov., sp. nov. e *Foliisarcina bertiogensis* gen. nov., sp. nov. (Alvarenga et al., 2016), além de uma nova espécie bacteriana, *Pseudomonas aestus* sp. nov. (Vasconcellos et al., 2017). Essa nova espécie bacteriana halotolerante, *Pseudomonas aestus* sp. nov., isolada de manguezais, mostrou-se potente solubilizadora de fosfato, capaz de promover o crescimento de plantas (Vasconcellos et al., 2017, 2021). Castro et al. (2018) isolaram 115 bactérias endofíticas associadas aos mangues, *Rhizophora mangle*, *Laguncularia racemosa* e *Avicennia nitida*, envolvidas na síntese de ácido

indol acético. Uma dessas linhagens, *Enterobacter* sp., MCR1.48, foi capaz de aumentar a biomassa da parte aérea da árvore *Acacia polyphylla* e efetivamente promover o crescimento. Aqui, percebe-se o grande potencial de microrganismos endofíticos de manguezais que podem ter aplicações na agricultura. Microrganismos endofíticos também podem ter outras aplicações industriais, por produzirem enzimas, proteínas, antibióticos, corantes e biosurfactantes. Foi com esse interesse que Castro et al. (2014) isolaram bactérias endofíticas das plantas, *Avicenia nitida* e *Rhizophora mangle*, capazes de produzir protease, endoglucanase, amilase e esterase. *Bacillus* compreendeu 42% de todas as bactérias isoladas, que, por sua vez, constituíram o gênero com maior potencial de produção de amilase, esterase e endoglucanase. O trabalho de Castro et al. (2014) vem contribuir para uma melhor compreensão da comunidade endofítica dos manguezais brasileiros, bem como para prospectar novas espécies com potencial biotecnológico.

Florestas de mangue são adaptadas a esse ambiente hostil e, provavelmente, isso limita o desenvolvimento de muitas espécies de plantas vasculares presentes no ambiente terrestre circunvizinho. Ademais, é possível que tanto manguezais como a microbiota associada atuem na inibição de muitos outros organismos, por produzirem substâncias bioativas.

Os microrganismos, assim como as plantas, também são capazes de sobreviver a várias condições de estresses abióticos, como estresses hídricos. Nesses casos, a tolerância deve-se à formação de biofilme, exopolissacarídeos, osmólitos intracelulares, entre outros (Chaves et al., 2002; Monier; Lindow, 2004). Os exopolissacarídeos (EPS) são produzidos por uma grande variedade de microrganismos, acumulando-se na superfície das células (Coronado et al., 1996), e seu uso vem sendo associado a um mecanismo de adaptação a uma grande variedade de condições estressantes ambientais, como solos salinos, variações de temperatura e estresse hídrico. A produção de EPS pelos microrganismos pode auxiliar na sobrevivência da planta a determinados tipos de estresse ambientais, quando inoculadas com microrganismos de interesse. Ashraf et al. (2004), ao inocular plântulas de trigo com bactérias capazes de produzir EPS, observaram uma redução na absorção de sódio, aliviando o estresse salino e, ainda, promovendo o crescimento da planta.

Há poucos estudos relacionando os microrganismos existentes em locais áridos e semiáridos, assim como microrganismos associados a plantas desses ambientes, mas vem crescendo o interesse por esse tema nos últimos anos. Nosso grupo de pesquisa vem desenvolvendo projetos voltados ao desenvolvimento de inoculantes bacterianos para uso agrícola, bem como a descoberta de substâncias bioativas a partir de microrganismos extremofílicos da Caatinga. Estresses abióticos, como as secas, normalmente são os principais fatores responsáveis por reduzir significativamente rendimentos de grandes culturas agrícolas no mundo. Uma estratégia bastante promissora, prática

e rápida para mitigação dos efeitos da seca é o uso de bactérias simbióticas ou fungos osmotolerantes obtidos de regiões áridas e semiáridas. Recentemente, nosso grupo isolou rizobactérias associadas a diversas cactáceas do bioma Caatinga, que apresentaram o diferencial de promover o crescimento de plantas de milho em condições de seca (Kavamura et al. 2013a). Em especial, uma bactéria, identificada como *Bacillus aryabhatai*, ainda foi capaz de promover o crescimento de outras plantas em déficit hídrico (Figura 16.4) e apresentar características interessantes para desenvolvimento de um bioproduto, dado o caráter de tolerância à seca e outras características igualmente importantes, como síntese de osmólitos compatíveis. Esforços também têm sido empregados por nossa equipe para compreender a dinâmica da comunidade microbiana em solo e rizosfera de mandacaru (*Cereus jamacaru*) (Kavamura et al., 2013b). Uma abordagem importante que pode suscitar a recuperação de áreas em processos de desertificação seria o replantio dessas áreas com plantas endêmicas tolerantes aos estresses abióticos, como as cactáceas, associadas a microrganismos osmotolerantes. Plantas assim inoculadas podem garantir maior índice de pegamento de mudas em solos degradados. Costa e Melo (2012) isolaram de palma (*Opuntia ficus-indica*) bactérias capazes de promover o crescimento de feijão-caupi. Essas bactérias, quando inoculadas em plantas de palma axênicas e plantadas em solos com baixa atividade de água, melhoraram o índice de pegamento das plântulas.

Foto: Tamar Melo



Figura 16.4. Plantas de soja inoculadas (à direita) com uma bactéria osmotolerante e não inoculadas (à esquerda), crescidas com reduzida atividade de água.

BIOPROSPECÇÃO DE SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS

Os microrganismos produzem valiosas substâncias químicas que são extensivamente utilizadas, há anos, na agricultura e na pecuária. A versatilidade metabólica desses organismos oferece oportunidade para prospecção de substâncias com atividade fungicida, bactericida, herbicida, inseticida, algicida, nematocida, antiparasitária e anti-oomiceto (Cantrell et al., 2012). Ainda mais importante, muitos desses metabólitos são responsáveis por novos mecanismos de ação, limitando questões de resistência aos químicos utilizados. Entre diversos exemplos de sucesso, destacam-se bialafos, avermectina e espinosina, produzidos por bactérias pertencentes aos gêneros *Streptomyces* e *Saccharopolyspora* (Yan et al., 2018). A Figura 16.5 ilustra as estruturas desses compostos. O bialafos, também conhecido como glufosinato, quando metabolizado pela planta, inibe a glutamina sintetase e tem sido empregado como um herbicida pós-emergência não seletivo, cuja ação biológica inspirou a síntese do glifosato (Saxena; Pandey, 2001). As espinosinas e suas modificações semissintéticas são os principais ingredientes ativos de muitos inseticidas comerciais, incluindo Spinosad e Spinetoram, que, efetivamente, podem eliminar pragas agrícolas por meio da hiperexcitação do sistema nervoso (Thompson et al., 2000). Por sua vez, na década de 1970, a avermectina revolucionou a área de medicina veterinária, graças a sua potente bioatividade contra ectoparasitas e endoparasitas (Jansson; Dybas, 1998). Desse modo, em 2015, o prêmio Nobel de Medicina foi entregue aos cientistas responsáveis pela descoberta desse importante antiparasítico (Callaway; Cyranoski, 2015).

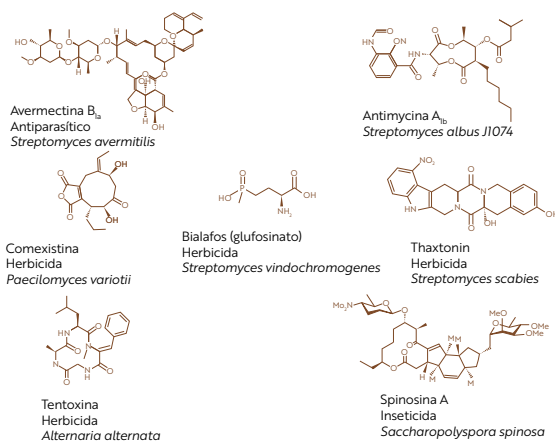


Figura 16.5. Estruturas químicas de produtos naturais microbianos que são utilizados como pesticidas. As bioatividades e fontes produtoras estão destacadas nas respectivas figuras.

Apesar de diversas descobertas que resumem décadas de ouro na prospecção de metabólitos microbianos, um recente declínio na taxa de descoberta de novos produtos naturais tem sido reportado (Jones et al., 2017). Contudo, a grande diversidade química sintetizada por microrganismos inspira o contínuo desenvolvimento de produtos comerciais (Shen, 2015). Novas substâncias naturais são descobertas quando novas estratégias de seleção são apresentadas ou quando novas fontes de diversidade são examinadas em bioensaios existentes. Assim, é importante reforçar esses dois aspectos de novidades em programas de bioprospecção (Cragg; Newman, 2013). À luz do atual conhecimento, a estratégia de bioprospecção tem sido apoiada em quatro pilares: A) isolamento microbiano seletivo; B) ensaios biológicos amplos e sensíveis; C) maximização das condições de cultivo; e D) combinações de estratégias químicas para seleção de compostos. A Figura 16.6 ilustra as etapas de um programa de descoberta de produtos naturais microbianos para uso na agricultura.

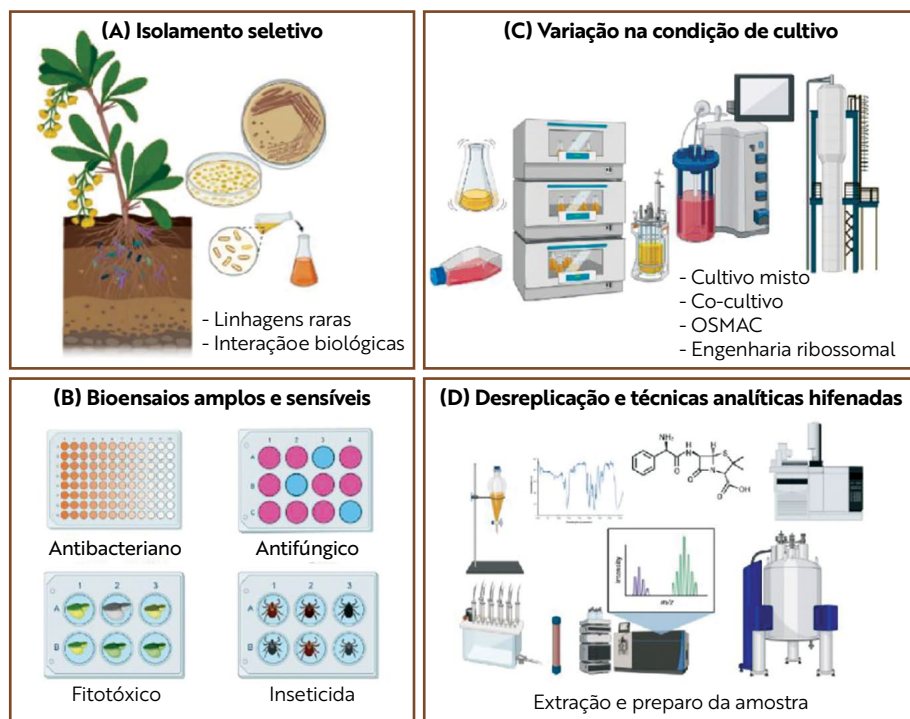


Figura 16.6. Estratégia para contínua prospecção de metabólitos secundários microbianos. (A) Busca baseada em observações ecofisiológicas e grupos microbianos raros; (B) painel de células para bioensaios e triagem de alto desempenho; (C) maximização das condições de cultivo para ativar genes e ampliar a diversidade de compostos; (D) extração, preparo da amostra e técnicas analíticas hífenadas para desrepliação de extratos microbianos.

A avaliação dos recursos microbianos preservados em coleções de culturas é de suma importância para descoberta de potenciais bioatividades. Entretanto, os programas de descobertas baseados na busca de moléculas inéditas têm alcançado maior sucesso ao selecionar linhagens raras prospectadas de nichos auspiciosos e poucos explorados (Strobel et al., 2004). Tais trabalhos utilizam a estratégia baseada na busca por novos gêneros e espécies que, supostamente, evoluíram para sintetizar vias metabólicas únicas (Challinor; Bode, 2015). Salinosporamida, cianosporasida, halomadurones, nocardiamida, actinosporina e paulomicina são exemplos de moléculas inéditas identificadas em estudos de metabolômica de novas espécies microbianas (Subramani; Sipkema, 2019).

Novos produtos naturais foram identificados a partir de uma variedade de habitats, incluindo microbiomas relacionados às plantas, microbiomas de habitats extremos e aqueles associados aos animais marinhos (Souza, 2016; Cragg; Newman, 2013; Strobel et al., 2004). Esforços têm sido conduzidos na Embrapa Meio Ambiente, em Jaguariúna, SP, para isolar bactérias e fungos de habitats extremos; a exemplo do que fizeram Silva et al. (2018, 2020) e Melo et al. (2016) que isolaram e identificaram compostos bioativos de bactérias da rizosfera de uma das duas únicas plantas que sobrevivem na Antártica, *Deschampsia antarctica* (Figura 16.7).



Fonte: Itamar Melo

Figura 16.7. *Deschampsia antarctica*, gramínea endêmica da Península Antártica em pleno crescimento durante o verão; planta hospedeira de uma grande diversidade de actinobactérias de onde se isolaram substâncias anticancerígenas (Silva et al., 2020).

Além disso, fungos endofíticos, isolados do musgo *Schistidium antarctici*, encontrado na Antártica, produziram substâncias antioxidantes e antibacterianas, principalmente contra bactérias patogênicas aos humanos. Particularmente, *Mortierella alpina* produz, além desses compostos, ômega 3, tendo os ácidos linolênico e araquidônico como os principais ácidos graxos majoritários (Melo et al., 2014). Os fungos endofíticos têm atraído atenção nos últimos anos, mas pouquíssimos foram isolados de musgos. Em ecossistemas como a Antártica, a distribuição de microrganismos é direcionada à localização dos diferentes hospedeiros, como as aves, as populações de invertebrados e a vegetação, as quais são verdadeiras minas para a prospecção (Silva et al., 2018).

Microrganismos endofíticos, associados às plantas de ambientes extremos, são recursos valiosos para a descoberta de novas substâncias bioativas. Geralmente, esses organismos evoluíram no sentido de sintetizar novos compostos, normalmente raros, que asseguram a sobrevivência em condições extremas. Em regiões áridas do globo, microrganismos simbióticos exercem papel crucial na sobrevivência e na manutenção de plantas e animais. Visando prospectar fungos endofíticos de plantas medicinais de regiões semiáridas envolvidos na produção de substâncias anticancerígenas e antifúngicas, Santos et al. (2012) identificaram potentes fungos endofíticos da espécie medicinal, nativa da Caatinga, *Combretum leprosum*. Extratos puros do endófito *Aspergillus oryzae* CFE 108 exibiram forte atividade citotóxica contra sarcoma J775, leucemia, carcinoma ECV304 e câncer cervical. Nesse contexto, vale destacar que *C. leprosum* é uma planta muito utilizada na região como anti-inflamatório, sedativo, inseticida e herbicida. Esses resultados mostram a importância de prospectar novas substâncias bioativas a partir de endófitos associados às plantas medicinais.

A estratégia de maior sucesso para a prospecção de metabólitos está relacionada à seleção de microrganismos que vivem em associação biológica com seus hospedeiros. Muitos produtos naturais têm coevoluído com seus alvos moleculares, apresentando potentes bioatividade e seletividade, cujos produtores utilizam para restringir o crescimento de competidores (Yan et al., 2018). Nesse sentido, o efeito alelopático tem ganhado cada vez mais atenção para prospecção de metabólitos de interesse agrícola (Saxena; Pandey, 2001). A alelopatia tem sido definida como qualquer processo envolvendo metabólitos secundários produzidos por plantas, algas, bactérias e fungos que influenciam o crescimento e o desenvolvimento de sistemas biológicos e agrícolas (Khalid et al., 2002). Apoiados por tais conceito e estratégia, pesquisadores têm buscado desenvolver novos bio-herbicidas à base de aleloquímicos, produtos considerados de alto valor e que ainda não existem no mercado agrícola brasileiro. Assim, Souza et al. (2017) estudaram a diversidade de microrganismos associados às esponjas marinhas do arquipélago de São Pedro e São Paulo que culminaram no isolamento e identificação das substâncias, butenolida, dicetopiperazinas,

acremomidinas e acremoxantonas, que apresentaram atividade fitotóxica (Silva, 2015), anti-oomiceto (Souza, 2016) e antibacteriana (Martins et al., 2021). Similarmente, Hoyos (2018), ao investigar linhagens de Actinobacteria isoladas de ecossistemas de manguezais, Cerrado e Caatinga, detectou ação antagonica contra o patógeno de plantas *Sclerotinia sclerotiorum*, e os metabólitos majoritários foram identificados como pertencentes à família das bafilomicinas. Anteriormente, em estudos do mesmo grupo de pesquisa, Crevelin et al. (2013) reportaram pela primeira vez a fitotoxicidade de bafilomicinas produzidas por *Streptomyces* sp. contra a microalga *Chlorella vulgaris*.

Atualmente, além de avançar na busca por novas fontes de diversidade microbiana em nichos pouco explorados, as pesquisas voltadas à identificação de moléculas inéditas têm sido dirigidas para “despertar” genes silenciados no genoma. Dados do genoma de bactérias e fungos revelam que o potencial genético para sintetizar novos produtos naturais é imensurável (Baltz, 2019). Muitos genes e seus produtos, entretanto, permanecem silenciados no genoma em condições de cultivo, sem, portanto, serem explorados para a indústria agrícola. Algumas técnicas baseadas no cultivo microbiano têm sido implementadas, tais como cultivo misto, cocultivo, alterações nas condições físico-químicas de cultivo (uma linhagem muitos compostos, do inglês one strain many compounds – OSMAC) e introdução de mutações ribossomais em uma tentativa de expressar genes crípticos (Ochi, 2007; Romano et al., 2018; Liu; Kakeya, 2020). Com essa estratégia, novos compostos têm sido elucidados, e muitos deles se tornaram protótipos para o desenvolvimento de importantes fármacos (Liu et al., 2021).

Com relação às estratégias de seleção de compostos, a prospecção guiada pela bioatividade tem sido o método mais empregado. Embora essa abordagem tenha rendido a identificação de novas estruturas químicas, ela falha ao analisar apenas uma parte do potencial químico de um extrato biológico (Ito; Masubuchi, 2014). Para superar essa falha, pesquisadores têm utilizado um painel de células e bioensaios cada vez mais extensos. Como consequência, antibióticos pertencentes às mais diversas classes químicas têm sido descobertos (Subramani; Sipkema, 2019). Entretanto, essa técnica demanda muita mão de obra para realização dos bioensaios e processos de purificação e análise química. Com o auxílio de métodos combinados de análise química associados a um sistema robotizado, robusto e com alta sensibilidade, tal como a estratégia de triagem de alto desempenho (*high-throughput screening* – HTS), novas substâncias bioativas de interesse agrícola devem ser descobertas em um menor prazo. Também, inovações em estratégias de desreplicação de extratos microbianos e o uso de tecnologias analíticas emergentes podem eliminar a redescoberta de metabólitos já conhecidos, ampliando as possibilidades para a elucidação de moléculas inéditas (Ito; Masubuchi, 2014).

BIOPROSPECÇÃO BASEADA NO GENOMA

Como mencionado anteriormente, a taxa de descoberta de novos produtos bioativos tem sofrido uma redução nas duas últimas décadas, sobretudo em função dos frequentes isolamentos dos mesmos compostos outrora já elucidados, bem como do isolamento das mesmas espécies/gêneros de microrganismos já identificadas. No entanto, com os avanços das pesquisas sobre sequenciamentos de genomas, os pesquisadores voltaram-se novamente às buscas de novos metabólitos secundários.

O genoma é o conjunto de genes de um organismo. Sua organização é diferenciada entre procariotos e eucariotos. Em procariotos, o genoma, na maioria das espécies, apresenta-se em forma circular (são poucos os procariotes que têm genoma linear), com apenas um cromossomo, e encontra-se livre no citoplasma. Já os eucariotos apresentam o genoma linear com múltiplos cromossomos envoltos pela membrana nuclear formando o núcleo (Madigan et al., 2015). A bioprospecção baseada no genoma tem oferecido uma significativa contribuição à descoberta de novas substâncias bioativas. Essa prospecção, mais conhecida como mineração, envolve a identificação de clusters gênicos biossintéticos previamente não caracterizados no genoma daquele organismo sequenciado, análise das sequências de substâncias que codificam para esses clusters e identificação dos produtos dos clusters gênicos (Trivella; Felicio, 2018).

Para a análise inicial de um genoma, é necessário realizar sua extração e, em seguida, seu sequenciamento. As plataformas Illumina e Ion Torrent conseguem gerar milhares de dados de sequenciamento genético com tamanho de fragmentos geralmente menores que outros analisadores. As plataformas PacBio e MinION, por exemplo, são capazes de gerar dados de DNA em longos fragmentos (Madigan et al., 2015), situação que é ideal para análise de genomas, sobretudo para a estratégia de mineração de agrupamentos de genes biossintéticos.

Assim, à medida que os genomas de muitas espécies têm sido sequenciados, vêm aumentando as chances de descobrir novas substâncias bioativas de importância biotecnológica, pois se têm identificado novos clusters gênicos que codificam a biossíntese de produtos naturais. Os genomas microbianos contêm múltiplos clusters para a biossíntese de compostos raros, e a maioria dos genes permanecem silenciados, evitando, dessa maneira, que as respectivas substâncias sejam descobertas. Em geral, esses genes não são expressos em condições de laboratório. O sequenciamento do genoma de *Streptomyces coelicolor* A3(2) (Bentley et al., 2002), há duas décadas, por exemplo, revelou o grande potencial dessa espécie em sintetizar uma série de compostos ainda não detectados pelos métodos de cultivo tradicionais. Outra espécie que teve seu genoma sequenciado e que, a partir das análises, teve novos metabólitos secundários descobertos foi *S. avermetillis*. Demonstrou-se que essas duas espécies têm no mínimo 20 clusters gênicos biossintéticos cada uma, e a maioria deles não estão ligados

aos compostos outrora já descobertos nas últimas duas décadas. Exemplos de novos compostos bioativos acessados por abordagem genômica incluem estambomicina, produzida por *S. ambofaciens* com atividade citotóxica (Laureti et al., 2011); orfamida, um lipopeptídeo cíclico produzido por *Pseudomonas fluorescens* (Gross et al., 2007); o sideróforo coelichelina de *S. coelicolor* (Challis; Ravel, 2000); e o peptídeo catenulipeptina de *Catenulispora acidiphila* (Wang; van der Donk, 2012). A abordagem computacional para efetiva predição de agrupamentos gênicos e consequente expressão heteróloga tem provado ser uma técnica robusta para explorar novas substâncias químicas que são de grande interesse para a humanidade. Essas novas estruturas químicas têm o potencial de inspirar o contínuo desenvolvimento de novas drogas, por exemplo, em uma posterior estratégia química combinatória. Também, na era genômica, técnicas de biologia sintética, associadas às ferramentas de bioinformática e inteligência artificial, devem acelerar a anotação de genes, a predição da estrutura do produto natural e a descoberta de efetivas novas drogas para uso na agricultura (Prihoda et al., 2021).

METAGENÔMICA FUNCIONAL COMO FONTE DE BIOPROSPECÇÃO

Os microrganismos isolados do solo pertencem, principalmente, aos filos Proteobacteria, Actinobacteria, Firmicutes e Bacteroidetes, visto que são grupos facilmente recuperados a partir de métodos tradicionais de cultivo. No entanto, uma imagem mais completa do mundo microbiano pôde ser obtida com o advento de ferramentas moleculares, revelando uma grande diversidade biológica ainda desconhecida e inexplorada (Handelsman et al., 2004). O acesso a essa maquinaria biossintética oculta abre possibilidade para novas descobertas e aplicações biotecnológicas. Nessa perspectiva, a metagenômica, ferramenta que permite a análise genômica das comunidades microbianas de determinado nicho ecológico sem necessidade de cultivar espécies individuais (Handelsman et al., 1998), surge como uma poderosa ferramenta de prospecção. Com essa técnica, é possível caracterizar comunidades bacterianas complexas em seus ambientes naturais, além de descobrir novos genes e compostos bioativos a partir da microbiota ainda não cultivável (Lacerda Júnior et al., 2017, 2019; Ofaim et al., 2017; Prayogo, et al., 2020).

A metagenômica funcional envolve isolamento do DNA de uma amostra ambiental, construção da biblioteca de clones (fragmentos de DNA recombinante) e triagem para determinada função de interesse por meio da expressão heteróloga por hospedeiro de fácil cultivo (Figura 16.8). Em geral, a triagem de bibliotecas metagenômicas baseia-se na atividade biológica (abordagem orientada por função) ou na sequência de nucleotídeos (abordagem orientada por sequência de DNA). Na triagem baseada na função, os clones metagenômicos são cultivados em meios suplementados com

substratos específicos e corantes (cromóforos) indicadores, sendo a conversão catalítica revelada pela formação de um halo claro ou colorido em torno da colônia. Vários parâmetros são importantes para uma triagem bem-sucedida, como a abundância do gene na biblioteca, o tamanho médio dos insertos, o uso de organismo hospedeiro capaz de expressar o gene-alvo e o método de ensaio (Ngara; Zhang, 2018).

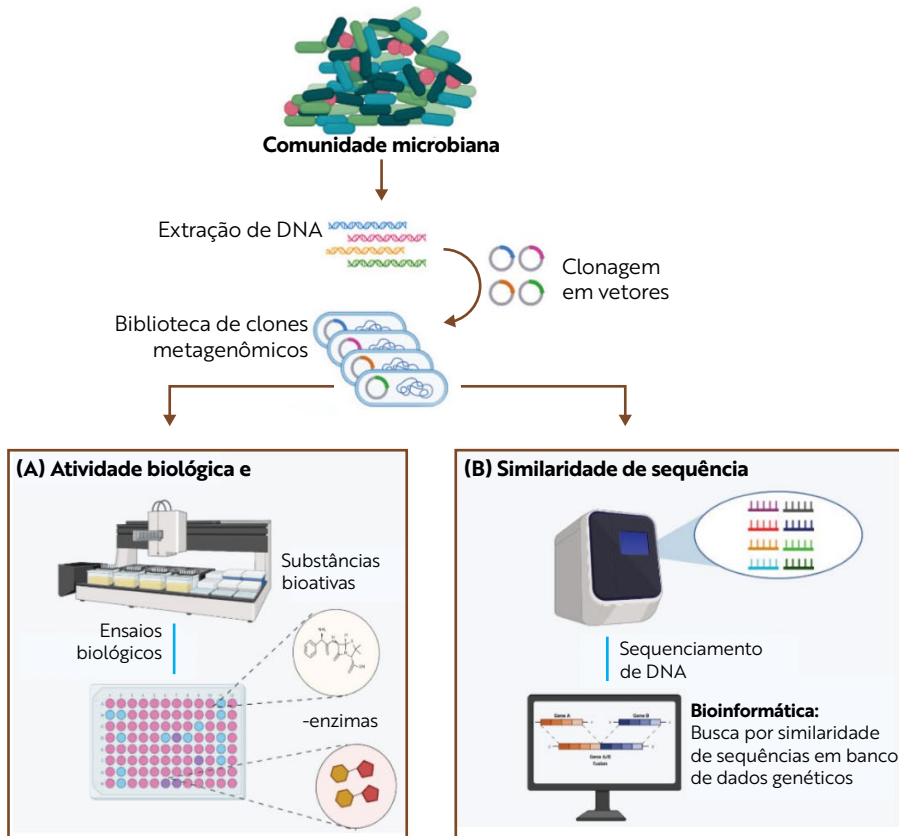


Figura 16.8. Etapas envolvidas na montagem de bibliotecas metagenômicas e estratégias de triagem de compostos bioativos baseadas na (A) atividade biológica e (B) na similaridade de sequência do inserto de DNA.

Ao empregar o método mais adequado ou a combinação de vários métodos, é possível acessar o rico e diverso reservatório genético inexplorado das comunidades microbianas, sem necessidade de cultivar espécies individuais. O uso dessa abordagem genética já levou à identificação de novas enzimas e substâncias bioativas com

potencial de uso em diversos setores industriais (Prayogo, et al., 2020). Na agricultura, o emprego dessa tecnologia pode desempenhar um importante papel na busca de novos agroquímicos naturais de origem microbiana, como alternativas aos produtos químicos sintéticos. Por exemplo, substâncias naturais com atividade antifúngica derivadas do metabolismo de microrganismos ainda não cultivados podem apresentar diferentes modos de ação bioquímica, burlando mecanismos de resistência dos patógenos aos fungicidas sintéticos (Santana-Pereira et al., 2020).

As bibliotecas metagenômicas construídas a partir de DNA isolado do solo podem armazenar um grande repertório de clusters gênicos biossintéticos originados da fração não cultivada de microrganismos, que codificam compostos naturais com novos mecanismos de ação antagonistas contra fitopatógenos (Santana-Pereira et al., 2020). Um clone metagenômico oriundo do solo de floresta foi detectado por meio da produção de um composto antifúngico da classe dos policetídeos. Embora a substância não tenha sido identificada, a caracterização molecular revelou a presença de um novo agrupamento gênico (Chung et al., 2008). Um peptídeo antifúngico, MMGP1, com propriedade de penetração direta na célula, foi recentemente identificado em metagenoma marinho. O peptídeo apresentou atividade proteolítica *in vitro*, que pode estar associada a sua atividade antifúngica. O peptídeo não mostrou similaridade com nenhuma sequência de peptídeo antimicrobiano existente no banco de dados (Pushpanathan et al., 2013).

Nesse mesmo contexto, a busca por quitinases a partir de bibliotecas metagenômicas vem ganhando destaque no controle de pragas agrícolas, apresentando tanto atividade inseticida como fungicida (Berini et al., 2019). Essas enzimas podem ser utilizadas individualmente, bem como em combinação com pesticidas químicos ou outros biopesticidas, reduzindo o impacto ambiental e/ou aumentando sua eficácia. Duas quitinases de origem metagenômica recentemente descobertas (Chi8H8 e 53D1) afetam, *in vitro*, a estrutura de *Bombyx mori*, inseto-modelo entre os lepidópteros. Entretanto, apenas 53D1 afetou o crescimento e o desenvolvimento da larva com administração oral, induzindo mortalidade e redução de peso das pupas. Os resultados *in vivo* demonstram um potencial promissor da quitinase 53D1 como proteína inseticida. Por outro lado, a Chi8H8, encontrada em metagenoma de um solo supressivo, também apresentou atividade antifúngica contra os fungos fitopatogênicos *Fusarium graminearum* e *Rhizoctonia solani* (Hjort et al., 2014; Berini et al., 2017).

A toxoflavina, uma fitotoxina sintetizada por patógenos bacterianos como *Burkholderia glumae* e *Burkholderia gladioli*, é um dos principais fatores de virulência associado a doenças no arroz, responsável por graves perdas em plantações ao redor do mundo (Nandakumar et al., 2009; Ham et al., 2011). Atualmente, nenhuma variedade com resistência completa à mancha bacteriana está disponível, e o surgimento de cepas bacterianas resistentes ao ácido oxolínico, principal método de controle, alerta para a

necessidade de novos tratamentos. Uma nova enzima, TxeA, descoberta por meio do *screening* de bibliotecas metagenômicas, é capaz de degradar a toxoflavina, atuando como uma estratégia de antivirulência no controle de doenças causadas pela toxina (Choi et al., 2018).

Além da degradação de fitotoxinas bacterianas, enzimas derivadas de bibliotecas metagenômicas também podem ser utilizadas no processo de biorremediação de compostos xenobióticos. Recentemente, uma nova dioxigenase foi minerada a partir do metagenoma de solo agrícola contaminado, com potencial para degradação de pesticidas (Sharma et al., 2020). A atividade catalítica dessas enzimas pode ser utilizada como estratégia de biorremediação em ambientes contaminados com pesticidas químicos amplamente utilizados na agricultura, que apresentam ampla toxicidade e acúmulo nos ecossistemas (Kumar et al., 2019).

O fósforo (P) é um dos macronutrientes essenciais para o crescimento e desenvolvimento vegetal. Entretanto, o fitato (PA), maior forma de P no solo, não é facilmente absorvido pelas raízes das plantas. Assim, as fitases, enzimas produzidas por uma gama de microrganismos do solo, decompõem o fitato, disponibilizando Pi assimilável. Diante do cenário de esgotamento de P, as fitases destacam-se como ferramentas poderosas para nutrição vegetal e aumento da produtividade agrícola. As fitases comerciais, com poucas exceções, são derivadas de microrganismos cultivados (Haefner et al., 2005). Na maioria dos casos, fitases fúngicas ou bacterianas podem ser aplicadas diretamente como fator de crescimento ou superexpressas em plantas transgênicas (Idriss et al., 2002; Bilyeu et al., 2008; Belgaroui et al., 2014). Do ponto de vista industrial e ambiental, a busca por fitases produzidas pela fração não cultivada de microrganismos por meio de técnicas independentes de cultivo (isto é, triagem de bibliotecas metagenômicas) apresenta grande potencial para descoberta de novas enzimas com características vantajosas. Embora ainda pouco explorado, o rastreamento de bibliotecas metagenômicas tem permitido a descoberta de novas fitases ocultas na fração não cultivada do solo. Algumas delas são novos tipos ou subtipos de fitases, apresentando domínios catalíticos nunca descritos (Castillo Villamizar et al., 2019) e alta resistência a amplas faixas de temperaturas (Tan et al., 2016). Essas descobertas podem ajudar na aplicação de biocatalisadores mais eficientes, com potencial na resolução de problemas futuros relacionados com a escassez de P na agricultura.

COLEÇÕES DE MICRORGANISMOS COMO FONTE PARA BIOPROSPECÇÃO

Coleções de microrganismos, ou bancos de recursos microbianos, são repositórios da biodiversidade mantidos *ex situ* em diferentes métodos de conservação de longo

prazo, a fim de assegurar a viabilidade e a estabilidade genética de microrganismos, garantindo material biológico de alta qualidade para uso em pesquisa e ensino, além de viabilizar o uso sustentável dos recursos microbianos, os quais são de extrema importância para o desenvolvimento econômico.

As coleções atuam como um backup de parte da diversidade de alguns habitats/*hotspots* da biosfera, sendo responsável pela preservação da diversidade genética. Tem papel preponderante na distribuição de linhagens-tipo (linhagens de referência), na manutenção de estudos taxonômicos e na descoberta de novas substâncias de importância farmacêutica, agrícola e industrial por meio da prospecção de linhagens superiores.

Muitas coleções têm em seus acervos grande parte da diversidade microbiana de alguns ambientes e guardam verdadeiros tesouros na forma de bioprodutos e/ou de novas substâncias bioativas. Por exemplo, a Coleção de Microrganismos de Importância Agrícola e Ambiental (CMAA), da Embrapa Meio Ambiente, conta com um acervo de fungos, arqueias e bactérias, incluindo cianobactérias e actinobactérias de diversos ecossistemas brasileiros e da Antártica, possibilitando a bioprospecção de microrganismos de ambientes de difícil acesso e que exigiriam grandes esforços de amostragem.

Algumas coleções geralmente têm a função principal de conservação de organismos específicos, como fungos entomopatogênicos, bactérias patogênicas aos humanos, leveduras para indústria de vinhos, cianobactérias e arqueias. Outras são consideradas coleções temáticas, sendo especializadas em organismos de determinados habitats/ecossistemas, a exemplo das coleções de microrganismos termofílicos, psicofílicos, halofílicos ou daquelas que mantêm grupos particulares de microrganismos envolvidos na biorremediação de poluentes ou produtores de enzimas. Há coleções que estudam gêneros/espécies específicas e, portanto, preservam espécies de interesse para a agroindústria, como é o caso da coleção de *Bradhyrhizobium* sp., da Embrapa Soja, e da coleção de *Bacillus thuringiensis*, da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

Muitos agentes de biocontrole e biofertilizantes, bem como substâncias bioativas, foram descobertos por meio da exploração em coleções de microrganismos. Estudos relatam a importância das coleções tanto para a manutenção da biodiversidade quanto para a promoção do desenvolvimento científico e tecnológico. Díaz-Rodríguez et al. (2021) descrevem o papel das coleções microbianas para garantir a segurança alimentar mundial por meio do desenvolvimento biotecnológico do setor agrícola. A exploração de microrganismos mantidos nas coleções de cultura é crucial para o desenvolvimento de tecnologias que levam ao aumento da produtividade, como melhora na fertilidade do solo, promoção de crescimento de plantas e controle biológico de pragas, além de contribuir para a redução de impactos, tornando as práticas agrícolas

mais sustentáveis (May et al., 2021; Murad et al., 2006; Hou; Johnston, 1992). Do mesmo modo, a diversidade microbiana assegurada nas coleções pode levar à descoberta de moléculas com atividades antimicrobianas, antioxidantes e antitumorais de interesse médico e farmacêutico (Andrade et al., 2018; Thomas et al., 2011). Um *screening* realizado a partir de 72 isolados provenientes da CMAA, da Embrapa Meio Ambiente, coletados na Antártica, identificou ao menos três cepas com atividade antitumoral (Silva et al., 2020). Similarmente, no Brasil, muitos estudos obtiveram sucesso ao prospectar valiosas moléculas para aplicação em diversos setores da indústria. Por exemplo, enzimas lignocelulolíticas, em especial aquelas que suportam atividade em altas temperaturas e em condições ácidas, foram descobertas após estratégias de *screening* de microrganismos depositados nas coleções de culturas mantidas por universidades e centros de pesquisa (Valencia; Chambergo, 2013). Essas enzimas alavancaram o setor de biocombustíveis, sobretudo a indústria do etanol de segunda geração, e têm o potencial para serem exploradas em plataformas de biorrefinaria. Além disso, universidades e centros nacionais de pesquisa exercem papel fundamental no processo de coleta e preservação do patrimônio genético brasileiro, em que microrganismos podem ser explorados para solucionar questões ambientais, agrícolas e de saúde animal e humana.

Em um cenário ideal, além da preservação de células microbianas vivas, as coleções poderiam preservar o DNA genômico e o extrato bruto contendo os metabólitos secundários. Sabe-se que a extração de DNA genômico é uma rotina em coleções de microrganismos, em virtude da identificação molecular de linhagens de referência. Também, é de amplo conhecimento que os custos para obter genomas completos se tornaram financeiramente mais acessíveis e que ferramentas de bioinformática podem ser aplicadas para acelerar a descoberta de valiosas substâncias químicas. Igualmente, com o advento de tecnologias robotizadas e *screening* de alto desempenho, as bibliotecas de extratos microbianos potencializam as possibilidades de descobertas, perfazendo testes biológicos em um método mais rápido e eficaz.

O amplo acervo de bactérias mantido na CMAA tem sido objeto de estudo para aqueles interessados em buscar linhagens antagonistas, produtoras de substâncias bioativas, capazes de controlar pragas e doenças de plantas cultivadas ou promover seu crescimento. Assim, Vasconcellos et al. (2017, 2021) encontraram uma nova bactéria halotolerante, descrita como *Pseudomonas aestus*, capaz de solubilizar fosfato e promover o crescimento de plantas. Também, após procedimentos de *screening* e isolamento bioguiado, uma linhagem de actinobactéria mostrou potente bioatividade contra *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, o agente causal do cancro cítrico, sendo que a atividade antimicrobiana foi determinada para o antibiótico lisolipina (Rodrigues et al., 2018). Nesse contexto, portanto, as coleções de culturas podem e devem ser exploradas como fontes de bioprospecção microbiana na busca por linhagens potencialmente

úteis aos diversos setores econômicos e industriais, uma vez que têm acervos de alto valor e potencial biotecnológico muitas vezes ainda inexplorado.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A agricultura tem se desenvolvido de modo que, atualmente, representa um dos principais pilares da economia brasileira, tendo experimentado uma tremenda revolução nas práticas de manejo do solo e de pragas, a fim de torná-la menos dependente de agrotóxicos e de fertilizantes químicos. Nesse sentido, o futuro da agricultura, sem dúvida, deverá priorizar o uso de insumos biológicos, principalmente aqueles envolvidos na promoção do crescimento de plantas e, conseqüentemente, no aumento de produtividade, bem como novos biopesticidas multifuncionais.

Considerando que o planeta Terra conta com aproximadamente 1 trilhão de microrganismos e que cerca de 99,99% ainda não foram descritos, percebe-se, então, que há muito a ser descoberto. Daí a busca por novos organismos funcionais para uso na agricultura. Esse tesouro microbiano produz, potencialmente, uma infinidade de substâncias naturais que podem ser diretamente aplicadas para auxiliar em programas de controle integrado de pragas. No entanto, apenas uma pequena fração cultivável é avaliada e, dessa fração, valiosos metabólitos ainda deixam de ser analisados, tais como os compostos orgânicos voláteis que têm sido ignorados em muitos estudos. Por questões de segurança, visando reduzir o uso intensivo de agroquímicos sintéticos, há uma urgente necessidade de novos produtos naturais com novos mecanismos de ação e acompanhados por esforços em reduzir os custos de sua produção. Portanto, as estratégias de bioprospecção voltadas à exploração da biodiversidade encontrada em diferentes habitats e a busca por moléculas inéditas são importantes para suprir a necessidade de um mercado de bioinsumos que está cada vez mais crescente e exigente.

Ademais, em razão da ação antrópica e dos desafios de cenários futuros de escassez hídrica e aumento da temperatura global, as pesquisas devem ser dirigidas à bioprospecção de microrganismos em ambientes ainda inexplorados, visando tolerância aos estresses abióticos, como secas, salinidade e temperaturas, como também a busca por biomoléculas com novos mecanismos de ação. Uma interessante estratégia para incrementar a eficiência de um agente de biocontrole é proceder ao manejo das condições ambientais no sentido de favorecer o antagonista. A adição de nutrientes, por exemplo, pode melhorar a capacidade de multiplicação de propágulos e de colonizar a rizosfera ou filosfera. Sabe-se, pois, que uma estratégia de bioprospecção malfeita leva, quase sempre, ao insucesso comercial. Portanto, é imprescindível que a exploração da biodiversidade nacional seja acompanhada das necessidades da indústria, para salvaguardar o enorme potencial da bioeconomia, visando à sustentabilidade dos agroecossistemas.

REFERÊNCIAS

- AINSWORTH, T. D.; THURBER, R. V.; GATES, R. D. The future of coral reefs: a microbial perspective. *Trends in Ecology and Evolution*, v. 25, n. 4, p. 233-240, 2010.
- ALVARENGA, D. O.; RIGONATO, J.; BRANCO, L. H. Z.; MELO, I. S.; FIORE, M. F. *Phyllonema aviceniicola* gen. nov., sp. nov. and *Foliisarcina bertioagensis* gen. nov., sp. nov., epiphyllitic cyanobacteria associated with *Avicennia schaueriana* leaves. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 66, p. 689-700, 2016.
- ALAIN, K.; QUERELLOU, J. Cultivating the uncultured: limits, advances and future challenges. *Extremophiles*, v. 13, n. 4, p. 583-594, 2009.
- ANDRADE, H. F.; ARAÚJO, L. C. A.; SANTOS, B. S.; PAIVA, P. M.; NAPOLEÃO, T. H.; CORREIA, M. T. S.; OLIVEIRA, M. B. M.; LIMA, G. M. S.; XIMENES, R. M.; SILVA, T.D.; SILVA, G. R.; SILVA, M. V. Screening of endophytic fungi stored in a culture collection for taxol production. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 49, supl. 1, p. 59-63, 2018.
- ASHRAF, M.; HASNAIN, S.; BERGE, O.; MAHMOOD, T. Inoculating wheat seedlings with exopolysaccharide-producing bacteria restricts sodium uptake and stimulates plant growth under salt stress. *Biology and Fertility of Soils*, v. 40, p. 157-162, 2004.
- AZEVEDO, J. L.; MACCHERONI, J. W.; PEREIRA, J. O.; ARAUJO, W. L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances in tropical plants. *Electronic Journal of Biotechnology*, v. 3, n. 1, p. 40-65, 2000.
- BAIS, H. P.; WEIR, T. L.; PERRY, L. G.; GILROY, S.; VIVANCO, J. M. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annual Review of Plant Biology*, v. 57, p. 233-266, 2006.
- BALTZ, R. H. Natural product drug discovery in the genomic era: realities, conjectures, misconceptions, and opportunities. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 46, n. 3-4, p. 281-299, 2019.
- BARCELOS, M. C.; RAMOS, C. L.; KUDDUS, M.; RODRIGUEZ-COUTO, S.; SRIVASTAVA, N.; RAMTEKE, P. W.; MISHRA, P. K.; MOLINA, G. Enzymatic potential for the valorization of agro-industrial by-products. *Biotechnology Letters*, v. 42, p. 1799-1827, 2020.
- BELGAROU, N.; ZAIDI, I.; FARHAT, A.; CHOUAYEKH, H.; BOUAIN, N.; CHAY, S.; CURIE, C.; MARI, S.; MASMOUDI, K.; DAVIDIAN, J. -C.; BERTHOMIEU, P.; ROUACHED, H.; HANIN, M. Over-expression of the bacterial phytase US417 in *Arabidopsis* reduces the concentration of phytic acid and reveals its involvement in the regulation of sulfate and phosphate homeostasis and signaling. *Plant & Cell Physiology*, v. 55, p. 1912-1924, 2014.
- BENTLEY, S. D.; CHATER, K. F.; CERDEÑO-TÁRRAGA, A. -M.; CHALLIS, G. L.; THOMSON, N. R.; JAMES, K. D.; HARRIS, D. E.; QUAIL, M. A.; KIESER, H.; HARPER, D.; BATEMAN, A.; BROWN, S.; CHANDRA, G.; CHEN, C. W.; COLLINS, M.; CRONIN, A.; FRASER, A.; GOBLE, A.; HIDALGO, J.; HORNSBY, T.; HOWARTH, S.; HUANG, C. -H.; KIESER, T.; LARKE, L.; MURPHY, L.; OLIVER, K.; O'NEIL, S.; RABBINOWITSCH, E.; RAJANDREAM, M. -A.; RUTHERFORD, K.; RUTTER, S.; SEEGER, K.; SAUNDERS, D.; SHARP, S.; SQUARES, R.; TAYLOR, K.; WARREN, T.; WIETZORREK, A.; WOODWARD,

- J.; BARREL, B. G.; PARKHILL, J.; HOPWOOD, D. A. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). **Nature**, V. 417, p. 141-147, 2002.
- BERINI, F.; CASARTELLI, M.; MONTALI, A.; REGUZZONI, M.; TETTAMANTI, G.; MARINELLI, F. Metagenome-sourced microbial chitinases as potential insecticide proteins. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, article 1358, 2019. DOI: <https://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2019.01358>.
- BERINI, F.; PRESTI, I.; BELTRAMETTI, F.; PEDROLI, M.; VÅRUM, K. M.; POLLEGIONI, L.; SJÖLING, S.; MARINELLI, F. Production and characterization of a novel antifungal chitinase identified by functional screening of a suppressive-soil metagenome. **Microbial Cell Factories**, v. 16, article 16, 2017. DOI: <https://dx.doi.org/10.1186/s12934-017-0634-8>.
- BILYEU, K. D.; ZENG, P.; COELLO, P.; ZHANG, Z. J.; KRISHNAN, H. B.; BAILEY, A.; BEUSELINCK, P. R.; POLACCO, J. C. Quantitative conversion of phytate to inorganic phosphorus in soybean seeds expressing a bacterial phytase. **Plant Physiology**, v. 146, p. 468-477, 2008.
- BO BO, A.; KHAITOV, B.; UMURZOKOV, M.; MIN CHO, K.; WOONG, K. P.; CHOI, J. S. Biological control using plant pathogens in weed management. **Weed & Turfgrass Science**, v. 9, p. 11-19, 2020.
- BRINGEL, F.; COUÉE, I. Pivotal roles of phyllosphere microorganisms at the interface between plant functioning and atmospheric trace gas dynamics. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, article 486, p. 1-14, May 2015.
- CALLAWAY, E.; CYRANOSKI, D. Anti-parasite drugs sweep Nobel prize in medicine 2015. **Nature**, v. 526, p. 174-175, 2015.
- CANTRELL, C. L.; DAYAN, F. E.; DUKE, S. O. Natural products as sources for new pesticides. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 6, p. 1231-1242, 2012.
- CARROL, M.; ZHOU, X. Panacea in progress: CRISPR and the future of its biological research introduction. **Microbiological Research**, v. 201, p. 63-74, 2017.
- CASTILLO VILLAMIZAR, G. A.; NACKE, H.; BOEHNING, M.; HERZ, K.; DANIEL, R. Functional metagenomics reveals an overlooked diversity and novel features of soil-derived bacterial phosphatases and phytases. **mBio**, v. 10, n. 1, e01966-18, 2019. DOI: <https://dx.doi.org/10.1128/mBio.01966-18>.
- CASTRO, R. A.; DOURADO, M. N.; ALMEIDA, J. R.; LACAVA, P. T.; NAVE, A.; MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L.; QUECINE, M. C. Mangrove endophyte promotes reforestation tree (*Acacia polyphylla*) growth. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 49, n. 1, p. 59-66, 2018.
- CASTRO, R. A.; QUECINE, M. C.; LACAVA, P. T.; BATISTA, B. D.; LUVIZOTTO, D. M.; MARCON, J.; FERREIRA, A.; MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. Isolation and enzyme bioprospection of endophytic bacteria associated with plants of Brazilian mangrove ecosystem. **SpringerPlus**, v. 3, p. 382, 2014.
- CHALLINOR, V. L.; BODE, H. B. Bioactive natural products from novel microbial sources. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1354, n. 1, p. 82-97, 2015.
- CHALLIS, G. L.; RAVEL, J. Coelichelin, a new peptide siderophore encoded by the *Streptomyces coelicolor* genome: structure prediction from the sequence of its non-ribosomal peptide synthetase. **FEMS Microbiology Letters**, v. 187, n. 2, p. 111-114, 2000.

- CHANG, C. H.; YANG, S. S. Thermo-tolerant phosphate-solubilizing microbes for multi- functional biofertilizer preparation. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 4, p. 1648-1658, 2009.
- CHAVES, M. M.; PEREIRA, J. S.; MAROCO, J.; RODRIGUES, M. L.; RICARDO, C. P. P.; OSÓRIO, M. L.; CARVALHO, I.; FARIA, T.; PINHEIRO, C. How plants cope with water stress in the field. Photosynthesis and Growth. **Annals of Botany**, v. 89, p. 907-916, 2002.
- CHEN, K. -S.; LIN, Y. -S.; YANG, S.-S. Application of thermotolerant microorganisms for biofertilizer preparation. **Journal of Microbiology, Immunology, and Infection**, v. 40, p. 462-473, 2007.
- CHOI, J. E.; NGUYEN, C. M.; LEE, B.; PARK, J. H.; OH, J. Y.; CHOI, J. S.; KIM, J. C.; SONG, J. K. Isolation and characterization of a novel metagenomic enzyme capable of degrading bacterial phytotoxin toxoflavin. **PLoS One**, v. 13, n. 1, e0183893, 2018.
- CHUNG, E. J.; LIM, H. K.; KIM, J. C.; CHOI, G. J.; PARK, E. J.; LEE, M. H.; CHUNG, Y. R.; LEE, S. W. Forest soil metagenome gene cluster involved in antifungal activity expression in *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 3, p. 723-30, 2008.
- CORONADO, C.; SÁNCHEZ-ANDDÚJAR, B.; PALOMARES, A. J. *Rhizobium* extracellular structures in the symbiosis. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 12, p. 127-136, 1996.
- CORREIA, N. M.; KRONKA JR., B. Controle químico de plantas dos gêneros *Ipomoea* e *Merremia* em cana-soca. **Planta Daninha**, v. 28, p.1143-1152, 2010.
- CORTES, M. V. C. B.; OLIVEIRA, M. I. DE S.; MATEUS, J. R.; SELDIN, L.; SILVA-LOBO, V. L.; FREIRE, D. M. G. A pipeline for the genetic improvement of a biological control agent enhances its potential for controlling soil-borne plant pathogens. **Biological Control**, v. 152, 104460, 2021.
- COSTA, F. E. C.; MELO, I. S. Endophytic and rhizospheric bacteria from *Opuntia ficus-indica* mill and their ability to promote plant growth in cowpea, *Vigna unguiculata* (L.) Walp. **African Journal of Microbiology Research**, v. 6, p. 1345-1353, 2012.
- CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1830, n. 6, p. 3670-3695, 2013.
- CREVELIN, E. J.; CANOVA, S. P.; MELO, I. S.; ZUCCHI, T. D.; DA SILVA, R. E.; MORAES, L. A. B. Isolation and characterization of phytotoxic compounds produced by *Streptomyces* sp. AMC 23 from red mangrove (*Rhizophora mangle*). **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 171, n. 7, p. 1602-1616, 2013.
- DAUB, M. E. Cercosporin, a photosensitized toxin from *Cercospora* species. **Phytopathology**, v.72, n.4, p. 369-371, 1982.
- DÍAZ-RODRÍGUEZ, A. M.; GASTELUM, L. A. S.; PABLOS, C. M. F.; PARRA-COTA, F. I.; SANTOYO, G.; PUENTE, M. L.; BHATTACHARYA, D.; MUKHERJEE, J.; SANTOS-VILLALOBOS, S. The current and future role of microbial culture collections in food security worldwide. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v. 4, 291, 2021.
- GROSS, H.; STOCKWELL, V. O.; HENKELS, M. D.; NOWAK-THOMPSON, B.; LOPER, J. E.; GERWICK, W. H. The genomisotopic approach: a systematic method to isolate products of orphan biosynthetic gene clusters. **Chemistry & Biology**, v. 14, p. 53-63, 2007. DOI: <https://dx.doi.org/10.1016/j.chembiol.2006.11.007>.

- HAEFNER, S.; KNIETSCH, A.; SCHOLTEN, E.; BRAUN, J.; LOHSCHIEDT, M.; ZELDER, O. Biotechnological production and applications of phytases. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 68, p. 588-597, 2005.
- HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W. F.; KLOEPPER, J. W. Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 43, p. 895-914, 1997.
- HAM, J. H.; MELANSON, R. A.; RUSH, M. C. *Burkholderia glumae*: next major pathogen of rice? *Molecular Plant Pathology*, v. 12, p. 329-339, 2011.
- HANDELSMAN, J. Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 68, n. 4, p. 669-685, 2004.
- HANDELSMAN, J.; M. R. RONDON, S. F. BRADY, J. CLARDY, AND R. M. GOODMAN. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chemistry & Biology*, v. 5, p. R245-R249, 1998.
- HILTNER, L. Über neuere Erfahrungen und Probleme auf dem Gebiet der Bodenbakteriologie und unter besonderer Berücksichtigung der Grundungung und Brache. *Arbeiten der Deutschen Landwirtschaftlichen Gesellschaft*, v. 98, p. 59-78, 1904.
- HJORT, K.; PRESTI, I.; ELVÄNG, A.; MARINELLI, F.; SJÖLING, S. Bacterial chitinase with phytopathogen control capacity from suppressive soil revealed by functional metagenomics. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 98, p. 2819-2828, 2014.
- HOU, C.T.; JOHNSTON, T. M. Screening of lipase activities with cultures from the agricultural research service culture collection. *Journal of American Oil Chemists' Society*, v. 69, p. 1088-1097, 1992.
- HOYOS, H. A. V. *Actinobactérias de biomas brasileiros: biodiversidade e potencial de uso na agricultura*. 2018. 130 f. Tese (Doutorado em Ciências (Microbiologia Agrícola) – Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba.
- HYDE, K. D. The amazing potential of fungi: 50 ways we can exploit fungi industrially. *Fungal Diversity*, v. 97, p. 1-136, 2019.
- IDRISS, E. E.; MAKAREWICZ, O.; FAROUK, A.; ROSNER, K.; GREINER, R.; BOCHOW, H.; RICHTER, T.; BORRIS, R. Extracellular phytase activity of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 contributes to its plant-growth-promoting effect. *Microbiology*, v. 148, p. 2097-2109, 2002.
- ITO, T.; MASUBUCHI, M. Dereplication of microbial extracts and related analytical technologies. *The Journal of Antibiotics*, v. 67, n. 5, p. 353-360, 2014.
- JABER, L.R.; OWNLEY, B.H. Can we use entomopathogenic fungi as endophytes for dual biological control of insect pests and plant pathogens? *Biological Control*, v. 116, p. 36-45, 2018.
- JACOBS, M. J.; BUGBEE, W. M.; GABRIELSON, D. A. Enumeration, location, and characterization of endophytic bacteria within sugar beet roots. *Canadian Journal of Botany*, v. 63, n. 7, p. 1262-1265, 1985.

- JANSSON, R. K.; DYBAS, R. A. Avermectins: biochemical mode of action, biological activity and agricultural importance. In: ISHAYA, I.; DEGHEELE, D. (eds.). **Insecticides with novel modes of action**. Heidelberg: Springer, Berlin: Heidelberg, 1998. p. 152-170.
- JONES, M. B.; NIERMAN, W. C.; SHAN, Y.; FRANK, B. C.; SPOERING, A.; LING, L.; PEOPLES, A.; ZULLO, A.; LEWIS, K.; NELSON, K. E. Reducing the bottleneck in discovery of novel antibiotics. **Microbial Ecology**, v. 73, n. 3, p. 658-667, 2017.
- JOSE, P.A.; MAHARSHI, A.; JHA, B. Actinobacteria in natural products research: Progress and prospects. **Microbiological Research**, v. 246, 126708, 2021.
- KAVAMURA, V. N.; SANTOS, S. N.; SILVA, J. L.; PARMA, M. M.; AVILA, L. A.; VISCONTI, A.; ZUCCHI, T. D.; TAKETANI, R. G.; ANDREOTE, F. D.; MELO, I. S. Screening of Brazilian cacti rhizobacteria for plant growth promotion under drought. **Microbiological Research**, v. 168, n. 4, p. 183-191, 2013a.
- KAVAMURA, V. N.; TAKETANI, R. G.; LANÇONI, M. D.; ANDREOTE, F. D.; MENDES, R.; MELO, I. S. Water regime influences bulk soil and rhizosphere of *Cereus jamacaru* bacterial communities in the Brazilian Caatinga biome. **PLoS ONE**, v. 8, n. 9, e73606, 2013b.
- KELLER, M.; ZENGLER, K. Tapping into microbial diversity. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, p. 141-150, 2004.
- KHALID, S.; AHMAD, T.; SHAD, R. A. Use of Allelopathy in Agriculture. **Asian Journal of Plant Sciences**, v. 1, p. 292-297, 2002.
- KUMAR, V.; KUMAR, P.; SINGH, J. An introduction to contaminants in agriculture and environment. In: KUMAR, V.; KUMAR, P.; SINGH, J.; KUMAR, P. **Contaminants in agriculture and environment: health risks and remediation**, chapter. 1, p. 1-8, 2019. DOI: <https://dx.doi.org/10.26832/AESA-2019-CAE-0159-01>.
- LACERDA-JÚNIOR, G. V.; NORONHA, M. F.; CABRAL, L.; DELFORNO, T. P.; DE SOUSA, S. T. P.; FERNANDES-JÚNIOR, P. I.; MELO, I. S.; OLIVEIRA, V. M. Land use and seasonal effects on the soil microbiome of a Brazilian dry forest. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. 648, 2019. DOI: <https://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2019.00648>.
- LACERDA-JÚNIOR, G. V.; NORONHA, M. F.; DE SOUSA, S. T.; CABRAL, L.; DOMINGOS, D. F.; SÁBER, M. L.; DE MELO, I. S.; OLIVEIRA, V. M. Potential of semiarid soil from Caatinga biome as a novel source for mining lignocellulose-degrading enzymes. **FEMS Microbiol Ecology**, v. 93, n. 2, Feb. 2017, fiw248. DOI: <https://dx.doi.org/10.1093/femsec/fiw248>.
- LAURETI, L.; SONG, L.; HUANG, S.; CORRE, C.; LEBLOND, P.; CHALLIS, G. L.; AIGLE, B. Identification of a bioactive 51-membered macrolide complex by activation of a silent polyketide synthase in *Streptomyces ambifaciens*. **PNAS**, v. 108, n. 15, p. 6258-6263, 2011.
- LIU, C.; KAKEYA, H. Cryptic chemical communication: secondary metabolic responses revealed by microbial co-culture. **Chemistry—An Asian Journal**, v. 15, n. 3, p. 327-337, 2020.
- LIU, Z.; ZHAO, Y.; HUANG, C.; LUO, Y. Recent advances in silent gene cluster activation in *Streptomyces*. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 9, article 632230, 2021.

LOCEY, K. J.; LENNON, J. T. Scaling laws predict global microbial diversity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 113, n. 21, p. 5870-5975, May 2016. DOI: <https://dx.doi.org/10.1073/pnas.1521291113>.

LYNCH, J. M. **The rhizosphere**. New York: John Wiley, 1990. 458 p.

MA, B.; LV, X.; WARREN, A.; GONG, J. Shifts in diversity and community structure of endophytic bacteria and archaea across root, stem and leaf tissues in the common reed, *Phragmites australis*, along a salinity gradient in a marine tidal wetland of northern China. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 104, p. 759-768, 2013.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; BENDER, K. S.; BUCKLEY, D. H.; STAHL, D. A. (ed.). **Brock biology of microorganisms**. 14. ed. [S. l.]: Global Edition, Pearson, 2015. Disponível em: <https://www.pearson.com/uk/educators/higher-education-educators/program/Madigan-Brock-Biology-of-Microorganisms-Global-Edition-14th-Edition/PGM1076927.html?tab=resources>. Acesso em: 14 mar. 2021.

MARSCHNER, P.; CROWLEY, D.; YANG, C. H. Development of specific rhizosphere bacterial communities in relation to plant species, nutrition and soil type. **Plant and Soil**, v. 261, n. 1-2, p. 199-208, 2004.

MARTINS, T.; SCHINKE, C.; QUEIROZ, S. C. N.; BRAGA, P. A. C.; SILVA, F. S.; MELO, I. S.; REYES, F. G. Role of bioactive metabolites from *Acremonium camptosporum* associated with the marine sponge *Aplysina fulva*. **Chemosphere**, 274, article 129753, July 2021.

MAY, A.; DOS SANTOS, M. S.; SILVA, EVANDRO, H. F. M.; VIANA, R. S.; VIEIRA JUNIOR, N. AP.; RAMOS, N. P.; MELO, I. S. Effect of *Bacillus aryabhatai* on the initial establishment of pre-sprouted seedlings of sugarcane varieties. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 2, e11510212337, 2021.

McINROY, J. A.; KLOEPPER, J. W. Survey of indigenous bacterial endophytes from cotton and sweet corn. **Plant and Soil**, v. 173, p. 337-342, 1995.

MELO, I. S.; SANTOS, S. N.; ROSA, L. H.; PARMA, M. M.; SILVA, L. J.; QUEIROZ, S. C.; PELLIZARI, V. H. Isolation and biological activities of an endophytic *Mortierella alpina* strain from the Antarctic moss *Schistidium antarctici*. **Extremophiles**, v. 18, n. 1, p. 15-23, 2014.

MELO, I. S.; SOUZA, W. R.; SILVA, L. J.; SANTOS, S. N.; ASSALIN, M. R.; ZUCCHI, T. D.; QUEIROZ, S. C. N. Antifungal Activity of *Pseudomonas frederiksbergensis* CMAA 1323 Isolated from the Antarctic hair grass *Deschampsia antarctica*. **British Microbiology Research Journal**, v. 14, p. I-II, 2016.

MIYAMOTO, T.; KAWAHARA, M.; MINAMISAWA, K. Novel endo-phytic nitrogen-fixing clostridia from the grass *Miscanthus sinensis* as revealed by terminal restriction fragment length polymorphism analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, p. 6580-6586, 2004.

MONIER, J. M.; LINDOW, S. E. Frequency, size, and localization of bacterial aggregates on bean leaf surfaces. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, p. 346-355, 2004.

MORIN, L. Progress in biological control of weeds with plant pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, v. 58, p. 201-223, 2020.

MURAD, A. M.; LAUMANN, R. A.; LIMA, T. DE A.; SARMENTO, R. B.C.; NORONHA, E. F.; ROCHA, T. L.; VALADARES-INGLIS, M. C.; FRANCO, OCTÁVIO L. Screening of entomopathogenic *Metarhizium anisopliae*

- isolates and proteomic analysis of secretion synthesized in response to cowpea weevil (*Callosobruchus maculatus*) exoskeleton. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part C, v. 142, p. 365-370, 2006.
- MWAJITA, M. R.; MURAGE, H.; TANI, A.; KAHANGI, E. M. Evaluation of rhizosphere, rhizoplane and phyllosphere bacteria and fungi isolated from rice in Kenya for plant growth promoters. **SpringerPlus**, v. 2, article 606, 2013. DOI: <https://dx.doi.org/10.1186/2193-1801-2-606>.
- NANDAKUMAR, R.; SHAHJAHAN, A. K.; YUAN, X. L.; DICKSTEIN, E. R.; GROTH, D. E.; CLARK, C. A.; CARTWRIGHT, R. D.; RUSH, M. C. *Burkholderia glumae* and *B. gladioli* cause bacterial panicle blight in rice in the southern United States. **Plant Disease**, v. 93, n. 9, p. 896-905, 2009.
- NECHET, K. L.; HALFELD-VIEIRA, B. A. Development of *Cercospora* leaf spot on *Ipomoea* weed species for biological control. **Biocontrol**, v. 64, p.185-195, 2019.
- NECHET, K. L.; VITORINO, M. D.; VIEIRA, B. S.; HALFELD-VIEIRA, B. A. Weeds. In: SOUZA, B.; VÁZQUEZ, L.; MARUCCI, R. (ed.). **Natural enemies of insect pests in neotropical agroecosystems: biological control and functional biodiversity**. Cham: Springer, 2019. Cap. 35. p. 437-449.
- NGARA, T. R.; ZHANG, H. Recent advances in function-based metagenomic screening. **Genomics Proteomics Bioinformatics**, v. 16, n. 6, p. 405-415, 2018.
- NWOKOLO, N. L.; ENEBE, M. C.; CHIGOR, C. B.; CHIGOR, V. N.; DADA, O. A. The contributions of biotic lines of defence to improving plant disease suppression in soils: A review. **Rhizosphere**, v. 19, 100372, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2021.100372>.
- OCHI, K. From microbial differentiation to ribosome engineering. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 71, n. 6, p. 1373-1386, 2007.
- OFAIM, S.; OFEK-LALZAR, M.; SELA, N.; JINAG, J.; KASHI, Y.; MINZ, D.; FREILICH, S. Analysis of microbial functions in the rhizosphere using a metabolic-network based framework for metagenomics interpretation. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, article1606, 2017. DOI: <https://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2017.01606>.
- ONGENA, M.; JACQUES, P. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. **Trends in Microbiology**, v. 16, p. 115-125, 2008.
- PETRINI, O.; FISHER, P. J. A comparative study of fungal endophytes in xylem and whole stems of *Pinus sylvestris* and *Fagus sylvatica*. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 91, p. 233-238, 1988.
- PRAYOGO, F. A.; BUDI HARJO, A.; KUSUMANINGRUM, H. P.; WIJANARKA, W.; SUPRIHADI, A.; NURHAYATI, N. Metagenomic applications in exploration and development of novel enzymes from nature: a review. **Journal of Genetic Engineering & Biotechnology**, v. 18, n. 1, 39, 2020.
- PRIHODA, D.; MARITZ, J. M.; KLEMPER, O.; DZAMBA, D.; WOELK, C. H.; HAZUDA, D. J.; BITTON, D. A.; HANNIGAN, G. D. The application potential of machine learning and genomics for understanding natural product diversity, chemistry, and therapeutic translatability. **Natural Product Reports**, v. 38, p. 1100-1108, 2021.
- PUSHPANATHAN, M.; GUNASEKARAN, P.; RAJENDHRAN, J. Mechanisms of the antifungal action of marine metagenome-derived peptide, MMGP1, against *Candida albicans*. **PLoS One**, v. 8, n. 7, e69316, 2013. DOI: <https://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0069316>.

- RAMASAMY, D.; MISHRA, A. K.; LAGIER, J. C.; MORGANE ROSSI, R. P.; SENTAUSA, E.; RAOULT, D.; FOURNIER, P. E. A polyphasic strategy incorporating genomic data for the taxonomic description of novel bacterial species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 64, p. 384-391, 2014.
- RODRIGUES, J. P.; PETI, A. P. F.; FIGUEIRÓ, F. S.; DE SOUZA ROCHA, I.; JUNIOR, V. R. A.; SILVA, T. G.; MELO, I. S.; BEHLAU, F.; MORAES, L. A. B. Bioguided isolation, characterization and media optimization for production of Lysolipins by actinomycete as antimicrobial compound against *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. *Molecular Biology Reports*, v. 45, n. 6, p. 2455-2467, 2018.
- RODRIGUES, K. A.; HESSE, M.; WERNER, C. Antimicrobial activities of secondary metabolites produced by endophytic fungi from *Spondias mombin*. *Journal of Basic Microbiology*, v. 40, n. 4, p. 261-267, 2000.
- RODRÍGUEZ, H.; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances*, v. 17, p. 319-339, 1999.
- ROMANO, S.; JACKSON, S. A.; PATRY, S.; DOBSON, A. D. Extending the “one strain many compounds” (OSMAC) principle to marine microorganisms. *Marine Drugs*, v. 16, n. 7, p. 244, 2018.
- ROVIRA, A. D. Interactions between plant roots and soil microorganisms. *Annual Review of Microbiology*, v. 19, p. 241-266, 1965.
- RYAN, P. R.; DELHAIZE, E. Function and mechanism of organic anion exudation from plant roots, *Annual Review of Plant Physiology and Molecular Biology*, v. 52, p. 527-560, 2001.
- SANTANA-PEREIRA, A. L. R.; SANDOVAL-POWERS, M.; MONSMA, S.; ZHOU, J.; SANTOS, S. R.; MEAD, D. A.; LILES, M. R. Discovery of novel biosynthetic gene cluster diversity from a soil metagenomic library. *Frontiers in Microbiology*, v. 11, 585398, 2020. DOI: <https://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2020.585398>.
- SANTOS, S. N.; FERRARIS, F. K.; SOUZA, A. O.; HENRIQUES, M. G.; Melo, I. S. Endophytic fungi from *Combretum leprosum* with potential anticancer and antifungal activity. *Symbiosis*, v. 12, p. 0218-0225, 2012.
- SAXENA, S.; PANDEY, A. K. Microbial metabolites as eco-friendly agrochemicals for the next millennium. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 55, n. 4, p. 395-403, 2001.
- SCHLATTER, D.; KINKEL, L.; THOMASHOW, L.; WELLER, D.; PAULITZ, T. Disease Suppressive Soils: New Insights from the Soil Microbiome. *Phytopathology*, v. 107, p. 1284-1297, 2017.
- SHARMA, V.; KUMAR, R.; SHARMA, V. K.; YADAV, A. K.; TIIROLA, M.; SHARMA, P. K. Expression, purification, characterization and in silico analysis of newly isolated hydrocarbon degrading bleomycin resistance dioxigenase. *Molecular Biology Reports*, v. 47, p. 533-544, 2020.
- SHEN, B. A new golden age of natural products drug discovery. *Cell*, v. 163, n. 6, p. 1297-1300, 2015.
- SILVA, F. S. P. **Bioprospecção de actinobactérias associadas à esponja marinha *Aplysina fulva*: isolamento, caracterização e produção de compostos bioativos**. 2015. 159 f. Tese (Doutorado em Ciências (Microbiologia Agrícola) – Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba.

- SILVA, L. J.; CREVELIN, E. J.; SOUZA, D. T.; LACERDA-JÚNIOR, G. V.; de OLIVEIRA, V. M.; RUIZ, A. L. T. G.; ROSA, L.H.; MORAES, L.A.B.; MELO, I. S. Actinobacteria from Antarctica as a source for anticancer discovery. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1-15, 2020.
- SILVA, T. R.; DUARTE, A. W. F.; PASSARINI, M. R. Z.; RUIZ, A. L. T. G.; FRANCO, C. H.; MORAES, C. B.; Melo, I. S.; Rodrigues, R. A.; FANTINATTI-GARBOGGINI, F.; OLIVEIRA, V. M. Bacteria from Antarctic environments: diversity and detection of antimicrobial, antiproliferative, and antiparasitic activities. **Polar Biology**, v. 41, n. 7, p. 1505-15192, 2018.
- SOUZA, D. T. **Exploração da diversidade bacteriana de esponjas marinhas por abordagens dependente e independente de cultivo**. 2016. 202 p. Tese (Doutorado em Ciências (Microbiologia Agrícola) – Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba.
- SOUZA, D. T.; GENUÁRIO, D. B.; SILVA, F. S. P.; PANSA, C. C.; KAVAMURA, V. N.; MORAES, F. C.; TAKETANI, R.G.; MELO, I. S. Analysis of bacterial composition in marine sponges reveals the influence of host phylogeny and environment. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 93, n. 1, f1w204, 2017.
- STEVENSON, B. S.; EICHORST, S. A.; WERTZ, J. T.; SCHMIDT, T. M.; BREZNAK, J. A. New strategies for cultivation and detection of previously uncultured microbes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, p. 4748-4755, 2004.
- STEWART, E. J. Growing unculturable bacteria. **Journal of Bacteriology**, v. 194, n. 16, p. 4151-4160, 2012.
- STROBEL, G.; DAISY, B.; CASTILLO, U.; HARPER, J. Natural products from endophytic microorganisms. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 2, p. 257-268, 2004.
- SUBRAMANI, R.; SIPKEMA, D. Marine rare actinomycetes: a promising source of structurally diverse and unique novel natural products. **Marine Drugs**, v. 17, n. 5, p. 249, 2019.
- TANAKA, T.; KAWASAKI, K.; DAIMON, S.; KITAGAWA, W.; YAMAMOTO, K.; TAMAKI, H.; TANAKA, M.; NAKATSU, C.H.; KAMAGATA, Y. A hidden pitfall in the preparation of agar media undermines microorganism cultivability. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 24, p. 7659-7666, 2014.
- TAN, H.; WU, X.; XIE, L.; HUANG, Z.; PENG, W.; GAN, B. Identification and characterization of a mesophilic phytase highly resilient to high-temperatures from a fungus-garden associated metagenome. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, p. 2225-2241, 2016.
- THOMAS, A. T.; RAO, J. V.; SUBRAHMANYAM, V. M., CHANDRASHEKHAR, H. R., MALIYAKKAL, N., KISAN, T. K.; JOSEPH, A.; UDUPA, N. *In vitro* anticancer activity of microbial isolates from diverse habitats. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 4, p. 279-287, 2011.
- THOMPSON, G. D.; DUTTON, R.; SPARKS, T. C. Spinosad –a case study: an example from a natural products discovery programme. **Pest Management Science: formerly Pesticide Science**, v. 56, n. 8, p. 696-702, 2000.
- TRIVELLA, D. B. B.; FELICIO, R. The tripod for bacterial natural product discovery: Genome mining, silent pathway induction, and mass spectrometry-based molecular networking. **mSystems**, v. 3, e00160-e17, 2018.
- VALENCIA, E. Y.; CHAMBERGO, F. S. Mini-review: Brazilian fungi diversity for biomass degradation. **Fungal Genetics and Biology**, v. 60, p. 9-18, 2013.

VASCONCELLOS, R. L. F.; ROMAGNOLI, E. M.; TAKETANI, R. G.; SANTOS, S. N.; ZUCCHI, T. D.; MELO, I. S. Impact of inoculation with *Pseudomonas aestus* CMAA 1215^T on the non-target resident bacterial community in a saline rhizosphere soil. **Current Microbiology**, v. 78, n. 1, p. 218-228, 2021.

VASCONCELLOS, R. L. F.; SANTOS, S. N.; ZUCCHI, T. D.; SILVA, F. S. P.; SOUZA, D. T.; MELO, I. S. *Pseudomonas aestus* sp. nov., a plant growth-promoting bacterium isolated from mangrove sediments. **Archives of Microbiology**, v. 199, p. 1223-1229, 2017.

VORHOLT, J. A. Microbial life in the phyllosphere. **Nature Reviews Microbiology**, v. 10, n. 12, p. 828-840, 2012.

WANG, H.; VAN DER DONK, W. A. Biosynthesis of the class III lantipeptide catenulipeptin. **Chemical Biology**, v. 7, n. 9, p. 1529-1535.

WESTWOOD, J. H.; CHARUDATTAN, R.; DUKE, S. O.; FENNIMORE, S. A.; MARRONE, P. G.; SLAUGHTER, D.; SWANTON, C. J.; ZOLLINGER, R. Weed management in 2050: perspectives on the future of weed science. **Weed Science**, v. 66, p. 275-285, 2018.

WISNIEWSKI, M.; WILSON, C.; DROBY, S.; CHALUTZ, E.; EL-GHAOUTH, A.; STEVENS, C. Postharvest biocontrol: new concepts and applications. In: VINCENT, C.; GOETTEL, M. S.; LAZAROVITIS, G. (eds.). **Biological Control: A Global Perspective**. Wallingford: Cabi Publishing. 2007. p. 262-273.

YAN, Y.; LIU, Q.; JACOBSEN, S. E.; TANG, Y. The impact and prospect of natural product discovery in agriculture: New technologies to explore the diversity of secondary metabolites in plants and microorganisms for applications in agriculture. **EMBO Reports**, v. 19, n. 11, e46824, 2018.

ZOU, W. X.; MENG, J. C.; LU, H.; CHEN, G. X.; SHI, G. X.; ZHANG, T. Y.; TAN, R. X. Metabolites of *Colletotrichum gloeosporioides*, an endophytic fungus in *Artemisia mongolica*. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 1529-1530, 2000.