



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
Colegiado do CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



**Ciências  
Biológicas**  
UEL

---

## **TRABALHO DE CONCLUSÃO DO CURSO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**ROBERTO RODRIGUES BAPTISTA JUNIOR**

### **ANÁLISE GENÔMICA DE *Streptomyces albidoflavus* LABIM42: DA EXTRAÇÃO DO DNA À IDENTIFICAÇÃO DE CLUSTERS BIOSINTÉTICOS**

---

Londrina – Paraná  
2025

**TRABALHO DE CONCLUSÃO DO CURSO DE GRADUAÇÃO  
EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**ROBERTO RODRIGUES BAPTISTA JUNIOR**

**ANÁLISE GENÔMICA DE *Streptomyces albidoflavus*  
LABIM42: DA EXTRAÇÃO DO DNA À  
IDENTIFICAÇÃO DE CLUSTERS BIOSINTÉTICOS**

Monografia apresentada ao Curso de Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina como um dos requisitos à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

**Orientador: Admilton Gonçalves de Oliveira Junior**

**Londrina – Paraná  
2025**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

R642a Junior, Roberto.  
ANÁLISE GENÔMICA DE *Streptomyces albidoflavus* LABIM42: DA EXTRAÇÃO DO DNA À IDENTIFICAÇÃO DE CLUSTERS BIOSINTÉTICOS / Roberto Rodrigues Baptista Junior Junior. - Londrina, 2025. 35 f.

Orientador: Admilton Gonçalves de Oliveira Junior.  
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Graduação em Ciências Biológicas, 2025.  
Inclui bibliografia.

1. Análise genômica - TCC. 2. Potencial Biotecnológico - TCC. I. Gonçalves de Oliveira Junior, Admilton . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Graduação em Ciências Biológicas.

CDU 574

**BANCA EXAMINADORA**

---

*Prof. Dr. Admilton Gonçalves de Oliveira Junior*

---

*Prof. Dr. Doumit Camilios Neto*

---

*Dr<sup>a</sup> Rafaella Cardoso*

---

*Prof. Dr. Eliandro Tavares*

Londrina, 09 de dezembro de 2025

## **DEDICATÓRIA**

Com amor e carinho aos meus pais, nenhuma história é escrita só.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço ao meu orientador, Admilton Gonçalves de Oliveira Junior, pelos ensinamentos e paciência durante minha formação como pesquisador. Ao restante da minha banca avaliadora Prof. Dr. Doumit Camilios Neto e Dr<sup>a</sup> Rafaella Cardoso Sichieri por se dispor a fazer parte da comissão de avaliação. Agradeço a todos os membros do Laboratório de Biotecnologia Microbiana (LaBiM), uma equipe que sempre esteve pronta para me apoiar; tenho muita sorte em fazer parte desse grupo que cada dia cresce mais.

Não posso esquecer de demonstrar meu eterno agradecimento ao meu Mestre, Guilherme Belarmino; os ensinamentos de cada dia me tornam um ser humano melhor e, sem eles, talvez não tivesse chegado até aqui. Demonstro também meu agradecimento a todos os meus amigos que se fizeram presentes, seja por mensagem ou no dia a dia. Em especial à minha amiga de longa data, Leiliani, que se tornou família nesse meio acadêmico. Às minhas amigas Brenda, Beatriz e Micaela, por me aguantarem trocando pancadas e pelos meus desabafos na elaboração desse projeto.

Não posso deixar de agradecer àqueles que foram base em absolutamente tudo para mim: meus pais. Sem a dedicação deles, amor, acolhimento e ensinamentos, nada disso seria possível. À minha irmã, por todo o apoio que me deu durante toda minha vida; foi exemplo para superar todas as adversidades que se apresentaram durante a minha graduação. À minha avó Izabel, por todo o amor me dado durante toda minha vida.

E àqueles que não estão mais aqui: meus avós, Antônio e Maria, sinto vocês ao meu lado em cada passo. E ao meu amado segundo pai, Ivonei, que mesmo sem saber foi o principal responsável por eu querer prestar um vestibular e, ao fim, estar aqui podendo manifestar minha gratidão.

Por fim, agradeço a minha própria pessoa por não ter desistido no primeiro erro e nem nos seguintes.

A vida presta.



RODRIGUES, Roberto. **ANÁLISE GENÔMICA DE *Streptomyces albidoflavus* LABIM42: DA EXTRAÇÃO DO DNA À IDENTIFICAÇÃO DE CLUSTERS BIOSINTÉTICOS**. 2025. 38 fls. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2025.

## RESUMO

O presente trabalho aborda o processo que se estende desde a avaliação da atividade antifúngica até a extração de DNA genômico e a mineração de metabólitos secundários em microrganismos de interesse biotecnológico. A metodologia empregada utilizou o sistema automatizado Extracta 16 (Loccus), baseado em partículas magnéticas, para a purificação de DNA de alta qualidade. Após a extração, as amostras foram avaliadas quanto à integridade (eletroforese em gel de agarose), concentração (fluorimetria – Qubit) e pureza (Nanodrop, razão A260/A280). O sequenciamento foi realizado utilizando duas plataformas: Illumina (leituras curtas 2x150 pb) e Oxford Nanopore Technologies (leituras longas via MinION), permitindo uma abordagem híbrida de montagem. A partir do genoma montado, ferramentas de bioinformática foram empregadas para identificar clusters biossintéticos e potenciais vias de síntese de compostos bioativos. Os resultados reforçam a importância da integração entre metodologias moleculares e análises computacionais para a prospecção de metabólitos com potencial agronômico.

**Palavras-chave:** Sequenciamento híbrido; Illumina; Nanopore; Mineração genômica; Metabólitos secundários; *Streptomyces*.



Rodrigues, Roberto. **Genomic Analysis of *Streptomyces albidoflavus* LABIM42: From DNA Extraction to Biosynthetic Gene Cluster Identification**. 2025. 38 pgs. Final Dissertation (Biological Sciences Undergraduation) – Londrina State University. Londrina. 2025.

## ABSTRACT

This study addresses the workflow ranging from the evaluation of antifungal activity to genomic DNA extraction and secondary metabolite mining in microorganisms of biotechnological interest. The methodology employed utilized the Extracta 16 (Loccus) automated system, based on magnetic particles, for high-quality DNA purification. Following extraction, samples were evaluated for integrity (agarose gel electrophoresis), concentration (fluorometry – Qubit), and purity (Nanodrop, A260/A280 ratio). Sequencing was performed using two platforms: Illumina (2×150 bp short reads) and Oxford Nanopore Technologies (long reads via MinION), enabling a hybrid assembly approach. Based on the assembled genome, bioinformatics tools were employed to identify biosynthetic gene clusters and potential synthesis pathways for bioactive compounds. The results underscore the importance of integrating molecular methodologies and computational analyses for the prospecting of metabolites with agronomic potential.

**Keywords:** Hybrid sequencing; Illumina; Nanopore; Genome mining; Secondary metabolites; *Streptomyces*.

## Lista de Siglas

1. **ANI** – Average Nucleotide Identity
2. **antiSMASH** – Antibiotics & Secondary Metabolite Analysis Shell
3. **A260/A280** – Razão de absorbância 260 para ácidos nucleicos. Absorbância 280 para proteínas
4. **BGC** – Biosynthetic Gene Cluster
5. **bp** – Base Pairs (Pares de Bases)
6. **BDA** – Potato Dextrose Agar
7. **DNA** – Deoxyribonucleic Acid
8. **Gb** – Gigabase
9. **gDNA** – Genomic DNA
10. **HMM** – Hidden Markov Model
11. **ITS** – Internal Transcribed Spacer
12. **Illumina** – Tecnologia de sequenciamento Illumina
13. **LB** – Luria-Bertani
14. **Mb** – Megabase
15. **MEGA** – Molecular Evolutionary Genetics Analysis
16. **MinION** – Plataforma de sequenciamento Nanopore
17. **N50** – Métrica de continuidade de montagem genômica
18. **NRPS** – Non-Ribosomal Peptide Synthetase
19. **ONT** – Oxford Nanopore Technologies
20. **PCR** – Polymerase Chain Reaction
21. **PKS** – Polyketide Synthase
22. **QC** – Quality Control
23. **RNA** – Ribonucleic Acid
24. **SPAdes** – St. Petersburg Genome Assembler
25. **SDT** – Species Delimitation Tool

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>1</b>
2.1. Fungos Fitopatogênicos .....	1
2.2. Cenário Atual do Mercado De Biodefensivos.....	2
2.3. Ação Integrada: Químicos e Biológicos no Manejo de Doenças.....	2
2.4. Gênero Streptomyces e Potencial Biotecnológico.....	3
2.5. Exploração do Potencial Genômico: Extração e sequenciamento.....	4
2.6. Mineração Genômica e Descoberta de Clusters.....	5
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>5</b>
3.1. Microrganismo e Condições de Cultivo .....	5
3.2. Avaliação antifúngica .....	5
3.3. Extração de DNA Genômico.....	6
3.4. Sequenciamento de Nova Geração (NGS).....	6
3.5. Montagem Genômica e Anotação.....	7
3.6. Mineração de Metabólitos e Visualização.....	7
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>7</b>
4.1. Avaliação da Atividade Antifúngica.....	7
4.2. Extração do DNA.....	8
4.3. Sequenciamento.....	9
4.4. Montagem Genômica e Métricas de Qualidade.....	10
4.5. Anotação Funcional e de Metabolismo Secundário.....	11
4.6. Identificação Taxonômica.....	12
4.7. Mineração de metabólitos.....	13
4.7.1. Atividade Antifúngica.....	14
4.7.2. Promoção de Crescimento e Competitividade: Sideróforos.....	15
4.7.3. Resistência ao Estresse Ambiental: Ectoína.....	15
4.7.4. Arsenal Antimicrobiano Auxiliar: Surugamidas e Macrolactamas.....	15

4.8. Comparação Genômica entre <i>Streptomyces albidoflavus</i> LABIM42 e o Genoma de Referência NBC 01110.....	18
4.8.1. Comparação das Métricas Genômicas.....	19
4.8.2. Comparação dos Clusters Biossintéticos.....	19
<b>5. CONCLUSÕES .....</b>	<b>20</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>21</b>

## **1. INTRODUÇÃO**

A demanda crescente por alternativas sustentáveis no manejo de doenças agrícolas tem impulsionado a busca por novos metabólitos produzidos por microrganismos do solo. Dentre esses organismos, o gênero *Streptomyces* destaca-se como uma das principais fontes de bioativos de importância médica, industrial e agrícola, sendo responsável pela síntese de mais de 70% dos antibióticos conhecidos.

O avanço das tecnologias de sequenciamento de nova geração (NGS) permitiu expandir a descoberta de compostos microbianos, possibilitando a identificação de clusters biossintéticos diretamente no genoma, independentemente de expressão in vitro. Softwares como antiSMASH e ferramentas de análise comparativa têm revelado que espécies de *Streptomyces* possuem genomas grandes (8–10 Mb) e alto conteúdo GC (>70%), características que favorecem a presença de múltiplos clusters de genes biossintéticos, aumentando sua diversidade química e adaptativa.

Paralelamente, o mercado brasileiro de bioinsumos vem crescendo de maneira contínua, movimentando R\$ 4,35 bilhões na safra 2024/25 e consolidando o país como referência global. O uso de microrganismos antagonistas surge como estratégia promissora dentro do Manejo Integrado de Doenças, reduzindo a dependência de fungicidas químicos tradicionais.

Nesse contexto, a combinação de avaliação antifúngica, extração de DNA de alta qualidade e sequenciamento híbrido (Illumina + Nanopore) permite acessar, caracterizar e prever o potencial biossintético de linhagens selecionadas.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antifúngica e caracterizar o potencial biossintético do isolado *Streptomyces albidoflavus* LABIM42, desde a extração do DNA até a identificação de clusters de genes biossintéticos associados à produção de metabólitos secundários.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1. Fungos Fitopatogênicos**

As doenças causadas por fungos representam uma das maiores ameaças à produção agrícola global, podendo ocasionar perdas entre 10% e 15% das principais culturas, resultando em prejuízos bilionários (PENG et al., 2021). O Brasil, devido à

sua diversidade climática, extensas áreas cultivadas e ciclos de monocultura, apresenta condições favoráveis ao estabelecimento de importantes fitopatógenos.

Entre os principais fungos de relevância econômica encontram-se *Fusarium oxysporum*, *Cercospora kikuchii* e *Macrophomina phaseolina*, todos associados a doenças de grande impacto em culturas como soja, feijão e algodão. Esses três patógenos foram utilizados nos ensaios deste trabalho devido à sua importância agrônômica e ao desafio que representam para o manejo convencional.

O aumento de resistência a fungicidas químicos e as preocupações ambientais têm impulsionado a busca por alternativas baseadas em microrganismos antagonistas, definidos como organismos capazes de inibir ou suprimir o crescimento de patógenos por mecanismos como antibiose, competição por nutrientes, indução de resistência ou produção de enzimas líticas.

## **2.2 Cenário Atual do Mercado de Bio defensivos**

O mercado global de produtos biológicos agrícolas tem apresentado um crescimento exponencial, impulsionado pela demanda por práticas agrícolas sustentáveis e pela necessidade de novas ferramentas para o manejo de resistência de pragas e doenças. O Brasil ocupa uma posição de liderança mundial na adoção dessas tecnologias. Dados recentes indicam que o mercado de bio defensivos no Brasil movimentou cerca de R\$ 4,35 bilhões na safra 2024/25, representando um crescimento de aproximadamente 18% em relação ao ciclo anterior (KYNETEC, 2025).

Esse cenário coloca o Brasil como um dos protagonistas globais no setor, com taxas de adoção superiores à média internacional, especialmente em grandes culturas como soja, milho e cana-de-açúcar. Estima-se que a área tratada com bio insumos no país já ultrapasse os 80 milhões de hectares, com projeções de que o setor continue crescendo nos próximos anos, impulsionado por políticas públicas favoráveis, como o Programa Nacional de Bio insumos, e pelo aumento da oferta de produtos registrados (CROPLIFE BRASIL, 2024).

## **2.3. Ação Integrada: Químicos e Biológicos no Manejo de Doenças**

Embora o crescimento dos biológicos seja expressivo, o consenso técnico-científico atual aponta para a eficiência da ação integrada entre o controle químico e o biológico, dentro das diretrizes do Manejo Integrado de Pragas e Doenças

(MIP/MID). A utilização isolada de fungicidas químicos, embora eficaz para o controle de choque e redução rápida do inóculo, tem enfrentado desafios relacionados à seleção de patógenos resistentes e à pressão regulatória por menores resíduos em alimentos e no meio ambiente.

A integração dos dois métodos permite explorar a sinergia entre eles: enquanto o defensivo químico atua na proteção imediata e erradicação em momentos críticos de alta pressão, o agente biológico coloniza o nicho ecológico, oferecendo proteção residual prolongada e atuando por mecanismos distintos, como antibiose, competição por nutrientes e indução de resistência sistêmica na planta (EMBRAPA, 2024). Essa estratégia combinada não apenas preserva a vida útil das moléculas químicas, retardando o desenvolvimento de resistência, mas também promove um equilíbrio maior no agroecossistema, mantendo a produtividade com menor impacto ambiental.

#### **2.4. O Gênero *Streptomyces* e seu Potencial Biotecnológico**

Taxonomicamente inserido no filo das actinobactérias, o gênero *Streptomyces* foi descrito formalmente por Waksman e Henrici (1943) como um grupo de microrganismos aeróbios, filamentosos e formadores de esporos. Além de sua morfologia complexa, este gênero é reconhecido mundialmente como a fonte mais prolífica de antibióticos, sendo a origem de aproximadamente 70% a 80% dos fármacos desta classe disponíveis no mercado (EVANGELISTA-MARTÍNEZ et al., 2022). Essa capacidade metabólica ímpar está intrinsecamente ligada à arquitetura do seu DNA. Segundo Alam et al. (2022), os genomas de *Streptomyces* são caracteristicamente grandes (entre 8 e 10 Mb) e possuem um elevado conteúdo de Guanina e Citosina (G+C >70%). O tamanho do genoma favorece a presença de múltiplos clusters de genes biossintéticos (BGCs) em um único organismo, viabilizando a produção de uma ampla gama de compostos bioativos incluindo antifúngicos e reguladores de crescimento vegetal de grande relevância médica e agrícola e seu alto conteúdo de Guanina e Citosina favorece a adaptação a condições ambientais extremas.

#### **2.5. Exploração do Potencial Genômico: Extração e sequenciamento**

Para acessar o potencial genético de actinobactérias, especialmente do gênero *Streptomyces*, a obtenção de dados genômicos robustos inicia-se com a superação

de barreiras físicas. A extração de DNA de alta qualidade (HMW-DNA) é uma etapa crítica e apresenta desafios singulares devido à complexidade da parede celular espessa e à presença de micélio fortemente aderido ao substrato (BABADI et al., 2022). Protocolos convencionais frequentemente falham ou exigem adaptações, uma vez que métodos agressivos de lise mecânica (bead beating), apesar de aumentarem o rendimento, tendem a causar fragmentação excessiva da molécula (STOJAN et al., 2023).

Conseqüentemente, para garantir a integridade necessária para o sequenciamento, protocolos específicos para *Streptomyces* priorizam a combinação de tratamentos enzimáticos (lisozima e proteinase K) com purificação química rigorosa para remover polissacarídeos inibidores (SINGH; VIJAYAN; KUMAR, 2020; FEENEY et al., 2022). A preservação da integridade do DNA é o pré-requisito fundamental para a aplicação eficiente das tecnologias de Sequenciamento de Nova Geração (NGS).

Embora a plataforma Illumina tenha se consolidado como a tecnologia dominante devido à sua alta precisão e baixo índice de erro (PERVEZ et al., 2022), ela apresenta limitações intrínsecas ao lidar com genomas complexos e com alto conteúdo de G+C (High-GC), típicos de *Streptomyces*. O preparo de bibliotecas Illumina pode sofrer com vieses de amplificação (GC bias), e suas leituras curtas (short reads) dificultam a resolução de regiões repetitivas, impactando a uniformidade da cobertura genômica (RIBARSKA et al., 2022).

Para superar esses obstáculos, a estratégia atualmente considerada mais robusta é a abordagem híbrida. A incorporação da tecnologia de sequenciamento por nanoporos (Oxford Nanopore Technologies), como o dispositivo MinION, permite a geração de leituras ultra-longas (long reads) essenciais para fechar lacunas (gaps) deixadas pelas tecnologias de leitura curta. Segundo Pervez et al. (2022), a combinação da precisão de nucleotídeos do Illumina com a continuidade estrutural fornecida pelo Nanopore possibilita a montagem de genomas completos e de alta qualidade em actinobactérias.

## **2.6. Mineração Genômica e Descoberta de Clusters**

Anteriormente a descoberta de metabólitos dependia exclusivamente do cultivo em laboratório, isso limitava o acesso a compostos cujos genes permanecem

"silenciosos" *in vitro*. A mineração genômica (*genome mining*) aparece como uma ferramenta para a identificação desses Clusters de Genes Biossintéticos (BGCs) diretamente no genoma (ALAM et al., 2022).

Ferramentas bioinformáticas como o antiSMASH (*Antibiotics and Secondary Metabolite Analysis Shell*) são fundamentais nesse processo. Em sua versão mais recente, o software utiliza modelos de perfil oculto de Markov (HMM) para prever com alta acurácia domínios enzimáticos e classificar metabólitos como policetídeos (PKS) e peptídeos não ribossomais (NRPS) (BLIN et al., 2023). Posteriormente, a análise de similaridade de redes, realizada por ferramentas como o BiG-SCAPE, permite agrupar esses BGCs em famílias genéticas e compará-los com bancos de dados globais, acelerando a identificação de novos compostos com potencial biotecnológico (NAVARRO-MUÑOZ et al., 2019).

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Microrganismo e Condições de Cultivo**

O isolado *Streptomyces albidoflavus* LABIM 42 encontra-se depositado na Coleção de Culturas do Laboratório de Biotecnologia Microbiana (LaBiM). A linhagem é criopreservada sob -80°C, em tubos criogênicos contendo meio Tryptone Soy (TS) suplementado com 20% de glicerol. Para a ativação, a linhagem foi estriada em placas de Petri contendo meio Tryptone Soy Agar (TSA) (1,5% de ágar) e incubada a 28°C por 48 horas. Posteriormente, uma colônia isolada foi inoculada em meio líquido Luria Bertani (LB) sem ágar e incubada em shaker de agitação orbital a 28°C e 200 rpm por 7 dias para produção de biomassa.

#### **3.2 Avaliação antifúngica**

O microrganismo antagonista *Streptomyces albidoflavus* LABIM42 foi ativado em meio TSA a 28 °C por 48 h. Colônias ativas foram utilizadas para preparar uma suspensão ajustada ao padrão McFarland 0,5. Em seguida, 400 µL foram utilizados como inóculo em Erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de meio LB, incubados a 28 °C por 18 h. Após esse período, 400 µL do pré-cultivo foram transferidos para novo Erlenmeyer contendo 80 mL de LB fresco, incubado por 72 h, obtendo-se uma cultura ativa para o teste.

O ensaio de cultura dupla foi conduzido em placas contendo BDA. Os fungos *Fusarium oxysporum*, *Cercospora kikuchii* e *Macrophomina phaseolina* foram escolhidos devido à sua importância agrônômica. Cada patógeno foi inoculado em uma extremidade da placa e LABIM42 foi inoculado na extremidade oposta (10 µL da cultura ativa). As placas foram incubadas a 28 °C por 5–7 dias. A inibição foi mensurada comparando o avanço micelial nos tratamentos com o controle (fungo isolado).

### **3.3 Extração de DNA Genômico**

A extração de DNA genômico foi realizada no sistema automatizado Extracta 16 (Loccus), baseado em partículas magnéticas. A etapa de lise incluiu tratamento enzimático com lisozima seguido de agitação mecânica com beads, garantindo ruptura eficiente da parede celular espessa típica de actinobactérias.

A integridade foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1%, a pureza foi estimada via espectrofotômetro NanoDrop (razão A260/A280), e a concentração foi medida com Qubit (quantificação específica para DNA de dupla fita). Valores elevados no Nanodrop em comparação ao Qubit indicaram presença de RNA residual, o que não compromete as etapas subsequentes de sequenciamento.

### **3.4. Sequenciamento de Nova Geração (NGS)**

O sequenciamento de leituras curtas foi realizado na plataforma Illumina NextSeq, gerando dados paired-end 2×150 pb. As leituras foram avaliadas com FastQC.

Para complementar a montagem, realizou-se o sequenciamento de leituras longas na plataforma Oxford Nanopore Technologies – MinION, utilizando o kit Rapid Sequencing DNA V14 (SQK-RBK114.96). O basecalling foi executado pelo Guppy, e leituras foram filtradas por qualidade (Q>7).

### **3.5. Montagem Genômica e Anotação**

A montagem do genoma foi conduzida através de uma estratégia interativa para maximizar a contiguidade. As leituras processadas foram montadas inicialmente

utilizando o software SPAdes (BANKEVICH et al., 2012). Os contigs obtidos foram submetidos ao software Medusa para scaffolding, utilizando genomas de referência de espécies filogeneticamente próximas. Para a consolidação final, utilizou-se a ferramenta RagTag (ALONGE et al., 2022) para correções de montagem e scaffolding baseado em homologia. Visando a integração dos dados, e melhoria da montagem, também foi utilizado um programa de montagem híbrida, que utiliza leituras curtas e longas na montagem, aplicou-se também uma abordagem híbrida utilizando o software Unicycler (WICK et al., 2017). O genoma montado foi submetido a etapas de polimento com o software Pilon, utilizando o mapeamento das leituras Illumina (BWA-MEM) para correção de erros.

### **3.6. Mineração de Metabólitos e Visualização**

A identificação de Clusters de Genes Biossintéticos (BGCs) foi realizada na plataforma antiSMASH (v.7.0). A classificação e busca de homologia utilizaram os bancos de dados MIBiG e NCBI nr via BLASTn/BLASTp. A representação gráfica circular do genoma foi gerada utilizando ferramentas Proksee.

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1. Avaliação da Atividade Antifúngica**

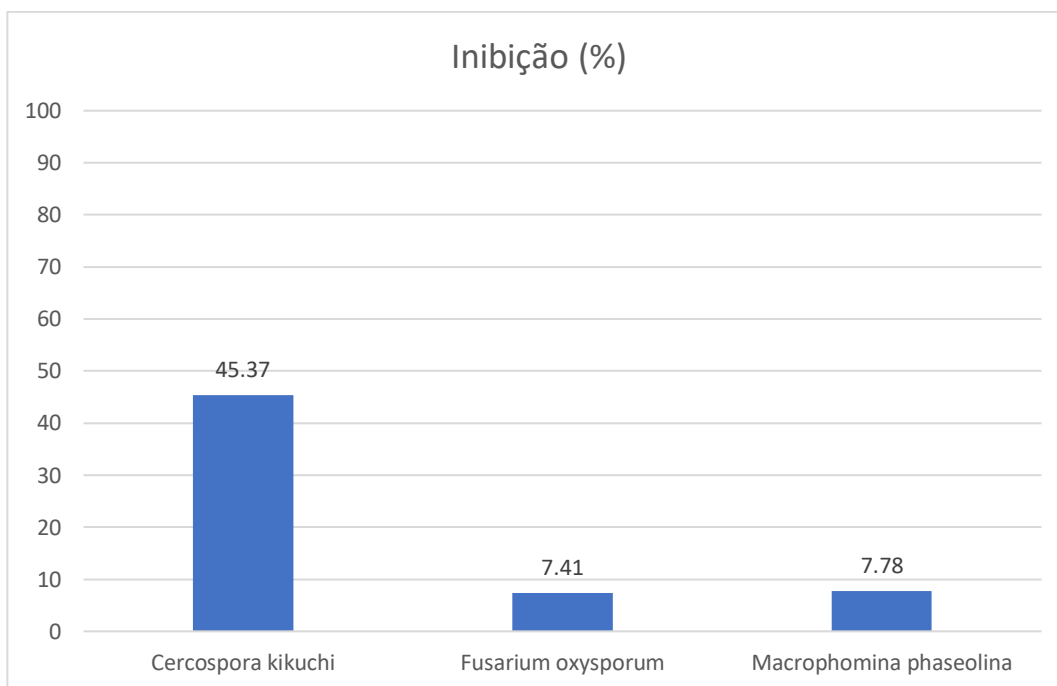
Os resultados obtidos no teste de cultura dupla demonstram que a linhagem L42 apresentou níveis diferenciados de antagonismo frente aos fitopatógenos avaliados. O maior percentual de inibição foi observado contra *Cercospora kikuchii* (45,37%), enquanto os índices para *Fusarium oxysporum* (7,41%) e *Macrophomina phaseolina* (7,78%) foram substancialmente inferiores.

Essa diferença entre os resultados pode ser explicada, pelo tempo de crescimento dos microrganismos envolvidos. No experimento realizado a linhagem L42 apresentou um crescimento lento e necessitando de um período de incubação prolongado para a fase em que a produção de metabólitos secundários é maximizada.

No caso de *C. kikuchii*, que também apresenta crescimento lento, a bactéria teve tempo hábil para se estabelecer no substrato e liberar compostos antifúngicos antes que o patógeno colonizasse a placa. Em contrapartida, *F. oxysporum* e *M. phaseolina* possuem crescimento micelial acelerado, ocupando o espaço físico rapidamente e

limitando o estabelecimento da L42 antes que esta pudesse expressar plenamente seu potencial metabólico. Portanto, a baixa inibição observada nestes casos reflete uma desvantagem competitiva temporal, sugerindo a necessidade de ensaios futuros com inoculação prévia da bactéria para permitir sua estabilização antes do confronto.

**Gráfico 1:** Resultado do teste de avaliação fungicida.



(Fonte: Autor, 2025)

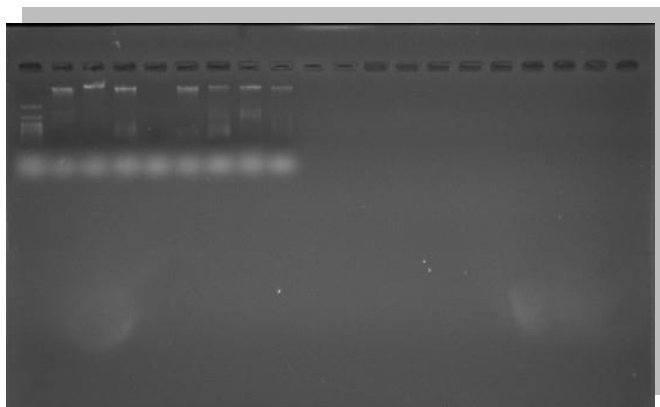
## 4.2. Extração do DNA

O protocolo de extração de DNA aplicado ao isolado de actinobactéria L42 demonstrou alta eficiência na análise celular e recuperação de ácidos nucleicos. A quantificação via espectrofotometria revelou uma concentração elevada de 463,22 ng/ $\mu$ L.

A avaliação da pureza da amostra indicou uma razão de absorbância A260/A280 de 2,08. Considerando que valores de referência para DNA puro situam-se em torno de 1,8, e valores próximos a 2,0 são característicos de RNA, este resultado sugeriu a presença de contaminação residual por RNA na amostra, o que pode levar a uma superestimativa da concentração real de DNA genômico total medida pelo espectrofotômetro. Não obstante, a quantificação específica realizada via Qubit confirmou a disponibilidade de material genético suficiente para o sequenciamento, resultando em 50,2 ng/ $\mu$ L.

Para validar a integridade do material genético e investigar a pureza indicada pela razão de absorbância, realizou-se uma eletroforese em gel de agarose (Figura 1).

**Figura 1:** Eletroforese realizada para validação do procedimento de extração do DNA.



(fonte: Autor)

A análise do perfil eletroforético corroborou os dados espectrofotométricos. Observou-se a presença de uma banda de alto peso molecular com mobilidade reduzida, correspondente ao DNA genômico (gDNA) da actinobactéria L42. Simultaneamente, notou-se uma mancha difusa e intensa de baixo peso molecular (na parte inferior do gel), característica da presença de RNA que não foi totalmente degradado durante o processo de extração.

Apesar da presença de RNA, a visualização da banda de gDNA confirmou que houve recuperação satisfatória de material genético de alto peso molecular. É importante ressaltar que, para fins de sequenciamento de nova geração (NGS), a presença de RNA residual não inviabiliza a amostra, uma vez que as etapas subsequentes de preparação de bibliotecas (como purificação com *beads* magnéticas ou seleção de tamanho) removem fragmentos pequenos, isolando o DNA de interesse. Desta forma, a amostra de L42 foi considerada apta para o envio ao sequenciamento na plataforma Illumina.

### 4.3. Sequenciamento

O sequenciamento do genoma de *Streptomyces albidoflavus* LABIM 42 foi realizado através de uma abordagem híbrida, combinando a alta precisão da plataforma Illumina com a capacidade de leitura longa da plataforma MinION (Oxford Nanopore Technologies).

A etapa de sequenciamento Illumina gerou leituras curtas (paired-end) de alta qualidade, essenciais para a correção de erros em nível de nucleotídeo e para a

montagem inicial dos contigs. No entanto, devido ao alto conteúdo GC (característico do gênero *Streptomyces*) e à presença de sequências repetitivas, a montagem baseada exclusivamente nestas leituras apresentou limitações na contiguidade, resultando em um genoma fragmentado.

Para superar essas barreiras, o sequenciamento via MinION foi fundamental. Esta tecnologia gerou leituras longas que atuaram como "âncoras" moleculares, permitindo a resolução de regiões complexas e o scaffolding (ordenamento) dos contigs gerados pelo Illumina. Conforme discutido por Pervez et al. (2022), essa estratégia híbrida é atualmente a mais robusta para microrganismos com genomas complexos, pois minimiza o viés de amplificação (GC bias) das plataformas de segunda geração.

#### **4.4. Montagem Genômica e Métricas de Qualidade**

A montagem *de novo* foi avaliada comparativamente em duas etapas principais: a montagem inicial com leituras curtas (utilizando o software SPAdes) e a montagem híbrida final (refinada com RagTag/MinION). Os dados comparativos das métricas de qualidade, obtidos através do software QUAST, estão sumarizados na Tabela 2.

A montagem inicial (L42) resultou em um genoma de 7.222.165 pb, fragmentado em 49 contigs. O valor de N50 métrica estatística que indica que 50% do genoma está contido em contigs desse tamanho ou maiores foi de 444.368 pb. Embora satisfatório para identificação de genes isolados, esse nível de fragmentação dificulta a prospecção completa de *clusters* biossintéticos grandes, que podem estar quebrados entre diferentes contigs (ALAM et al., 2022).

Com a incorporação das leituras longas do MinION e o uso da ferramenta RagTag para *scaffolding*, houve uma melhoria drástica na integridade do genoma. O número de contigs foi reduzido de 49 para apenas 5. O tamanho total do genoma aumentou ligeiramente para 7.239.012 pb, e o N50 saltou para 7.146.026 pb. Este valor de N50 corresponde a média do tamanho dos contigs referente a montagem, indicando que o cromossomo principal da bactéria foi recuperado quase integralmente em uma única sequência contínua.

**Tabela 1.** Comparação das métricas de montagem do genoma de *S. albidoflavus* LABIM 42

utilizando apenas Illumina (SPAdes) e a estratégia Híbrida (Illumina + MinION).

Métrica	Illumina (SPAdes)	Híbrida (Illumina + MinION)
Número de Contigs ( $\geq 500$ bp)	49	5
Tamanho Total (pb)	7.222.165	7.239.012
Maior Contig (pb)	1.284.264	7.146.026
N50 (pb)	444.368	7.146.026
L50	5	1
Conteúdo G+C (%)	72,99%	73,36%
N's por 100 kbp	0	321,87

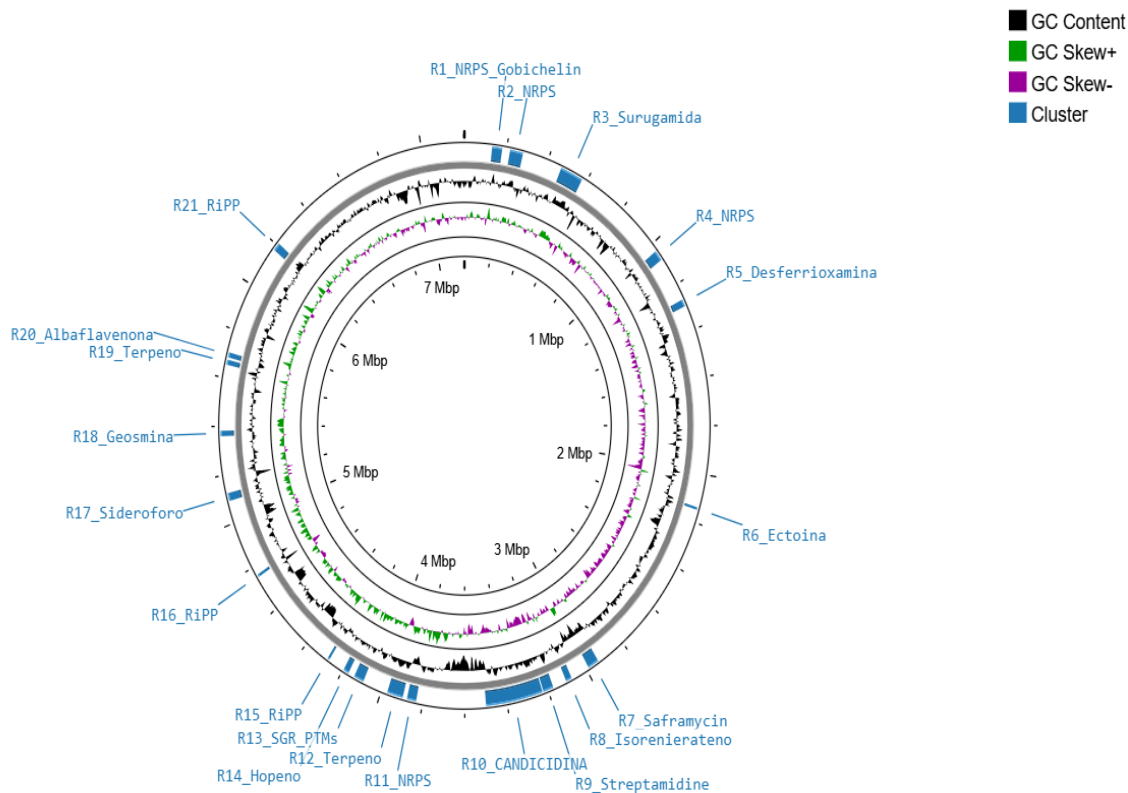
(Fonte: autor, 2025)

#### 4.5. Anotação Funcional e de Metabolismo Secundário

A anotação funcional do genoma de *Streptomyces albidoflavus* LABIM42 revelou ampla versatilidade metabólica. A classificação por categorias funcionais (COG e KEGG), organizada pelo pipeline RAST/Proksee, está apresentada na Tabela 3A. A presença predominante de genes ligados ao metabolismo de carboidratos (12,8%), aminoácidos e derivados (11,5%) e cofatores/vitaminas (9,7%) é condizente com o estilo de vida saprofítico do gênero *Streptomyces*, conforme descrito por Evangelista-Martínez et al. (2022) e Alam et al. (2022).

Adicionalmente, genes agrupados nas categorias “Virulência, Doença e Defesa” (5,2%) e “Resposta ao Estresse” (4,4%) reforçam o potencial da linhagem para sobreviver em ambientes competitivos e com desafios químicos, incluindo solos contendo resíduos de defensivos — padrão comum entre espécies de solo com elevado fitness ecológico (Feeney et al., 2022).

Figura 2: Distribuição das categorias de subsistemas funcionais do genoma de *S. albidoflavus* LABIM 42, obtida via plataforma Proksee.



### Streptomyces albidoflavus LABIM 42

(Fonte: Autor, 2025)

#### 4.6. Identificação Taxonômica

A identificação taxonômica definitiva do isolado LABIM 42 foi realizada através da análise de Identidade Média de Nucleotídeos (ANI), comparando o genoma montado contra um banco de dados de espécies tipo do gênero. Os resultados obtidos demonstraram que o genoma de LABIM 42 apresenta 97,60% de identidade com a cepa de referência *Streptomyces albidoflavus* NBC 01110, conforme apresentado na Tabela 2.

De acordo com os critérios taxonômicos atuais, que estabelecem um limiar de 95% a 96% de ANI para a delimitação de espécies procarióticas (RICHTER; ROSSELLÓ-MÓRA, 2009), confirma-se a identidade do isolado como pertencente à espécie *Streptomyces albidoflavus*.

A análise também revelou uma proximidade filogenética com *Streptomyces koyangensis* (95,51%), sugerindo que esta pode ser uma espécie irmã ou um sinônimo

taxonômico próximo. Em contrapartida, as demais espécies comparadas apresentaram valores de identidade significativamente inferiores (<92%), como observado para *Streptomyces diastaticus* e *Streptomyces rutgersensis*, evidenciando a distinção do isolado em relação a outros grupos do gênero.

**Tabela 2.** Valores de Identidade Média de Nucleotídeos (ANI) obtidos na comparação entre o genoma do isolado LABIM 42 e espécies-tipo do gênero *Streptomyces*.

Espécie de Referência	Identidade (ANI %)	Status
<i>Streptomyces albidoflavus</i>	97,6	Mesma espécie
<i>Streptomyces koyangensis</i>	95,51	Fronteira de espécie
<i>Streptomyces diastaticus</i>	91,79	Espécie distinta
<i>Streptomyces rutgersensis</i>	91,77	Espécie distinta

(Fonte: Próprio autor, 2025)

#### 4.7. Mineração de Metabólitos

A mineração genômica realizada com a ferramenta antiSMASH (v. 8.0.4) no genoma de *Streptomyces albidoflavus* LABIM 42 revelou um arsenal metabólico robusto, totalizando 21 regiões de clusters de genes biossintéticos (BGCs), como mostra a Tabela 3. A diversidade de classes químicas encontradas incluindo poliquetídeos (PKS), peptídeos não-ribossomais (NRPS), terpenos e sideróforos fundamenta o potencial desta linhagem como um agente multifuncional para a agricultura sustentável. A seguir, discute-se a aplicação prática dos principais compostos identificados.

##### 4.7.1. Atividade Antifúngica

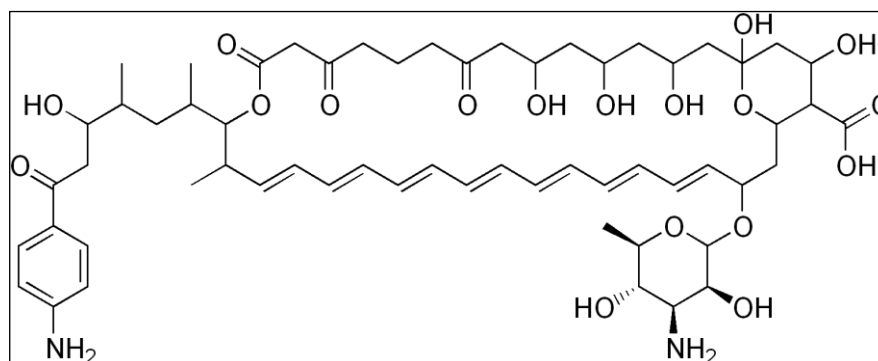
O cluster híbrido T1PKS/NRPS identificado na Região 10 apresenta alta similaridade com o gene cluster da candicidina, um macrolídeo polieno cuja ação antifúngica é amplamente documentada. A candicidina se liga ao ergosterol da membrana fúngica, promovendo formação de poros e extravasamento celular (Guo; Yin; Ping, 2008). Estudos recentes também confirmam sua atividade contra fungos filamentosos de importância agrícola (Evangelista-Martínez et al., 2022).

Dessa forma, a presença desse cluster sugere que a linhagem LABIM42 possui

capacidade genética para atuar no controle de doenças radiculares e foliares, reduzindo a necessidade de fungicidas sintéticos alinhado às recomendações recentes para sistemas agrícolas sustentáveis.

A Figura 3 apresenta a estrutura química da candicidina, conforme descrita originalmente por Guo, Yin e Ping (2008).

Figura 3. Estrutura química da candicidina



(Fonte: Autor, 2025)

#### 4.7.2. Promoção de Crescimento e Competitividade: Sideróforos

Os clusters presentes nas Regiões 5 (Desferrioxamina B) e 17 (sideróforo putativo) indicam forte capacidade siderofórica da linhagem. Sideróforos são reconhecidos como moléculas essenciais para o fitness microbiano no solo e como importantes componentes na promoção de crescimento vegetal (Feeney et al., 2022).

No contexto agrícola, possuem duas funções principais:

Biocontrole por competição: sideróforos sequestram ferro livre no solo, reduzindo a disponibilidade para fitopatógenos como *Fusarium* e *Cercospora*, que dependem do metal para germinação e virulência.

Promoção de crescimento vegetal: plantas conseguem internalizar complexos ferro-sideróforo, especialmente em solos pobres, melhorando o metabolismo do ferro e aumentando vigor e biomassa (Alam et al., 2022).

A presença desses clusters reforça o potencial de LABIM42 como bioinoculante multifuncional.

#### 4.7.3. Resistência ao Estresse Ambiental: Ectoína

A Região 6 corresponde ao cluster de biossíntese da ectoína, um soluto compatível associado à tolerância contra estresse osmótico e térmico. Em

actinobactérias do solo, a ectoína atua estabilizando proteínas e estruturas celulares, garantindo sobrevivência em ambientes secos, salinos ou com variações térmicas (Stojan et al., 2023).

A presença deste cluster indica vantagem ecológica e tecnológica para formulações de bioinoculantes, colaborando para a persistência de LABIM42 em condições adversas de campo.

#### **4.7.4 Arsenal Antimicrobiano Auxiliar: Surugamidas e Macrolactamas**

Além da candidicina, o genoma apresentou clusters para Surugamidas (Região 3) e Macrolactamas Tetramato Policíclicas (SGR PTMs, Região 13).

As surugamidas são peptídeos cíclicos com atividade inibitória de proteassoma, ampliando o espectro de defesa da bactéria e oferecendo vantagem competitiva especialmente contra patógenos capazes de desenvolver resistência a outros mecanismos antimicrobianos. Da mesma forma, os compostos do grupo SGR-PTMs, frequentemente associados à defesa contra competidores microbianos e predadores como nematoides e amebas de solo, reforçam a capacidade de persistência e manutenção do inoculante em ambientes rizosféricos complexos. No contexto da sinalização volátil e pigmentação, os clusters de terpenos desempenham papéis ecológicos essenciais. Entre eles, destacam-se a geosmina (Região 18), reconhecida como marcador de atividade microbiana no solo, e a albaflavenona (Região 20), um sesquiterpeno com atividade antibiótica comprovada, contribuindo para a supressividade natural contra fitopatógenos. Além disso, o isorenierateno (Região 8), um carotenoide com propriedades protetoras contra danos oxidativos e radiação UV, sugere que a linhagem LABIM42 possui maior tolerância a exposição solar, o que pode favorecer sua aplicação também na fitosfera, garantindo maior viabilidade em ambientes de alta radiação quando comparada a linhagens não pigmentadas.

**Tabela 3:** *Resumo dos Clusters Biossintéticos*

<b>Região</b>	<b>Classe</b>	<b>Função Biológica</b>	<b>Aplicação Agrícola Potencial (Justificativa)</b>
---------------	---------------	-------------------------	---

		<b>Principal</b>	
<b>5, 17</b>	<b>Sideróforos</b>  <i>(Desferrioxamina B, NI-siderophore)</i>	Quelantes de Ferro	<b>Biocontrole e Promoção de Crescimento:</b>  1. <b>Competição:</b> Sequestram o ferro do solo, impedindo o crescimento de fitopatógenos que dependem desse metal.  2. <b>Nutrição:</b> Podem fornecer ferro diretamente para as raízes das plantas em solos pobres.
<b>10</b>	<b>Candicidina</b>  <i>(T1PKS)</i>	Antifúngico Potente (Polieno)	<b>Fungicida Biológico:</b>  Este é um dos compostos mais valiosos para agricultura nesta cepa. A candicidina é altamente eficaz contra fitopatógenos fúngicos (ex: <i>Candida</i> , e fungos filamentosos), protegendo sementes e raízes contra podridões.
<b>6</b>	<b>Ectoína</b>	Osmoprotetor	<b>Resistência a Estresse:</b>  Permite que a bactéria sobreviva e colonize solos salinos ou sob seca severa. Um inoculante com ectoína é mais estável e eficiente em campo sob condições

			climáticas adversas.
3	<b>Surugamida</b>  ( <i>NRPS</i> )	Inibidor de Proteassoma / Peptídeo Cíclico	<b>Biodefensa:</b>  Estudos indicam atividade contra certos oomicetos e fungos. Pode atuar sinergicamente com outros compostos para suprimir doenças complexas no solo.
13	<b>SGR PTMs</b>  ( <i>Macrolactamas</i> <i>Tetramato</i> <i>Policíclicas</i> )	Antibiótico / Antifúngico	<b>Proteção de Cultivos:</b>  Esta classe de moléculas possui amplo espectro de atividade contra fungos fitopatogênicos e bactérias, reforçando o arsenal de biocontrole da linhagem.
18, 20	<b>Terpenos</b>  ( <i>Geosmina</i> , <i>Albaflavenona</i> )	Voláteis / Antibióticos	<b>Sinalização e Inibição:</b>  <b>Geosmina:</b> Indica colonização ativa no solo (cheiro de terra).  <b>Albaflavenona:</b> Atua como antibiótico antibacteriano e antifúngico, contribuindo para a "supressividade" do solo contra doenças.
8	<b>Isorenierateno</b>	Pigmento Carotenoide	<b>Proteção UV / Antioxidante:</b>  Protege a própria bactéria contra

			radiação UV e estresse oxidativo, aumentando a sobrevivência do inoculante quando aplicado na superfície das folhas (filosfera).
1, 2, 4	<b>NRPS (Desconhecidos)</b>	Peptídeos Não-Ribossomais	<b>Fonte de Novas Moléculas:</b>  Por terem baixa similaridade com compostos conhecidos, representam alvos para a descoberta de <b>novos bioinseticidas ou herbicidas biológicos.</b>

(Fonte: Elaborada pelo autor com base nos dados do antiSMASH (2025)).

#### 4.8. Comparação Genômica entre *Streptomyces albidoflavus* LABIM42 e o Genoma de Referência NBC 01110

A comparação genômica entre o isolado LABIM42 e o genoma de referência *Streptomyces albidoflavus* NBC 01110 (RefSeq GCF\_003693155.1) permitiu identificar diferenças estruturais e metabólicas relevantes que ajudam a explicar o comportamento fenotípico observado nos ensaios antifúngicos e o potencial biotecnológico expandido da linhagem utilizada neste estudo.

O genoma NBC 01110 representa o material de referência mais próximo de LABIM42, com 97,6% de identidade ANI, confirmando pertencimento à mesma espécie. Apesar da proximidade evolutiva, diferenças expressivas foram encontradas nos clusters biossintéticos e no conteúdo gênico total.

##### 4.8.1. Comparação das Métricas Genômicas

Tabela 4 — Comparação entre o genoma LABIM42 (este estudo) e o genoma NBC 01110 (NCBI)

Parâmetro Genômico	LABIM42 (Híbrido Illumina+MinION)	–	NBC 01110 (RefSeq)
Tamanho total (pb)	7.239.012		7.082.355

GC (%)	73,36%	72,99%
Nº de genes CDS	~6.650	~6.320
Nº de BGCs (antiSMASH 7.0)	21	16

(Fonte: Autor, 2025)

#### 4.8.2. Comparação dos Clusters Biossintéticos

A análise dos clusters biossintéticos revelou diferenças marcantes entre LABIM42 e o genoma NBC 01110, utilizado como referência. Ambos compartilham o conjunto metabólico central típico de *Streptomyces albidoflavus*, incluindo os clusters de Candicidina (T1PKS/NRPS), Desferrioxamina B, Ectoína e terpenos como Geosmina e Albaflavenona, indicando conservação das vias essenciais relacionadas à competição microbiana básica e resposta a estresses ambientais. Entretanto, LABIM42 apresenta expansão significativa do repertório biossintético, com cinco clusters adicionais ausentes em NBC 01110: Surugamidas, SGR-PTMs, Isorenierateno, um cluster NRPS de sideróforo adicional e um terpeno não identificado. Esses clusters exclusivos sugerem ganho funcional e maior diversidade metabólica, associados a atividades antifúngicas ampliadas, melhor aquisição de ferro e adaptação a ambientes de alta competição. Em contraste, NBC 01110 apresenta arquitetura mais conservada, com menor plasticidade genômica e ausência dessas vias especializadas, reforçando que LABIM42 representa uma variante evolutivamente enriquecida, com potencial metabólico superior ao genoma de referência.

## 5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos demonstram que a linhagem estudada possui potencial para produzir metabólitos antifúngicos relevantes. A combinação de análises laboratoriais e genômicas permitiu uma visão mais ampla da capacidade biossintética do microrganismo, apontando caminhos para futuras etapas de identificação e

validação química desses compostos. O trabalho contribui, portanto, para o desenvolvimento de alternativas biotecnológicas no controle de fungos patogênicos agrícolas.

## REFERÊNCIAS

- ALAM, K. et al. *Streptomyces*: the biofactory of secondary metabolites. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, p. 1-17, 2022.
- ALONGE, M. et al. Automated assembly scaffolding using RagTag elevates a new tomato system for high-throughput genome editing. **Genome Biology**, v. 23, n. 1, p. 258, 2022.
- BABADI, Z. K. et al. Combination and improvement of conventional DNA extraction methods for actinobacteria. **Iranian Journal of Microbiology**, v. 14, n. 3, p. 250-260, 2022. DOI: <https://doi.org/10.18502/ijm.v14i3.9788>.
- BANKEVICH, A. et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. **Journal of Computational Biology**, v. 19, n. 5, p. 455–477, 2012.
- BLIN, K. et al. antiSMASH 7.0: new and improved predictions for detection, regulation, chemical structures and visualisation. **Nucleic Acids Research**, v. 51, n. W1, p. W46–W50, 2023.
- BOSI, E. et al. MeDuSa: a multi-draft based scaffolder. **Bioinformatics**, v. 31, n. 15, p. 2443–2451, 2015.
- CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos**: v. 12, safra 2024/25, n. 7, sétimo levantamento, abril 2025. Brasília: Conab, 2025.
- CROPLIFE BRASIL. **Adoção de bioinsumos cresce 13% na safra 2024/2025 e consolida Brasil como referência global**. Comunicado Técnico. Brasília: CropLife Brasil, 2024. Disponível em: <https://croplifebrasil.org/adocao-de-bioinsumos-cresceu-13-na-safra-2024-2025>. Acesso em: nov. 2025.
- EMBRAPA. **Resultados do manejo integrado de pragas da soja na safra 2023/2024 no Paraná**. Documentos, 467. Londrina: Embrapa Soja, 2024.
- EVANGELISTA-MARTÍNEZ, Z. et al. Secondary metabolites produced by *Streptomyces* spp. **Microorganisms**, v. 10, n. 1, p. 25, 2022.
- FEENEY, M. A. et al. ActinoBase: a community resource for actinobacterial research. **FEMS Microbiology Letters**, v. 369, n. 1, p. 1-7, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1093/femsle/fnab249>.
- GUO, X.; YIN, H.; PING, W. Identification of *Streptomyces* sp. strain and its antifungal activity. **Wei sheng wu xue tong bao (Microbiology)**, v. 35, n. 4, p. 548-552, 2008.
- GUREVICH, A. et al. QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. **Bioinformatics**, v. 29, n. 8, p. 1072–1075, 2013.

ILLUMINA. **Illumina DNA Prep Reference Guide**. San Diego: Illumina, 2023. Disponível em: <https://support.illumina.com>.

KYNETEC. **FarmTrak Bioinsumos**: Mercado de biodefensivos no Brasil movimentou R\$ 4,35 bilhões na safra 2024/25. Relatório de Mercado. São Paulo: Kynetec Brasil, 2025.

NAVARRO-MUÑOZ, J. C. et al. A computational framework for systematic exploration of biosynthetic gene clusters. **Nature Chemical Biology**, v. 16, n. 1, p. 60–68, 2019.

PENG, Y. et al. Research Progress on Phytopathogenic Fungi and Their Role as Biocontrol Agents. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 670135, 2021.

PERVEZ, M. T. et al. A comprehensive review of performance of next-generation sequencing platforms. **Computational Biology and Chemistry**, v. 96, p. 107–121, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.compbiolchem.2021.107607>.

RIBARSKA, T. et al. A comparison of library preparation methods for Illumina sequencing. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 1-12, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-022-05123-5>.

RICHTER, M.; ROSSELLÓ-MÓRA, R. Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 45, p. 19126–19131, 2009.

SEEMANN, T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. **Bioinformatics**, v. 30, n. 14, p. 2068–2069, 2014.

SINGH, A.; VIJAYAN, V.; KUMAR, S. Protocols for isolation of high-quality genomic DNA from *Streptomyces* species. **Methods in Molecular Biology**, v. 2106, p. 55-66, 2020. DOI: [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0247-8\\_5](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0247-8_5).

STOJAN, I. et al. Evaluation of DNA extraction methods and direct PCR in marine bacterial communities. **Frontiers in Microbiology**, v. 14, p. 1-12, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1134455>.

WAKSMAN, S. A.; HENRICI, A. T. The nomenclature and classification of the actinomycetes. **Journal of Bacteriology**, v. 46, n. 4, p. 337–341, 1943.

WALKER, B. J. et al. Pilon: an integrated tool for comprehensive microbial variant detection and genome assembly improvement. **PLoS ONE**, v. 9, n. 11, p. e112963, 2014.

WICK, R. R. et al. Unicycler: resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. **PLoS Computational Biology**, v. 13, n. 6, p. e1005595, 2017.

WYDRO, U. et al. Soil microbiome study based on DNA extraction: a review. **Water**, v. 14, n. 17, p. 1-18, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/w14172725>.

ZHANG, Y. et al. Evaluation of DNA extraction methods for microbial genomics from woody substrates. **Frontiers in Microbiology**, v. 15, p. 1-15, 2024. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1271469>.