

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA
AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

Marcela Proença Borba

**ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR E PRODUTOS NATURAIS DE
Streptomyces ISOLADOS DA ANTÁRTICA**

Porto Alegre
2021

Marcela Proença Borba

**ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR E PRODUTOS NATURAIS DE
Streptomyces ISOLADOS DA ANTÁRTICA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de doutora em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Sueli Van Der Sand

Porto Alegre

2021

CIP - Catalogação na Publicação

Borba, Marcela
ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR E PRODUTOS
NATURAIS DE Streptomyces ISOLADOS DA ANTÁRTICA /
Marcela Borba. -- 2021.
182 f.
Orientadora: Sueli Van Der Sand.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde,
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e
do Ambiente, Porto Alegre, BR-RS, 2021.

1. Actinobacteria. 2. Antimicrobianos. 3. PCR
fingerprinting. 4. Atividade antimicrobiana. 5.
Espectometria de massas. I. Van Der Sand, Sueli,
orient. II. Título.

Apesar de você
Amanhã há de ser
Outro dia
Você vai ter que ver
A manhã renascer
E esbanjar poesia
Como vai se explicar
Vendo o céu clarear
De repente, impunemente?
Como vai abafar
Nosso coro a cantar
Na sua frente?

Francisco Buarque de Hollanda

AGRADECIMENTOS

Ao povo brasileiro que custeou toda minha escolaridade, desde a Escola Estadual de Ensino Fundamental Anne Frank, seguida pelo Colégio Estadual Florinda Tubino Sampaio até a Universidade Federal do Rio Grande Sul.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, minha casa durante toda minha trajetória acadêmica, da graduação e mestrado ao doutorado, pelo ensino público de qualidade e de referência.

À minha orientadora há mais de 10 anos, Prof^a. Dr^a. Sueli Van Der Sand, por sempre me acalmar com sua tranquilidade e flexibilidade, além de confiar no andamento do meu trabalho.

Ao Prof. Dr. Paris Lavin pela parceria científica que vem sendo firmada desde o XXI Congresso Latinoamericano de Microbiologia em 2012.

À Prof^a. Dr^a. Andreza Martins pelos milhares de e-mails trocados e reuniões com dúvidas de bioinformática.

À Dra. Olga Genilloud por aceitar minha proposta de doutorado sanduíche e por escrever tantos documentos durante as 3 tentativas, ao Dr. Ignacio Gonzalez por me receber em seu laboratório, à Mercedes de la Cruz pela empatia e a todos funcionários da Fundación MEDINA que estiveram presentes em meus experimentos.

A todos colegas que passaram pelo Laboratório de Microbiologia Aplicada durante o período do meu doutorado e que de alguma forma contribuíram para o meu crescimento profissional e pessoal, com destaque às minhas colegas e agora amigas, Gabriele Saldanha e Roberta Boff.

Às minhas queridas alunas de iniciação científica, Ana Elisa Ballarini, Renata Lameira e Ana Paula Ferrero por compartilhar os desesperos e as gargalhadas. Incluo o agora mestrando João Witusk, que nunca foi “meu”, mas sinto como se fosse, por tantos anos de colaboração.

A todos os participantes da Ação COVID-19, em especial à equipe *PCR*, por renovar minha esperança na humanidade e na ciência durante a pandemia.

Ao meu noivo, Voltaire Neto, por sempre acreditar no meu sucesso, muitas vezes mais do que eu mesma, e pelo companheirismo nos bons e maus momentos aos quais um casal de estudantes de pós-graduação é submetido.

Aos meus pais, Fátima Proença e Ricardo Borba, por nunca ter sido cobrada por “só estudar”. Aos meus irmãos, Leonardo e Pedro, pelo amor em todos

os instantes. À minha irmã, Fernanda Rutkoski, pela presença segura e estável. Ao meu tio Dr. José Vanderlei Borba e a minha madrinha Valesca Borba que foram meus exemplos de dedicação e caminhos a serem seguidos.

Às minhas amigas Alice Orofino, Thays Bueno, Anna Grillo, Marina Coelho, Bruna Gentil e Martina Gomes por trazerem leveza à minha vida e por me ensinarem a lutar. Ao meu amigo Pedro Henrique Fonseca por entender como ninguém minhas angústias dentro e fora da academia. “A gente não tá só.”

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa.

ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR E PRODUTOS NATURAIS DE *Streptomyces* ISOLADOS DA ANTÁRTICA

Autora: Marcela Proença Borba

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Sueli Van Der Sand

Streptomyces é o gênero bacteriano mais promissor na pesquisa de produtos naturais, desde a Era de Ouro das descobertas de antibióticos até recentemente com a perspectiva dos grupos de genes crípticos de biossíntese. Entretanto, apesar do uso internacional do sequenciamento do gene 16S rRNA para identificação de espécies bacterianas, seu uso não discrimina as 750 espécies do gênero *Streptomyces*. Neste trabalho, o padrão de amplificação gerado por BOX-PCR e REP-PCR de 49 isolados de estreptomicetos de solo antártico foi comparado para avaliar a diversidade presente no grupo e para caracterizar os isolados bacterianos, além da amplificação dos genes 16S rRNA, *rpoB*, *gyrB*, *recA*, *trpB* e *atpD*. O *primer* BOX-A1R apresentou fragmentos mais claros, diferente dos padrões obtidos usando os *primers* REP 1R e 2R. Duas bases de dados foram utilizadas, GenBank e EzBioCloud, para comparar as sequências dos genes 16S das amostras. O banco de dados GenBank mostrou-se insuficiente para análise dos outros genes, devido à escassez de sequências depositadas. O isolado LMA323St_9 demonstrou ser potencialmente uma nova espécie a ser estudada. Além disso, o uso de genes *housekeeping* fornece informações filogenéticas robustas para o entendimento das relações dentro do grupo. Ainda, investigou-se os compostos antimicrobianos de 40 isolados, fermentação em microplacas e tubos foram usadas para testagem de 10 meios de cultura distintos e os extratos resultantes foram testados contra bactérias Gram-positivas e Gram negativas, fungos filamentosos e leveduras. Os extratos ativos foram analisados por LC-UV-LRMS e HRMS. Foram encontrados 14 compostos, incluindo maltofilinas e alteramidas antifúngicas. Um isolado, identificado como LMA323St_43d, apresentou atividade antifúngica mas não foram encontrados compostos correspondentes nas bases de dados avaliadas. Este trabalho traz informações acerca de 49 isolados de *Streptomyces* com alto potencial antifúngico.

¹Tese de Doutorado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (182 p.) novembro, 2021.

ISOLATION, MOLECULAR IDENTIFICATION AND NATURAL PRODUCTS IN *Streptomyces* FROM ANTARCTIC

Author: Marcela Proença Borba

Advisor: Prof. Dr. Sueli Van Der Sand

Streptomyces is the most promising bacterial genera in natural products research, since the Golden Era of antibiotic discovery until the present time with the perspective of cryptic biosynthetic gene clusters. However, despite the worldwide use of 16S rRNA sequencing to identify bacterial species, the use of this gene does not discriminate the 750 species in the genus *Streptomyces*. In this work, amplification profiles generated from BOX-PCR and REP-PCR of 49 Antarctic soil streptomycetes were compared to evaluate the diversity present in the group and to characterize the bacterial isolates, along with 16S rRNA, *rpoB*, *gyrB*, *recA*, *trpB* and *atpD* amplifications. The BOX-A1R primer exhibit clearer amplification fragments, different from the patterns obtained using the REP 1R and 2R primers. It was used two different databases, GenBank and EzBioCloud, to compare the 16S sequences. There is a lack of deposited sequences in the other genes, as the data in GenBank proved to be insufficient. The results indicate that the use of housekeeping genes provides robust phylogenetic information, and isolate LMA323St_9 is potentially a novel species to be studied in the future. Besides that, the antimicrobial compounds produced by 40 isolates were investigated in microplates fermentations and tubes were used to test 10 different culture media and the resultant extracts were tested against Gram-negative and Gram-positive bacteria, filamentous fungi and yeasts. The active extracts were analyzed by LC-UV-LRMS and HRMS. A number of 14 compounds were found, including the antifungals maltophilin and alteramide. One isolate identified as LMA323St_43d presents antifungal activity but no relative compound in the used mass spectrometry databases was found. This work brings information about the 49 *Streptomyces* isolates with great antifungal potential.

¹Doctoral Dissertation in Agricultural and Environmental Microbiology – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (182 p.) nov, 2021.

SUMÁRIO

| | | |
|-----------|--|-----|
| 1. | INTRODUÇÃO | 1 |
| 2. | OBJETIVOS | 3 |
| 2.1 | Objetivo Geral | 3 |
| 2.2 | Objetivos Específicos..... | 3 |
| 3. | REVISÃO DA LITERATURA | 4 |
| 3.1 | Resistência Bacteriana | 4 |
| 3.2 | Produtos Naturais | 6 |
| 3.3 | <i>Streptomyces</i> | 7 |
| 3.4 | Engenharia metabólica | 9 |
| 3.5 | Antártica..... | 10 |
| 4. | MATERIAL E MÉTODOS | 13 |
| 4.1 | Isolamento | 13 |
| 4.2 | Extração de DNA | 13 |
| 4.3 | BOX-PCR..... | 14 |
| 4.4 | REP-PCR..... | 14 |
| 4.5 | Genes <i>housekeeping</i> e 16S rRNA | 15 |
| 4.6 | Árvores filogenéticas..... | 16 |
| 4.7 | <i>Multi-locus Sequence Typing</i> | 17 |
| 4.8 | Fermentações miniaturizadas | 17 |
| 4.9 | Fermentações EPA..... | 18 |
| 4.10 | Triagem de atividade antimicrobiana | 19 |
| 4.11 | Espectrometria de massas..... | 20 |
| 5. | ARTIGOS | 22 |
| 5.1. | Artigo 1..... | 23 |
| 5.2. | Artigo 2..... | 32 |
| 5.3. | Artigo 3..... | 68 |
| 6. | DISCUSSÃO GERAL | 95 |
| 7. | CONCLUSÃO | 99 |
| 8. | REFERÊNCIAS | 100 |
| 9. | APÊNDICES | 112 |
| 9.1 | Resultados por isolado | 112 |
| 9.2 | Meios de cultivo e reagentes | 161 |

LISTA DE TABELAS

| | Página |
|---|--------|
| Tabela 1 <i>Primers</i> e temperaturas de anelamento utilizados para amplificação dos genes <i>housekeeping</i> . | 16 |
| Tabela 2 Condições para triagem dos microrganismos teste | 20 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|-------------|---|
| ACA | Amido Caseína Agar |
| <i>atpD</i> | ATP sintase F1 |
| BSA | <i>Bovine serum albumin</i> |
| CAPES | Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior |
| CDC | <i>Centers for Diseases Control and Prevention</i> |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| DNA | <i>Deoxyribonucleic acid</i> |
| dNTP | <i>Deoxyribonucleotides triphosphate</i> |
| EPA | <i>Environmental Protect Agency</i> |
| ESBL | <i>Extended-spectrum β -lactamases</i> |
| GLASS | <i>Global Antimicrobial Resistance Surveillance System</i> |
| <i>gyrB</i> | DNA girase subunidade β |
| INACH | Instituto Antartico Chileno |
| MH | Mueller Hinton |
| MLST | <i>Multilocus Sequence Typing</i> |
| NCBI | <i>National Center for Biotechnology Information</i> |
| OMS | Organização Mundial da Saúde |
| PCR | <i>Polymerase chain reaction</i> |
| PFGE | <i>Pulse field gel electrophoresis</i> |
| PRINT | Programa Institucional de Internacionalização |
| <i>recA</i> | Recombinase A |
| <i>rpoB</i> | RNA polimerase subunidade β |
| rRNA | <i>Ribosomal ribonucleic acid</i> |
| SDS | <i>Sodium dodecil sulfate</i> |
| <i>trpB</i> | Triptofano sintase cadeia β |
| UFCSPA | Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre |
| MRSA | Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> |
| MSSA | Methicillin-susceptible <i>Staphylococcus aureus</i> |

1. INTRODUÇÃO

Produtos naturais microbianos representam uma das mais importantes fontes de diversidade química e estruturas bioativas. A pesquisa por estes compostos surge em resposta à urgência da necessidade por novas moléculas antibióticas contra os patógenos multirresistentes para os quais a demanda ainda não foi completamente preenchida (Genilloud, 2014). Em maio de 2014, a Organização Mundial da Saúde (OMS) publicou um relatório sobre a resistência bacteriana em nível global em virtude do alarmante surgimento e disseminação de bactérias resistentes a múltiplas drogas. Com isso, a necessidade de novos antibióticos com novos espectros de ação é o maior desafio no combate a doenças infecciosas, visto que a maioria das classes de antibióticos foram descobertas antes de 1970, com apenas quatro novas classes de antibacterianos introduzidas ao uso clínico após 2000 (Genilloud e Vicente, 2012; Silver, 2011).

Produtos naturais oriundos de bactérias do filo Actinobacteria possuem longa história e grande contribuição na saúde humana (Baltz, 2016) e ainda representam importantes fontes de novos compostos até os dias atuais (Jose e Jha, 2018; Lee et al., 2021). Com destaque à ordem Actinomycetales (Buchanan, 1917) que possui cerca de 80 gêneros importantes quanto a produção de compostos biologicamente ativos, em especial o gênero *Streptomyces*. Espécies deste gênero bacteriano são altamente promissoras quanto a produção de produtos naturais (Barka et al., 2016), porém a sistemática deste gênero é bastante complexa, com mais de três mil espécies identificadas nos anos 70. Após esforços como o *International Streptomyces Project* (Shirling e Gottlieb, 1966), atualmente há cerca de 750 espécies de estreptomicetos oficialmente reconhecidas. Os estudos que envolveram 16S rRNA (*ribosomal ribonucleic acid*) foram essenciais para determinar a taxonomia do grupo, apesar de haver diferenças entre cepas com sequências similares e até idênticas do gene em questão, mesmo com diferenças significativas de morfologia e fisiologia (Antony-Babu et al., 2017). Novas técnicas de biologia molecular permitiram o aprofundamento do estudo da filogenia do gênero, como hibridização de DNA (*deoxyribonucleic acid*) e DNA *fingerprinting*, porém nenhuma delas mostrou resolução e reprodutibilidade suficiente para se tornar um recurso na identificação das espécies (Guo et al., 2008). Já o *Multi-Locus Sequence Typing* (MLST) tem sido amplamente utilizado na caracterização de

patógenos desde a sua criação (Maiden et al., 1998) devido justamente a sua alta reprodutibilidade. A identificação correta das espécies se faz importante pois busca-se espécies desconhecidas que sejam capazes de produzir novas moléculas bioativas. Atualmente, através da análise de genomas, sabe-se que mesmo microrganismos bastante estudados ainda possuem capacidade de sintetizar vários compostos distintos. Bentley et al. (2002) sequenciaram a totalidade do genoma de *Streptomyces coelicolor* A3(2) e detectaram a capacidade de produção de pelo menos vinte metabólitos secundários, enquanto a triagem clássica resultou na obtenção de apenas cinco metabólitos (Aigle et al., 2014; Challis, 2014). Isto se dá porque a grande maioria destes metabólitos são oriundos de genes crípticos que necessitam atingir um nível de produção suficientemente grande para detecção, visto que apenas uma pequena parcela de rotas de biossíntese de metabólitos é expressa em condições usuais de cultivo bacteriano em laboratório (Baltz, 2016). A ativação das rotas de biossíntese de genes crípticos pode ser feita através da utilização de diferentes meios de cultivo (Bode et al., 2002) e da adição de substâncias não usuais a estes meios de cultivo (Ochi et al., 2014). Pode-se também fazer uso de diferentes temperaturas de incubação (Bode et al., 2002), além da indução de resistência a antimicrobianos (Hosaka et al., 2009, Tanaka et al., 2013).

Na busca por novas moléculas e com a certeza de que *Streptomyces* ainda é um gênero promissor neste quesito, busca-se também o isolamento de cepas a partir de ambientes pouco explorados e que exerçam uma grande pressão seletiva, como é o caso do continente antártico (Encheva-Malinova et al., 2014; Lavin et al., 2016; Lamilla et al., 2018). Estas características selecionam microrganismos que são capazes de se multiplicar em condições de estresse ambiental. Devido a habilidade de produção de esporos, é provável que amostras de sedimento da Antártica contenham estreptomicetos, tanto em solo quanto em ambiente marinho (Purves et al., 2016). Desta forma, o objetivo deste trabalho é o isolamento e identificação molecular de *Streptomyces* a partir de solo antártico, além da avaliação da capacidade de produção de novas moléculas bioativas quando em cultivo em diferentes condições nutricionais.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Este trabalho tem como objetivo geral o isolamento de estreptomicetos do solo antártico, a avaliação da diversidade obtida e a identificação dos isolados obtidos, além de verificar a capacidade metabólica quanto à produção de produtos naturais.

2.2 Objetivos Específicos

- 2.2.1 Isolar *Streptomyces* a partir de amostras de solo da Antártica
- 2.2.2 Identificar e caracterizar a diversidade genética dos isolados a partir dos genes *housekeeping*: *atpD*, *recA*, *trpB*, *rpoB*, *gyrB* e do 16S rRNA
- 2.2.3 Verificar a diversidade genética dos isolados utilizando BOX-PCR e REP-PCR e MLST
- 2.2.4 Avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos obtidos pós cultivo dos isolados em fermentações miniaturizadas contra microrganismos de referência
- 2.2.5 Avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos obtidos pós cultivo dos isolados após a ampliação do volume de cultivo de fermentação contra microrganismos de referência
- 2.2.6 Identificar os compostos responsáveis pelas atividades antimicrobianas através de espectrometria de massas

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Resistência Bacteriana

De forma geral, a resistência bacteriana se define como a capacidade que uma bactéria tem de sobreviver a um antibiótico. Algumas variações mais detalhadas dessa definição podem surgir na tentativa de explicar as causas desse fenômeno. Na clínica, uma bactéria resistente é aquela que sobrevive a um tratamento antibiótico realizado de forma adequada. Já a definição farmacológica leva em consideração as concentrações existentes da droga no corpo do paciente. De forma parecida, a epidemiologia também se preocupa com a concentração de antibióticos utilizada, mas foca nas populações bacterianas capazes de resistir a estes. E a microbiologia, por fim, define que uma bactéria resistente é aquela que apresenta capacidade de crescimento em uma maior concentração de que normalmente é utilizada para a bactéria original, aquela sem o mecanismo, podendo ser chamada de *wild type* (Acar e Röstel, 2001).

A descoberta e introdução dos antibióticos foi uma das mais importantes conquistas do século XX, porém isolados bacterianos adquiriram resistência logo que os tratamentos tiveram início, e isto se dá até os anos atuais, sempre a partir da entrada de uma nova droga ao uso clínico (Zankari et al., 2012). Em maio de 2014, a OMS publicou um relatório chamado “*Antimicrobial resistance: global report on surveillance 2014*” que consiste em um panorama global sobre a resistência bacteriana, em decorrência do surgimento e disseminação de bactérias resistentes a múltiplas drogas. Neste relatório, a OMS prediz que entraremos em uma era pós antibiótica, onde pequenas infecções poderão levar a óbito em virtude da falta de antibióticos disponíveis para uso. Este relatório foi o primeiro passo de uma série de ações que a OMS vem propondo para lidar com a propagação da resistência bacteriana, tanto em hospitais como em comunidades e nos seus mais diversos meios de difusão, como na água e na alimentação. Em 2015 foi lançado o *Global Antimicrobial Resistance Surveillance System* (GLASS) com uma série de normas e ferramentas para vigilância e detecção de patógenos importantes na aquisição de resistência bacteriana no mundo todo. A implementação foi proposta para ser realizada até o ano 2019, com a inscrição dos países envolvidos e primeiros monitoramentos. Estes patógenos considerados importantes são bactérias que estão extensamente envolvidas com a aquisição de resistência à múltiplas drogas

(Mulani et al., 2019), sendo conhecidas pelo acrônimo ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter* spp.). Estes patógenos possuem diversos mecanismos de resistência a diversos antimicrobianos e o nome do grupo faz alusão justamente à capacidade que estes microrganismos têm de escapar dos tratamentos. A resistência pode se dar através da produção de enzimas que inativam ou alteram os antibióticos, como por exemplo as β -lactamases, capazes de romper o anel presente nos β -lactâmicos. TEM-1 é uma *extended-spectrum* β -lactamases (ESBL) amplamente difundida nas bactérias da família *Enterobacteriaceae*, maioria dos patógenos ESKAPE, e, além disso, é comumente encontrada também em *P. aeruginosa*. Outra ESBL, a CTX-Ms, já foi identificada em todos patógenos do grupo em questão. *E. faecium* ainda tem a capacidade de modificar o sítio alvo do antibiótico e tornar-se resistente aos glicopeptídeos, por exemplo, por meio de uma mudança na cadeia de peptídeos do seu peptídeoglicano. Bombas de efluxo distribuídas entre estes microrganismos proporcionam um controle na regulação da quantidade de antibiótico que entra na célula, outro mecanismo de resistência. A maioria dos ESKAPE são bactérias Gram negativas e por isso já possuem uma permeabilidade reduzida frente aos antibióticos pela presença de porinas na membrana externa (Santajit e Indrawattana, 2016). Devido a diversidade e complexidade de mecanismos de resistência apresentados por estes patógenos, entende-se a importância desses microrganismos quando falamos de resistência bacteriana.

A *One Health* é uma abordagem multidisciplinar e colaborativa proposta pelo *Centers for Diseases Control and Prevention* (CDC) e propõe que se pense em saúde de forma conectada, unindo a saúde humana, animal e ambiental. Já é bastante claro como patógenos hospitalares adquirem resistência aos tratamentos utilizados e como a utilização exacerbada e descontrolada dos antibióticos levam ao aumento de linhagens de bactérias resistentes. A questão em foco atualmente é como essa resistência se espalha a todos os ambientes, não sendo uma preocupação somente do ambiente hospitalar, já que a aquisição de resistência bacteriana pode acontecer em diversos outros ambientes, como na pecuária e agricultura, através da utilização de antibióticos como promotor de crescimento nos animais, o que por sua vez causa a contaminação dos solos e águas (O'Brien, 2002, Scott et al., 2019, Thakur e Gray, 2019). Além disso, a disseminação dos genes de

resistência é um grande desafio no controle da disseminação da resistência bacteriana, pois estes genes possuem grande mobilidade entre populações e espécies de bactérias e entre diversos ambientes, servindo de reservatório para a resistência adquirida (Vikesland et al., 2019).

3.2 Produtos Naturais

Desde a descoberta da penicilina em meados dos anos 1940, seguido por actinomicina e estreptomicina, a busca por compostos com atividade antimicrobiana já atingiu seu ápice na Era de Ouro dos Antibióticos e seu declínio no denominado Vazio de Descoberta nos anos 2000, com a escassez de descobrimento de novas moléculas (Baltz, 2019). A necessidade de novos antibióticos com novos espectros de ação é o maior desafio no combate a doenças infecciosas, visto que a maioria das classes de antibióticos foram descobertas antes de 1970, com apenas quatro novas classes de antibacterianos introduzidas ao uso clínico após 2000 (linezolid, daptomicina, retapamulina e fidaxomicina) (Genilloud e Vicente, 2012; Silver, 2011). A triagem de extratos a partir de potenciais microrganismos produtores guiados pela atividade biológica com posterior fracionamento da amostra, que fora amplamente utilizada, mostrou certa limitação pelo grande re-isolamento de moléculas bioativas já conhecidas (Aigle et al., 2014). Nos anos 2000, a ideia de que os produtos naturais microbianos já haviam atingido a completa escassez começou a mudar graças a técnicas aperfeiçoadas de sequenciamento do genoma que revelou um grande número de genes de biossíntese de metabólitos que normalmente encontram-se silenciados em condições usuais de cultivo em laboratório (Nett et al., 2009). Estes genes necessitam de ativação para atingir níveis possíveis de detecção, que os métodos usuais de fermentação e triagem não estavam alcançando (Baltz, 2016). Tendo isto em vista, produtos naturais microbianos são cada vez mais são considerados uma importante fonte de moléculas com atividade bioativas e com alta diversidade química. Segundo Wright et al. (2019), nos encontramos em uma segunda Era de Ouro, desta vez uma Era que versa sobre o entendimento da biossíntese, bioquímica e bioengenharia dos produtos naturais.

Produtos naturais são pequenas moléculas orgânicas produzidas por microrganismos e plantas, principalmente. Fazem parte do *parvome*, o grupo químico que reúne os compostos bioativos produzidos por seres vivos (Davies,

2011; Rigali et al., 2018). Já foram chamados de metabólitos secundários, pois não seriam compostos estritamente necessários para crescimento e reprodução. Porém, além de não haver dúvidas quanto ao importante papel que estas moléculas desempenham no ambiente onde são produzidas, mediando interações entre os microrganismos (Jensen et al., 2016), os agrupamentos de genes de biossíntese que dão origem aos produtos naturais podem estar ligados ao metabolismo de açúcar e de aminoácidos, essenciais ao microrganismo (Baltz, 2019). Produtos naturais possuem as características físicas e químicas necessárias para a atividade biológica, com estruturas tridimensionais complexas dificilmente atingidas por moléculas sintetizadas em laboratório, além do fato de que estes compostos já foram triados através da evolução por seleção natural, visto que são produzidos pelos microrganismos que sofrem também desta seleção, conferindo a eles uma vantagem evolutiva perante outros microrganismos, que são alvos naturais dos compostos (Wright, 2019).

A pesquisa por produtos naturais surge em resposta à urgência da necessidade por novas moléculas antibióticas contra os patógenos multirresistentes para os quais a demanda ainda não foi completamente preenchida (Genilloud, 2014).

3.3 *Streptomyces*

Produtos naturais oriundos de bactérias do filo Actinobacteria possuem longa história e grande contribuição na saúde humana (Baltz, 2016). Actinobactérias são bactérias Gram positivas que estão presentes em diversos ambientes, aquáticos e terrestres: no solo, representam a maior parte da biomassa microbiana. Os componentes do filo são aeróbios, quimioautotróficos e mesófilos em sua maioria (Goodfellow e Williams, 1983). Algumas linhagens são fitopatogênicas (Kaup et al., 2005) e outra minoria pode causar doenças em humanos e animais (McNeil e Brown, 1994). O destaque se dá à ordem Actinomycetales (Buchanan, 1917) que possui cerca de 80 gêneros importantes quanto a produção de compostos biologicamente ativos. *Streptomyces* é o gênero mais promissor para a produção de metabólitos biologicamente ativos e representa a grande maioria dos isolados pertencentes a Actinomycetales. Cerca de 70% dos antibióticos que conhecemos são oriundos do metabolismo de estreptomicetos (Bérdy, 2012), e além disso o gênero é capaz de sintetizar uma variedade de

compostos com atividades biológicas distintas, com ações anti-tumorais, antivirais, anti-helmínticas, antifúngicas e larvicidas (Procópio et al., 2012; Dochhil et al., 2013; Tanvir et al., 2014; Golinska et al., 2015; Chen et al., 2019; Hussain et al., 2018; Ortega et al., 2019). Visto que somente 1% dos organismos no solo são conhecidos e cultiváveis (Bérdy, 2012; Baltz, 2016), ainda há uma gama de produtos naturais produzidos por estes microrganismos que não foram descobertos. Além do mais, hoje sabe-se que mesmo linhagens de estreptomicetos já bastante estudadas anteriormente possuem capacidade de sintetizar vários compostos distintos e isto se deu através do sequenciamento de genomas.

Como nos outros representantes do filo, o conteúdo G+C do gênero encontra-se entre 66-78%. Apresentam um grande cromossomo linear com 8 a 10 Mb. Há presença de plasmídeos lineares e circulares (Ventura et al., 2007). Estreptomicetos possuem um micélio multicelular e isto se dá através da germinação do esporo em hifa vegetativa que cresce até se tornar um micélio ramificado (Chater et al., 2010). O crescimento da hifa consiste em uma combinação entre extensão da célula e ramificação da hifa, sem fissão celular, levando a uma hifa compartimentalizada (Claessen et al., 2014). Sob situação adversa, o micélio vegetativo se diferencia em hifa aérea, sendo este o momento em que a maioria dos antibióticos são produzidos (Chater et al., 2010). O micélio vegetativo e o aéreo podem ser pigmentados (Kämpfer, 2010) e podem apresentar produção de pigmento extracelular e difusível no meio.

Apesar de ser amplamente utilizado na identificação de uma série de microrganismos (Srinivasan et al., 2015; Deiner et al., 2015), há alguns impasses quanto ao uso do 16S rRNA dentro do gênero *Streptomyces*. Nos anos 70, a sistemática deste gênero foi bastante conturbada, com mais de três mil espécies identificadas, principalmente em registros de patentes. Após esforços como o *International Streptomyces Project* (Shirling e Gottlieb, 1966), onde mais de quarenta pesquisadores de dezessete países uniram-se para padronizar critérios, métodos e meios de cultura para isolamento e identificação de espécies do gênero, atualmente há cerca de 750 espécies de estreptomicetos oficialmente reconhecidas. Os estudos que envolveram 16S rRNA foram essenciais para determinar a taxonomia do grupo, apesar de haver diferenças entre cepas com sequências similares do gene em questão. Conforme demonstrado por Antony-Babu et al. (2017), dez cepas de *Streptomyces* sp. mesmo com fenótipos distintos,

tanto de morfologia de colônia quanto de tolerância ao estresse ambiental, apresentam sequências idênticas de 16S rRNA. Novas técnicas de biologia molecular permitiram o aprofundamento do estudo da filogenia do gênero, como hibridização de DNA e DNA *fingerprinting*, porém nenhuma delas mostrou resolução e reprodutibilidade suficiente para ser recurso na identificação das espécies (Guo et al., 2008). A técnica MLST (Maiden et al., 1998) consiste na identificação de alelos diretamente das sequências nucleotídicas de fragmentos internos de genes *housekeeping*, dessa forma criando padrões genéticos que caracterizam a cepa em estudo e possui alta reprodutibilidade. Guo et al., (2008), desenvolveram o MLST do gênero *Streptomyces* utilizando os genes *atpD* (ATP sintase F1), *recA* (recombinase A), *trpB* (triptofano sintase cadeia β), *rpoB* (RNA polimerase subunidade β), *gyrB* (DNA girase subunidade β) e 16S rRNA a fim de facilitar o entendimento da evolução do gênero.

3.4 Engenharia metabólica

A triagem de extratos a partir de potenciais produtores guiados pela atividade biológica com posterior fracionamento da amostra mostrou certa limitação pelo grande re-isolamento de moléculas bioativas (Aigle et al., 2014). Com o advento do sequenciamento do genoma foi possível verificar que mesmo microrganismos já bastante estudados possuem capacidade de sintetizar vários compostos distintos a partir da análise do seu genoma. Bentley et al. (2002) sequenciaram a totalidade do genoma de *S. coelicolor* A3(2) e detectaram a capacidade da espécie de produzir pelo menos vinte metabólitos secundários, quando a triagem clássica, realizada por cinquenta anos, resultou na obtenção de apenas cinco metabólitos (Aigle et al., 2014; Challis, 2014). Hoje sabe-se que apenas uma pequena parcela de rotas de biossíntese de metabólitos é expressa em condições usuais de cultivo bacteriano em laboratório, sendo a grande maioria destes metabólitos oriundos de genes crípticos que necessitam serem ativados para atingir um nível de produção suficientemente grande para detecção (Baltz, 2016). A técnica de mineração do genoma baseia-se na busca de genes que codificam metabólitos secundários a partir do genoma da espécie de interesse e para isso há uma série de softwares disponíveis que realizam a mineração automatizada comparando genomas em busca de genes de biossíntese e de função desconhecida, como o antiSMASH (Medema et al., 2011). A partir da

identificação destes genes são necessários métodos para aumentar sua expressão gênica.

O ponto chave para o descobrimento de novas moléculas é descobrir métodos que ativem as rotas metabólicas silenciosas e, dessa forma, despertem os clusters de genes biossintéticos (Ochi e Hosaka, 2013). Algumas das estratégias utilizadas incluem engenharia ribossomal, elicitores químicos e co-cultivo (Choi et al., 2018). A engenharia ribossomal remete a mutações nos ribossomos bacterianos, utilizando a resistência a antimicrobianos para alterar rotas de biossíntese de proteínas (Tanaka et al., 2013), e dessa forma ter acesso a novos produtos naturais. Manipulações nos genes *rpoB* e *rpsL* resultaram na produção de antibióticos em diversas espécies de actinomicetos (Choi et al., 2018). A adição de elicitores químicos resulta no aumento de produção de metabólitos em *Streptomyces* (Choi et al., 2018), por estes interagirem com receptores presentes na membrana plasmática e então acionarem cascatas de sinalização celular na bactéria (Zhu et al., 2014). Cultivar o estreptomiceto aliado a outro microrganismo, sendo assim o co-cultivo, é uma tentativa de mimetizar as condições ambientais onde os produtos naturais são gerados, visto que as condições de laboratório estão longe de serem próximas ao ambiente (Zhu et al., 2014). Além disso, os nutrientes presentes nos meios de cultivo afetam não só as taxas de crescimento bacteriano como influenciam toda expressão gênica. A fonte de carbono escolhida no meio de cultivo possui um grande impacto diretamente nos genes de biossíntese, visto que quando em um meio existem fontes distintas de carbono, a bactéria utiliza primeiramente a fonte mais rapidamente degradável até sua exaustão, após a bactéria utiliza a segunda fonte de carbono considerada mais difícil e isto relaciona-se com a produção de antibióticos (Zhu et al., 2014).

3.5 Antártica

A Antártica é um continente que possui características muito próprias, devido principalmente a suas condições climáticas, sendo o continente mais frio (com temperatura recorde de -89.2 °C) e mais seco da Terra. Tal ambiente inóspito seleciona seres vivos adaptados a estas peculiaridades, entre eles microrganismos resistentes a uma série de fatores ambientais estressantes e capazes de sintetizar metabólitos com estruturas únicas que resultam em diversas atividades biológicas, fazendo da Antártica um grande reservatório de novas espécies e novos produtos

naturais (Bratchkova e Ivanova, 2011). O continente antártico é dividido em duas partes principais pelos Montes Transantárticos, dando origem à Antártica Oriental e à Antártica Ocidental (Goodge, 2020). Da Antártica Ocidental parte a Península Antártica, região que se aproxima do continente americano. Na Península Antártica pode-se observar um aumento de 2 °C em sua média de temperatura anual desde 1950 (Ducklow et al., 2007), tendo a região destaque em estudos sobre aquecimento global (Scambos et al., 2000). Na Península Antártica encontra-se o Canal Lemaire, local de recebimento de turistas há mais de 30 anos (Beck, 1990). Saindo da Península Antártica em direção ao Chile, encontramos a Ilha Rei George. A Ilha Rei George possui a maior densidade de estações de pesquisa e, particularmente em uma região denominada Península Fildes, e conta com a presença de moradores há mais de 50 anos (Amaro et al., 2015). A Península Fildes localiza-se ao sul da Ilha Rei George e é a maior área livre de gelo do continente. Possui pelo menos cinco estações: Base Professor Julio Escudero e Estação Eduardo e Frei Montalva (Chile); Estação Bellingshausen (Rússia); Estação General Artigas (Uruguai); Estação da Grande Muralha (China). Nesta região há conflito entre ciência, turismo e logística da região, tamanho a densidade populacional (Braun et al., 2012). A presença humana no continente antártico deu-se logo no início do século XIX, com a entrada de exploradores e caçadores. Os cientistas chegaram no século XX e há registro da presença até mesmo de turistas (Amaro et al., 2015).

Por ser o continente mais distante dos outros, é o de mais difícil acesso e com muito ainda a ser explorado (Bratchkova e Ivanova, 2011), tornando-se então uma fonte muito promissora de novos compostos bioativos, visto que o isolamento geográfico afeta a estrutura das populações bacterianas (Millán-Aguiñaga et al., 2019) o que por sua vez propicia diferenças nos produtos naturais por estas gerados. Durante a busca por novos estreptomicetos e novas moléculas buscou-se o isolamento destes em ambientes extremos, como o oceano profundo, o deserto, os vulcões e os polos (Sivalingam et al., 2019). Então, um número cada vez maior de estudos demonstrou a grande diversidade de espécies e de atividades biológicas existente no Ártico e na Antártica (Liu et al., 2013). No polo sul, Ivanova et al. (2001) isolaram um estreptomiceto da Ilha Livingston capaz de produzir um composto ativo contra *Micrococcus luteus* e *Bacillus subtilis*. Da mesma forma, Moncheva et al. (2002) isolaram 47 Actinomycetes da mesma ilha e 19 destes

apresentaram atividade contra bactérias Gram positivas e Gram negativas. Em 2005, Bruntner et al. identificaram um novo antibiótico denominado frigociclina a partir de uma cepa de *Streptomyces griseus* oriundo de Baía Terra Nova. Núñez-Montero et al. (2019) sequenciaram o genoma completo de *Streptomyces fildesensis* após um estudo anterior do grupo onde foram isolados alguns estreptomicetos (Lamilla et al., 2018). O objetivo do sequenciamento foi investigar o potencial antimicrobiano a partir da análise dos clusters de genes de biossíntese. Além disso, ensaios de extração com solventes dos compostos foram realizados para análises cromatográficas e de massas. Outros gêneros de actinobactérias da Antártica são igualmente promissores como demonstrado por Liao et al. (2019), após a mineração do genoma de *Marisediminicola antarctica*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Isolamento

Sete pontos de coleta de solo antártico: Brown II (64°82'34S, 62°85'73.83W), Brown III (64°82'31.83S, 62°85'77.33W), 58 (62°19'58.47S, 58°95.83.33W), CI (62°20'11.96S, 58°96'19.98W), CII (62°20'05.98S, 58°96'37.68W), Hill II (62°04'31.7W, 58°24'14.9S) e Nico II (62°20'04.00S, 58°96'37.68W) foram previamente enviados pelo Dr. Leonardo Paris Lavin Sepulveda (Instituto Antártico Chileno - INACH) e cedidos para uso neste trabalho. Dez gramas de solo de cada ponto coletado foram pesados em ambiente estéril e dissolvidos em 90 mL de água peptonada. Esta solução permaneceu 2 h sob agitação de 50 rpm. Foram realizadas diluições seriadas até 10^4 e 100 μ L de cada diluição foram incubados através da técnica de espalhamento em superfície em placa de Petri com diferentes meios de cultivo: ACA (amido caseína agar), Aveia, ISP2 e Rafinose-Histidina. As placas permaneceram em temperatura ambiente até o crescimento bacteriano, por no máximo 30 dias. A escolha das colônias para isolamento foi realizada por identificação visual de características morfológicas pertencentes ao gênero *Streptomyces*, apresentando aspecto seco e pulverulento. Após isolamento, os isolados foram armazenadas em glicerol 20%.

4.2 Extração de DNA

Os isolados bacterianos foram inoculados em 25 mL de caldo AC em frascos de Erlenmeyer de 125 mL e incubados sob agitação de 100 rpm a 28 °C durante 48 h. Para a obtenção das células, a cultura foi centrifugada a 10.000 rpm por 5 min. As células foram ressuspensas em 700 μ L de tampão SET (composição em Anexos) onde foi adicionado 35 μ L de lisozima (20 mg/mL). Após incubação em banho de água a 37 °C por 1 h foi adicionado SDS (*sodium dodecil sulfate*) 1% e 20 μ L de proteinase K (20 mg/mL). A mistura foi incubada em banho de água a 55 °C por 2 h. Após este período, 1,25 M de NaCl foi adicionado e a amostra homogeneizada por inversão. As etapas de limpeza do DNA se seguiram com: uma lavagem com clorofórmio; uma com fenol; uma com fenol e clorofórmio (1:1 volume) e uma última de clorofórmio e álcool isoamílico (24:1 volume). Após, ao sobrenadante foi adicionado 600 μ L de álcool isopropílico, para a precipitação do DNA e a amostra incubada a -20 °C por 18 h. Posteriormente, a amostra foi

centrifugada durante 5 min a 13.000 rpm, o sobrenadante foi desprezado e ao DNA precipitado foi adicionado 500 µL álcool etílico 70% gelado. Uma nova centrifugação a 13.000 rpm por 10 min foi realizada e o álcool foi desprezado. Após totalmente seco, o DNA foi ressuscitado em 200 µL de TE. A fim de se averiguar a concentração e a qualidade de DNA após o processo de extração, realizou-se a leitura no sistema Nano Espectrofotômetro (Kasvi).

4.3 BOX-PCR

Com o objetivo de caracterizar geneticamente os isolados de *Streptomyces* utilizou-se o primer BOX-A1R (Exxtend), de sequência 5' CTA CGG CAA GGC GAC GCT TGA CG 3'. Para um volume de 25 µL de reação, adicionou-se 2,5 µL de tampão de reação 10X, 3,5 mM de MgCl₂, 2,5 UI de Taq polimerase, 2,5 mM de cada dNTP (*deoxyribonucleotides triphosphate*), 2,5 pmol do primer, 150 ng de BSA (*bovine serum albumine*) e 100 ng de DNA. As condições de amplificação compreenderam uma etapa inicial de desnaturação a 94 °C por 7 min, seguido de 30 ciclos que envolveram uma etapa de desnaturação a 94 °C por 1 min 15 s, uma de anelamento a 44 °C por 1 min 15 s e uma etapa de extensão a 65 °C por 8 min 30 s, finalizando-se com uma extensão a 72°C por 5 min. Os produtos de PCR (*polymerase chain reaction*) resultantes foram analisados em gel de agarose 1,5 %, em uma corrida a 100 V, 80 mA e 80 W, utilizando GelRed (QuatroG) como corante fluorescente de DNA e fotografados no sistema de fotodocumentação Major Science modelo UVCI-1200. Os fragmentos gerados foram comparados com o marcador de peso molecular de 100 pb (Ludwig Biotec) e organizados de modo que fragmentos de tamanho inferior a 20 pb foram considerados iguais.

4.4 REP-PCR

Foram utilizados os primers REP (IDT) de sequências 1R 5' III ICG ICG ICA TCI GGC 3' e 2R 5' ICG ICT TAT CIG GCC TAC 3', para complementar a caracterização dos isolados. Em um volume de 25 µL de reação, adicionou-se 2,5 µL de tampão de reação 10X, 4 mM MgCl₂, 1,2 pmol de cada primer, 0,8 mM de cada dNTP, 2 U de Taq polimerase e 100 ng de DNA. As condições de amplificação incluíram uma etapa inicial de desnaturação a 94 °C por 5 min, seguido de 35 ciclos que incluíram uma etapa de desnaturação a 94 °C por 1 min, uma de anelamento a 40 °C por 1 min e uma etapa de extensão a 71°C por 1 min 30 s, finalizando com

uma de extensão de 5 min a 72 °C. Os produtos de *PCR* resultantes foram analisados em gel de agarose a 1,5%, em uma corrida a 100 V, 80 mA e 80 W, utilizando GelRed (QuatroG) como corante fluorescente de DNA e fotografados no sistema de fotodocumentação Major Science modelo UVCI-1200. Os fragmentos gerados foram comparados com o marcador de peso molecular de 100 pb (Ludwig Biotec) e organizados de modo que fragmentos de tamanho inferior a 20 pb foram considerados iguais.

4.5 Genes *housekeeping* e 16S rRNA

Cinco genes *housekeeping* (*rpoB*, *recA*, *atpD*, *gyrB*, *trpB*) foram amplificados visando a identificação dos isolados. Os *primers* utilizados em cada reação estão listados na tabela 1. Para amplificação do gene 16S rRNA em sua totalidade, o fragmento de aproximadamente 1500 bp foi dividido em três fragmentos menores e amplificados separadamente. Em um volume final de 25 µL de reação, foi adicionado 1,5 mM de MgCl₂, 1U de Taq Polimerase, 0,3 mM de dNTPs, 5 pmol de cada primer e 50 ng de DNA. As condições de amplificação utilizadas foram: um ciclo inicial de desnaturação a 94 °C por 5 minutos seguida de 35 ciclos de 94 °C por 1 minuto (desnaturação), 59 °C por 1 minuto (anelamento) e 72°C por 2 minutos (extensão), e uma extensão final de 10 minutos a 72°C. Para amplificação dos genes *rpoB*, *gyrB* e *trpB*, as condições utilizadas foram, em um volume de 25 µL: 1 mM de MgCl₂, 1 U de Taq polimerase, 0,1 mM do conjunto de dNTPs, 2,5 µL de DMSO (dimetilsulfóxido), 1,2 pmol de ambos primers e 50 ng de DNA. Já para os genes *atpD* e *recA*, além da 1U de Taq polimerase, 2,5 µL DMSO e 50 ng de DNA, foram utilizados 1,3 mM de MgCl₂, 2,4 pmol de cada primer, 0,15 mM de dNTPs. A amplificação dos genes *rpoB*, *gyrB*, *trpB*, *recA* e *atpD* deu início com a desnaturação do DNA a 95 °C durante 5 minutos, seguida de 30 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 30 segundos para anelamento conforme temperaturas específicas dos primers, registradas na tabela 1, e um período de extensão de 90 segundos a 72 °C, por fim uma extensão final a 72 °C por 10 minutos. Os produtos resultantes das reações de *PCR* foram analisados em géis de agarose a 1%. Os produtos de *PCR* foram sequenciados no Laboratório de Biologia Molecular da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), as reações de sequenciamento foram realizadas utilizando BigDye® Terminator V3.1 Cycle Sequencing Reaction kit (Applied BioSystems, Foster City, USA) de acordo com as

instruções do fabricante. Em seguida, as análises dos fragmentos foram processadas através sequenciador automático ABI Prism 3130 Genetic Analyzer (Applied BioSystems, Foster City, CA). As sequências foram analisadas no software Geneious Prime. Sequências de 16S rRNA foram alinhadas através do Map Reference com *S. coelicolor* A3(2), retirada do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), para montar o fragmento total a partir dos três fragmentos sequenciados separadamente. Após, as sequências de todos os genes *housekeeping* foram comparadas com o banco de dados do GenBank e o 16S também foi analisado no banco de dados EzBioCloud (Yoon et al., 2017).

Tabela 1: *Primers* e temperaturas de anelamento utilizados para amplificação dos genes *housekeeping*.

| Região | Primer | Sequência 5' - 3' | T _a |
|--------------------|----------------|--|----------------|
| 16S <i>rRNA</i> | A sense | AGAGTTTGATCCTGGCTCA | 59 |
| | M anti-sense | CGCTACACCAGGAAATTC | |
| | Strep 1F | AAAGAGCTCGTAGGCGGCTT | 59 |
| | F anti-sense | ACGAGCTGACGACAGCCATG | |
| | Strep 2F | CGGTGTACAGGTGGTGCATG | 59 |
| | H anti-sense | AGGAGGTGATCCAGCCGCAC | |
| <i>rpoB</i> | <i>rpoB</i> PF | GAGCGCATGACCACCCAGGACGTCGAGGC | 65 |
| | <i>rpoB</i> PR | CCTCGTAGTTGTGACCCTCCCACGGCATGA | |
| <i>gyrB</i> | <i>gyrB</i> PF | GAGGTCGTGCTGACCGTGCTGCACCGCGGCGGCAAGTTCGGC | 65 |
| | <i>gyrB</i> PR | GTTGATGTGCTGGCCGTCGACGTCGGCGTCCGCCAT | |
| <i>atpD</i> | <i>atpD</i> PF | GTCGGCGACTTACCAAGGGCAAGGTGTTCAACACC | 63 |
| | <i>atpD</i> PR | GTGAACTGCTTGGCCACGTGGGTGTTCTGGGACAGGAA | |
| <i>recA</i> | <i>recA</i> PF | CCGCRCTCGCACAGATTGAACGSCAATTC | 60 |
| | <i>recA</i> PR | GSCAGGTCCGGGTTGTCCTTSAGGAAGTTGCG | |
| <i>trpB</i> | <i>trpB</i> PF | GCGCGAGGACCTGAACCACACCGGCTCACACAAGATCAACA | 66 |
| | <i>trpB</i> PR | TCGATGGCCGGGATGATGCCCTCGGTGCGCGACAGCAGGC | |

Primers do 16S rRNA: desenhados pelo grupo de pesquisa; demais primers: Guo et al., 2008; T_a temperatura de anelamento.

4.6 Árvores filogenéticas

As árvores filogenéticas foram construídas no software MEGA X (Kumar et al., 2018) através do método *neighbour-joining*. A técnica de *bootstrap* foi utilizada para avaliar a confiança dos ramos encontrados nas árvores construídas pelo software, sendo as sequências analisadas 500 vezes. O modelo *Kimura 2-parameter* foi o escolhido para estabelecer a evolução nucleotídica. Foram construídas árvores para cada gene separadamente, além de árvores com o gene 16S rRNA concatenado com cada um dos demais genes e uma árvore com todos os genes concatenados.

4.7 Multi-locus Sequence Typing

A partir dos seis alelos referentes as sequências 16S rRNA, *rpoB*, *recA*, *trpB*, *gyrB* e *atpD*, os isolados tiveram suas *Sequence Type* (ST) atribuídas com a utilização da base de dados de *Streptomyces* disponível em PubMLST (Jolley et al., 2018).

As etapas que seguem foram realizadas durante o período de setembro/2019 a fevereiro/2020 que compreendeu o Doutorado Sanduíche financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) através do Programa Institucional de Internacionalização (PRINT) Edital nº 41/2017 que foi realizado na Fundación Medina em Granada, Espanha.

4.8 Fermentações miniaturizadas

Os isolados foram enviados em criotubos na forma de discos de ágar que foram anteriormente cultivados no Brasil em placas de Petri com ACA, durante 5 dias a 28 °C. Após crescimento dos esporos, os discos de aproximadamente 7 mm foram retirados da placa de Petri e inseridos nos criotubos. Os isolados foram enviados em duplicata, sendo a identificação da duplicata identificada com a letra “d”. Na chegada, os discos de ágar foram depositados em placas de Petri com YME e a partir do disco distribui-se o isolado no meio de cultivo com auxílio de suabe. As placas de Petri foram incubadas a 28 °C até formação de esporos. Após esse período, cinco discos de ágar foram retirados das placas com auxílio de *spectrum transfer tube* e armazenados em criotubos com glicerol 10% (Estoque 1). Outros cinco discos foram retirados e inoculados em tubos com 10 mL de ATCC-2 a 28 °C com agitação de 300 rpm por 24h. Fez-se um controle de esterilidade em placas de

petri contendo BHI. Destes tubos, 0,9 mL do cultivo foram armazenados em criotubos com 0,9 mL de glicerol 20% (Estoque 2). Além do estoque em glicerol, 1,5 mL do cultivo foram utilizados para preparação da placa mãe para inóculo em placas de 96 poços deep well (capacidade máxima de 2 mL). Os diferentes meios de cultivo testados foram organizados em placas Duetz da seguinte maneira: com auxílio de uma pipeta multicanal foram dispensados 0,8 mL de meio de cultivo por poço, de modo que a coluna 1 e 12 da placa ficassem vazias. Os isolados foram então inoculados nas placas que continham os meios de cultivo a partir da placa mãe através de um replicador. Ao início e ao final do processo, placas de BHI foram utilizadas para verificar esterilidade no decorrer dos inóculos. Os meios utilizados para crescimentos dos isolados foram: ACA, APM-9, Czapek Dox, DEF-15, DNPM, KHC, M016, RAMP2-P V2 e SAM-6. Sendo que o meio de cultivo M016 foi testado em duas diferentes condições, uma delas com adição de ácido nalidíxico. A placa com M016 foi incubada durante 48 h a 28 °C e 300 rpm. Após esse período foi adicionado o ácido nalidíxico 0.2 mg/mL em metade da placa e esta foi então incubada a 22 °C por mais 72h. As placas Duetz com os outros meios de cultivo permaneceram durante 5 dias a 28 °C e 300 rpm.

Após crescimento dos isolados nas placas Duetz, foi realizado a extração dos metabólitos com solvente. Foram adicionados 0,8 mL de acetona em cada poço e as placas foram agitadas a 200 rpm por 2 h. As placas foram então centrifugadas no vácuo para evaporação da acetona durante 3 h e permaneceram abertas na capela de exaustão por 18 h. Uma nova centrifugação a 3000 rpm por 15 min se fez necessária para obtenção do sobrenadante. Enquanto isso, 60 µL de DMSO foram adicionados a novas placas de 96 poços *deep well*. Após centrifugação, 240 µL do sobrenadante resultante foram pipetados nas placas que continham o DMSO. As placas foram seladas e armazenadas em 4 °C.

4.9 Fermentações EPA

Para esta etapa, foram selecionados os isolados que apresentaram padrões de compostos distintos baseados nos resultados de triagem da atividade antimicrobiana (4.10) e espectrometria de massas (4.11). A partir do Estoque 2, 500 µL foram inoculados em tubos com 12 mL de ATCC-2 e incubados a 28 °C com 300 rpm por 72h. Após esse período, foram realizados testes de esterilidade em BHI e 500 µL destes tubos foram inoculados nos respectivos meios de cultivo (DNPM,

KHC, M016, RAMP2-P V2 e SAM-6) em tubos do tipo *Environmental Protection Agency* (EPA), com volume de 11 mL. Da mesma forma que em 4.8, o meio de cultivo M016 foi testado em duas diferentes condições, uma delas com adição de ácido nalidíxico após 48h de incubação. Os tubos EPA foram incubados a 28 °C com 300 rpm por 5 dias.

Após crescimento dos isolados nos tubos EPA, também foi realizado a extração com solvente dos metabólitos produzidos. Foram adicionados 10 mL de acetona em cada tubo, que permaneceram em agitação a 200 rpm por 2 h. As placas foram então centrifugadas e 12 mL do sobrenadante foram transferidos para novos tubos juntamente com 600 µL de DMSO. Tubos sofreram um processo de evaporação *overnight*. Do restante que permaneceu no tubo, 540 µL foram pipetados para uma placa de 96 poços *deep well*, onde foram filtrados por centrifugação durante 20 min a 3500 rpm com filtro de 0,2 µm. As placas foram seladas e armazenadas em 4 °C.

4.10 Triagem de atividade antimicrobiana

As placas de 96 poços *deep well* que continham os extratos pós-extração foram agitadas após armazenamento e 10 µL dos extratos presentes foram distribuídos em novas placas de 96 poços, nas colunas de 2 a 11. Para testar a atividade antimicrobiana dos extratos oriundos da microfermentação dos estreptomicetos foram utilizados os seguintes microrganismos pertencentes a bacterioteca da Fundación MEDINA: *S. aureus* resistente à metilina (MRSA - methicillin resistant *S. aureus*) MB 5393, *S. aureus* suscetível à metilina (MSSA - methicillin sensitive *S. aureus*) ATCC 29123, *E. coli* ATCC 25922, *K. pneumoniae* ATCC 700603, *C. albicans* ATCC 64124, *Aspergillus fumigatus* ATCC 46645, *A. baumannii* ATCC 19606, *P. aeruginosa* MB 5919. As bactérias MSSA, MRSA, *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa* foram incubadas *overnight* nos respectivos meios de cultivo líquido (tabela 2), já *E. coli* e *A. baumannii* permaneceram incubadas por 2 h antes do ensaio. Após o cultivo, foram realizadas uma série de diluições para que estas atingissem o número de unidades formadoras de colônias ou densidade ótica adequadas para dar continuidade à triagem. Quanto aos fungos, *C. albicans* foi inoculado em placa de Petri com 24 h de antecedência e a diluição foi ajustada retirando-se as colônias do meio de cultivo. No caso do *Aspergillus*, que foi cultivado durante dois dias, fez-se necessário a contagem de esporos em câmara

de neubauer. Os esporos foram retirados da placa de petri com 1 mL de tween 20. De acordo com as especificidades de cada microrganismo (tabela 2), 90 µL da diluição final foram adicionados às placas com os extratos, nas colunas de 2 a 12. Na coluna 12 também foram pipetados os antibióticos referentes aos microrganismos testados. Nos quatro primeiros poços da coluna 1 (linhas A, B, C e D) foram adicionados 100 µL de meio de cultivo para controle negativo e nos quatro últimos poços (linhas E, F, G e H) foram pipetados 100 µL do microrganismo teste para controle positivo de crescimento. Foi realizada a leitura de absorbância a 660 nm (Tempo Zero), as placas foram incubadas de acordo com especificações de cada microrganismo teste e após esse período as placas foram lidas novamente (Tempo final). A leitura de inibição do crescimento foi calculada no *software* Genedata Screener (Genedata AG, Switzerland).

Tabela 2: Condições para triagem dos microrganismos teste.

| Microrganismo | Meio | Nº células | Antibiótico |
|---------------------------------|-------------|---------------------|--------------------------|
| <i>S. aureus</i> MRSA MB5393 | BHI | 1.106 | Vancomicina |
| <i>S. aureus</i> MSSA ATCC29123 | MH II | 0,1 (OD) | Vancomicina |
| <i>E. coli</i> ATCC25922 | MH II | 0,111 (OD) | Aztreonam |
| <i>K. pneumoniae</i> ATCC700603 | MH II | 5.10 ⁵ | Gentamicina |
| <i>A. baumannii</i> ATCC19606 | MH II | 0,377 (OD) | Anfotericina/Rifampicina |
| <i>P. aeruginosa</i> MB5919 | LB | 5.10 ⁴ | Anfotericina/Aztreonam |
| <i>C. albicans</i> ATCC64124 | RPMI | 0,25-0,28 (OD) | Anfotericina |
| <i>A. fumigatus</i> ATCC46645 | RPMI | 2,5.10 ⁴ | Anfotericina/Rifampicina |

A avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos resultantes do cultivo em tubos EPA foi realizada da mesma forma, porém com mudanças nos microrganismos testados. Desta vez, exclui-se a bactéria-teste MSSA e as Gram negativas e incluiu-se *Candida glabrata* ATCC 2001, *Candida parapsilosis* ATCC 22019, *Candida krusei* ATCC 6258 e *Candida tropicalis* ATCC 750.

4.11 Espectrometria de massas

Os extratos ativos foram dereplicados através do processo LC-UV-LRMS que consiste em uma etapa inicial de separação dos compostos por cromatografia líquida seguido da coleta dos espectros de UV e massa das moléculas existentes em um sistema DAD-MS no espectrômetro Agilent 1200, conforme Martín et al. (2013) e Pérez-Victoria et al. (2016). O dendrograma da relação massa/carga (m/z) dos compostos foi construído (UPGMA) a partir da matriz de similaridade (Correlação de Pearson) no software BioNumerics.

Os extratos ativos foram dereplicados por LC-UV-LRMS e analisados em um dendrograma. O tempo de retenção, o espectro de leitura UV e a relação massa/carga das moléculas foram comparados ao banco de dados MS Gold, doado pela Merck CO. e alimentado pelos dados gerados na Fundación MEDINA. Além disso, os extratos foram analisados através de HRMS, por ESI-TOF no espectrômetro Bruker maXis. Os dados gerados deste espectrômetro são diretamente ligados ao banco de dados MEDINA-HRMS, interno da Fundación MEDINA (Pérez-Victoria et al., 2016).

5. ARTIGOS

Esta tese resultou na confecção de três artigos científicos.

Com o título “*Evaluation of BOX-PCR and REP-PCR as Molecular Typing Tools for Antarctic Streptomyces*” o Artigo 1 foi publicado na revista *Current Microbiology* e trata sobre o isolamento e diversidade genética dos estreptomicetos, abordando o continente antártico como importante local de investigação e utilizando técnicas de *PCR fingerprinting*.

O segundo artigo chamado “*Efforts in molecular identification of Streptomyces strains from Antarctic soil*” foi submetido na revista *Archives of Microbiology* e está nesse momento sob revisão. Neste, discutimos a identificação molecular dos isolados do gênero *Streptomyces* através do sequenciamento de 5 diferentes genes *housekeeping* e o 16S rRNA.

O terceiro e último artigo chama-se “*Overview on natural products from Antarctic Streptomyces isolates*” e identifica os compostos com atividade antimicrobiana presentes nos isolados, com destaque a capacidade antifúngica observada em múltiplos isolados. Este último compreende os resultados obtidos no período do doutorado sanduíche e encontra-se em construção com o grupo de pesquisa da Fundación MEDINA.

5.1. Artigo 1

Evaluation of BOX-PCR and REP-PCR as Molecular Typing Tools for Antarctic *Streptomyces*

Marcela Proença Borba^{1#} (<https://orcid.org/0000-0003-4909-969X>), Ana Elisa Ballarini^{1#}, Joao Paulo Duarte Witusk¹, Paris Lavin^{2,3}, Sueli Van Der Sand¹

1 Laboratório de Microbiologia Aplicada, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia. Rua Sarmiento Leite, 500 – 90050-170 – Bairro Farroupilha, Porto Alegre, Brazil

2 Laboratorio de Complejidad Microbiana y Ecología Funcional, Instituto Antofagasta, Universidad de Antofagasta, Chile.

3 Facultad de Ciencias del Mar y Recursos Biológicos, Departamento de Biotecnología, Universidad de Antofagasta, Chile.

Corresponding author: marcela.borba@ufrgs.br - +55 51 3308 3935

Authors contributed equally to this work

Abstract

Molecular studies led to the resurgence of natural products research from genus *Streptomyces*, already known for their long history and importance for the pharmaceutical industry. However, species belonging to this genus are difficult to identify and the most commonly used techniques, which are based on 16S rRNA sequencing, do not discriminate between related species. In this work, amplification profiles generated from BOX-PCR and REP-PCR of 49 Antarctic soil streptomycetes were compared in order to evaluate the diversity present in the group and to characterize the bacterial isolates, along with some 16S rRNA amplifications. The BOX-A1R primer exhibit clearer amplification fragments, different from the amplification patterns obtained using the REP 1R and 2R primers. A higher diversity was observed with REP-PCR amplifications, even though a larger number of fragments was obtained with BOX-A1R primer amplifications. There are at least 4 isolates that showed great similarity (about 90%) in both techniques. In other hand, there are two others that are 90 % similar in BOX-PCR, but distant in REP-PCR, showing only 40% of similarity. Results of the combination of BOX-PCR and REP-PCR represent a simple and low-cost method to discriminate between

Streptomyces strains. There is no species identification with only the 16S rRNA, most isolates seem to be related to *S. globisporus*. Further studies added to the obtained results may provide better data to help the characterization of these microorganisms.

Keywords: *Streptomyces*, fingerprinting DNA, PCR, similarity, Antarctica

Acknowledgements

This work was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) by the grants received. The author also thanks to Voltaire Neto for the figures artwork.

Authors' Contributions

M.P. Borba isolated the *Streptomyces*, extracted DNA, supervised the PCR fingerprinting reactions, performed the 16S rRNA PCR reactions, analyzed the data and wrote the manuscript. A.E. Ballarini extracted DNA, performed the PCR fingerprinting reactions, analyzed the data and wrote the manuscript. J.P.D. Witusk contributed to the isolation and DNA extraction. P. Lavin collected the soil samples and supervised the manuscript writing. S. Van der Sand supervised the experiments, data analysis and manuscript writing. All the authors have approved the final manuscript.

Introduction

Microorganisms play an important role in the production of interesting compounds to the pharmaceutical industry. Among the most varied products, we can highlight antibiotics, antitumor, antivirals, vaccines, enzyme inhibitors, polymers and bioherbicides [1]. It is estimated that only a small fraction of compounds has been discovered in past years and post-sequencing DNA studies have been pointing to the great potential of natural products production by bacteria from the phylum Actinobacteria [2]. The genus *Streptomyces* are distinct in this phylum because they have genomes that contain a large number of biosynthesis genes not yet studied [3].

The genus *Streptomyces* stands out among soil bacteria for presenting filamentous mycelium, aerial hyphae and spores during their life cycle [4]. They are Gram positive microorganisms distributed in different terrestrial and aquatic ecosystems, also presents a high content of guanine (G) and cytosine (C) bases in their DNA [5]. For a long time, it was identified based on the morphological characteristics of colonies, hyphae and biochemical tests. All of these techniques require a lot of expertise to be used and this type of identification changed by the molecular taxonomic data [6]. Identification techniques that are based on 16S region sequencing of ribosomal DNA may not achieve accurate discrimination between related species within this genus. This has been observed by Antony-Babu et al. [7] with ten strains of *Streptomyces* sp., even with distinct phenotypes of both colony morphology and environmental stress tolerance, they showed identical 16S rRNA sequences.

Different DNA fingerprinting techniques have been applied to access the genetic diversity of different microorganisms and the use of specific primers to certain genome regions provides amplifications patterns that are efficient to separate taxonomic groups. Among those used, repetitive extragenic palindromic sequence (REP) [8] and BOX (repetitive sequence *Streptococcus*) [9] are Polymerase Chain Reaction (PCR) fingerprint techniques developed for analyze genetic patterns in prokaryotes and both can be called Rep-PCR [10]. This analysis uses primers with repetitive elements, generating specific amplification patterns for each sample, which can be used as a way of differentiating between bacterial strains [11].

The BOX element consists of 154 bp repetitive sequences, organized into three subunits, which are: boxA (59 bp), boxB (45 bp), boxC (50 bp), these highly conserved DNA sequences were founded throughout the genome of *Streptococcus pneumoniae* [9]. The BOX element function may be related to the transcription regulation gene and these can be found near virulence genes. The BOX-PCR technique has been used to study the existing diversity of the genus *Streptomyces*. In different studies, the amplification patterns obtained were sufficient for the similarity analysis between the isolates [12, 13]. The REP sequence consists of 38 bp palindromic units [8]. In contrast to the BOX element, these elements are conserved in Gram negative enteric bacteria such as *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. A detailed analysis of the fragment patterns obtained

by the two techniques can become a good tool for analysis of genetic diversity among strains of the genus *Streptomyces*.

Antarctica is a poorly explored continent due mainly to difficulties in collecting samples. It is the coldest and windiest continent on Earth and such conditions select microorganisms that can be adapted to these environmental stress peculiarities [14]. Studies of Antarctic soil microbiota have been frequent, thus searching for new species of streptomycetes with potential for natural products distinct from those currently known [15, 16]. Two important regions in Antarctica are the Antarctica Peninsula and the King George Island, both regions have human activities, ranging from scientific stations to tourism [17].

Through DNA fingerprinting analysis, the objective of this work was to observe the genetic diversity of *Streptomyces* isolates collected in Antarctic soil, using the Rep-PCR technique with BOX-A1R, REP 1R and REP 2R primers.

Materials and Methods

Isolates of Streptomyces

Seven Antarctic soil samples from collection points: Brown II (64°82'34S, 62°85'73.83W), Brown III (64°82'31.83S, 62°85'77.33W), 58 (62°19'58.47S, 58°95'83.33W), CI (62°20'11.96S, 58°96'19.98W), CII (62°20'05.98S, 58°96'37.68W), Hill II (62°04'31.7W, 58°24'14.9S) and Nico II (62°20'04.00S, 58°96'37.68W) (Figure 1) were collected in Antarctic and used for this work. Ten grams of soil from each point collected was dissolved in 90 mL of peptone water. This solution remained for 2 h under 50 rpm stirring. Serial dilutions were made up to 10⁴ and 100 µL of each dilution were inoculated by surface spreading in Petri dish with different culture media: Starch Casein Agar SCA (10 g soluble starch, 0.3 g casein, 2 g nitrate potassium, 2 g sodium chloride, 2 g dipotassium phosphate, 0.05 g magnesium sulfate, 0.01 g ferrous sulfate, 15 g agar to 1 L distilled water), Oatmeal Agar (16 g oat, 14.4 g agar to 1 L water distilled), International *Streptomyces* Project 2 - ISP2 (4 g yeast extract, 10 g malt extract, 4 g glucose, 20 g agar to 1 L distilled water), Raffinose-Histidine – Raf Hist (2 g raffinose, 0.2 g L-histidine 0.1 g magnesium sulfate, 0.002 g ferrous sulfate, 0.2 g dipotassium sulfate, 4 g agar to 1 L of distilled water). The Petri dishes remained at room temperature until bacterial growth for up to 30 days. The choice of colonies isolation was made

by identifying morphological characteristics present in the genus *Streptomyces*. After isolation, the isolates were stored in 20% glycerol.

DNA extraction

Bacterial isolates were inoculated into 25 mL of Starch Casein broth in 125 mL Erlenmeyer flasks and incubated under shaking at 100 rpm at 28 °C for 48 h. To obtain the cells, the culture was centrifuged at 10,000 rpm for 5 minutes. Cells were resuspended in 700 µL SET buffer (75 mM sodium chloride, 25 mM EDTA pH 8.0, 20 mM Tris-HCl pH 7.5) where 35 µL lysozyme (20 mg/mL) was added. After incubation in water bath at 37 °C for 1h, 1% SDS (sodium dodecyl sulfate) and 20 µL proteinase K (20 mg/mL) were added. The mixture was incubated in a 55 °C water bath for 2 h. After this period, 1.25 M NaCl was added and the sample homogenized by inversion. The DNA cleaning steps were followed by: a chloroform wash; one with phenol; one with phenol and chloroform (1:1 volume) and one last with chloroform and isoamyl alcohol (24:1 volume). Then, 600 µL of isopropyl alcohol for DNA precipitation was added to the supernatant and incubated at -20 °C for 18 h. Subsequently, the sample was centrifuged for 5 min at 13,000 rpm, the supernatant was discarded and to the precipitated DNA 500 µL 70% cold ethyl alcohol was added. A new centrifugation at 13,000 rpm for 10 minutes was performed and the alcohol was discarded. After completely dry, the DNA was resuspended in 200 µL TE (5 mM Tris, 0.5 mM EDTA).

DNA amplification using BOX-PCR

In order to characterize the *Streptomyces* isolates, the primer BOX-A1R (Exxtend), sequence 5 'CTA CGG CAA GGC GAC GCT TGA CG 3' was used. For a 25 µL reaction volume, 2.5 µL 10X reaction buffer, 3.5 mM MgCl₂, 2.5 U Taq polymerase, 2.5 mM each dNTP, 2.5 pmol of primer, 150 µg of BSA and 100 µg of DNA. Amplification conditions comprised an initial denaturation step at 94 °C for 7 min, followed by 30 cycles that included a denaturation step at 94 °C for 75 sec, an annealing step at 44 °C for 75 sec, an extension step at 65 °C for 8 min 30 sec, ending in an extension step at 72 °C for 5 min. The resulting PCR products were analyzed on a 1.5% agarose gel in a 100 V, 80 mA and 80 W run using GelRed (QuatroG) as a fluorescent DNA dye and photographed on the Major Science UVCI photo document system. The generated fragments were compared with the 100 bp

molecular weight marker (Ludwig Biotec) and organized so that fragments with a size difference of less than 20 bp were considered equal.

DNA amplification using REP-PCR

REP (IDT) primers of sequences 1R 5' III ICG ICG ICA TCI GGC 3' and 2R 5' ICG ICT TAT CIG GCC TAC 3' were used to complement the characterization of the isolates. In a 25 μ L reaction volume, 2.5 μ L 10X reaction buffer, 4 mM MgCl₂ were added, 1.2 pmol from each primer, 0.8 mM from each dNTP, 2 U Taq polymerase and 100 μ g of DNA. Amplification conditions included an initial denaturation step at 94 °C for 5 min, followed by 35 cycles that included a denaturation step at 94 °C for 1 min, an annealing step at 40 °C for 1 min and an extension at 71 °C for 90 sec, ending with a 5 min extension step at 72 °C. The resulting PCR products were analyzed on a 1.5% agarose gel in a 100 V, 80 mA and 80 W run using GelRed (QuatroG) as a fluorescent DNA dye and photographed on the Major Science UVCI photo document system. The generated fragments were compared with the 100 bp molecular weight marker (Ludwig Biotec) and organized so that fragments with a size difference of less than 20 bp were considered equal.

Analysis of Amplification Patterns

Analysis of each fragment was performed manually for each isolate using the software CLIQS 1D Pro (Totalab). After identifying each fragment individually, its molecular weights were determined by comparing it to the 100 bp molecular weight standard (Ludwig Biotec) applied to the gel. Finally, the analyzed samples were grouped based on the pattern of the fragments generated in the two PCR techniques performed using Pearson's correlation coefficient as statistical analysis in the measure of similarity and UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) as a grouping method.

16S rRNA

For amplification of the entire 16S rRNA gene, the approximately 1500 bp fragment was divided into three smaller fragments and amplified separately. In a final 25 μ L reaction volume, 1.5 mM MgCl₂, 1U Taq Polymerase, 0.3 mM dNTPs, 5 pmol of each primer (Table 1) and 50 ng DNA were added. The amplification conditions used were: an initial denaturation cycle at 94 °C for 5 minutes followed by 35 cycles of 94 °C for 1 minute (denaturation), 59 °C for 1 minute (annealing)

and 72 °C for 2 minutes (extension), and a final extension of 10 minutes at 72 °C. The resulting PCR reaction products were analyzed on 1% agarose gels and photographed on the MS Major Science photodocumentation system. PCR products were sequenced at the UFCSPA Molecular Biology Laboratory (Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre), sequencing reactions were performed using BigDye® Terminator V3.1 Cycle Sequencing Reaction kit (Applied BioSystems, Foster City, USA), according to the manufacturer's instructions. Then the fragment analyzes were processed by ABI Prism 3130 Genetic Analyzer automated sequencer (Applied BioSystems, Foster City, CA). The sequences obtained were compared to the Genbank database, available in NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) and the higher scores of sequence similarity were chosen to identify the isolates.

Table 1 Primers used for 16S rRNA amplification

| Gene | Primers | Sequence 5'-3' |
|-------------|-------------|-----------------------|
| 16S rRNA | A sense | AGAGTTTGATCCTGGCTCA |
| | M antisense | CGCTACACCAGGAAATTCCAA |
| | Strep 1F | AAAGAGCTCGTAGGCGGCTT |
| | F antisense | ACGAGCTGACGACAGCCATG |
| | Strep 2F | CGGTGTACAGGTGGTGCATG |
| | H antisense | AGGAGGTGATCCAGCCGCAC |

Primers A sense and H antisense [18]. Other primers were designed by the research group.

Results

From the seven soil points collected it was possible to isolate 49 actinobacteria in six points. At Nico II, no characteristic colonies of the group in search were observed. Brown II was the collection point where the largest number of actinobacterial isolates was obtained, and the culture medium that provided the growth of a larger number of isolates of the *Streptomyces* group was the SCA. The isolates and their respective collection points and culture medium can be seen in table 2.

Table 2 List of isolates according to collection point and culture medium.

| Isolate | Site | Medium | Isolate | Site | Medium |
|-------------|-----------|----------|-------------|-----------|----------|
| LMA323St_1 | 58 | SCA | LMA323St_26 | Brown II | Raf Hist |
| LMA323St_2 | 58 | SCA | LMA323St_27 | Brown II | Raf Hist |
| LMA323St_3 | Brown II | SCA | LMA323St_28 | Brown II | Raf Hist |
| LMA323St_4 | Brown II | SCA | LMA323St_29 | CI | Raf Hist |
| LMA323St_5 | Brown II | SCA | LMA323St_30 | CI | Raf Hist |
| LMA323St_6 | Brown II | SCA | LMA323St_31 | CI | Raf Hist |
| LMA323St_7 | Brown II | SCA | LMA323St_32 | CII | Raf Hist |
| LMA323St_8 | Brown II | SCA | LMA323St_33 | CI | Raf Hist |
| LMA323St_9 | Brown II | SCA | LMA323St_34 | CI | SCA |
| LMA323St_10 | Brown II | SCA | LMA323St_35 | CII | Oat |
| LMA323St_11 | CI | SCA | LMA323St_36 | CI | SCA |
| LMA323St_12 | CII | SCA | LMA323St_37 | CII | ISP2 |
| LMA323St_13 | CII | SCA | LMA323St_38 | Brown III | SCA |
| LMA323St_14 | CII | SCA | LMA323St_39 | Brown III | ISP2 |
| LMA323St_15 | CII | SCA | LMA323St_40 | Brown III | ISP2 |
| LMA323St_16 | Hill II | SCA | LMA323St_41 | CII | Oat |
| LMA323St_17 | Hill II | SCA | LMA323St_42 | Brown II | SCA |
| LMA323St_18 | 58 | Oat | LMA323St_43 | CII | SCA |
| LMA323St_19 | CII | Oat | LMA323St_44 | CII | Raf Hist |
| LMA323St_20 | Hill II | Oat | LMA323St_45 | CII | ISP2 |
| LMA323St_21 | Brown III | ISP2 | LMA323St_46 | Brown II | ISP2 |
| LMA323St_22 | CII | ISP2 | LMA323St_47 | Brown II | SCA |
| LMA323St_23 | Hill II | ISP2 | LMA323St_48 | Hill II | ISP |
| LMA323St_24 | Brown II | SCA | LMA323St_49 | Brown III | SCA |
| LMA323St_25 | Brown II | Raf Hist | | | |

The BOX-A1R primer presented clearer amplification fragments, different from the patterns obtained using the REP 1R and 2R primers, which presented lower resolution and smaller molecular weight fragments. Only nine isolates that amplified with REP 1R and REP 2R primers showed less than three amplification fragments. The REP technique showed less distinct patterns, with fewer fragments and with lower resolution and molecular weights than those present in the BOX reaction.

A total of 451 fragments was observed using the BOX-A1R primer with an average of 9 fragments per isolate. Isolate LMA323St_2 presented the smallest number of fragments, with only 4 fragments being visualized, while isolate LMA323St_46 presented a profile with 15 fragments. The smallest fragment showed 170 bp and the largest fragment 2630 bp. With the obtained fragments a dendrogram was constructed (Figure 2) where the 49 isolates grouped into two large

groups with 70% of similarity (group A and B). In group A it is possible to observe two subgroups with 85% similarity (subgroup 1 and subgroup 2). No groups with 100% similarity were observed, which indicates the diversity of the isolates.

In the REP analysis, 310 fragments were obtained, 33.5% less than when using the BOX-A1R primer, with an average of five fragments per sample. The largest fragment observed was 2160 bp and the smallest 50 bp. Of the total isolates analyzed, four LMA323St_10, LMA323St_11, LMA323St_14 and LMA323St_43 presented only one amplification fragment and isolate LMA323St_40 presented 19 fragments differing from the others analyzed. In the analysis of the dendrogram generated for this primer (Figure 3), we can observe six distinct groups with 70% of similarity, demonstrating a greater diversity than that obtained with the BOX-A1R primer.

Unlike with BOX-PCR, the highest concentration of fragments between 100 bp and 399 bp was observed in REP-PCR. Of the isolates analyzed, 39 had at least one fragment between 100-199 bp, 34 isolates had at least one fragment in the range of 200-299 bp and 37 isolates between 300-399 bp.

Moreover, when analyzing each isolate individually, it was observed that isolates LMA323St_10 and LMA323St_12 showed high similarity in both techniques (Figures 2 and 3). Similar too, isolates LMA323St_25 and LMA323St_26, are about 90% similar in both techniques. In contrast, isolates LMA323St_7 and LMA323St_6 are close in the REP-PCR dendrogram (Figure 3), about 90% similar, while in the BOX-PCR dendrogram (Figure 2), these same isolates are approximately 60% distant. Isolates LMA323St_13, LMA323St_16, LMA323St_17 and LMA323St_19 have 90% of similarity when analyzed in the REP-PCR dendrogram. In BOX-PCR, we can observe that isolates LMA323St_13, LMA323St_16 and LMA323St_17 are also close, although isolate LMA323St_17 is further away, but still within subgroup 1 of group A.

For better understanding of these patterns, some isolates of each cluster had their 16S rRNA amplified. The isolates and their species identification can be seen in Table 3. There is no certain identification, the higher similarity percentage was 98,82. All isolates are *Streptomyces* and most of them seems to be related to *S. globisporus*.

Table 3 Isolates and their respective species following Genbank database

| Isolate | Site | Size (bp) | Isolates Accession Number | Id (%) | Query (%) | Species | Accession Number | Reference |
|-------------|------|-----------|---------------------------|--------|-----------|-----------------------|------------------|------------|
| LMA323St_2 | 58 | 1281 | MT612461 | 95,57 | 100 | <i>S. globisporus</i> | CP013738.1 | [19] |
| LMA323St_3 | BII | 1168 | MT612462 | 97,19 | 100 | <i>S. lunaelactis</i> | KU714921.1 | [20] |
| LMA323St_6 | BII | 1270 | MT612463 | 98,82 | 100 | <i>S. globisporus</i> | CP013738.1 | [19] |
| LMA323St_18 | 58 | 1293 | MT612464 | 98,16 | 100 | <i>S. globisporus</i> | CP013738.1 | [19] |
| LMA323St_20 | HII | 1261 | MT612465 | 94,71 | 99 | <i>S. parvus</i> | EU741140.1 | Goodfellow |
| LMA323St_21 | BIII | 1295 | MT612466 | 94,71 | 100 | <i>S. globisporus</i> | CP013738.1 | [19] |
| LMA323St_28 | BII | 1263 | MT612467 | 95,06 | 100 | <i>S. globisporus</i> | CP013738.1 | [19] |
| LMA323St_34 | CI | 1440 | MT612468 | 94,81 | 98 | <i>S. anulatus</i> | EU647474.1 | [21] |
| LMA323St_41 | CII | 1311 | MT612469 | 98,28 | 87 | <i>S. anulatus</i> | HQ143607.1 | [22] |
| LMA323St_45 | CII | 1266 | MT612470 | 94,58 | 100 | <i>S. fildesensis</i> | MK742730.1 | [23] |

Discussion

Antarctica is known to be the most inhospitable environment on the planet, mainly due to its low temperature and lack of available water [24], but despite its unique climatic conditions, a large diversity of endemic organisms has already been identified [15] and it is believed that many species are not yet known. From this perspective, in all collection points and in all cultivation media used, the growth of bacteria and fungi with distinct colonial morphologies was observed. The methodology chosen for isolation is extremely important for obtaining the isolates, as the physical and chemical factors for the cultivation of microorganisms will determine which of them will be able to grow under such conditions. In the Antarctic continent, the presence of psychotrophic and psychrotolerant microorganisms is expected, which are nothing but mesophiles adapted to low temperatures that compete equally for resources in the extreme environment and with a high capacity to withstand seasonal climate change [25].

Studies have shown the applicability of the fingerprinting methodology, based on the amplification of palindromic sequences common in the DNA of different microorganisms [26]. Despite being promising, there are limitations in the technique that make it difficult to elaborate an analysis and grouping profile common to all microorganisms. An increase in extension time led to the production of higher molecular weight fragments. This can be explained because this modification allows the enzyme to polymerize more complete products. Yang and Yen [27] has demonstrated that when different hybridization temperatures were applied, a difference in the resolution of the produced bands could be observed, besides the presence of fragments with different molecular weights. In general, the authors

observed that increasing the annealing temperature leads to amplification of fragments with lower molecular weights, and decreasing the annealing temperature leads to the production of fragments with higher molecular weights. However, in the same study a good reproducibility of the technique was observed, since the results obtained with different annealing temperatures showed some specific amplification patterns and some variables in different strains analyzed [27]. This shows that it is important to standardize a technique execution, but that changes in reaction conditions are acceptable if there is a reliable database for comparison of results. Lanoot et al. [12] seeking to elucidate synonymous issues of the genus *Streptomyces*, conducted a study with 473 streptomycetes and observed that 350 strains presented a fragment pattern, once again, demonstrating the applicability of the technique to differentiate microorganisms.

The REP technique showed less distinct patterns and fewer fragments generated when comparison to BOX-PCR. This may be justified by the fact that the REP 1R and REP 2R primers are shorter and have a large proportion of deoxinosins [28]. Deoxinosins are nucleosides formed by the binding of hypoxanthine to a deoxyribose and are useful in molecular biology for primer design as they may nonspecifically pair with adenine (A), thymine (T) or cytosine (C) bases. Palindromic extragenic repetitive DNA sequences (REP) have been found to be widely distributed among bacteria of phylogenetically different groups [29]. A report using REP primers [30] observed that REP was less reliable than those using intergenic repetitive consensus sequence (ERIC) primers in differentiating *E. coli* strains, but their analysis involved a small number of samples (30) with a limited number of fragments.

The similarity percentages founded in Genbank were not high enough to affirm the correct identification of this isolates, based on 16S rRNA. This was already expected due to the known difficult to use this gene to identify members of *Streptomyces* genera [7]. Besides, the species found in this study are related to soil and plants isolates [31], caves [32], marine environments [33], even walls [34], with only one of them directly associated with Antarctic, *S. fildesensis* [35, 22]. The cluster that contains *S. fildesensis* isolate is repeated in both BOX and REP dendrograms, but *S. globisporus* isolates are spread among the clusters.

Observe the same clusters in different reactions may assist in the process of characterization of isolates, linking the similarities, but lower percentages

in similarities fail to give strength to the results. Further studies added to the results obtained may provide better data to help and facilitate the identification of microorganisms of the *Streptomyces* genus, like the sequencing of certain genes, whereas even the whole gene 16S rRNA does not give all information needed for species identification, as we can see by sequencing some 16S rRNA.

References

- [1] Diminic J, Starcevic A, Lisfi M, Baranasic D, Gacesa R, Hranueli D, Long PF, Cullum J, Zucko J (2013) Evolutionary concepts in natural products discovery: what actinomycetes have taught us. *J Ind Microbiol Biotech* 41:211-217. <https://doi.org/10.1007/s10295-013-1337-8>
- [2] Busti E, Monciardini P, Cavaletti L, Bamonte R, Lazzarini A, Sosio M, Donadio S (2006) Antibiotic-producing ability by representatives of the newly discovered lineage of actinomycetes. *Microbiol* 152:675-683. <https://doi.org/10.1099/mic.0.28335-0>
- [3] Nett M., Ikeda H. Moore BS (2009) Genomic basis for natural product biosynthetic diversity in the actinomycetes. *Nat Prod Rep* 26:1362-1384. <https://doi:10.1039/b817069j>
- [4] Liu R, Deng Z, Liu T (2018) *Streptomyces* species: Ideal chassis for natural product discovery and overproduction. *Metab Eng* 50:74-84. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2018.05.015>
- [5] Cheah YK, Lee LH, Chieng CYC, Wong VL (2015) Isolation, identification and screening of Actinobacteria in volcanic soil of Deception Island (the Antarctic) for antimicrobial metabolites. *Pol Polar Res* 36:67-78. <https://doi.10.1515/popore-2015-0001>
- [6] Barka EA, Vasta P, Sanchez L, Gaveau-Vaillant N, Jacquard C, Klenk HP, Clément C, Ouhdouch Y, Wezel GP (2015) Taxonomy, Physiology and Natural Products of Actinobacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 80:1-43. <https://doi:10.1128/MMBR.00019-15>
- [7] Antony-Babu S, Stien D, Eparvier V, Parrot D, Tomasi S, Suzuki MT (2017) Multiple *Streptomyces* species with distinct secondary metabolomes have identical 16S rRNA gene sequences. *Sci Rep*. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11363-1>

- [8] Stern MJ, Ames GF-L, Smith NH, Robinson EC, Higgins CF (1984) Repetitive Extragenic Palindromic Sequences: A Major Component of the Bacterial Genome. *Cell* 34:1015-26. [https://doi:10.1016/0092-8674\(84\)90436-7](https://doi:10.1016/0092-8674(84)90436-7)
- [9] Martin B, Humbert O, Chamber M, Guenzi E, Walker J, Mitchell T, Andrew P, Prudhomme M, Alloing G, Hakenbeck R, Morrison DA, Boulnois GJ, Claverys JP (1992) A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. *Nucl Ac Res* 20:3479-3843. <https://doi:10.1093/nar/20.13.3479>
- [10] Michelim L, Muller G, Zacaria J, Delamare APL, Costa SOP, Echeverrigaray S (2008) Comparison of PCR-Based Molecular Markers for the Characterization of *Proteus mirabilis* Clinical Isolates. *Braz J Infect Dis* 12:423-29. <https://doi:10.1590/s1413-86702008000500014>
- [11] Korvin D, Graydon C, McNeil L, Mroczek M (2014) Banding profile of Rep-PCR experiments with varying extension times and annealing temperatures. *JEMI* 18:146–149.
- [12] Lanoot B, Vancanneyt M, Dawyndt P, Cnockaert M, Zhang J, Huang Y, Liu Z, Swings J (2004) BOX-PCR fingerprinting as a powerful tool to reveal synonymous names in the genus *Streptomyces*. Emended descriptions are proposed for the species *Streptomyces cinereorectus*, *S. fradiae*, *S. tricolor*, *S. colombiensis*, *S. filamentosus*, *S. vinaceus* and *S. phaeopurpureus*. *Syst Appl Microb* 27:84-92. <https://doi:10.1078/0723-2020-00257>
- [13] Borba MP (2016) Characterization of actinobacterial isolates using BOX-PCR and URP-PCR and purification of bioactive compound produced by a *Streptomyces* sp. Dissertation, Universidade Federal do Rio Grande do Sul
- [14] Bratchkova A, Ivanova V (2011) Bioactive Metabolites Produced by Microorganisms Collected in Antarctica and the Artic. *Biotechnol Biotec Equip* 25: 1-7. <https://doi.org/10.5504/BBEQ.2011.0116>
- [15] Encheva-Malinova M, Stoyanova M, Avramova H, Pavlova Y, Gocheva B, Ivanova I, Moncheva P (2014) Antibacterial potential of streptomycete strains from Antarctic soils. *Biotechnol Biotec Equip* 28:721-727. <https://doi.10.1080/13102818.2014.947066>
- [16] Lamilla C, Braga D, Castro R, Guimarães C, Castile LVA, Freire DMG, Barrientos L (2018) *Streptomyces luridus* So3.2 from Antartic soil as a novel

producer of compounds with bioemulsification potential. PLoS One. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196054>

[17] Amaro E, Padeiro A, Ferro AM, Mota AM, Leppe M, Verkulich S, Hughes KA, Peter HU, Canário J (2015) Assessing trace element contamination in Fildes Peninsula (King George Island) and Ardley Island, Antarctic. Mar Pollut Bull 97:523-527. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2015.05.018>

[18] Edwards U, Rogall T, Blöcker H, Böttger E (1989) Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes, characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. Nuc Acids Res 17:7843-7853. <https://doi.org/10.1093/nar/17.19.7843>

[19] Wang L, Wang S, He Q, Yu T, Li Q, Hong B (2012) Draft genome sequence of *Streptomyces globisporus* C-1027, which produces an antitumor antibiotic consisting of a nine-membered enediyne with a chromoprotein. J Bacteriol. <https://doi.org/10.1128/JB.00797-12>

[20] Maciejewska M, Adam D, Martinet L, Naômé A, Calusińska M, Delfosse P, Carnol M, Barton HA, Hayette MP, Smargiasso N, De Pauw E, Hanikenne M, Baurain D, Rigali S (2016) A Phenotypic and Genotypic Analysis of the Antimicrobial Potential of Cultivable *Streptomyces* Isolated from Cave Moonmilk Deposits. Front Microbiol 21(1):1455. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01455>

[21] Matter AM, Hoot SB, Anderson PD, Neves SS, Cheng YQ (2009) Valinomycin biosynthetic gene cluster in *Streptomyces*: conservation, ecology and evolution. PLoS One. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007194>

[22] Jin F, Ding Y, Ding W, Reddy MS, Fernando WG, Du B (2011) Genetic diversity and phylogeny of antagonistic bacteria against *Phytophthora nicotianae* isolated from tobacco rhizosphere. Int J Mol Sci. <https://doi.org/10.3390/ijms12053055>

[23] Lavin PL, Yong ST, Wong CMVL, Stefano M (2016) Isolation and characterization of Antarctic psychrotroph *Streptomyces* sp. strain INACH3013. Antarctic Sci. <https://doi.org/10.1017/S0954102016000250>

[24] Durán P, Barra PJ, Jorquera MA, Viscardi S, Fernandez C, Paz C, Mora ML, Bol R. 2019. Occurrence of Soil Fungi in Antarctic Pristine Environments. Front Bioeng Biotechnol. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00028>

[25] Martinez A, Cavello I, Garmendia G, Rufo C, Cavalito S, Vero S (2016) Yeasts from sub-Antarctic region: biodiversity, enzymatic activities and their potential as

oleaginous microorganisms. *Extremophiles* 20:759-769.
<https://doi.10.1007/s00792-016-0865-3>

[26] Chapaval L, Moon, D, Gomes, J, Duarte, F, Tsai, S (2006). Using the REP - PCR technique in the tracking of *Staphylococcus aureus* in a milking room, for milk quality production. *Braz J Vet Res and Anim Sci* 43:309-320.
<https://doi.org/10.11606/issn.1678-4456.bjvras.2006.26478>

[27] Yang A, Yen C (2012) PCR optimization of BOX-A1R PCR for microbial source tracking of *Escherichia coli* in waterways. *JEMI* 16:58-89

[28] Martin FH, Castro MM, Aboul-she F, Tinoco I (1985) Base pairing involving deoxyinosine: implications for probe design. *Nucl Ac Res* 13:8927-8938.
<https://doi.10.1093/nar/13.24.8927>

[29] Versalovic J, Lupski JR (1998) Interspersed Repetitive Sequences in Bacterial Genomes. In: Brujin FJ, Lupski JR, Weinstock GM (ed) *Bacterial Genomes - Physical Structure and Analysis*. Springer Link, New York, pp 38-48

[30] Lipman LJA, A. de Nijs, Lam TJGM, Gaastra W (1995) Identification of *Escherichia coli* strains from clinical mastitis by serotyping and DNA polymorphism patterns with REP and ERIC primers. *Vet Microb* 43:13-19.
[https://doi.10.1016/0378-1135\(94\)00070-d](https://doi.10.1016/0378-1135(94)00070-d)

[31] Chen Z, Ou P, Liu L, Jin X (2020) Anti-MRSA Activity of Actinomycin X2 and Collismycin A Produced by *Streptomyces globisporus* WA5-2-37 From the Intestinal Tract of American Cockroach (*Periplaneta americana*). *Frontiers in Microbiology*.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00555>

[32] Rangseekeaw P, Pathom-aree W (2019) Cave Actinobacteria as Producers of Bioactive Metabolites. *Frontiers in Microbiol.*
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00387>

[33] Al-Dhabi NA, Ghilan AM, Esmail GA, Arasu MV, Duraipandiyani V, Ponmurugan K (2019) Environmental friendly synthesis of silver nanomaterials from the promising *Streptomyces parvus* strain Al-Dhabi-91 recovered from the Saudi Arabian marine regions for antimicrobial and antioxidant properties. *J Photochem Photobiol, B: Bio*
<https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2019.111529>

[34] Gonzalez-Pimentel JL, Jurado V, Laiz L, Saiz-Jimenez C (2019) Draft Genome Sequence of a Granaticin-Producing Strain of *Streptomyces parvus* Isolated from a Roman Tomb in the Necropolis of Carmona, Spain. *Microbiol Resour Announc.*
<https://doi.org/10.1128/MRA.01127-19>

[35] Núñez-Monteiro K, Lamilla C, Abanto M, Maruyama F, Jorquera MA, Santos A, Martinez-Urtaza J, Barrientos L (2019) Antarctic *Streptomyces fildesensis* So13.3 strain as a promising source for antimicrobials Discovery. Sci Rep. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43960-7>

Fig. 1 Map of the sample points.

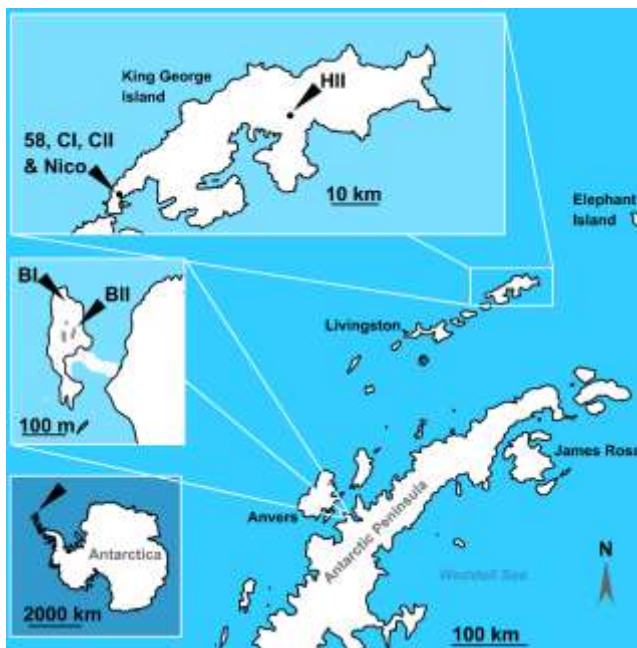


Fig. 2 Dendrogram showing the clusters generated from the different amplification patterns of *Streptomyces* isolates obtained from BOX-PCR (UPGMA - Pearson's correlation).

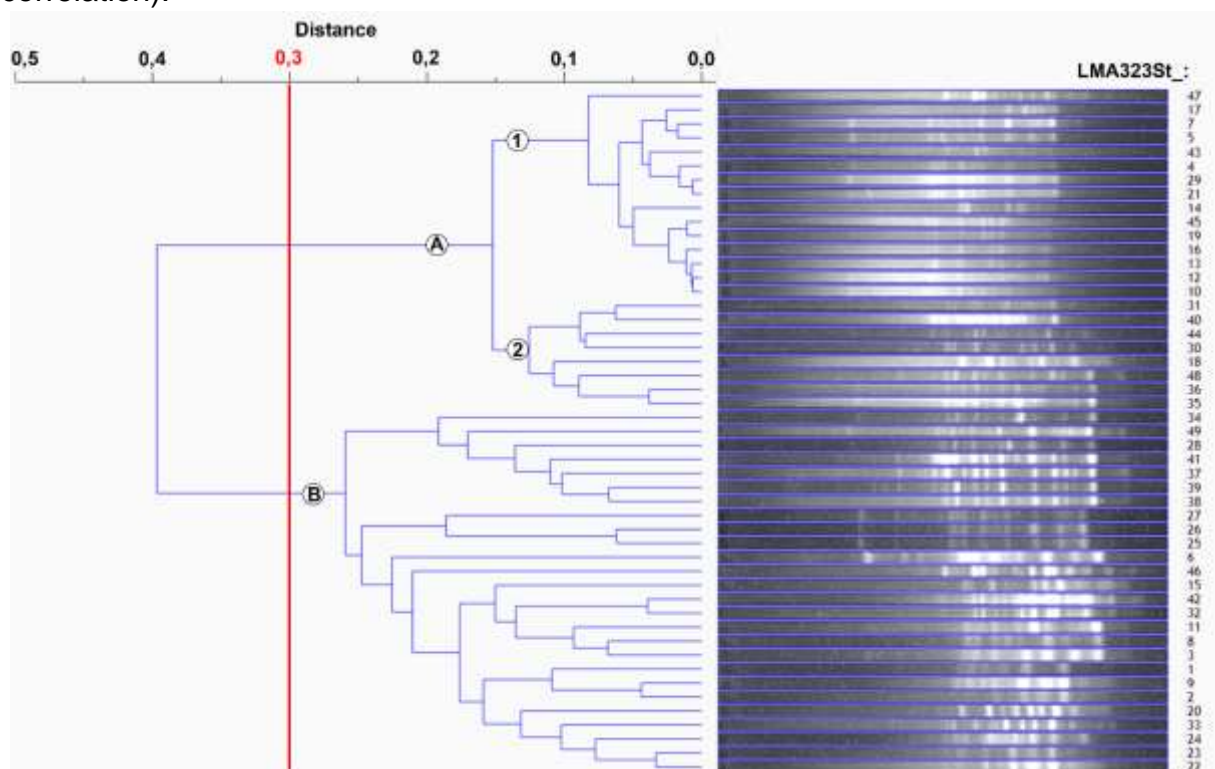
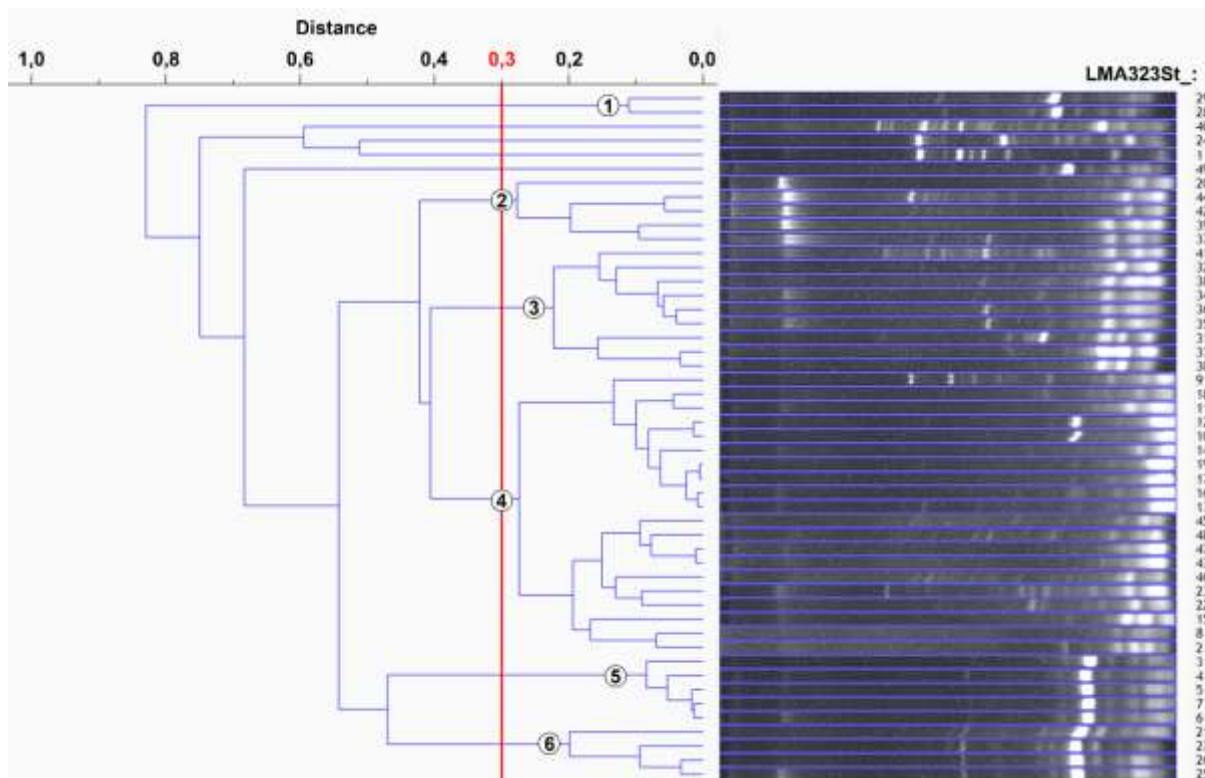


Fig. 3 Dendrogram showing the clusters generated from the different amplification patterns of *Streptomyces* isolates obtained from REP-PCR (UPGMA - Pearson's correlation).



5.2. Artigo 2

Efforts in molecular identification of *Streptomyces* strains from Antarctic soil

Marcela Proença Borba¹ (0000-0003-4909-969X), Ana Paula Ferrero¹, Renata de Souza Lameira¹, Sueli Van Der Sand¹ (0000-0002-8591-6514)

1- Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

Corresponding author: Marcela Proença Borba (marcela.borba@ufrgs.br)

Abstract

Despite the worldwide use of 16S rRNA to identify bacterial species, the use of this gene does not discriminate the 750 species in the genus *Streptomyces*. A MLST scheme was constructed with *rpoB*, *gyrB*, *recA*, *trpB* and *atpD* genes to assess the genomic variances in *Streptomyces* species evolution. We analyze the housekeeping genes in 49 *Streptomyces* isolates from Antarctic soil. It was used two different databases, GenBank and EzBioCloud to compare the 16S sequences. The species founded in both databases are not the same, but in both cases a few isolates achieve the necessary high percentage to consider the identification. There is a lack of deposited sequences in the other genes, as the data in GenBank proved to be insufficient. Isolate LMA323St_9 has the potential to be studied as a novel species. Besides that, the use of housekeeping genes gives robust phylogenetic information to understand ingroup relationships.

Keywords 16S rRNA, housekeeping genes, genomic database

Declarations

Funding: This study was funded by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) (88882.439723/2019-01)

Conflicts of interest/Competing interests: The authors declare that they have no

conflict of interest.

Availability of data and material: due to the large number of nucleotide sequences, database accession numbers are found in tables throughout the manuscript and in the supplementary data on online resources.

Authors' contributions

Marcela P. Borba and Sueli Van Der Sand: work conception. Marcela P. Borba, Renata S. Lameira and Ana Paula Ferrero: data acquisition and analysis. Marcela P. Borba: data interpretation and original draft writing. Sueli Van Der Sand: critical revision and supervision.

Acknowledgements

The authors would like to thank the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior for financial support and Prof. Dr. Paris Lavin for the discussions that help the sequences deposit and data analysis.

Introduction

Over thirty years ago, Woese said that rRNAs were the main and most useful molecular markers because of their constant functionality (Woese 1987). Moreover, these genes are present in all organisms and different positions in their nitrogenous base change at markedly different rates, thus allowing phylogenetic studies from the analysis of these positions. Over the years, new insights into these genes have been established: the 16S rRNA gene is approximately 1550 bp and consists of conserved and variable regions, and the amplification of this gene occur through complementary universal primers to these conserved regions (Clarridge 2004). In addition, the genetic information contained in this gene is critical and unaffected by horizontal gene transfer (Acinas et al. 2004). In the 2000s, the largest nucleotide sequence database, GenBank, contained about 90,000 sequences of the 16S rRNA gene (Clarridge 2004). There are currently more than 40 million 16S rRNA deposited sequences in the GenBank Nucleotide database only for bacteria. EzBioCloud (Yoon et al. 2017), another database available online has over 65,000 16S rRNA sequences, previously curated from whole genomes deposited in GenBank. Although widely used to identify a number of microorganisms (Deiner et

al. 2015; Srinivasan et al. 2015), there are some impasses regarding the use of 16S rRNA in at least two bacterial genera: in the group *Bacillus*, strains have more than 99% sequence identity and it is very difficult to identify species within the genus using this technique alone (Fox et al. 1992); The same difficulty exists in the genus *Streptomyces*. In the 1970s, the systematic of this genus was quite troubled, with over 3,000 species identified, mainly in patent registrations. After efforts such as the International *Streptomyces* Project (Shirling and Gottlieb 1966), where over forty researchers from seventeen countries have come together to standardize criteria, methods and culture media for isolating and identifying species of the genus *Streptomyces*, there are currently about 750 species officially recognized (Piao et al. 2018). Studies involving 16S rRNA were essential in determining group taxonomy, although there were differences between strains with similar sequences of the gene in question. As demonstrated by Antony-Babu et al. (2017), ten *Streptomyces* sp. with distinct phenotypes of both colony morphology and environmental stress tolerance have identical 16S rRNA sequences. New molecular biology techniques have allowed further studies of genus phylogeny, such as DNA hybridization and DNA fingerprinting, but none of them showed sufficient resolution and reproducibility to be a resource for species identification (Guo et al. 2008). Multilocus Sequence Typing (MLST) has been widely used in pathogen characterization since its conception (Maiden et al. 1998) due to its high reproducibility. The technique consists of identifying alleles directly from the nucleotide sequences of internal fragments of housekeeping genes, thus creating genetic patterns that characterize the strain under study. Guo et al. (2008), developed *Streptomyces* MLST using the following genes: *atpD* (ATP synthase F1), *recA* (recombinase A), *trpB* (tryptophan synthase β chain), *rpoB* (RNA polymerase β subunit), *gyrB* (DNA gyrase subunit β) and 16S rRNA, to facilitate the understanding of genera evolution.

The interest in the genus *Streptomyces* is due to its large capacity to produce bioactive compounds. Natural products from bacteria of the genus have a long history and a great contribution to human health (Baltz 2016). About 70% of the known antibiotics are produced by streptomycetes (Bérdy 2012). Screening of extracts from potential producers guided by biological activity with subsequent sample fractionation, which had been widely used, showed some limitation by the large re-isolation of bioactive molecules (Aigle et al. 2014). However, genome

sequencing of a number of actinomycetes completely changed the perception of these strains as secondary metabolite producers, as they have genomes that contain a large number of biosynthesis genes (Nett et al. 2009) that may be silenced in certain situations of laboratory cultivation. In the search for new antimicrobial compounds and with the certainty that *Streptomyces* is still a promising genus in this regard, we also seek the isolation of strains from underexploited environments that exert great selective pressure, such as the Antarctic continent (Encheva-Malinova et al. 2014; Lamilla et al. 2018; Lavin et al. 2016). Thus, the objective of this work is to discuss the identification of 49 *Streptomyces* isolates from the Antarctic soil.

Material and methods

Isolates and DNA extraction

The bacterial isolates and the DNA extraction were described in Borba et al. (2020).

Housekeeping genes and 16S rRNA amplification

The 16S rRNA and five housekeeping genes (*rpoB*, *atpD*, *gyrB*, *recA* and *trpB*) were amplified to identify 49 isolates. The primers used in each reaction are listed in Table 1. The amplification of the entire 16S rRNA gene was performed in 39 isolates as Borba et al. (2020). The 16S rRNA data from 10 isolates used in Borba et al. (2020) were also used in this work. The amplification conditions for *rpoB*, *gyrB* and *trpB* genes, were, in a 25 μ L volume: 1 mM MgCl₂, 1 U Taq polymerase, 0.1 mM dNTPs, 2.5 μ L DMSO, 1.2 pmol of both primers and 50 ng of DNA. For *atpD* and *recA* genes, the reaction was 1 U Taq polymerase, 2.5 μ L DMSO and 50 ng DNA, 1.3 mM MgCl₂, 2.4 pmol of each primer, 0.15 mM dNTPs. Amplification of the *rpoB*, *gyrB*, *trpB*, *recA* and *atpD* genes began with DNA denaturation at 95 °C for 5 minutes, followed by 30 cycles of 95 °C for 30 seconds, 30 seconds for annealing according to specific primer temperatures recorded in Table 1, and an extension period of 90 seconds at 72 °C, and a final extension at 72 °C for 10 minutes. The resulting PCR reaction products were analyzed on 1% agarose gels. PCR products were sequenced at the UFCSPA Molecular Biology Laboratory (Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre) and sequencing reactions were performed using BigDye® Terminator V3.1 Cycle

Sequencing Reaction kit (Applied BioSystems, Foster City, USA), according to the manufacturer's instructions. Then the fragment analyzes were processed by ABI Prism 3130 Genetic Analyzer automated sequencer (Applied BioSystems, Foster City, CA).

Table 1: Primers used for housekeeping genes amplification.

| | Sequence 5'-3' | T _a |
|--|--|----------------|
| 16S rRNA | AGAGTTTGATCCTGGCTCA CGCTACACCAGGAAATTCCAA | 59 |
| | AAAGAGCTCGTAGGCGGCTT ACGAGCTGACGACAGCCATG | 59 |
| | CGGTGTACAGGTGGTGCATG AGGAGGTGATCCAGCCGCAC | 59 |
| | <i>rpoB</i> GAGCGCATGACCACCCAGGACGTCGAGGC CCTCGTAGTTGTGACCCTCCCACGGCATGA | 65 |
| | <i>gyrB</i> GAGGTCGTGCTGACCGTGCTGCACCGCGGCGGCAGTTCGGC GTTGATGTGCTGGCCGTCGACGTCGGCGTCCGCCAT | 65 |
| | <i>atpD</i> GTCGGCGACTTCACCAAGGGCAAGGTGTTCAACACC GTGAACTGCTTGGCCACGTGGGTGTTCTGGGACAGAA | 63 |
| <i>recA</i> CCGCRCTCGCACAGATTGAACGSCAATTC GSCAGGTCCGGGTTGTCCTTSAGGAAGTTGCG | 60 | |
| <i>trpB</i> GCGCGAGGACCTGAACCACACCGGCTCACACAAGATCAACA TCGATGGCCGGGATGATGCCCTCGGTGCGCGACAGCAGGC | 66 | |

16S rRNA primers: designed by the research group; other primers: Guo et al. (2008). T_a: annealing temperature

Sequence analysis

The 16S rRNA sequences were analyzed in the Geneious Prime 9.0.5., where they were aligned through Map Reference with *Streptomyces coelicolor* A3(2) as reference for connect the three gene fragments sequenced separately. The sequences were then compared to the GenBank database, using the following criteria: sequences with 97% or more similarity recorded in published research papers or deposited by Emeritus Professor Michael Goodfellow of Newcastle University – UK were considered suitable to identification. In the EzBioCloud database, the 16S rRNA sequences were examined through the software cut-off point default. The genes sequences (*rpoB*, *recA*, *trpB*, *gyrB*, *atpD*) were trimmed in Geneious Prime 9.0.5. The sequence with higher percentage of similarity and query

are the one chosen for identification in GenBank database, matches under 97% were considered only the genus.

The six alleles 16S rRNA, *trpB*, *recA*, *rpoB*, *gyrB* and *atpD* had their Sequence Type (ST) assignments using the *Streptomyces* database at PubMLST (Jolley et al. 2018). Both strands were sequenced by using forward and reverse primers. The consensus strand was achieved by alignment in Geneious Prime 9.0.5.

Phylogenetic trees

Phylogenetic trees were built using the MEGA X software (Kummar et al. 2018) using the neighbor-joining method with all the isolates and the following sequences from NCBI: *Streptomyces rimosus* ATCC 10970 (NZ_CP023688), *Streptomyces griseus subsp. griseus* NRBC 13350 (NC_010572), *Streptomyces coelicolor* A3 (2) (NC_003888), *Streptomyces avermitilis* MA-4680 = NBRC 14893 (NC_003155) with *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (NC_000962) as an outgroup. The bootstrap technique was used to evaluate the confidence of the found branches in the built trees by the software, and the sequences were analyzed 500 times. The Kimura 2-parameter model was chosen to establish nucleotide evolution. Trees were constructed for each gene separately and with all concatenated genes.

Results

All 49 isolates had the six housekeeping genes amplified and sequenced. Following analysis of the sequences in Geneious Prime, they were compared with the sequences deposited in the GenBank database and in the EzBioCloud database. In the EzBioCloud, that has only sequences for 16S rRNA, we could see seven different species in Top Hit Match: *Streptomyces fulvissimus*, *Streptomyces fulvorobeus*, *Streptomyces globisporus*, *Streptomyces griseus subsp. griseus*, *Streptomyces pratensis*, *Streptomyces urticae* and *Streptomyces yanii*. A number of 15 isolates presented only one hit with this database: LMA323St_9 has an 85.96% similarity with *S. yanii*, demonstrating that this strain may be of unknown specie, considering the low percentage; LMA323St_12, LMA323St_13, LMA323St_16, LMA323St_19, and LMA323St_45 showed similarity only with *S. urticae*, even though they also presented a low similarity percentage; LMA323St_26, LMA323St_34, LMA323St_36, LMA323St_46, and LMA323St_48 have matched with *S. fulvorobeus*; LMA323St_20 and LMA323St_40 were linked to *S. pratensis*;

LMA323St_4 and LMA323St_39 presented some relation with *S. griseus*. Only seven isolates, marked in bold in Table 2, have a high percentage of similarity in this database that could be consider a proper identification and all of them are *S. fulvissimus* by the EzBioCloud cut-off default. Although this database selects the Top Hit Match for each isolate, it is possible to observe that 34 isolates have more than only one hit: the isolates identified as *S. fulvissimus* (Table 2), including the seven ones cited above, have the same similarity percentage with other species: *Streptomyces setonii*, *Streptomyces anulatus*, *Streptomyces badius*, *Streptomyces cyaneofuscatus* and *Streptomyces luridiscabiei*. In the same way, the isolates identified as *S. globisporus* also shows similarities with *S. fulvorobeus*.

Table 2: Top Hit Match in EzBioCloud from *Streptomyces* 16S rRNA sequences. Isolates marked in bold are considerate identified.

| Isolate | Size (bp) | Id (%) | Species | Accession Number |
|--------------------|-------------|--------------|------------------------------|------------------|
| LMA323St_1 | 1161 | 97.96 | <i>S. fulvissimus</i> | CP005080 |
| LMA323St_2 | 1281 | 96.23 | <i>S. globisporus</i> | AB184203 |
| LMA323St_3 | 1168 | 97.70 | <i>S. fulvissimus</i> | CP005080 |
| LMA323St_4 | 1260 | 95.50 | <i>S. griseus</i> | M76388 |
| LMA323St_5 | 1259 | 98.12 | <i>S. fulvissimus</i> | CP005080 |
| LMA323St_6 | 1270 | 99.35 | <i>S. fulvissimus</i> | CP005080 |
| LMA323St_7 | 1271 | 99.51 | <i>S. fulvissimus</i> | CP005080 |
| LMA323St_8 | 1263 | 99.92 | <i>S. fulvissimus</i> | CP005080 |
| LMA323St_9 | 1474 | 85.96 | <i>S. yanii</i> | AB006159 |
| LMA323St_10 | 1166 | 99.56 | <i>S. fulvissimus</i> | CP005080 |
| LMA323St_11 | 1263 | 97.22 | <i>S. globisporus</i> | AB184203 |
| LMA323St_12 | 1258 | 97.71 | <i>S. urticae</i> | KY788226 |
| LMA323St_13 | 1254 | 95.39 | <i>S. urticae</i> | KY788226 |
| LMA323St_14 | 1260 | 99.35 | <i>S. fulvissimus</i> | CP005080 |
| LMA323St_15 | 1256 | 96.30 | <i>S. globisporus</i> | AB184203 |
| LMA323St_16 | 1265 | 93.85 | <i>S. urticae</i> | KY788226 |
| LMA323St_17 | 1263 | 95.91 | <i>S. globisporus</i> | AB184203 |
| LMA323St_18 | 1293 | 98.57 | <i>S. fulvissimus</i> | CP005080 |
| LMA323St_19 | 1268 | 95.09 | <i>S. urticae</i> | KY788226 |
| LMA323St_20 | 1261 | 96.46 | <i>S. pratensis</i> | JQ806215 |
| LMA323St_21 | 1295 | 95.29 | <i>S. globisporus</i> | AB184203 |
| LMA323St_22 | 1294 | 95.53 | <i>S. globisporus</i> | AB184203 |
| LMA323St_23 | 1290 | 95.76 | <i>S. globisporus</i> | AB184203 |

| | | | | |
|--------------------|-------------|--------------|------------------------------|----------|
| LMA323St_24 | 1295 | 93.71 | <i>S. globisporus</i> | AB184203 |
| LMA323St_25 | 1292 | 95.27 | <i>S. globisporus</i> | AB184203 |
| LMA323St_26 | 1435 | 96.42 | <i>S. fulvorobeus</i> | AB184203 |
| LMA323St_27 | 1259 | 94.52 | <i>S. globisporus</i> | AB184203 |
| LMA323St_28 | 1263 | 95.02 | <i>S. globisporus</i> | AB184203 |
| LMA323St_29 | 1261 | 96.24 | <i>S. globisporus</i> | AB184203 |
| LMA323St_30 | 1071 | 93.31 | <i>S. globisporus</i> | AB184203 |
| LMA323St_31 | 1432 | 98.85 | <i>S. fulvissimus</i> | CP005080 |
| LMA323St_32 | 1268 | 99.75 | <i>S. fulvissimus</i> | CP005080 |
| LMA323St_33 | 1466 | 92.22 | <i>S. yanii</i> | AB006159 |
| LMA323St_34 | 1440 | 95.94 | <i>S. fulvorobeus</i> | AB184711 |
| LMA323St_35 | 1257 | 97.29 | <i>S. globisporus</i> | AB184203 |
| LMA323St_36 | 1426 | 95.95 | <i>S. fulvorobeus</i> | AB184711 |
| LMA323St_37 | 1271 | 96.91 | <i>S. fulvissimus</i> | CP005080 |
| LMA323St_38 | 1265 | 95.32 | <i>S. globisporus</i> | AB184203 |
| LMA323St_39 | 1297 | 94.28 | <i>S. griseus</i> | M76388 |
| LMA323St_40 | 1471 | 94.64 | <i>S. pratensis</i> | JQ806215 |
| LMA323St_41 | 1311 | 96.20 | <i>S. fulvissimus</i> | CP005080 |
| LMA323St_42 | 1268 | 97.17 | <i>S. fulvissimus</i> | CP005080 |
| LMA323St_43 | 1268 | 97.27 | <i>S. globisporus</i> | AB184203 |
| LMA323St_44 | 1436 | 97.21 | <i>S. fulvorobeus</i> | AB184711 |
| LMA323St_45 | 1266 | 95.81 | <i>S. urticae</i> | KY788226 |
| LMA323St_46 | 1447 | 96.80 | <i>S. fulvorobeus</i> | AB184711 |
| LMA323St_47 | 1267 | 96.49 | <i>S. globisporus</i> | AB184203 |
| LMA323St_48 | 1263 | 95.82 | <i>S. globisporus</i> | AB184203 |
| LMA323St_49 | 1265 | 98.61 | <i>S. fulvissimus</i> | CP005080 |

In the GenBank, 3 isolates, marked in bold in Table 3, fit in the criteria assumed to identification: LMA323St_31 is *S. griseus*; LMA323St_41 is *S. anulatus*; LMA323St_44 is *S. cyaneofuscatus*. All the other isolates or does not show similarity percentage above 97% or exhibited the same similarity percentage with more than one species, making it difficult to identify. Most isolates revealed sequence identity with *S. globisporus*, and *S. griseus* with the same similarity, and isolates LMA323St_1, LMA323St_3 and LMA323St_10 showed the same percentage with *Streptomyces lunaelactis*, *S. glosbisporus*, and *S. griseus*. Despite the low percentage, isolates LMA323St_12, LMA323St_13, LMA323St_16, LMA323St_19, and LMA323St_45 seems to be related to *Streptomyces fildesensis* in this database. Isolates LMA323St_24, LMA323St_27, LMA323St_37, LMA323St_39, and

LMA323St_43 do not have any identification following the criteria assumed. The LMA323St_9 is the isolate with the lowest similarity percentage, demonstrating one more time no species recognition.

Table 3: Similarity list of *Streptomyces* 16S rRNA sequences found in GenBank. Isolates marked in bold are considerate identified.

| Isolate | Accession Number | Id (%) | Query (%) | Species | Accession Number | Reference |
|-------------|------------------|--------|-----------|-----------------------|------------------|-------------------------|
| | | 97.19 | 100 | <i>S. lunaelactis</i> | KU714921 | Maciejewska et al. 2015 |
| LMA323St_1 | MW055589 | 97.19 | 100 | <i>S. globisporus</i> | CP013738 | Wang et al. 2012 |
| | | 97.19 | 100 | <i>S. griseus</i> | D63872 | Takeuchi et al. 1996 |
| LMA323St_2 | MT612461 | 95.57 | 100 | <i>S. globisporus</i> | CP013738 | Wang et al. 2012 |
| | | 95.57 | 100 | <i>S. griseus</i> | D63872.1 | Takeuchi et al. 1996 |
| | | 97.19 | 100 | <i>S. lunaelactis</i> | KU714921 | Maciejewska et al. 2015 |
| LMA323St_3 | MT612462 | 97.19 | 100 | <i>S. globisporus</i> | CP013738 | Wang et al. 2012 |
| | | 97.19 | 100 | <i>S. griseus</i> | D63872 | Takeuchi et al. 1996 |
| LMA323St_4 | MW055590 | 94.19 | 100 | <i>S. globisporus</i> | CP013738 | Wang et al. 2012 |
| | | 94.19 | 100 | <i>S. griseus</i> | D63872 | Takeuchi et al. 1996 |
| LMA323St_5 | MW055591 | 97.55 | 100 | <i>S. globisporus</i> | CP013738 | Wang et al. 2012 |
| | | 97.55 | 100 | <i>S. griseus</i> | D63872 | Takeuchi et al. 1996 |
| LMA323St_6 | MT612463 | 98.82 | 100 | <i>S. globisporus</i> | CP013738 | Wang et al. 2012 |
| | | 98.82 | 100 | <i>S. griseus</i> | D63872 | Takeuchi et al. 1996 |
| LMA323St_7 | MW055592 | 99.14 | 100 | <i>S. globisporus</i> | CP013738 | Wang et al. 2012 |
| | | 99.14 | 100 | <i>S. griseus</i> | D63872 | Takeuchi et al. 1996 |
| LMA323St_8 | MW055593 | 98.74 | 100 | <i>S. globisporus</i> | CP013738 | Wang et al. 2012 |
| | | 98.74 | 100 | <i>S. griseus</i> | D63872 | Takeuchi et al. 1996 |
| LMA323St_9 | MW055594 | 88.64 | 86 | <i>S. globisporus</i> | NR_044145 | Goodfellow M |
| | | 99.15 | 100 | <i>S. lunaelactis</i> | KU714921 | Maciejewska et al. 2015 |
| LMA323St_10 | MW055595 | 99.15 | 100 | <i>S. globisporus</i> | CP013738 | Wang et al. 2012 |
| | | 99.15 | 100 | <i>S. griseus</i> | D63872 | Takeuchi et al. 1996 |
| LMA323St_11 | MW055596 | 96.70 | 100 | <i>S. globisporus</i> | CP013738 | Wang et al. 2012 |
| | | 96.70 | 100 | <i>S. griseus</i> | D63872 | Takeuchi et al. 1996 |
| LMA323St_12 | MW055597 | 96.91 | 100 | <i>S. fildesensis</i> | MK742730 | Lavin et al. 2016 |
| LMA323St_13 | MW055598 | 94.39 | 100 | <i>S. fildesensis</i> | MK742730 | Lavin et al. 2016 |
| LMA323St_14 | MW055599 | 98.66 | 100 | <i>S. globisporus</i> | CP013738 | Wang et al. 2012 |
| | | 98.66 | 100 | <i>S. griseus</i> | D63872 | Takeuchi et al. 1996 |
| LMA323St_15 | MW055600 | 95.83 | 100 | <i>S. globisporus</i> | CP013738 | Wang et al. 2012 |
| | | 95.83 | 100 | <i>S. griseus</i> | D63872 | Takeuchi et al. 1996 |
| LMA323St_16 | MW055601 | 93.63 | 100 | <i>S. fildesensis</i> | MK742730 | Lavin et al. 2016 |
| LMA323St_17 | MW055602 | 95.45 | 100 | <i>S. globisporus</i> | CP013738 | Wang et al. 2012 |
| LMA323St_18 | MT612464 | 98.16 | 100 | <i>S. globisporus</i> | CP013738 | Wang et al. 2012 |
| | | 98.16 | 100 | <i>S. griseus</i> | D63872 | Takeuchi et al. 1996 |
| LMA323St_19 | MW055603 | 94.34 | 100 | <i>S. fildesensis</i> | MK742730 | Lavin et al. 2016 |

| | | | | | | |
|--------------------|-----------------|--------------|-----------|---------------------------------|-----------------|-----------------------------|
| LMA323St_20 | MT612465 | 94.71 | 99 | <i>S. parvus</i> | EU741140 | Goodfellow M |
| LMA323St_21 | MT612466 | 94.71 | 100 | <i>S. globisporus</i> | CP013738 | Wang et al. 2012 |
| | | 94.71 | 100 | <i>S. griseus</i> | D63872 | Takeuchi et al. 1996 |
| LMA323St_22 | MW055604 | 95.49 | 100 | <i>S. globisporus</i> | CP013738 | Wang et al. 2012 |
| | | 95.49 | 100 | <i>S. griseus</i> | D63872 | Takeuchi et al. 1996 |
| LMA323St_23 | MW055605 | 95.34 | 100 | <i>S. globisporus</i> | CP013738 | Wang et al. 2012 |
| | | 95.34 | 100 | <i>S. griseus</i> | D63872 | Takeuchi et al. 1996 |
| LMA323St_24 | MW055606 | - | - | - | - | - |
| LMA323St_25 | MW055607 | 93.09 | 97 | <i>S. cavourensis</i> | KP718520 | Petříčková et al. 2015 |
| LMA323St_26 | MW055608 | 95.92 | 100 | <i>S. microflavus</i> | DQ442519 | Goodfellow M |
| LMA323St_27 | MW055609 | - | - | - | - | - |
| LMA323St_28 | MT612467 | 95.06 | 100 | <i>S. globisporus</i> | CP013738 | Wang et al. 2012 |
| | | 95.06 | 100 | <i>S. griseus</i> | D63872 | Takeuchi et al. 1996 |
| LMA323St_29 | MW055610 | 95.76 | 100 | <i>S. globisporus</i> | CP013738 | Wang et al. 2012 |
| | | 95.76 | 100 | <i>S. griseus</i> | D63872 | Takeuchi et al. 1996 |
| LMA323St_30 | MW055611 | 95.88 | 90 | <i>S. microflavus</i> | KX714589 | Soltani et al. 2016 |
| LMA323St_31 | MW055612 | 98.47 | 99 | <i>S. griseus</i> | DQ026671 | Goodfellow M |
| LMA323St_32 | MW055613 | 98.82 | 100 | <i>S. globisporus</i> | CP013738 | Wang et al. 2012 |
| | | 98.82 | 100 | <i>S. griseus</i> | D63872 | Takeuchi et al. 1996 |
| LMA323St_33 | MZ409521 | 90.50 | 93 | <i>S. griseus</i> | KF981731 | Xie et al. 2014 |
| LMA323St_34 | MT612468 | 94.81 | 98 | <i>S. anulatus</i> | EU647474 | Matter et al. 2009 |
| LMA323St_35 | MW055614 | 96.62 | 100 | <i>S. globisporus</i> | CP013738 | Wang et al. 2012 |
| | | 96.62 | 100 | <i>S. griseus</i> | D63872 | Takeuchi et al. 1996 |
| LMA323St_36 | MW055615 | 95.01 | 100 | <i>S. microflavus</i> | EF178673 | Goodfellow M |
| LMA323St_37 | MW055616 | - | - | - | - | - |
| LMA323St_38 | MW055617 | 94.52 | 100 | <i>S. globisporus</i> | CP013738 | Wang et al. 2012 |
| | | 94.52 | 100 | <i>S. griseus</i> | D63872 | Takeuchi et al. 1996 |
| LMA323St_39 | MW055618 | - | - | - | - | - |
| LMA323St_40 | MW055619 | 94.68 | 98 | <i>S. microflavus</i> | DQ442519 | Goodfellow, M. |
| LMA323St_41 | MT612469 | 98.92 | 87 | <i>S. anulatus</i> | HQ143607 | Jin et al. 2011 |
| LMA323St_42 | MW055620 | 94.61 | 100 | <i>S. globisporus</i> | CP013738 | Wang et al. 2012 |
| | | 94.61 | 100 | <i>S. griseus</i> | D63872 | Takeuchi et al. 1996 |
| LMA323St_43 | MW055621 | - | - | - | - | - |
| LMA323St_44 | MW055622 | 99.49 | 95 | <i>S. cyaneofuscatus</i> | KC354444 | Řeháková et al. 2015 |
| LMA323St_45 | MT612470 | 94.58 | 100 | <i>S. fildesensis</i> | MK742730 | Lavin et al. 2016 |
| LMA323St_46 | MW055623 | 96.35 | 99 | <i>S. griseus</i> | DQ026671 | Goodfellow M |
| LMA323St_47 | MW055624 | 95.75 | 100 | <i>S. globisporus</i> | CP013738 | Wang et al. 2012 |
| | | 95.75 | 100 | <i>S. griseus</i> | D63872 | Takeuchi et al. 1996 |
| LMA323St_48 | MW055625 | 95.28 | 100 | <i>S. globisporus</i> | CP013738 | Wang et al. 2012 |
| | | 95.28 | 100 | <i>S. griseus</i> | D63872 | Takeuchi et al. 1996 |
| LMA323St_49 | MW055626 | 98.11 | 100 | <i>S. globisporus</i> | CP013738 | Wang et al. 2012 |
| | | 98.11 | 100 | <i>S. griseus</i> | D63872 | Takeuchi et al. 1996 |

Isolates with blank spaces do not have any match with sequences published in papers.

The *rpoB*, *recA*, *atpD*, *trpB*, and *gyrB* similarity list can be seen in Tables S1, S2, S3, S4 and S5, respectively, in Supplementary data available on Online

Resource 1. A total of 12 isolates had only the genera identified when *rpoB* was analyzed in Blast, and the species founded with the other isolates were *Streptomyces praecox* and *S. fulvissimus* (Table S1 on Online Resource 1). In *recA*, we observed only three species: *S. praecox*, *S. fulvissimus* and *S. fildesensis* and the isolate LMA323St_45 do not show any similarity in the database (Table S2 on Online Resource 1), the same could be observed in *atpD* gene. Besides that, only 15 isolates had matches above 97% with this gene, comprising *Streptomyces puniscabiei*, *S. luridiscabiei*, *S. fulvissimus* and *S. griseus* (Table S3 on Online Resource 1), most isolates had only the genus identified. Whereas the species found in *trpB* analysis were *S. praecox*, *S. fulvissimus*, *S. griseus* and *Streptomyces longispororuber* (Table S4 on Online Resource 1). A different species was found in *gyrB* data too: *Streptomyces anulatus*. A high number (42) of isolates were identified when this gene was analyzed (Table S5 on Online Resource 1). The species and results for each isolate are quite similar in *rpoB*, *recA* and *trpB*. In *gyrB* results, we can see *S. anulatus* in isolates that are *S. praecox* in *rpoB* and *recA*. The species *S. fildesensis* appears with more than 97% of similarity only when *recA*, *trpB* and 16S rRNA were analyzed. Otherwise, *S. fulvissimus* and *S. praecox* appears in all housekeeping genes, excepting 16S rRNA. Isolates LMA323St_6, LMA323St_29, LMA323St_35 and LMA323St_36 showed identification with *S. fulvissimus* in all housekeeping genes.

In MLST analysis, the isolates are grouped in two different STs: ST31 and ST38, but with some uncertain alleles. The two prominent allelic profiles are, respectively to ST31 and ST38, 16S rRNA allele 16 and 31, *atpD* allele 6 and 12, *gyrB* allele 29 and 1, *recA* allele 12 and 13, *rpoB* 12 and 13, *trpB* allele 31 and 38.

Polytomies were found in all phylogenetic trees obtained with the *rpoB*, *recA*, *atpD*, *trpB*, *gyrB* and 16S rRNA genes when analyzed separately (Figures S1 to S6 in Supplementary data on Online Resource 1). Also, *M. tuberculosis* H37Rv, used as outgroup, appears to be more similar to some strains than other *Streptomyces*. Genes alone do not produce congruent trees, however the joining of them as all results in a robust phylogenetic tree is showed in Figure 1.

Discussion

The correlations between the isolates are not well explained when 16S rRNA were analyzed. In both databases, GenBank and EzBioCloud, it was not

possible to identify all the isolates. Only a few isolates could be considered identified and only one of them, LMA323St_31, is correlated with the same species in both analysis: *S. griseus*. Such difficulties were expected, because it is known that this gene, widely used as a basis for microbial identification, has several limitations, especially in the genus *Streptomyces* (Chevrette et al. 2019). Chevrette et al. (2019), demonstrated that 16S rRNA does not correlate with streptomycetes metabolism and ecological traits, highlighting the importance to associate other characteristics in microbial ecology and evolutionary studies. Although the notorious use of 16S until now, Chevrette et al. (2019) makes an analogy with 18S rRNA studies in Eukarya, where humans and dolphins were grouped together using the criteria commonly used for grouping *Streptomyces* with 16S sequences. This may indicate that we are underestimating the diversity within the genus by using just one molecular characteristic that does not represent the genetic complexity of streptomycetes. We observe seven clustering patterns when the 16S rRNA was analyzed in EzBioCloud database, showing some 16S similarities between the isolates. However, it is important to note that such isolates do not come from the same collection point and were not grown in a single culture medium (Borba et al. 2020). A higher number of species were found in GenBank in comparison the ones observed in EzBioCloud, which makes perfectly sense, since EzBioCloud get the complete genomes deposited in GenBank to curation. This curation is done by reconstructing the genome annotation and then analyzing the 16S, *recA*, *gyrB* and tetranucleotide compositions, to ensure the taxonomic names (Teeling et al. 2004; Yoon et al. 2017).

As observed in the aforementioned studies, the 16S rRNA gene alone is not capable of identify species in *Streptomyces* genus. Other genes were known to be strong phylogenetic markers, such *gyrB* (Kirby et al. 2010) and *recA* (Thompson et al. 2004).

Thompson et al. (2004) demonstrated for *Vibrionaceae* family that *recA* showed more discrimination than 16S. In *Streptomycetaceae* studies, the use of this gene showed a high similarity correlation between 16S and *recA* (Han et al. 2012). Besides that, *recA* and *gyrB* genes displayed the highest correlation among the protein coding genes used (Han et al. 2012). Unlike Han et al. (2012), in our work the *Streptomyces* 16S tree exhibited higher bootstrap numbers than in *recA* tree and the genetic differences are better demonstrated (Figures S2 and S6).

Zhang et al. (2020), used 16S, *atpD*, *rpoB* and *recA* for a *Streptomyces* isolates identification and showed that it was not possible to accomplish and suggested a whole genome sequencing. The *atpD* gene has been used in studies aiming to clarify the phylogenetic relationships existing in the genus *Streptomyces* (Guo et al. 2008, Labeda 2011, Labeda et al. 2014), to detect streptomycetes (Laskaris et al. 2012), and also to identify isolates (Jin et al. 2019; Kamjam et al. 2019). Kamjan et al. (2019) and Jin et al. (2019) described new species of *Streptomyces* with the aid of the genes used in this work. The *rpoB* gene, besides providing information about group taxonomy (Ayed et al. 2018), it is also important in studies aiming the improving of bioactive compounds production (Liu et al. 2018; Shentu et al. 2018). In GenBank, we first notice a void of sequences referring to *rpoB*, *recA*, *trpB*, *gyrB* and *atpD* genes. Sequences of few species are present in the database and they are still referring to a few articles, which led to a redundancy in the similarities obtained when the sequences of this work were compared. It is strongly suggested that more housekeeping genes sequences should be deposited in this database to enrich studies like that without necessity of whole genome sequencing.

The MLST scheme is a good choice to improve genomic analysis, by means of more than one gene, like 16S rRNA commonly, as demonstrated above. The five housekeeping genes used together with 16S represents more information to characterize the strains and more characters to construct more robust phylogenetic trees. However, allelic profiles studies in PubMLST platform were not efficient in this study. The database contains 272 isolates (data in June 15, 2021), which can mean a low number towards the species number in this huge bacterial genus (Pérez-Losada et al. 2013). Allelic profiles are investigated in epidemiology studies, through observation of small differences inside the alleles (Katsarou et al. 2021). These differences could be used to differentiate *Streptomyces* isolates since 16S was not sufficient to set variance, but this approach need more studies and database to be established.

One isolated group remains together in phylogenetic trees: LMA323St_12, LMA323St_13, LMA323St_16, LMA323St_ the 19 and LMA323St_45. These isolates show sequence similarities with *S. fildesensis* in GenBank analysis. However, even these isolates being considered *S. urticae* in Top Hit Match EzBioCloud, they present *S. fildesensis* as a possible identification. This cluster illustrates the difficulty in to use 16S rRNA as the only molecular data to

recognize and identify *Streptomyces* species. The species, *S. fildesensis* and *S. urticae*, are known to be phylogenetic related (Piao et al. 2018). *S. urticae* was describe as novel specie from rizhospere in Piao et al. (2018), and exhibited 16S rRNA similarity sequences above 98% with *S. fildesensis* and *Streptomyces abietis*. Another gene, *gyrB*, was used to confirm this data, showing similarities percentages above 92% with the same species cited. Piao et al. (2018) also executes chemotaxonomic and biochemical analysis between *S. urticae*, *S. fildesensis* and *S. abietis*, in the same way, they realize DNA-DNA hybridization. This last analysis showed a DNA relatedness of 56% with *S. abietis* and 49% with *S. fildesensis* when compared to *S. urticae*, showing significant differences to be consider a novel species. The *S. fildesensis* was isolated for the first time in Fildes Peninsula, King George Island, Antarctic by Li et al. (2011). With this in view, the isolates in our work are probably *S. fildesensis* members, all of them come from King George Island (Borba et al. 2020).

The phylogenetic tree does not represent the identification groups found in housekeeping analysis. Isolates are spread without species correlation observed in sequence similarity. Using the six genes gives us a more robust tree; nevertheless, the bootstrap numbers are quite low. There is a cluster with a high bootstrap that reunited 15 isolates with *S. griseus* subps. *griseus* NRBC 13350. From these isolates, 10 of them show the probability to be *S. griseus* in 16S rRNA analysis and LMA323St_31 had more than 97% sequence similarity with this species. The *S. griseus* clade is one of the taxonomic clades described to *Streptomyces* genus (Rong and Huang et al. 2010).

The isolate LMA323St_9 has the potential to be studied as a novel species. Chemotaxonomic and biochemical tests could benefit the identification in Antarctic streptomycetes isolates, since sequence similarity showed to be not enough to confirm the identification of most isolates described in our work. Besides that, this study provides sufficient data to corroborate with molecular analysis within *Streptomyces* genus.

Conclusion

The 49 *Streptomyces* isolates could not be properly identified with sequences from *rpoB*, *recA*, *trpB*, *gyrB*, *atpD* and even 16S rRNA. These genes alone do not have the discriminatory power to characterize the isolates, but using

all of them together could lead to more differentiation between isolates from the genus *Streptomyces*. Undoubtedly, more information should be deposited in databases to improve the genomic comparative studies.

Appendix

Supplementary data on Online Resources.

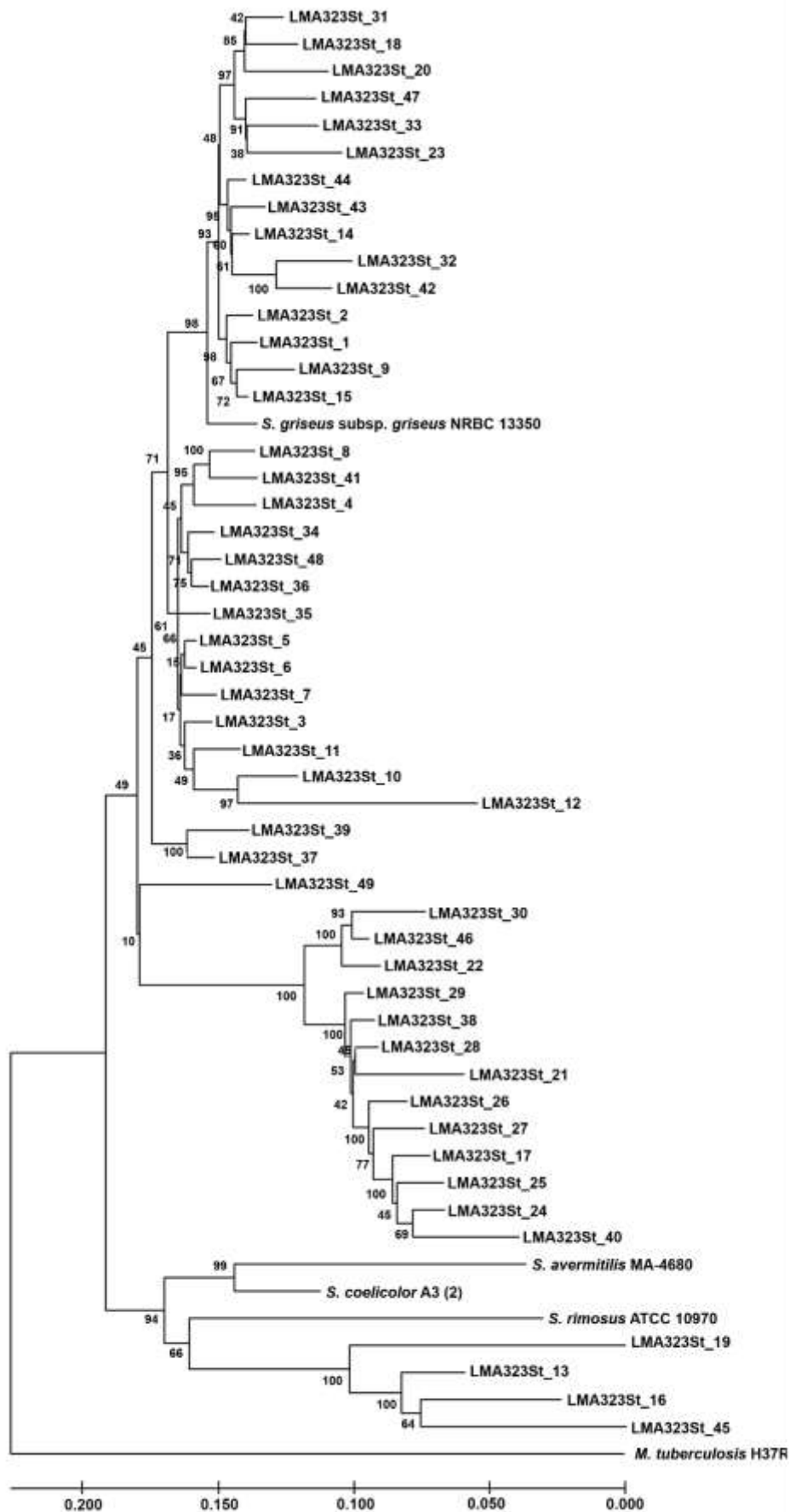


Fig1 Phylogenetic tree constructed with 16S rRNA, *rpoB*, *recA*, *gyrB*, *trpB* and *atpD* sequences from all the 49 *Streptomyces* isolates in MEGA X using neighbor-joining with Kimura 2-parameter

References

- Acinas SG, Marcelino LA, Klepac-Ceraj V, Polz MF (2004) Divergence and Redundancy of 16S rRNA Sequences in Genomes with Multiple *rrn* Operons. *J Bacteriol* 186(9):2629-2635. <https://doi.org/10.1128/JB.186.9.2629-2635.2004>
- Aigle B, Lautru S., Spiteller D, Dickschat JS, Challis GL, Leblond P, Pernodet JL (2014) Genome mining of *Streptomyces ambofaciens*. *J Ind Microbiol Biotechnol* 41:251-263. <https://doi.org/10.1007/s10295-013-1379-y>
- Antony-Babu S, Stien D, Eparvier V, Parrot D, Tomasi S, Suzuki MT (2017) Multiple *Streptomyces* species with distinct secondary metabolomes have identical 16S rRNA gene sequences. *Sci Rep* 7(1):11089. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11363-1>
- Ayed A, Slama N, Mankai H, Bachkouel S, ElKahoui S, Tabbene O, Liman F (2018) *Streptomyces tunisialbus* sp. nov.; a novel *Streptomyces* species with antimicrobial activity. *Antonie van Leeuwenhoek* 111:1571-1581. <https://doi.org/10.1007/s10482-018-1046-4>
- Baltz RH (2016) Genetic manipulation of secondary metabolite biosynthesis for improved production in *Streptomyces* and other actinomycetes. *J Ind Microbiol Technol* 43:343-370. <https://doi.org/10.1007/s10295-015-1682-x>
- Bérdy J (2012) Thoughts and facts about antibiotics: Where we are now and where we are heading. *J Antibiot* 65:385-95. <https://doi.org/10.1038/ja.2012.27>
- Borba MP, Ballarini AE, Witusk JPD, Lavin P, Van Der Sand S (2020) Evaluation of BOX-PCR and REP-PCR as Molecular Typing Tools for Antarctic *Streptomyces*. *Curr Microbiol* 77:3573-3581. <https://doi.org/10.1007/s00284-020-02199-6>
- Chevrette MG, Carlos-Shanley C, Louie KB, Bower BP, Northen TR, Currie CR (2019) Taxonomic and Metabolic Incongruence in the Ancient Genus *Streptomyces*. *Front Microbiol* 10:2170 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02170>
- Clarridge JE (2004) Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Disease. *Clin Microbiol Rev* 17(4):840-862. <https://doi.org/10.1128/CMR.17.4.840-862.2004>
- Deiner K, Walser JC, Machler W, Altermatt F (2015) Choice of capture and extraction methods affect detection of freshwater biodiversity from environmental DNA. *Biol Cons* 183:53-63.

<https://doi.org/10.1016/j.biocon.2014.11.018>

- Encheva-Malinova M, Stoyanova M, Avramova H, Pavlova Y, Gocheva B, Ivanova I, Moncheva P (2014) Antibacterial potential of streptomycetes strains from Antarctic soils. *Biotechnol Equip* 28:721-727. <https://doi.org/10.1080/13102818.2014.947066>
- Fox GE, Wisotzkey JD, Jurtshuk P (1992) How Close Is Close: 16S rRNA Sequence Identity May Not Be Sufficient To Guarantee Species Identity. *Int J Syst Bacteriol* 42(1):166-170. <https://doi.org/10.1099/00207713-42-1-166>
- Guo Y, Zheng W, Rong X, Huang Y (2008) A multilocus phylogeny of the clade *Streptomyces griseus* 16S rRNA gene clade: use of multilocus sequence analysis for streptomycetes systematics. *Int J Syst Evol Microbiol* 58:149-159. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.65224-0>
- Han J, Cho M, Kim SB (2012) Ribosomal and protein coding gene based multigene phylogeny on the family *Streptomycetaceae*. *Syst App Microbiol* 35:1-6. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2011.08.007>
- Jin F, Ding Y, Ding W, Reddy MS, Fernando WG, Du B (2011) Genetic diversity and phylogeny of antagonistic bacteria against *Phytophthora nicotianae* isolated from tobacco rhizosphere. *Int J Mol Sci* 12(5):3055-3071. <https://doi.org/10.3390/ijms12053055>
- Jin L, Zhao Y, Song W, Duan L, Jiang S, Wang X, Zhao J, Xiang W (2019) *Streptomyces inhibens* sp. nov., a novel actinomycete isolated from rhizosphere soil of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Int J Syst Evol Microbiol* 69:688-695. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003204>
- Jolley KA, Bray JE, Maiden MCJ (2018) Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications. *Wellcome Open Res* 3:124. <https://doi.org/10.12688/wellcomeopenres.14826.1>
- Kamjam M, Nopnakorn P, Zhang L, Peng F, Deng Z, Hong K (2019) *Streptomyces polaris* sp. nov. and *Streptomyces septentrionalis* sp. nov.; isolated from frozen soil. *Antonie Van Leeuwenhoek* 112:375-387. <https://doi.org/10.1007/s10482-018-1166-x>
- Katsarou EI, Chatzopoulos DC, Giannoulis T, Ioannidi KS, Katsafadou AI, Kontou PI, Lianou DT, Mamuris Z, Mavrogianni VS, Michael CK, Papadopoulos E, Petinaki E, Sarrou S, Vasileiou NGC, Fthenakis GC (2021) MLST-Based Analysis and Antimicrobial Resistance of *Staphylococcus epidermidis* from

- Cases of Sheep Mastitis in Greece. *Biology* 10:170. <https://doi.org/10.3390/biology10030170>.
- Kirby BM, Everest GJ, Meyers PR (2010) Phylogenetic analysis of the genus *Kribbella* based on the *gyrB* gene: proposal of a *gyrB*-sequence threshold for species delineation in the genus *Kribbella*. *Antonie van Leeuwenhoek* 97:131-142. <https://doi.org/10.1007/s10482-009-9393-9>
- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K (2018) MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol Biol Evol* 35(6):547-1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Labeda DP (2011) Multilocus sequence analysis of phytopathogenic species of the genus *Streptomyces*. *Int J Syst Evol Microbiol* 61:2525-2531. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.028514-0>
- Labeda DP, Doroghazi JR, Ju KS, Metcalf WW (2014) Taxonomic evaluation of *Streptomyces albus* and related species using multilocus sequence analysis and proposals to emend the description of *Streptomyces albus* and describe *Streptomyces pathocidini* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*. 64: 894-900. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.058107-0>
- Lamilla C, Braga D, Castro R, Guimarães C, Castilho LVA, Freire DMG, Barrientos L (2018) *Streptomyces luridus* So3.2 from Antarctic soil as a novel producer of compounds with bioemulsification potential. *PLoS ONE* 13(4):e0196054. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196054>
- Laskaris P, Sekine T, Wellington EMH (2012) Diversity Analysis of Streptomycetes and Associated Phosphotransferase Genes in Soil. *PLoS ONE* 7(4):e35756. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035756>
- Lavin PL, Yong ST, Wong CMVL, Stefano M (2016) Isolation and characterization of Antarctic psychrotroph *Streptomyces* sp. strain INACH3013. *Antarct Sci* 28(6), 433-442. <https://doi.org/10.1017/S0954102016000250>
- Li J, Tian X, Zhu T, Yang L, Li W (2011) *Streptomyces fildesensis* sp. nov., a novel streptomycetes isolated from Antarctic soil. *Antonie van Leeuwenhoek* 100:537-543. <https://doi.org/10.1007/s10482-011-9609-7>
- Liu L, Wang Z, Yan X, Yang D, Zhu X, Shen B, Duan Y, Huang Y (2018) Ribosome engineering and fermentation optimization leads to overproduction of tiancimycin A, a new enediyne natural product from *Streptomyces* sp. CB03234. *J Ind Microbiol Biotechnol* 45:141-151. <https://doi.org/10.1007/s10295-018->

2014-8

- Maciejewska M, Pessi IS, Arguelles-Arias A, Noifalisse P, Luis G, Ongena M, Barton H, Carnol M, Rigali S (2015) *Streptomyces lunaelactis* sp. nov., a novel ferrioxalate A-producing *Streptomyces* species isolated from a moonmilk speleothem. *Antonie van Leeuwenhoek* 170:519-531. <https://doi.org/10.1007/s10482-014-0348-4>
- Maiden MCJ, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russel JE, Urwin R, Zhang Q, Zhou J, Zurth K, Caugant DA, Feavers IM, Achtman M, Spratt BG (1998) Multilocus sequence typing: A portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci* 95:3140-3145. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.6.3140>
- Matter AM, Hoot SB, Anderson PD, Neves SS, Cheng YQ (2009) Valinomycin biosynthetic gene cluster in *Streptomyces*: conservation, ecology and evolution. *PLoS One* 4(9):e7194. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007194>
- Nett M, Ikeda H, Moore BS (2009) Genomic basis for natural product biosynthetic diversity in the actinomycetes. *Nat Prod Rep* 26:1362-1384. <https://doi.org/10.1039/b817069j>
- Pérez-Losada M, Cabezas P, Castro-Nallar E, Crandall KA (2013) Pathogen typing in the genomics era: MLST and the future of molecular epidemiology. *Infect Genet Evol* 16:35-53. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2013.01.009>
- Petříčková K, Chroňáková A, Zelenka T, Chrudimský T, Pospíšil S, Petříček M, Křišťůfek V (2015) Evolution of cyclizing 5-aminolevulinate synthases in the biosynthesis of actinomycete secondary metabolites: outcomes for genetic screening techniques. *Front Microbiol* 6:814. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00814>
- Piao C, Ling L, Zhao J, Jin L, Jiang S, Guo X, Wang X, Xiag W (2018) *Streptomyces urticae* sp. nov., isolated from rhizosphere soil of *Urtica urens* L. *Antonie van Leeuwenhoek* 111:1835-1843. <https://doi.org/10.1007/s10482-018-1072-2>
- Řeháková K, Chroňáková A, Křišťůfek V, Kuchtová B, Čapková K, Scharfen J, Čapek P, Doležal J (2015) Bacterial community of cushion plant *Thylacospermum caespitosum* on elevational gradient in the Himalayan cold desert. *Front Microbiol* 6:304. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00304>
- Rong X, Huang Y (2010) Taxonomic evaluation of the *Streptomyces griseus* clade using multilocus sequence analysis and DNA–DNA hybridization, with proposal

- to combine 29 species and three subspecies as 11 genomic species. *Int J Syst Evol Microbiol* 60:696-703. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.012419-0>.
- Shentu XP, Cao ZY, Xiao Y, Tang G, Ochi Z, Yu XP (2018) Substantial improvement of toyocamycin production in *Streptomyces diastatochromogenes* by cumulative drug resistance mutations. *PLoS ONE* 13(8):e0203006. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203006>
- Shirling EB, Gottlieb D (1966) Methods for Characterization of *Streptomyces* Species. *Int J Syst Bacteriol* 16(3):313-340.
- Soltani NM, Khatami M, Shahidi BGH (2016) Extracellular synthesis gold nanotriangles using biomass of *Streptomyces microflavus*. *IET Nanobiotechnol.* 10(1):33-8. <https://doi.org/10.1049/iet-nbt.2015.0028>
- Srinivasan R, Karaoz U, Volegova M, MacKichan J, Kadori-Maeda M, Nadarajan R, Brodie EL, Lynch SV (2015) Use of 16S rRNA Gene for Identification of a Broad Range of Clinically Relevant Bacterial Pathogens. *PLoS ONE* 10(2):e0117617. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117617>
- Takeuchi T, Sawada H, Tanaka F, Matsuda I (1996) Phylogenetic analysis of *Streptomyces* spp. causing potato scab based on 16S rRNA sequences. *Int J Syst Bacteriol* 46(2):476-9. <https://doi.org/10.1099/00207713-46-2-476>
- Teeling H, Meyerdierks A, Bauer M, Amann R, Glöckner FO (2004) Application of tetranucleotide frequencies for the assignment of genomic fragments. *Environ Microbiol* 6(9):938-947. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2004.00624.x>
- Thompson CC, Thompson FL, Vandemeulebroecke K, Hoste B, Dawyndt P, Swings J (2004) Use of *recA* as an alternative phylogenetic marker in the family *Vibrionaceae*. *Int J Syst Evol Microbiol* 54:919-924. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02963-0>
- Wang L, Wang S, He Q, Yu T, Li Q, Hong B (2012) Draft genome sequence of *Streptomyces globisporus* C-1027, which produces an antitumor antibiotic consisting of a nine-membered enediyne with a chromoprotein. *J Bacteriol* 194(15):4144. <https://doi.org/10.1128/JB.00797-12>
- Woese C (1987) Bacterial Evolution. *Microbiol Rev* 51(2):221-271. [https://doi.org/0146-0749/87/020221-51\\$02.00/0](https://doi.org/0146-0749/87/020221-51$02.00/0)
- Xie P, Ma M, Rateb ME, Shaaban KA, Yu Z, Huang S, Zhao L, Zhu X, Yan Y, Peterson RM, Lohman JR, Yang D, Yin M, Rudolf JD, Jiang Y, Duan Y, Shen B (2014) Biosynthetic Potential-Based Strain Prioritization for Natural Product

Discovery: A Showcase for Diterpenoid-Producing Actinomycetes. *J Nat Prod* 77:377-387. <https://doi.org/10.1021/np401063s>

Yoon SH, Ha SM, Kwon S, Lim J, Kim Y, Seo H, Chun J (2017) Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. *Int J Syst Evol Microbiol* 67:1613-1617. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001755>.

Zhang Z, Li C, Hao J, Li Y, Li D, Zhang D, Xing X, Liang Y (2020) A Novel *Streptomyces* sp. Strain PBSh9 for Controlling Potato Common Scab Caused by *Streptomyces galilaeus*. *Plant Dis*. <https://doi.org/10.1094/PDIS-07-19-1469-RE>

SUPPLEMENTARY DATA – Archives of Microbiology

Efforts in molecular identification of *Streptomyces* strains from Antarctic soil

Marcela Proença Borba¹ (0000-0003-4909-969X), Ana Paula Ferrero¹, Renata de Souza Lameira¹, Sueli Van Der Sand¹ (0000-0002-8591-6514)

1- Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

Corresponding author: Marcela Proença Borba (marcela.borba@ufrgs.br)

Table S1: Similarity list of *Streptomyces rpoB* sequences found in GenBank.

| Isolate | Size (bp) | Acession Number | Id (%) | Qu (%) | Species | Acession Number | Reference |
|-------------|-----------|-----------------|--------|--------|-------------------------|-----------------|-----------------|
| LMA323St_1 | 790 | MZ613357 | 99 | 100 | <i>S. praecox</i> | JF424013 | Han et al. 2012 |
| LMA323St_2 | 788 | MZ613358 | 99 | 100 | <i>S. praecox</i> | JF424013 | Han et al. 2012 |
| LMA323St_3 | 786 | MZ613359 | 99 | 100 | <i>S. fulvissimus</i> | CP005080 | Unpublished |
| LMA323St_4 | 786 | MZ613360 | 99 | 100 | <i>S. fulvissimus</i> | CP005080 | Unpublished |
| LMA323St_5 | 786 | MZ613361 | 99 | 100 | <i>S. fulvissimus</i> | CP005080 | Unpublished |
| LMA323St_6 | 785 | MZ613362 | 99 | 100 | <i>S. fulvissimus</i> | CP005080 | Unpublished |
| LMA323St_7 | 787 | MZ613363 | 99 | 100 | <i>S. fulvissimus</i> | CP005080 | Unpublished |
| LMA323St_8 | 788 | MZ613364 | 99 | 100 | <i>S. fulvissimus</i> | CP005080 | Unpublished |
| LMA323St_9 | 788 | MZ613365 | 99 | 100 | <i>S. praecox</i> | JF424013 | Han et al. 2012 |
| LMA323St_10 | 789 | MZ613366 | 98 | 100 | <i>S. praecox</i> | JF424013 | Han et al. 2012 |
| LMA323St_11 | 783 | MZ613367 | 97 | 100 | <i>S. fulvissimus</i> | CP005080 | Unpublished |
| LMA323St_12 | 785 | MZ613368 | 97 | 100 | <i>S. fulvissimus</i> | CP005080 | Unpublished |
| LMA323St_13 | 713 | MZ613369 | 92 | 74 | <i>Streptomyces</i> sp. | KT389099 | Unpublished |
| LMA323St_14 | 788 | MZ613370 | 98 | 100 | <i>S. praecox</i> | JF424013 | Han et al. 2012 |
| LMA323St_15 | 788 | MZ613371 | 99 | 100 | <i>S. praecox</i> | JF424013 | Han et al. 2012 |
| LMA323St_16 | 457 | MZ613372 | 86 | 53 | <i>Streptomyces</i> sp. | KT389099 | Unpublished |
| LMA323St_17 | 421 | MZ613373 | 88 | 99 | <i>Streptomyces</i> sp. | CP005080 | Unpublished |
| LMA323St_18 | 788 | MZ613374 | 99 | 100 | <i>S. praecox</i> | JF424013 | Han et al. 2012 |
| LMA323St_19 | 703 | MZ613375 | 95 | 73 | <i>Streptomyces</i> sp. | KT389099 | Unpublished |
| LMA323St_20 | 788 | MZ613376 | 99 | 100 | <i>S. praecox</i> | JF424013 | Han et al. 2012 |
| LMA323St_21 | 785 | MZ613377 | 98 | 100 | <i>S. fulvissimus</i> | CP005080 | Unpublished |
| LMA323St_22 | 787 | MZ613378 | 98 | 100 | <i>S. praecox</i> | JF424013 | Han et al. 2012 |
| LMA323St_23 | 788 | MZ613379 | 99 | 100 | <i>S. praecox</i> | JF424013 | Han et al. 2012 |
| LMA323St_24 | 538 | MZ613380 | 92 | 97 | <i>Streptomyces</i> sp. | CP005080 | Unpublished |
| LMA323St_25 | 777 | MZ613381 | 94 | 99 | <i>Streptomyces</i> sp. | CP005080 | Unpublished |

| | | | | | | | |
|-------------|-----|----------|----|-----|-------------------------|----------|-----------------|
| LMA323St_26 | 614 | MZ613382 | 88 | 100 | <i>Streptomyces</i> sp. | CP005080 | Unpublished |
| LMA323St_27 | 770 | MZ613383 | 98 | 100 | <i>S. fulvissimus</i> | CP005080 | Unpublished |
| LMA323St_28 | 784 | MZ613384 | 97 | 100 | <i>S. fulvissimus</i> | CP005080 | Unpublished |
| LMA323St_29 | 789 | MZ613385 | 99 | 100 | <i>S. fulvissimus</i> | CP005080 | Unpublished |
| LMA323St_30 | 789 | MZ613386 | 99 | 99 | <i>S. praecox</i> | JF424013 | Han et al. 2012 |
| LMA323St_31 | 788 | MZ613387 | 99 | 100 | <i>S. praecox</i> | JF424013 | Han et al. 2012 |
| LMA323St_32 | 783 | MZ613388 | 91 | 99 | <i>Streptomyces</i> sp. | JF424013 | Han et al. 2012 |
| LMA323St_33 | 788 | MZ613389 | 99 | 100 | <i>S. praecox</i> | JF424013 | Han et al. 2012 |
| LMA323St_34 | 783 | MZ613390 | 99 | 100 | <i>S. fulvissimus</i> | CP005080 | Unpublished |
| LMA323St_35 | 782 | MZ613391 | 98 | 100 | <i>S. fulvissimus</i> | CP005080 | Unpublished |
| LMA323St_36 | 788 | MZ613392 | 99 | 100 | <i>S. fulvissimus</i> | CP005080 | Unpublished |
| LMA323St_37 | 787 | MZ613393 | 99 | 100 | <i>S. fulvissimus</i> | CP005080 | Unpublished |
| LMA323St_38 | 782 | MZ613394 | 97 | 100 | <i>S. fulvissimus</i> | CP005080 | Unpublished |
| LMA323St_39 | 788 | MZ613395 | 99 | 100 | <i>S. fulvissimus</i> | CP005080 | Unpublished |
| LMA323St_40 | 767 | MZ613396 | 89 | 99 | <i>Streptomyces</i> sp. | CP005080 | Unpublished |
| LMA323St_41 | 786 | MZ613397 | 98 | 100 | <i>S. fulvissimus</i> | CP005080 | Unpublished |
| LMA323St_42 | 777 | MZ613398 | 88 | 99 | <i>Streptomyces</i> sp. | JF424013 | Han et al. 2012 |
| LMA323St_43 | 783 | MZ613399 | 96 | 100 | <i>Streptomyces</i> sp. | JF424013 | Han et al. 2012 |
| LMA323St_44 | 787 | MZ613400 | 98 | 100 | <i>S. praecox</i> | JF424013 | Han et al. 2012 |
| LMA323St_45 | 691 | MZ613401 | 87 | 73 | <i>Streptomyces</i> sp. | KT389099 | Unpublished |
| LMA323St_46 | 790 | MZ613402 | 99 | 100 | <i>S. praecox</i> | JF424013 | Han et al. 2012 |
| LMA323St_47 | 790 | MZ613403 | 99 | 100 | <i>S. praecox</i> | JF424013 | Han et al. 2012 |
| LMA323St_48 | 789 | MZ613404 | 98 | 100 | <i>S. fulvissimus</i> | CP005080 | Unpublished |
| LMA323St_49 | 783 | MZ613405 | 97 | 100 | <i>S. fulvissimus</i> | CP005080 | Unpublished |

Table S2: Similarity list of *Streptomyces recA* sequences found in GenBank.

| Isolate | Size (bp) | Acession Number | Id (%) | Qu (%) | Species | Acession Number | Reference |
|-------------|-----------|-----------------|--------|--------|-------------------------|-----------------|-----------------|
| LMA323St_1 | 826 | MZ575663 | 99 | 98 | <i>S. praecox</i> | JF424060 | Han et al. 2012 |
| LMA323St_2 | 827 | MZ575664 | 99 | 98 | <i>S. praecox</i> | JF424060 | Han et al. 2012 |
| LMA323St_3 | 828 | MZ575665 | 98 | 100 | <i>S. fulvissimus</i> | CP005080 | Unpublished |
| LMA323St_4 | 808 | MZ575666 | 96 | 100 | <i>Streptomyces</i> sp. | CP005080 | Unpublished |
| LMA323St_5 | 828 | MZ575667 | 98 | 100 | <i>S. fulvissimus</i> | CP005080 | Unpublished |
| LMA323St_6 | 825 | MZ575668 | 98 | 100 | <i>S. fulvissimus</i> | CP005080 | Unpublished |
| LMA323St_7 | 828 | MZ575669 | 98 | 100 | <i>S. fulvissimus</i> | CP005080 | Unpublished |
| LMA323St_8 | 827 | MZ575670 | 98 | 100 | <i>S. fulvissimus</i> | CP005080 | Unpublished |
| LMA323St_9 | 827 | MZ575671 | 99 | 98 | <i>S. praecox</i> | JF424060 | Han et al. 2012 |
| LMA323St_10 | 830 | MZ575672 | 97 | 100 | <i>S. fulvissimus</i> | CP005080 | Unpublished |
| LMA323St_11 | 828 | MZ575673 | 98 | 100 | <i>S. fulvissimus</i> | CP005080 | Unpublished |
| LMA323St_12 | 815 | MZ575674 | 97 | 99 | <i>S. fulvissimus</i> | CP005080 | Unpublished |

| | | | | | | | |
|-------------|-----|----------|----|-----|-------------------------|----------|-----------------|
| LMA323St_13 | 828 | MZ575675 | 98 | 100 | <i>S. fildesensis</i> | MT594398 | Unpublished |
| LMA323St_14 | 822 | MZ575676 | 98 | 98 | <i>S. praecox</i> | JF424060 | Han et al. 2012 |
| LMA323St_15 | 827 | MZ575677 | 99 | 98 | <i>S. praecox</i> | JF424060 | Han et al. 2012 |
| LMA323St_16 | 807 | MZ575678 | 99 | 100 | <i>S. fildesensis</i> | MT594398 | Unpublished |
| LMA323St_17 | 891 | MZ575679 | 98 | 95 | <i>S. fulvissimus</i> | CP005080 | Unpublished |
| LMA323St_18 | 789 | MZ575680 | 90 | 62 | <i>Streptomyces</i> sp. | KT385327 | Unpublished |
| LMA323St_19 | 923 | MZ575681 | 96 | 94 | <i>Streptomyces</i> sp. | MT594398 | Unpublished |
| LMA323St_20 | 683 | MZ575682 | 87 | 65 | <i>Streptomyces</i> sp. | KT385327 | Unpublished |
| LMA323St_21 | 907 | MZ575683 | 95 | 92 | <i>Streptomyces</i> sp. | CP005080 | Unpublished |
| LMA323St_22 | 877 | MZ575684 | 97 | 88 | <i>S. praecox</i> | JF424060 | Han et al. 2012 |
| LMA323St_23 | 774 | MZ575685 | 85 | 60 | <i>Streptomyces</i> sp. | KT385327 | Unpublished |
| LMA323St_24 | 888 | MZ575686 | 97 | 96 | <i>S. fulvissimus</i> | CP005080 | Unpublished |
| LMA323St_25 | 874 | MZ575687 | 96 | 95 | <i>Streptomyces</i> sp. | CP005080 | Unpublished |
| LMA323St_26 | 873 | MZ575688 | 96 | 98 | <i>Streptomyces</i> sp. | CP005080 | Unpublished |
| LMA323St_27 | 942 | MZ575689 | 96 | 90 | <i>Streptomyces</i> sp. | CP005080 | Unpublished |
| LMA323St_28 | 892 | MZ575690 | 98 | 94 | <i>S. fulvissimus</i> | CP005080 | Unpublished |
| LMA323St_29 | 884 | MZ575691 | 97 | 95 | <i>S. fulvissimus</i> | CP005080 | Unpublished |
| LMA323St_30 | 892 | MZ575692 | 98 | 89 | <i>S. praecox</i> | JF424060 | Han et al. 2012 |
| LMA323St_31 | 561 | MZ575693 | 88 | 82 | <i>Streptomyces</i> sp. | KT385327 | Unpublished |
| LMA323St_32 | 706 | MZ575694 | 91 | 68 | <i>Streptomyces</i> sp. | KT385327 | Unpublished |
| LMA323St_33 | 813 | MZ575695 | 92 | 98 | <i>Streptomyces</i> sp. | JF424060 | Han et al. 2012 |
| LMA323St_34 | 826 | MZ575696 | 98 | 98 | <i>S. fulvissimus</i> | CP005080 | Unpublished |
| LMA323St_35 | 828 | MZ575697 | 98 | 100 | <i>S. fulvissimus</i> | CP005080 | Unpublished |
| LMA323St_36 | 827 | MZ575698 | 98 | 100 | <i>S. fulvissimus</i> | CP005080 | Unpublished |
| LMA323St_37 | 625 | MZ575699 | 88 | 62 | <i>Streptomyces</i> sp. | EF055028 | Guo et al. 2008 |
| LMA323St_38 | 961 | MZ575700 | 98 | 86 | <i>S. fulvissimus</i> | CP005080 | Unpublished |
| LMA323St_39 | 849 | MZ575701 | 88 | 57 | <i>Streptomyces</i> sp. | EF055028 | Guo et al. 2008 |
| LMA323St_40 | 890 | MZ575702 | 97 | 95 | <i>S. fulvissimus</i> | CP005080 | Unpublished |
| LMA323St_41 | 823 | MZ575703 | 99 | 99 | <i>S. fulvissimus</i> | CP005080 | Unpublished |
| LMA323St_42 | 823 | MZ575704 | 99 | 97 | <i>S. praecox</i> | JF424060 | Han et al. 2012 |
| LMA323St_43 | 817 | MZ575705 | 98 | 96 | <i>S. praecox</i> | JF424060 | Han et al. 2012 |
| LMA323St_44 | 811 | MZ575706 | 97 | 97 | <i>S. praecox</i> | JF424060 | Han et al. 2012 |
| LMA323St_45 | 571 | MZ575707 | - | - | - | - | - |
| LMA323St_46 | 888 | MZ575708 | 98 | 89 | <i>S. praecox</i> | JF424060 | Han et al. 2012 |
| LMA323St_47 | 788 | MZ575709 | 92 | 94 | <i>Streptomyces</i> sp. | JF424060 | Han et al. 2012 |
| LMA323St_48 | 793 | MZ575710 | 93 | 100 | <i>Streptomyces</i> sp. | CP005080 | Unpublished |
| LMA323St_49 | 562 | MZ575711 | 80 | 93 | <i>Streptomyces</i> sp. | CP005080 | Unpublished |

Table S3: Similarity list of *Streptomyces atpD* sequences found in GenBank.

| Isolate | Size (bp) | Acession Number | Id (%) | Qu (%) | Species | Acession Number | Reference |
|-------------|-----------|-----------------|--------|--------|-------------------------|-----------------|--------------------|
| LMA323St_1 | 834 | MZ566574 | 93 | 99 | <i>Streptomyces</i> sp. | AP009493 | Hirano et al. 2008 |
| LMA323St_2 | 859 | MZ566575 | 94 | 99 | <i>Streptomyces</i> sp. | AP009493 | Hirano et al. 2008 |
| LMA323St_3 | 851 | MZ566576 | 96 | 100 | <i>Streptomyces</i> sp. | CP054926 | Unpublished |
| LMA323St_4 | 855 | MZ566577 | 94 | 57 | <i>Streptomyces</i> sp. | EF031286 | Guo et al. 2008 |
| LMA323St_5 | 856 | MZ566578 | 97 | 98 | <i>S. puniscabiei</i> | JF303753 | Unpublished |
| | | | 97 | 98 | <i>S. luridiscabiei</i> | JF303752 | Unpublished |
| LMA323St_6 | 853 | MZ566579 | 98 | 98 | <i>S. fulvissimus</i> | CP054926 | Unpublished |
| LMA323St_7 | 857 | MZ566580 | 93 | 99 | <i>Streptomyces</i> sp. | CP054926 | Unpublished |
| LMA323St_8 | 856 | MZ566581 | 90 | 94 | <i>Streptomyces</i> sp. | CP054926 | Unpublished |
| LMA323St_9 | 858 | MZ566582 | 96 | 97 | <i>Streptomyces</i> sp. | JF424200 | Han et al. 2012 |
| LMA323St_10 | 861 | MZ566583 | 85 | 99 | <i>Streptomyces</i> sp. | CP054926 | Unpublished |
| LMA323St_11 | 860 | MZ566584 | 95 | 100 | <i>Streptomyces</i> sp. | CP054926 | Unpublished |
| LMA323St_12 | 855 | MZ566585 | 80 | 84 | <i>Streptomyces</i> sp. | JF424204 | Han et al. 2012 |
| LMA323St_13 | 853 | MZ566586 | 91 | 99 | <i>Streptomyces</i> sp. | MT594395 | Lavin et al. 2016 |
| LMA323St_14 | 853 | MZ566587 | 96 | 100 | <i>Streptomyces</i> sp. | AP009493 | Hirano et al. 2008 |
| LMA323St_15 | 856 | MZ566588 | 97 | 100 | <i>S. griseus</i> | AP009493 | Hirano et al. 2008 |
| LMA323St_16 | 853 | MZ566589 | 79 | 63 | <i>Streptomyces</i> sp. | MT594395 | Lavin et al. 2016 |
| LMA323St_17 | 860 | MZ566590 | 93 | 100 | <i>Streptomyces</i> sp. | CP054926 | Unpublished |
| LMA323St_18 | 856 | MZ566591 | 96 | 100 | <i>Streptomyces</i> sp. | AP009493 | Hirano et al. 2008 |
| LMA323St_19 | 854 | MZ566592 | 90 | 57 | <i>Streptomyces</i> sp. | KT384779 | Unpublished |
| LMA323St_20 | 859 | MZ566593 | 99 | 100 | <i>S. griseus</i> | AP009493 | Hirano et al. 2008 |
| LMA323St_21 | 861 | MZ566594 | 89 | 99 | <i>Streptomyces</i> sp. | JF303753 | Unpublished |
| LMA323St_22 | 861 | MZ566595 | 94 | 99 | <i>Streptomyces</i> sp. | AP009493 | Hirano et al. 2008 |
| LMA323St_23 | 859 | MZ566596 | 93 | 99 | <i>Streptomyces</i> sp. | AP009493 | Hirano et al. 2008 |
| LMA323St_24 | 851 | MZ566597 | 95 | 99 | <i>Streptomyces</i> sp. | CP054926 | Unpublished |
| LMA323St_25 | 856 | MZ566598 | 96 | 99 | <i>Streptomyces</i> sp. | CP054926 | Unpublished |
| LMA323St_26 | 855 | MZ566599 | 96 | 99 | <i>Streptomyces</i> sp. | CP054926 | Unpublished |
| LMA323St_27 | 858 | MZ566600 | 97 | 99 | <i>S. fulvissimus</i> | CP054926 | Unpublished |
| LMA323St_28 | 859 | MZ566601 | 95 | 100 | <i>Streptomyces</i> sp. | CP054926 | Unpublished |
| LMA323St_29 | 857 | MZ566602 | 97 | 99 | <i>S. fulvissimus</i> | CP054926 | Unpublished |
| LMA323St_30 | 861 | MZ566603 | 97 | 100 | <i>S. griseus</i> | AP009493 | Hirano et al. 2008 |
| LMA323St_31 | 860 | MZ566604 | 99 | 100 | <i>S. griseus</i> | AP009493 | Hirano et al. 2008 |
| LMA323St_32 | 856 | MZ566605 | 96 | 100 | <i>Streptomyces</i> sp. | AP009493 | Hirano et al. 2008 |
| LMA323St_33 | 853 | MZ566606 | 94 | 99 | <i>Streptomyces</i> sp. | AP009493 | Hirano et al. 2008 |
| LMA323St_34 | 854 | MZ566607 | 96 | 100 | <i>Streptomyces</i> sp. | CP054926 | Unpublished |
| LMA323St_35 | 858 | MZ566608 | 97 | 100 | <i>S. fulvissimus</i> | CP054926 | Unpublished |
| LMA323St_36 | 852 | MZ566609 | 97 | 100 | <i>S. fulvissimus</i> | CP054926 | Unpublished |

| | | | | | | | |
|-------------|-----|----------|----|-----|-------------------------|----------|--------------------|
| LMA323St_37 | 856 | MZ566610 | 98 | 99 | <i>S. fulvissimus</i> | CP054926 | Unpublished |
| LMA323St_38 | 858 | MZ566611 | 96 | 100 | <i>Streptomyces</i> sp. | CP054926 | Unpublished |
| LMA323St_39 | 857 | MZ566612 | 98 | 99 | <i>S. fulvissimus</i> | CP054926 | Unpublished |
| LMA323St_40 | 852 | MZ566613 | 93 | 99 | <i>Streptomyces</i> sp. | CP054926 | Unpublished |
| LMA323St_41 | 853 | MZ566614 | 91 | 98 | <i>Streptomyces</i> sp. | CP054926 | Unpublished |
| LMA323St_42 | 859 | MZ566615 | 96 | 99 | <i>Streptomyces</i> sp. | AP009493 | Hirano et al. 2008 |
| LMA323St_43 | 854 | MZ566616 | 94 | 100 | <i>Streptomyces</i> sp. | AP009493 | Hirano et al. 2008 |
| LMA323St_44 | 857 | MZ566617 | 98 | 100 | <i>S. griseus</i> | AP009493 | Hirano et al. 2008 |
| LMA323St_45 | 857 | MZ566618 | - | - | - | - | - |
| LMA323St_46 | 851 | MZ566619 | 97 | 100 | <i>S. griseus</i> | AP009493 | Hirano et al. 2008 |
| LMA323St_47 | 861 | MZ566620 | 96 | 99 | <i>Streptomyces</i> sp. | AP009493 | Hirano et al. 2008 |
| LMA323St_48 | 859 | MZ566621 | 96 | 100 | <i>Streptomyces</i> sp. | CP054926 | Unpublished |
| LMA323St_49 | 855 | MZ566622 | 98 | 99 | <i>S. fulvissimus</i> | CP054926 | Unpublished |

Table S4: Similarity list of *Streptomyces trpB* sequences found in GenBank.

| Isolate | Size (bp) | Accession Number | Id (%) | Qu (%) | Species | Accession Number | Reference |
|-------------|-----------|------------------|--------|--------|---------------------------|------------------|-------------------|
| LMA323St_1 | 759 | MZ645877 | 100 | 75 | <i>S. longispororuber</i> | KT389296 | Unpublished |
| LMA323St_2 | 759 | MZ645878 | 98 | 96 | <i>S. praecox</i> | JF423966 | Han et al. 2012 |
| LMA323St_3 | 760 | MZ645879 | 98 | 99 | <i>S. fulvissimus</i> | CP005080 | Unpublished |
| LMA323St_4 | 759 | MZ645880 | 98 | 99 | <i>S. fulvissimus</i> | CP005080 | Unpublished |
| LMA323St_5 | 760 | MZ645881 | 98 | 100 | <i>S. fulvissimus</i> | CP005080 | Unpublished |
| LMA323St_6 | 759 | MZ645882 | 98 | 99 | <i>S. fulvissimus</i> | CP005080 | Unpublished |
| LMA323St_7 | 760 | MZ645883 | 98 | 99 | <i>S. fulvissimus</i> | CP005080 | Unpublished |
| LMA323St_8 | 760 | MZ645884 | 97 | 100 | <i>S. fulvissimus</i> | CP005080 | Unpublished |
| LMA323St_9 | 759 | MZ645885 | 98 | 96 | <i>S. praecox</i> | JF423966 | Han et al. 2012 |
| LMA323St_10 | 760 | MZ645886 | 97 | 99 | <i>S. fulvissimus</i> | CP005080 | Unpublished |
| LMA323St_11 | 759 | MZ645887 | 98 | 99 | <i>S. fulvissimus</i> | CP005080 | Unpublished |
| LMA323St_12 | 760 | MZ645888 | 98 | 99 | <i>S. fulvissimus</i> | CP005080 | Unpublished |
| LMA323St_13 | 759 | MZ645889 | 97 | 99 | <i>S. fildesensis</i> | MT594399 | Lavin et al. 2016 |
| LMA323St_14 | 760 | MZ645890 | 97 | 96 | <i>S. praecox</i> | JF423966 | Han et al. 2012 |
| LMA323St_15 | 759 | MZ645891 | 100 | 75 | <i>S. longispororuber</i> | KT389296 | Lavin et al. 2016 |
| LMA323St_16 | 759 | MZ645892 | 97 | 99 | <i>S. fildesensis</i> | MT594399 | Unpublished |
| LMA323St_17 | 758 | MZ645893 | 98 | 100 | <i>S. fulvissimus</i> | CP005080 | Unpublished |
| LMA323St_18 | 541 | MZ645894 | 98 | 89 | <i>S. longispororuber</i> | KT389296 | Unpublished |
| LMA323St_19 | 759 | MZ645895 | 97 | 99 | <i>S. fildesensis</i> | MT594399 | Lavin et al. 2016 |
| LMA323St_20 | 759 | MZ645896 | 98 | 96 | <i>S. praecox</i> | JF423966 | Han et al. 2012 |
| LMA323St_21 | 761 | MZ645897 | 98 | 100 | <i>S. fulvissimus</i> | CP005080 | Unpublished |
| LMA323St_22 | 759 | MZ645898 | 98 | 96 | <i>S. praecox</i> | JF423966 | Han et al. 2012 |
| LMA323St_23 | 574 | MZ645899 | 97 | 90 | <i>S. longispororuber</i> | KT389296 | Unpublished |

| | | | | | | | |
|-------------|-----|----------|----|-----|---------------------------|----------|-----------------|
| LMA323St_24 | 760 | MZ645900 | 98 | 100 | <i>S. fulvissimus</i> | CP005080 | Unpublished |
| LMA323St_25 | 760 | MZ645901 | 98 | 100 | <i>S. fulvissimus</i> | CP005080 | Unpublished |
| LMA323St_26 | 760 | MZ645902 | 98 | 100 | <i>S. fulvissimus</i> | CP005080 | Unpublished |
| LMA323St_27 | 760 | MZ645903 | 98 | 100 | <i>S. fulvissimus</i> | CP005080 | Unpublished |
| LMA323St_28 | 759 | MZ645904 | 98 | 100 | <i>S. fulvissimus</i> | CP005080 | Unpublished |
| LMA323St_29 | 760 | MZ645905 | 98 | 100 | <i>S. fulvissimus</i> | CP005080 | Unpublished |
| LMA323St_30 | 759 | MZ645906 | 99 | 75 | <i>S. longispororuber</i> | KT389296 | Unpublished |
| LMA323St_31 | 300 | MZ645907 | 99 | 81 | <i>S. longispororuber</i> | KT389296 | Unpublished |
| LMA323St_32 | 759 | MZ645908 | 97 | 96 | <i>S. praecox</i> | JF423966 | Han et al. 2012 |
| LMA323St_33 | 759 | MZ645909 | 98 | 96 | <i>S. praecox</i> | JF423966 | Han et al. 2012 |
| LMA323St_34 | 760 | MZ645910 | 98 | 100 | <i>S. fulvissimus</i> | CP005080 | Unpublished |
| LMA323St_35 | 760 | MZ645911 | 98 | 100 | <i>S. fulvissimus</i> | CP005080 | Unpublished |
| LMA323St_36 | 760 | MZ645912 | 98 | 99 | <i>S. fulvissimus</i> | CP005080 | Unpublished |
| LMA323St_37 | 760 | MZ645913 | 98 | 100 | <i>S. fulvissimus</i> | CP005080 | Unpublished |
| LMA323St_38 | 760 | MZ645914 | 98 | 100 | <i>S. fulvissimus</i> | CP005080 | Unpublished |
| LMA323St_39 | 760 | MZ645915 | 98 | 100 | <i>S. fulvissimus</i> | CP005080 | Unpublished |
| LMA323St_40 | 459 | MZ645916 | 94 | 88 | <i>Streptomyces</i> sp. | EF055164 | Guo et al. 2008 |
| LMA323St_41 | 760 | MZ645917 | 98 | 99 | <i>S. fulvissimus</i> | CP005080 | Unpublished |
| LMA323St_42 | 758 | MZ645918 | 97 | 96 | <i>S. praecox</i> | JF423966 | Han et al. 2012 |
| LMA323St_43 | 759 | MZ645919 | 97 | 96 | <i>S. praecox</i> | JF423966 | Han et al. 2012 |
| LMA323St_44 | 759 | MZ645920 | 97 | 96 | <i>S. praecox</i> | JF423966 | Han et al. 2012 |
| LMA323St_45 | 380 | MZ645921 | 93 | 84 | <i>Streptomyces</i> sp. | KT389448 | Unpublished |
| LMA323St_46 | 759 | MZ645922 | 97 | 96 | <i>S. praecox</i> | JF423966 | Han et al. 2012 |
| LMA323St_47 | 759 | MZ645923 | 97 | 96 | <i>S. praecox</i> | JF423966 | Han et al. 2012 |
| LMA323St_48 | 759 | MZ645924 | 98 | 99 | <i>S. fulvissimus</i> | CP005080 | Unpublished |
| LMA323St_49 | 271 | MZ645925 | 97 | 99 | <i>S. fulvissimus</i> | CP054926 | Unpublished |

Table S5: Similarity list of *Streptomyces gyrB* sequences found in GenBank.

| Isolate | Size (bp) | Accession Number | Id (%) | Qu (%) | Species | Accession Number | Reference |
|-------------|-----------|------------------|--------|--------|-------------------------|------------------|-----------------|
| LMA323St_1 | 989 | MZ596363 | 97 | 100 | <i>S. anulatus</i> | HQ995509 | Kim et al. 2012 |
| LMA323St_2 | 996 | MZ596364 | 98 | 99 | <i>S. anulatus</i> | HQ995509 | Kim et al. 2012 |
| LMA323St_3 | 995 | MZ596365 | 99 | 100 | <i>S. fulvissimus</i> | CP005080 | Unpublished |
| LMA323St_4 | 988 | MZ596366 | 98 | 100 | <i>S. fulvissimus</i> | CP005080 | Unpublished |
| LMA323St_5 | 997 | MZ596367 | 99 | 100 | <i>S. fulvissimus</i> | CP005080 | Unpublished |
| LMA323St_6 | 996 | MZ596368 | 98 | 99 | <i>S. fulvissimus</i> | CP005080 | Unpublished |
| LMA323St_7 | 1003 | MZ596369 | 99 | 100 | <i>S. fulvissimus</i> | CP005080 | Unpublished |
| LMA323St_8 | 1006 | MZ596370 | 98 | 100 | <i>S. fulvissimus</i> | CP005080 | Unpublished |
| LMA323St_9 | 992 | MZ596371 | 98 | 100 | <i>S. anulatus</i> | HQ995509 | Kim et al. 2012 |
| LMA323St_10 | 497 | MZ596372 | 94 | 94 | <i>Streptomyces</i> sp. | CP054926 | Unpublished |

| | | | | | | | |
|-------------|------|----------|----|-----|-------------------------|----------|-------------------|
| LMA323St_11 | 990 | MZ596373 | 97 | 99 | <i>S. fulvissimus</i> | CP005080 | Unpublished |
| LMA323St_12 | 1014 | MZ596374 | 89 | 29 | <i>Streptomyces</i> sp. | EF054975 | Guo et al. 2008 |
| LMA323St_13 | 993 | MZ596375 | 93 | 99 | <i>Streptomyces</i> sp. | MG905917 | Lavin et al. 2016 |
| LMA323St_14 | 997 | MZ596376 | 99 | 100 | <i>S. anulatus</i> | HQ995509 | Kim et al. 2012 |
| | | | | | <i>S. praecox</i> | HQ995520 | Kim et al. 2012 |
| LMA323St_15 | 1007 | MZ596377 | 98 | 100 | <i>S. anulatus</i> | HQ995509 | Kim et al. 2012 |
| LMA323St_16 | 999 | MZ596378 | 91 | 99 | <i>Streptomyces</i> sp. | MG905917 | Lavin et al. 2016 |
| LMA323St_17 | 901 | MZ596379 | 98 | 98 | <i>S. fulvissimus</i> | CP005080 | Unpublished |
| LMA323St_18 | 1004 | MZ596380 | 98 | 100 | <i>S. anulatus</i> | HQ995509 | Kim et al. 2012 |
| LMA323St_19 | 949 | MZ596381 | 86 | 98 | <i>Streptomyces</i> sp. | MG905917 | Lavin et al. 2016 |
| LMA323St_20 | 1009 | MZ596382 | 97 | 99 | <i>S. anulatus</i> | HQ995509 | Han et al. 2012 |
| LMA323St_21 | 364 | MZ596383 | 93 | 81 | <i>Streptomyces</i> sp. | CP054926 | Unpublished |
| LMA323St_22 | 1013 | MZ596384 | 97 | 99 | <i>S. anulatus</i> | HQ995509 | Kim et al. 2012 |
| LMA323St_23 | 1009 | MZ596385 | 98 | 99 | <i>S. anulatus</i> | HQ995509 | Kim et al. 2012 |
| LMA323St_24 | 425 | MZ596386 | 97 | 96 | <i>S. luridiscabiei</i> | EF054961 | Guo et al. 2008 |
| LMA323St_25 | 994 | MZ596387 | 99 | 99 | <i>S. fulvissimus</i> | CP005080 | Unpublished |
| LMA323St_26 | 999 | MZ596388 | 99 | 100 | <i>S. fulvissimus</i> | CP005080 | Unpublished |
| LMA323St_27 | 1001 | MZ596389 | 99 | 99 | <i>S. fulvissimus</i> | CP005080 | Unpublished |
| LMA323St_28 | 1002 | MZ596390 | 99 | 100 | <i>S. fulvissimus</i> | CP005080 | Unpublished |
| LMA323St_29 | 1005 | MZ596391 | 98 | 99 | <i>S. fulvissimus</i> | CP005080 | Unpublished |
| LMA323St_30 | 1003 | MZ596392 | 98 | 100 | <i>S. anulatus</i> | HQ995509 | Kim et al. 2012 |
| LMA323St_31 | 1005 | MZ596393 | 98 | 100 | <i>S. anulatus</i> | HQ995509 | Kim et al. 2012 |
| LMA323St_32 | 1001 | MZ596394 | 98 | 100 | <i>S. anulatus</i> | HQ995509 | Kim et al. 2012 |
| LMA323St_33 | 1006 | MZ596395 | 98 | 99 | <i>S. anulatus</i> | HQ995509 | Kim et al. 2012 |
| LMA323St_34 | 1006 | MZ596396 | 98 | 99 | <i>S. fulvissimus</i> | CP005080 | Unpublished |
| LMA323St_35 | 1008 | MZ596397 | 98 | 100 | <i>S. fulvissimus</i> | CP005080 | Unpublished |
| LMA323St_36 | 1001 | MZ596398 | 99 | 100 | <i>S. fulvissimus</i> | CP005080 | Unpublished |
| LMA323St_37 | 1002 | MZ596399 | 99 | 99 | <i>S. fulvissimus</i> | CP005080 | Unpublished |
| LMA323St_38 | 1003 | MZ596400 | 99 | 100 | <i>S. fulvissimus</i> | CP005080 | Unpublished |
| LMA323St_39 | 999 | MZ596401 | 99 | 100 | <i>S. fulvissimus</i> | CP005080 | Unpublished |
| LMA323St_40 | 999 | MZ596402 | 99 | 99 | <i>S. fulvissimus</i> | CP005080 | Unpublished |
| LMA323St_41 | 1003 | MZ596403 | 99 | 100 | <i>S. fulvissimus</i> | CP005080 | Unpublished |
| LMA323St_42 | 999 | MZ596404 | 99 | 100 | <i>S. anulatus</i> | HQ995509 | Kim et al. 2012 |
| LMA323St_43 | 996 | MZ596405 | 98 | 100 | <i>S. anulatus</i> | HQ995509 | Kim et al. 2012 |
| LMA323St_44 | 1003 | MZ596406 | 99 | 99 | <i>S. anulatus</i> | HQ995509 | Kim et al. 2012 |
| LMA323St_45 | 994 | MZ596407 | 92 | 100 | <i>Streptomyces</i> sp. | MG905917 | Lavin et al. 2016 |
| LMA323St_46 | 996 | MZ596408 | 98 | 99 | <i>S. anulatus</i> | HQ995509 | Kim et al. 2012 |
| LMA323St_47 | 1006 | MZ596409 | 97 | 100 | <i>S. anulatus</i> | HQ995509 | Kim et al. 2012 |
| LMA323St_48 | 1000 | MZ596410 | 99 | 100 | <i>S. fulvissimus</i> | CP005080 | Unpublished |
| LMA323St_49 | 1003 | MZ596411 | 98 | 99 | <i>S. fulvissimus</i> | CP005080 | Unpublished |

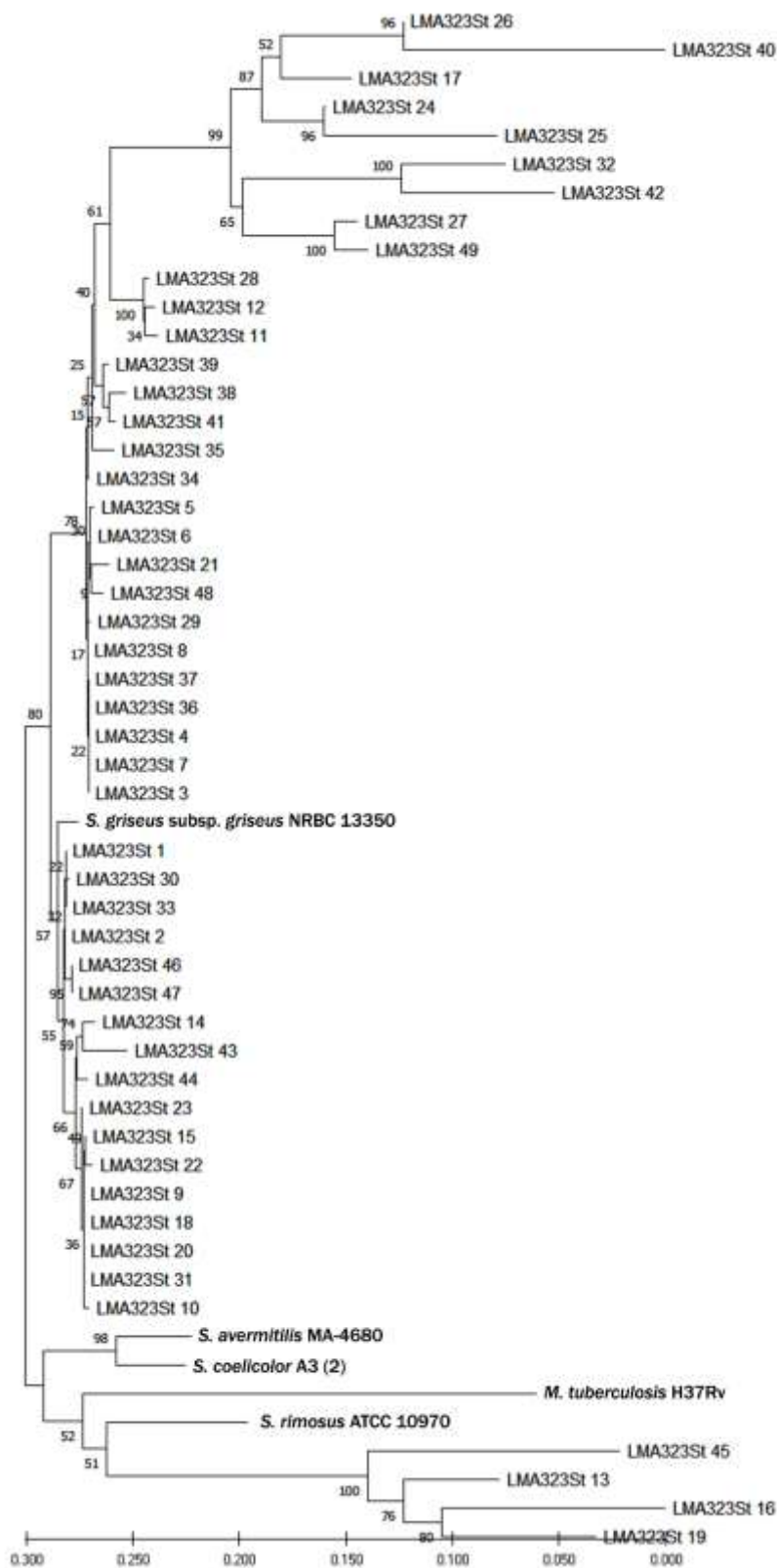


Figure S1:
Phylogenetic tree
constructed with *rpoB*
sequences from all
the 49 *Streptomyces*
isolates in MEGA X
using neighbor-
joining.

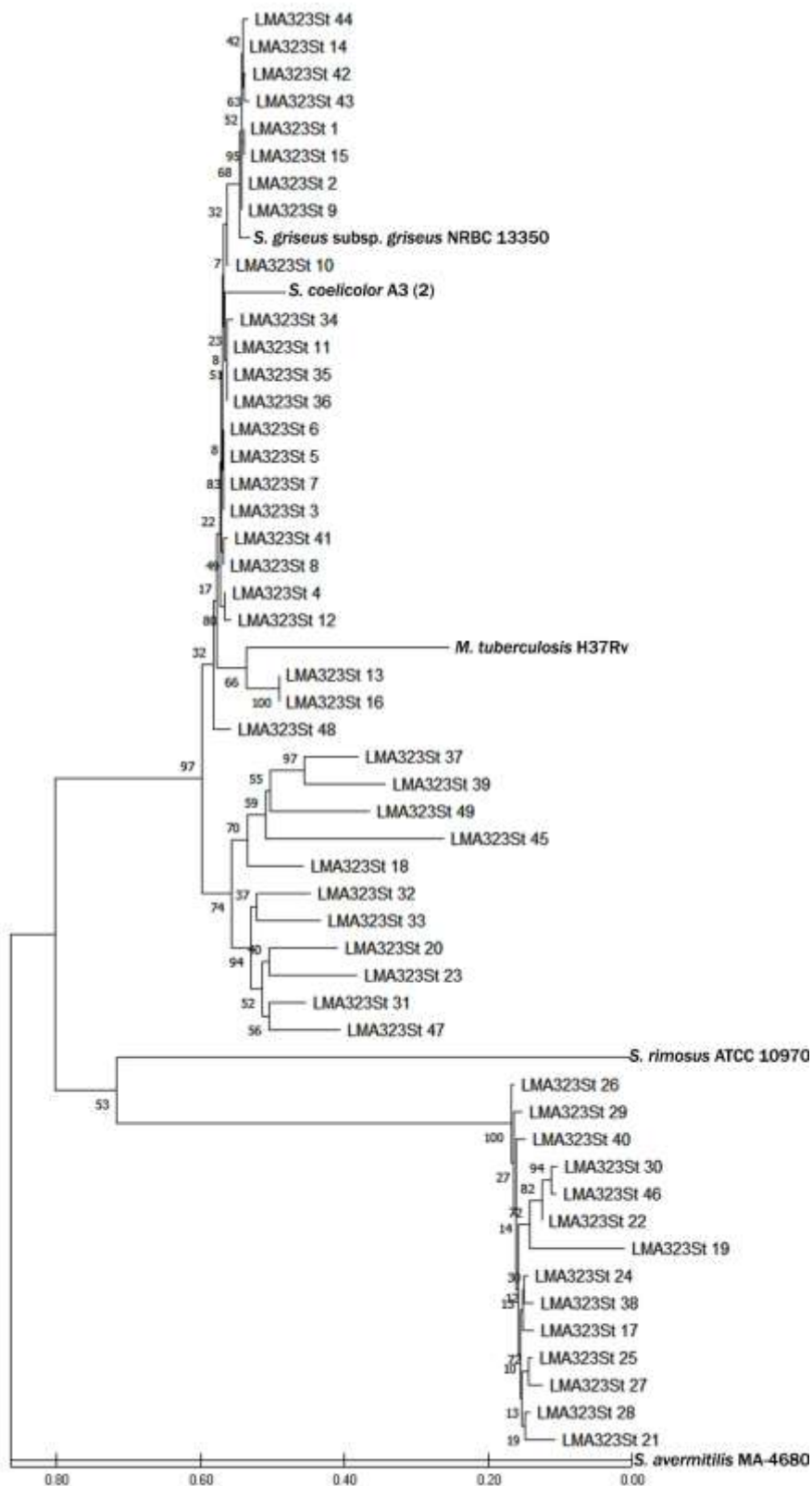


Figure S2:
Phylogenetic tree
constructed with *recA*
sequences from all
the 49 *Streptomyces*
isolates in MEGA X
using neighbor-
joining.

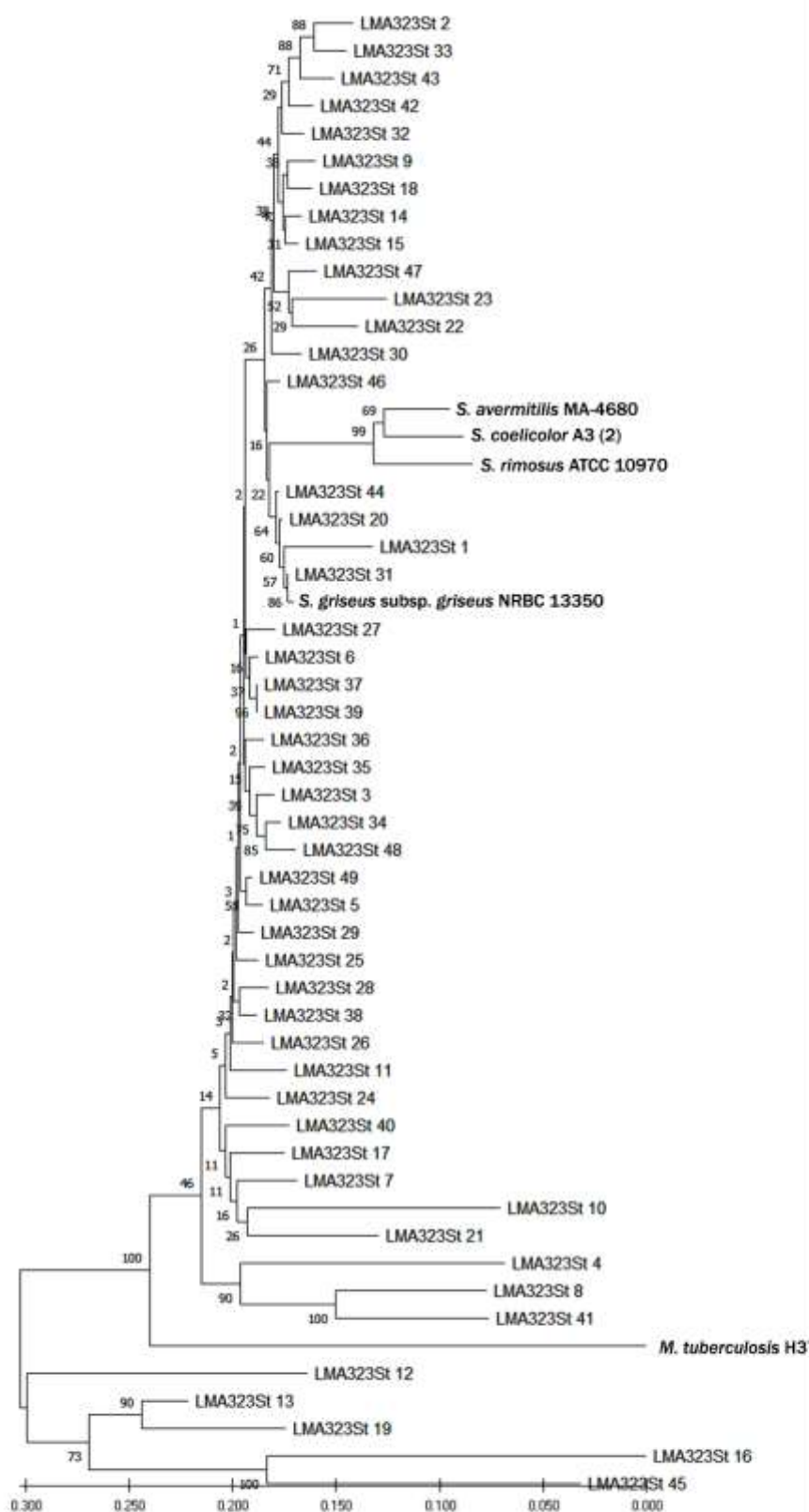


Figure S3:
Phylogenetic tree
constructed with
atpD sequences
from all the 49
Streptomyces
isolates in MEGA X
using neighbor-
joining.

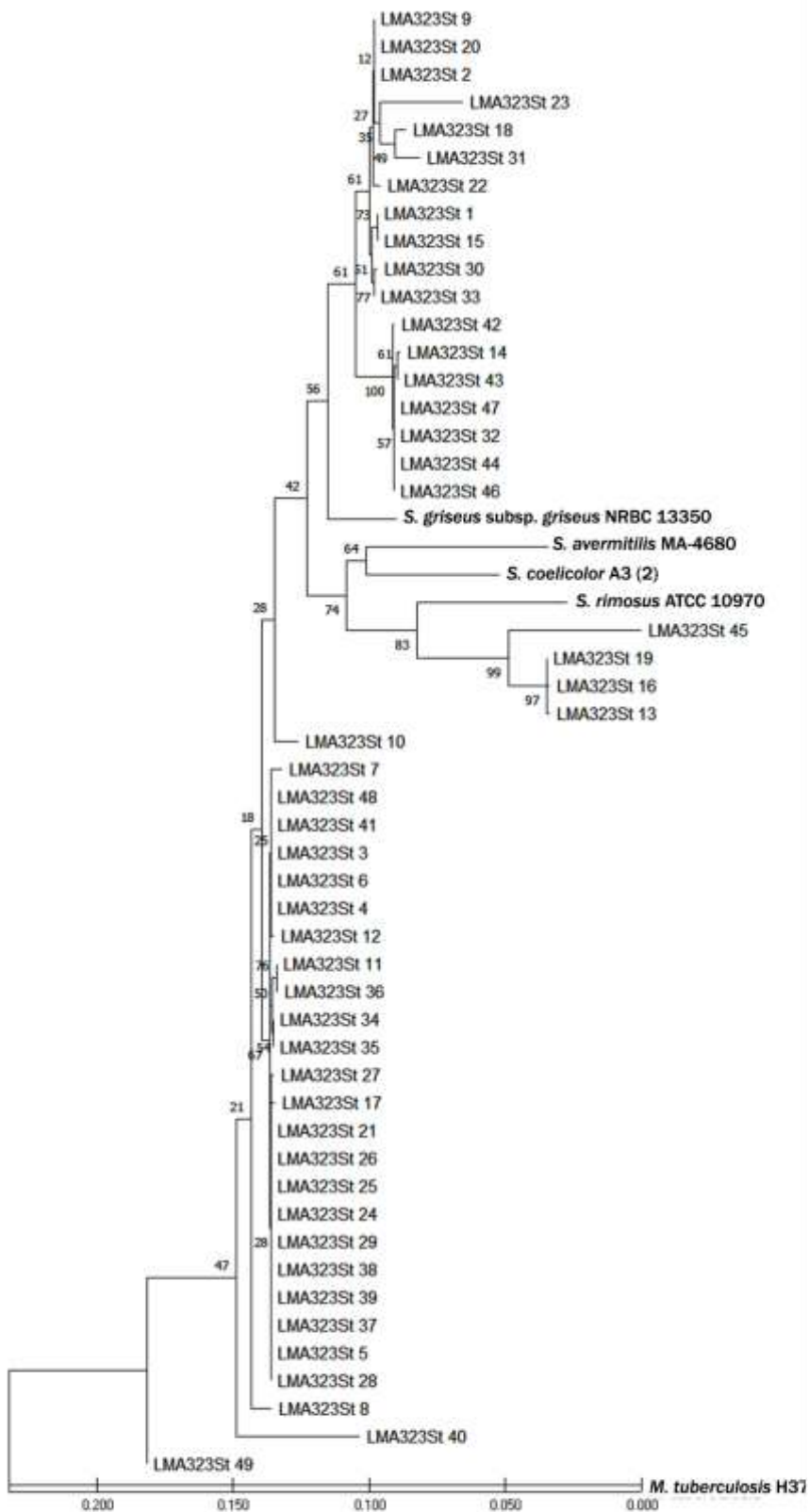


Figure S4: Phylogenetic tree constructed with *trpB* sequences from all the 49 *Streptomyces* isolates in MEGA X using neighbor-joining.

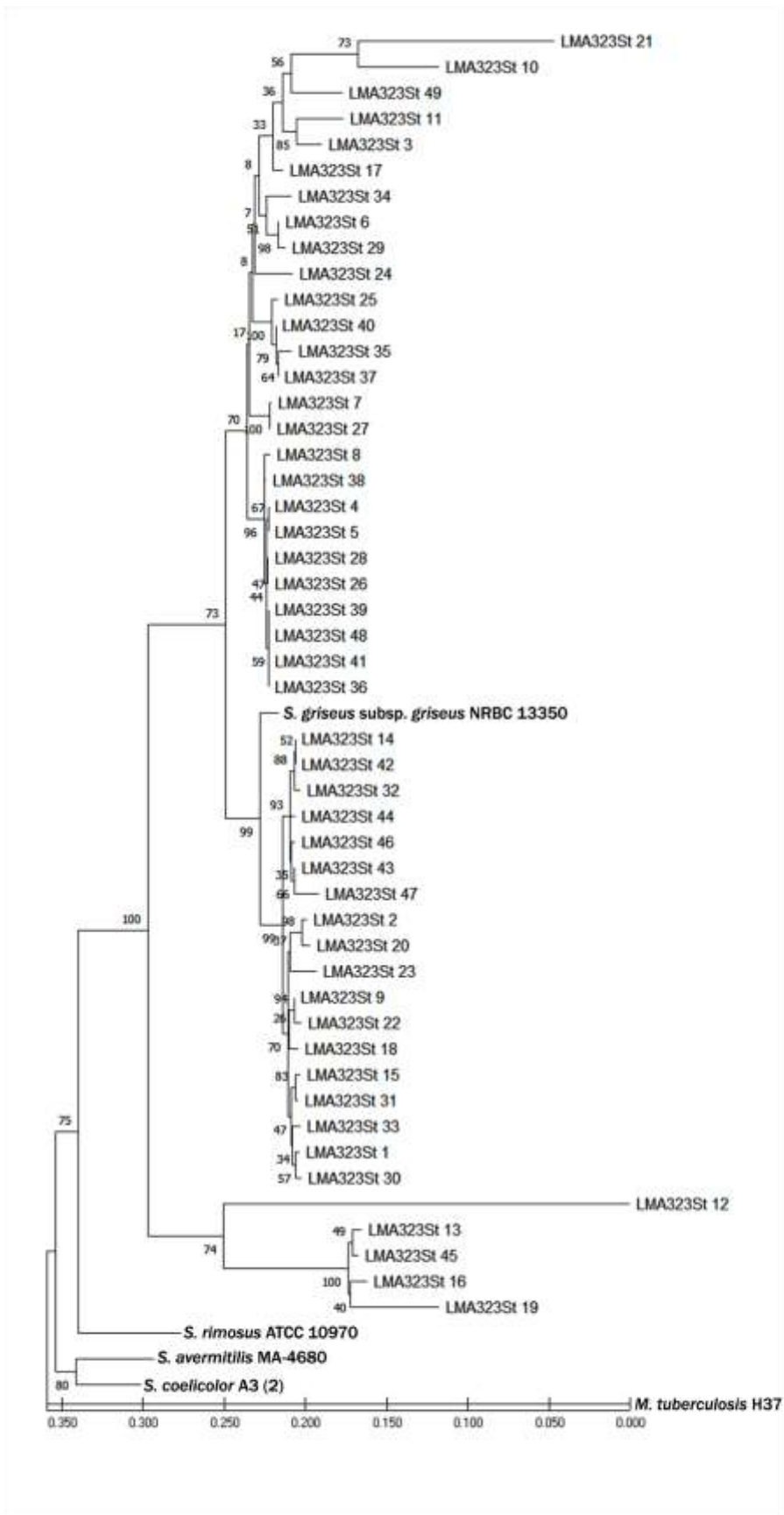


Figure S5:
Phylogenetic tree
constructed with *gyrB*
sequences from all
the 49 *Streptomyces*
isolates in MEGA X
using neighbor-
joining.

REFERENCES

- Guo Y, Zheng W, Rong X, Huang Y (2008) A multilocus phylogeny of the *Streptomyces griseus* 16S rRNA gene clade: use of multilocus sequence analysis for streptomycete systematics. *Int J Syst Evol Microbiol* 58:149-159. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65224-0>
- Han JH, Cho MH, Kim SB (2012) Ribosomal and protein coding gene based multigene phylogeny on the family *Streptomycetaceae*. *Syst Appl Microbiol* 35(1):1-6. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2011.08.007>
- Hirano S, Tanaka K, Ohnishi Y, Horinouchi S (2008) Conditionally positive effect of the TetR-family transcriptional regulator AtrA on streptomycin production by *Streptomyces griseus*. *Microbiol* 15: 905-914. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2007/014381-0>
- Kim KO, Shin KS, Kim MN, Shin KS, Labeda DP, Han JH, Kim SB (2012) Reassessment of the status of *Streptomyces setonii* and reclassification of *Streptomyces fimicarius* as a later synonym of *Streptomyces setonii* and *Streptomyces albovinaceus* as a later synonym of *Streptomyces globisporus* based on combined 16S rRNA/gyrB gene sequence analysis. *Int J Syst Evol Microbiol* 6:2978-2985. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.040287-0>.
- Lavin PL, Yong ST, Wong CMVL, Stefano M (2016) Isolation and characterization of Antarctic psychrotroph *Streptomyces* sp. strain INACH3013. *Antarctic Sci* <https://doi.org/10.1017/S0954102016000250>

5.3. Artigo 3

Overview on natural products from Antarctic *Streptomyces* isolates

Marcela Proença Borba¹, Ignacio Gonzalez², Caridad Diaz², Mercedes de la Cruz², Jesús Martín², Rúben Tormo², Olga Genilloud², Sueli Van Der Sand¹

1- Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

2- Fundación MEDINA, Parque Tecnológico Ciencias de la Salud, Granada, Spain

Abstract

Streptomyces has been the most promising bacterial genus in natural products research, since the Golden Era of antibiotic discovery until the present time with the perspective of cryptic biosynthetic gene clusters. In this paper, we investigate the antimicrobial compounds produced by 40 *Streptomyces* isolates from Antarctic soil. Miniaturized fermentations were used to test 10 different culture media and the resultant extracts were tested against Gram-negative and Gram-positive bacteria, filamentous fungi and yeasts. The active extracts chemical profiles were analyzed by LC-UV-LRMS. A scaled-up fermentation was also performed for the most promising isolates according to this mass spectrometry-based profiling. A total of 14 compounds were found, including the antifungals maltophilin and alteramide. One isolate identified as LMA323St_43d produces an antifungal activity that cannot be associated to any known compound in the natural products mass spectrometry databases.

Keywords

Biosynthesis metabolism, mass spectrometry, miniaturized fermentation, dereplication, antifungals, *Streptomyces*

Introduction

Actinobacteria is one of the most diverse bacterial phyla and has a vast historic importance to natural products discovery (Baltz, 2016). *Streptomyces* is the

major genus of this phylum and responsible of the production of more than 10,000 compounds with biological interest identified since the Golden Era of Antibiotics (Lee et al., 2021) until the discovery void in the 2000's. Nevertheless, *Streptomyces* are still characterized as a "hidden treasure" nowadays thanks to genomic studies that demonstrated the high metabolic diversity present in these species (Jose and Jha, 2016). Since Bentley et al. (2002) sequenced the entire genome of *Streptomyces coelicolor* A3(2) and detected the production capacity of at least twenty secondary metabolites, which outnumber the five metabolites already discovered by classical methodologies (Aigle et al., 2014; Challis, 2014), much attention has been devoted to this genus and its prolific metabolism. Most of these metabolites come from cryptic genes and need to reach a certain level of production to be detected or its biosynthetic pathways need to be expressed in unusual conditions in the laboratory (Baltz, 2016). Activation of cryptic biosynthetic gene pathways can be achieved using different culture media and incubation times (Bode et al., 2002) and the addition of metabolic elicitors to these culture media (Ochi et al., 2014). Different techniques are being used to accelerate the screening for new natural products, like cultivation in miniaturized conditions (Koepff et al., 2017). The miniaturization allows a rapid and low-cost generation of a large number of culturing conditions to test multiple settings and preparations (Achinas et al., 2020). Furthermore, dereplication strategies also contribute to identify the already known compounds in initial steps, thus decreasing the rate of rediscovery of known natural products (Mohimani et al., 2018, Lianza et al., 2021).

In the search for new molecules and with the certainty that *Streptomyces* is still a promising genus in this regard, the isolation of strains from underexplored environments that exert great selective pressure, as is the case of the Antarctic continent (Encheva-Malinova et al., 2014; Lavin et al., 2016; Lamilla et al., al., 2018) is an interesting approach. These climatic characteristics select certain microorganisms that are capable of multiplying under such conditions of environmental stress. Because spore production ability, it is likely that sediment samples from Antarctica contain streptomycetes, both in soil and in the marine environment (Purves et al., 2016).

Thus, this paper identifies the diversity of known natural products produced by *Streptomyces* isolates from Antarctic soil and their antimicrobial activity profile.

Material and methods

Streptomyces isolates

Forty *Streptomyces* isolates were used in this work, in independent duplicates. The Antarctic sampling, isolation and primary characterization of these streptomycetes is described in Borba et al., 2020 and identification is discussed in Borba et al., 2021 (under review).

Fermentation and organic extraction

The 40 *Streptomyces* strains were cultivated in duplicate as follows: isolates were pre-cultivated in ATCC-2 liquid medium (g/L: 20 soluble potato starch, 10 dextrose, 5 N-Z-amine type E, 5 peptone, 5 yeast extract, 3 beef extract, 1 CaCO₃, pH 7.0) for 24h at 28° C. After that, the strains were micro-fermented in 96-deep well plates using the Duetz system (Duetz et al., 2000) with 0,8 mL of each media per well. A total of 10 culture media were used: ACA (g/L: 10 starch, 0.3 casein, 2 KNO₃, 2 NaCl, 2 K₂HPO₄, 0.05 MgSO₄, 0.01 FeSO₄), Czapek (g/250 mL: 7.5 saccharose, 0.75 NaNO₃, 0.125 MgSO₄, 0.125 NaCl, 0.25 K₂HPO₄, 0.0025 FeSO₄, pH 7.5), APM-9 (g/250 mL: 12.5 glucose, 3 soluble potato starch, 7.5 soy flour, 0.0005 CoCl₂.H₂O, 1.75 CaCO₃, pH 7.0), DEF-15 (g/250 mL: 10 saccharose, 0.5 NH₄Cl, 0.5 K₂HPO₄, 0.25 MgCl₂.6H₂O, 0.25 NaCl, 0.5 CaCO₃, 0.25 mL trace elements mg/100 mL: 100 MnCl₂.4H₂O, 100 ZnC₂, 100 FeCl₂.4H₂O, 50 NaI, pH 7.0), KHC (g/250 mL: 5 corn dextrin, 2.5 β-cyclodextrin, 0.00125 CoCl₂.6H₂O, 5 tomato extract, 2.5 yeast extract, pH 7.2), DNPM (g/250 mL: corn dextrin, 1.875 N-Z-soy peptone, 1.25 yeast extract, 5.25 MOPS, pH 7.0), SAM-6 (g/250 mL: 2.5 glucose, 7.5 soluble potato starch, 1.25 yeast extract, 1,25 N-Z-amine type E, 0.0025 CoCl₂.6H₂O, 1.25 CaCO₃, pH 7.0), RAM2-P V2 (g/250 mL: 2.5 glucose, 3.75 maltose, 1 corn flour, 1.25 yeast extract, 1.25 peptone, pH 7.0), and M016 (g/500 mL: 5 glucose, 5 soluble potato starch, 5 maltose, 0.5 yeast extract, 2.5 Bacto Soytone, 2 tryptone, 0.05 KH₂PO₄, 0.1 K₂HPO₄, 0.025 MgCl₂.6H₂O, 0.01 NaCl, 0.025 CaCl₂.2H₂O, 0.5 mL trace elements g/L: 0.005 SnCl₂, 0.01 H₃BO₃, 0.012 Na₂MoO₄.2H₂O, 0.015 CuSO₄, 0.02 CoCl₂.6H₂O, 0.02 KCl, 0.02 ZnCl₂, 0.1 MnSO₄.4H₂O, 5.8 FeCl₃, 2 mL HCl, pH 5.8). Plates were incubated for 5 days at 28° C under agitation of 300 rpm. The M016 medium was used in a second condition by addition of 0.2 mg/mL nalidixic acid after 48h incubation time, following incubation for further 72h after addition. To obtain the extracts, 0.8 mL of acetone was added

per well to disrupt cell membranes and ensure extraction, and followed by the addition of 0.08 mL dimethyl-sulfoxide, filtration and concentration of supernatant to 0.5 mL.

Some isolates were cultivated in EPA vials to increase the fermentation volumes to 11 mL. The isolates were also pre-cultivated in ATCC-2 liquid medium for 24h at 28° C and after cultivated in DNPM, KHC, RAM2-P V2, SAM-6 and M016 with the same two different conditions as described above. The EPA vials were incubated at 28° C for 5 days. To obtain these extracts, 10 mL of acetone was added per tube, followed by 0.6 mL dimethyl-sulfoxide centrifugation to eliminate cell debris and concentration to evaporate the acetone. These extracts were dispensed in 96 well plates after filtration with 0.2 µm filter.

Antimicrobial Activity

To evaluate the antimicrobial activity of the *Streptomyces* extracts when cultivated in Duetz plates the following pathogenic strains were used: methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) MB 5393, methicillin susceptible *S. aureus* (MSSA) ATCC 29123, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Pseudomonas aeruginosa* MB 5919, *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606, *Aspergillus fumigatus* ATCC 46645 and *Candida albicans* ATCC 64124. The extract obtained from the EPA vials fermentations were additionally tested against a *Candida* species panel: *Candida glabrata* ATCC 2001, *Candida parapsilosis* ATCC 22019, *Candida krusei* ATCC 6258 and *Candida tropicalis* ATCC 750. To perform the assays Gram positive and Gram negative bacteria were cultivated in 250 mL Erlenmeyer flasks with Mueller Hinton II (MH II) during 18h at 37° C, with the exception of MRSA that was cultivated in Brain Heart Infusion (BHI) and *P. aeruginosa* in Luria Bertani (LB). Besides that, *E. coli* and *A. baumannii* were incubated only 2h before the assay. Fungi were cultivated in Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI), *Candida* spp. in 37° C for 18h and *A. fumigatus* in 28° C for 48h. All microorganisms were diluted to achieve the correct number of cells for the assay and vancomycin, gentamicin, rifampicin, aztreonam and amphotericin were used as controls. Bioactivity assays against the selected microorganisms were performed according Lacret et al., 2015, using 10 µL of the extract in 96-well plates and reading the absorbance before and after the indicated incubation time for all microorganism, except for *A. fumigatus*, where the reading was by

fluorescence, adding resazurin to the growth medium. Inhibition growth rates above 70% were considered to determine an active extract.

Dereplication by mass spectrometry

The active extracts were dereplicated by LC/UV/LRMS and LC/HRMS, following the workflow defined in Pérez-Victoria et al. (2016). Dereplication was carried out with the aid of proprietary MEDINA MS databases as well as the Dictionary of Natural Products as it is described in Pérez-Victoria et al. (2016).

Apart of the dereplication by mass spectrometry and in order to see the similarity of the extracts based on mass spectrometry data, a dendrogram of the mass/charge (m/z) ratio of the compounds was constructed, calculating the similarity matrix with the Pearson Correlation algorithm and building the dendrogram with the UPGMA method, using the BioNumerics software (bioMérieux) (see in Supplementary Material Figure 1).

Results

All 80 samples (40 isolates in duplicate) grew in all media after 5 days at 28 °C in the Duetz plates. After solvent extraction, the resulting 800 extracts were tested to determine the antimicrobial activity and 312 out of them displayed activity against at least one of the microorganisms tested. No relevant activity was detected in the Czapek Dox and DEF-15 media. However, KHC media (23% of the 312 active extracts) was one of the most productive media with activity against *S. aureus* and RAM2-P V2 extracts (20% of 312) were particularly active against *C. albicans* ATCC 64124 and *A. fumigatus* ATCC 46645. The strains showed activity against the Gram positive bacteria and fungi tested, but no activity was detected against the Gram negative bacteria. All the 312 active extracts and their inhibition percentages are included in Supplementary Material Table 1. More than half of the extracts showed activity against *C. albicans* ATCC 64124 (56% of the 312 active extracts) and MRSA MB 5393 (67% of 312). We can observe that 40 extracts (marked in bold) show activity against four pathogens (MSSA ATCC 29123, MRSA MB 5393, *C. albicans* ATCC 64124 and *A. fumigatus* ATCC 46645) and most of the active extracts were obtained when the isolates were cultivated in RAM2-P V2. Furthermore, 14 isolates produced activity in more than six conditions, the isolate LMA323St_31 was active against MSSA in eight conditions and the isolate LMA323St_33 is the one with more

active extracts, a total of six extracts, against *C. albicans* ATCC 64124. Both LMA323St_17 and LMA323St_33d produce bioactive extracts that inhibit all tested microorganisms (Table S1). Many of these isolates, even with a high number of active extracts, do not show any activity against *A. fumigatus* ATCC 46645, like LMA323St_42d.

The isolates that showed a different compound profile in the m/z dendrogram derived from LC-UV-LRMS analysis and presented some antimicrobial activity in a greater number of culture media were selected for cultivation in EPA vials, continuing the investigation of antimicrobials production on a larger scale. After 5 days incubation and solvent extraction, the extracts were retested to assess their antimicrobial activity (Supplementary Material Table 2), the microorganisms tested in this second screening are the ones that had their growth affected by the *Streptomyces* extracts from the Duetz fermentation with the addition of more four species of *Candida*. No activity above 70% was detected against *C. krusei* ATCC 6258 and *C. tropicalis* ATCC 750. Almost all extracts that had any antimicrobial activity and that are listed in Table S2 were active against *C. glabrata* ATCC 2001, except the extract from LMA323St_35. Extracts from isolate LMA323St_33 continued to display potent activity against *C. albicans* ATCC 64124 and demonstrated the same activity against *C. glabrata* ATCC 2001. The isolate LMA323St_35 is the only one that showed an active extract against MRSA in EPA-type tube and at the same time showed only activity against *C. parapsilosis* ATCC 22019.

LC-UV-LRMS and HRMS analysis were performed with these extracts and the natural products dereplicated are identified in Table 1 and Table 2, respectively. Five natural products were identified by LC-UV-LRMS: the macrolides monactin and dynactin, the antifungal polycyclic tetramate macrolactams maltophilin and dihydromaltophilin and the siderophore norcardamine. By HRMS (Table 2) we identified in addition the macrolides nonactin and feigrisolide C and D, the polycyclic tetarmate macrolactams alteramide A and B, and the cyclodepsipeptide skyllamicin A.

Table 1: Identified compounds in EPA vials fermentation when analyzed by LRMS.

| LRMS Compounds | ID Isolate | ID Extract |
|--------------------|-------------|------------------------------|
| Dihydromaltophilin | LMA323St_33 | CA-300257-a01-MO021-EC01-a01 |

| | | |
|------------------------------|--------------|------------------------------|
| | LMA323St_49d | CA-300322-a01-MO021-EC01-a01 |
| Dinactin, monactin | LMA323St_35 | CA-300259-a01-MO011-EC01-a01 |
| | LMA323St_3d | CA-300276-a01-MO012-EC01-a01 |
| | LMA323St_9 | CA-300233-a01-MO012-EC01-a01 |
| | LMA323St_9 | CA-300233-a01-MO013-EC01-a01 |
| | LMA323St_12 | CA-300236-a01-MO023-EC01-a01 |
| | LMA323St_16d | CA-300289-a01-MO011-EC01-a01 |
| Maltophilin | LMA323St_17 | CA-300241-a01-MO024-EC01-a01 |
| | LMA323St_20 | CA-300244-a01-MO012-EC01-a01 |
| | LMA323St_28 | CA-300252-a01-MO012-EC01-a01 |
| | LMA323St_29d | CA-300302-a01-MO013-EC01-a01 |
| | LMA323St_33d | CA-300306-a01-MO021-EC01-a01 |
| | LMA323St_33d | CA-300306-a01-MO023-EC01-a01 |
| | LMA323St_36 | CA-300260-a01-MO021-EC01-a01 |
| | LMA323St_41 | CA-300265-a01-MO021-EC01-a01 |
| | LMA323St_12d | CA-300285-a01-MO021-EC01-a01 |
| Norcardamine | LMA323St_17 | CA-300241-a01-MO021-EC01-a01 |
| | LMA323St_19 | CA-300243-a01-MO012-EC01-a01 |
| | LMA323St_29d | CA-300302-a01-MO011-EC01-a01 |
| | LMA323St_36d | CA-300309-a01-MO021-EC01-a01 |
| Norcardamine and Maltophilin | LMA323St_17 | CA-300241-a01-MO022-EC01-a01 |

Table 2: Identified compounds in EPA type tubes fermentation when analyzed by HRMS.

| HRMS Compounds | ID Isolate | ID Extract |
|----------------------|--------------|------------------------------|
| | LMA323St_2d | CA-300275-a01-MO011-EC01-a01 |
| | LMA323St | CA-300276-a01-MO012-EC01-a01 |
| | LMA323St_9 | CA-300233-a01-MO014-EC01-a01 |
| | LMA323St_12 | CA-300236-a01-MO023-EC01-a01 |
| | LMA323St_12d | CA-300285-a01-MO022-EC01-a01 |
| | LMA323St_16d | CA-300289-a01-MO011-EC01-a01 |
| | LMA323St_17 | CA-300241-a01-MO024-EC01-a01 |
| | LMA323St_17d | CA-300290-a01-MO021-EC01-a01 |
| Alteramide A and B | LMA323St_18d | CA-300291-a01-MO011-EC01-a01 |
| | LMA323St_20 | CA-300244-a01-MO012-EC01-a01 |
| | LMA323St_24 | CA-300248-a01-MO021-EC01-a01 |
| | LMA323St_25 | CA-300249-a01-MO022-EC01-a01 |
| | LMA323St_28 | CA-300252-a01-MO012-EC01-a01 |
| | LMA323St_33 | CA-300257-a01-MO021-EC01-a01 |
| | LMA323St_33d | CA-300306-a01-MO023-EC01-a01 |
| | LMA323St_36 | CA-300260-a01-MO021-EC01-a01 |
| | LMA323St_41 | CA-300265-a01-MO021-EC01-a01 |
| Alteramide B | LMA323St_9 | CA-300233-a01-MO011-EC01-a01 |
| | LMA323St_19 | CA-300243-a01-MO012-EC01-a01 |
| | LMA323St_2 | CA-300226-a01-MO012-EC01-a01 |
| | LMA323St_2d | CA-300275-a01-MO011-EC01-a01 |
| | LMA323St_3 | CA-300227-a01-MO012-EC01-a01 |
| | LMA323St_3d | CA-300276-a01-MO012-EC01-a01 |
| | LMA323St_4 | CA-300228-a01-MO011-EC01-a01 |
| | LMA323St_6 | CA-300230-a01-MO022-EC01-a01 |
| Feigrisolide C and D | LMA323St_9 | CA-300233-a01-MO011-EC01-a01 |
| | LMA323St_9 | CA-300233-a01-MO014-EC01-a01 |
| | LMA323St_9d | CA-300282-a01-MO011-EC01-a01 |
| | LMA323St_12 | CA-300236-a01-MO023-EC01-a01 |
| | LMA323St_12d | CA-300285-a01-MO022-EC01-a01 |
| | LMA323St_16d | CA-300289-a01-MO011-EC01-a01 |
| | LMA323St_17 | CA-300241-a01-MO024-EC01-a01 |
| | LMA323St_17d | CA-300290-a01-MO021-EC01-a01 |

| | | |
|--------------|--------------|------------------------------|
| | LMA323St_18d | CA-300291-a01-MO011-EC01-a01 |
| | LMA323St_19 | CA-300243-a01-MO012-EC01-a01 |
| | LMA323St_20 | CA-300244-a01-MO012-EC01-a01 |
| | LMA323St_24 | CA-300248-a01-MO021-EC01-a01 |
| | LMA323St_25 | CA-300249-a01-MO022-EC01-a01 |
| | LMA323St_26 | CA-300250-a01-MO011-EC01-a01 |
| | LMA323St28 | CA-300252-a01-MO012-EC01-a01 |
| | LMA323St_29d | CA-300302-a01-MO011-EC01-a01 |
| | LMA323St_29d | CA-300302-a01-MO012-EC01-a01 |
| | LMA323St_29d | CA-300302-a01-MO013-EC01-a01 |
| | LMA323St_31d | CA-300304-a01-MO022-EC01-a01 |
| | LMA323St_33 | CA-300257-a01-MO021-EC01-a01 |
| | LMA323St_33d | CA-300306-a01-MO021-EC01-a01 |
| | LMA323St_33d | CA-300306-a01-MO023-EC01-a01 |
| | LMA323St_35 | CA-300259-a01-MO012-EC01-a01 |
| | LMA323St_35 | CA-300259-a01-MO014-EC01-a01 |
| | LMA323St_36 | CA-300260-a01-MO021-EC01-a01 |
| | LMA323St_36d | CA-300309-a01-MO021-EC01-a01 |
| | LMA323St_36d | CA-300309-a01-MO022-EC01-a01 |
| | LMA323St_40 | CA-300264-a01-MO022-EC01-a01 |
| | LMA323St_41 | CA-300265-a01-MO021-EC01-a01 |
| | LMA323St_42 | CA-300266-a01-MO011-EC01-a01 |
| | LMA323St_44d | CA-300317-a01-MO022-EC01-a01 |
| | LMA323St_48 | CA-300272-a01-MO012-EC01-a01 |
| Nonactins | LMA323St_35 | CA-300259-a01-MO012-EC01-a01 |
| | LMA323St_35 | CA-300259-a01-MO014-EC01-a01 |
| Skylamicin A | LMA323St_2d | CA-300275-a01-MO011-EC01-a01 |
| | LMA323St_17 | CA-300241-a01-MO024-EC01-a01 |
| | LMA323St_33 | CA-300257-a01-MO021-EC01-a01 |
| | LMA323St_33d | CA-300306-a01-MO023-EC01-a01 |

Discussion

In natural products research the use of microplates fermentations enable the testing of multiple nutritional conditions thus accessing further exploration of metabolic pathways reducing cost and time. After verifying the presence of antimicrobial activity in several culture media, the scale-up fermentation confirms the reproducibility of the production of the bioactive molecules and a future industrial fermentation (Zhang et al., 1996). In the case of this study, the initial miniaturized fermentation in 10 different media used to evaluate the expression of the metabolic diversity present in these streptomycetes, was followed by the reproduction of the fermentations in EPA vials in the defined media to proceed to the chemical profiling of bioactive extracts.

In the dereplication process, the microorganisms chosen as target in activity assays are the guide through the process, leading us to identify the active extracts according to their antimicrobial capacity against the microorganisms selected as target (Hahn, 2013). Dihydromaltophilin is known to have antifungal activity against *C. albicans* (Quesada et al., 2017) and in this work, from the 16

active extracts producing maltophilin or dihydromaltophilin, six of them did not showed activity against *C. albicans* but had great inhibition rates against *C. glabrata*. Maltophilin is an antifungal produced by *Stenotrophomonas maltophilia* isolated from rhizosphere, with activity against several fungi species, like *C. albicans*, *Fusarium solani*, *Neurospora crassa*, *Penicillium notatum* and *Penicillium puberulum*, besides *Trichoerma pseudokoningii* (Jakobi et al., 1996). As expected, one year later the same antifungal was isolated from a streptomycetes together with a new similar compound, called dihydromatophilin (Graupner et al., 1997). Both compounds were found in the present work in LRMS analysis, showing potent antifungal activity against the fungi tested. Alteramides are another group of polycyclic tetramic acid macrolactams, produced by some of ours isolates (Quezada et al., 2017).

In table 1, we can observe that isolate LMA323St_35 produced monactin and dynactin, two compounds known to be active against MRSA (Table S1). Monactin and dynactin are frequently produced by *Streptomyces* and are well known to present biological activity (Graven et al., 1966; Zhang et al., 2020). Since Zizka (1998), a series of biological effects are being cited regarding the structural class of macrolides, like the antifungal (Silva et al., 2020) and antiproliferative activity against cancer cells (Yang et al., 2019), but few studies showed antibacterial activity against *Staphylococcus* spp. It is clearly a great topic in medical chemistry (Kwon et al., 2001) and genomic papers (Walczak et al., 2000) and a lot is known about monactin and its biosynthesis, however insufficient data is published demonstrating the activity against MRSA. Feigrisolides C and D, were observed in more than half of the extracts analyzed in HRMS (38 extracts of 63 total). These compounds were first isolated from *Streptomyces griseus* (Tang et al., 2000) and then identified in marine streptomycetes (Blun et al., 2006). In our work, feigrisolides C and D were identified in soil streptomycetes, collected in an island where resides the unactive González Videla Chilean base, between Lemaire and Antarctic Peninsula (Borba et al., 2020).

Isolate LMA323St_35, the only one that continues to show activity in EPA vials fermentation against MRSA, produces macrolides in both mass spectrometry analysis. Besides that, this isolate seems to be related to *Streptomyces globisporus* (Borba et al., 2021), a known species into dynactin production (Zhang et al., 2020). The isolates LMA323St_17 and LMA323St_33d, which inhibits all tested

microorganisms, showed production of feigrisolides, alteramides and skyllamicin at the same extract. To finish, we highlighted the isolate LMA323St_43d, which demonstrated antimicrobial activity in both fermentations and did not have any natural product identified in the databases.

Silva et al. (2020) describes the isolation of two *Streptomyces* strains from *Deschampsia antarctica* rhizosphere with antitumor properties. One of this strain, *Streptomyces* sp. CMAA 1653 seems to be related to *Streptomyces fildesensis*, as we previously found LMA323St_12, LMA323St_16, and LMA323St_19 (Borba et al., 2021). All these strains demonstrated activity against *A. fumigatus* and *C. albicans*, but LMA323St_12 showed activity against all *Candida* spp. tested and are producer of four distinct compounds (maltophilin, norcardamine, alteramides and feigrisolides).

In this study, norcardamine was identified in five strains (LMA323St_12, LMA323St_17, LMA323St_19, LMA323St_29 and LMA323St_36) that are also active against *C. albicans*. Benaud et al. (2021) sequenced the genome of 17 bacterial genomes from Antarctic soil, three of them are *Streptomyces* strain that have several biosynthetic gene clusters to natural products. Two strains produce desferrioxamine, also known as norcardamine and the strain NBH77 also showed BGC to macrolactams that is active against *C. albicans* too.

Streptomyces strains from Antarctic are a promising source of unknown natural products and the methods used to achieve this production needs to be effective to get around the obstacles in cultivated filamentous bacteria.

Conclusion

Streptomyces isolates from Antarctic soil produces antifungals against *Candida* spp. With miniaturized fermentation and dereplication process it was possible to achieve these compounds in a minor range of time. More studies are necessary and suggested, like to investigate the isolate LMA323St_43d and understand the relationships between the chemical profile and species identification.

References

Achinas S, Heins J, Krooneman J, Euverink GJW. 2020. Miniaturization and 3D Printing of Bioreactors: A Technological Mini Review. *Micromachines* 11(9):853.

- <https://doi.org/10.3390/mi11090853>
- Aigle B, Lautru S, Spiteller D, Dickschat JS, Challis GL, Leblond P, Pernodet JL. 2014. Genome mining of *Streptomyces ambofaciens*. J Ind Microbiol Biotechnol 41:251-263. <https://doi.org/10.1007/s10295-013-1379-y>
- Baltz RH. 2016. Genetic manipulation of secondary metabolite biosynthesis for improved production in *Streptomyces* and other actinomycetes. J Ind Microbiol Technol 43:343-370. <https://doi.org/10.1007/s10295-015-1682-x>
- Benaud N, Edwards RJ, Amos TG, D'Agostino PM, Gutiérrez-Chávez C, Montgomery K, Nicetic I, Ferrari B. 2021. Antarctic desert soil bacteria exhibit high novel natural product potential, evaluated through long-read genome sequencing and comparative genomics. Environ Microbiol 23:3646-3664. <https://doi.org/10.1111/emi.15300>
- Bentley SD, Chater KF, Cerdeño-Tárraga AM, Challis GL, Thomson NR, James KD, Harris DE, Quail MA, Kieser H, Harper D, Bateman A, Brown S, Chandra G, Chen CW, Collins M, Cronin A, Fraser A, Goble A, Hidalgo J, Hornsby T, Howarth S, Huang CH, Kieser T, Larke L, Murphy L, Oliver K, O'Neil S, Rabinowitsch E, Rajandream MA, Rutherford K, Rutter S, Seeger K, Saunders D, Sharp S, Squares R, Squares S, Taylor K, Warren T, Wietzorrek A, Woodward J, Barrell BG, Parkhill J, Hopwood DA. 2002. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). Nature 417:141-147. <https://doi.org/10.1038/417141a>
- Bode HB, Bethe B, Höfs R, Zeeck A. 2002. Big effects from small changes: possible ways to explore nature's chemical diversity. ChemBiochem 3:619-27. [https://doi.org/10.1002/1439-7633\(20020703\)3:7<619::AID-BIC619>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/1439-7633(20020703)3:7<619::AID-BIC619>3.0.CO;2-9)
- Borba MP, Ballarini AE, Witusk JPD, Lavin P, Van Der Sand S. 2020. Evaluation of BOX-PCR and REP-PCR as Molecular Typing Tools for Antarctic *Streptomyces*. Curr Microbiol 77:3573-3581. <https://doi.org/10.1007/s00284-020-02199-6>
- Borba MP, Ferrero AP, Lameira RS, Van Der Sand S. 2021. Efforts in molecular identification of *Streptomyces* strains from Antarctic soil. Archives in Microbiology (**in review**)
- Challis GL. 2014. Exploitation of the *Streptomyces coelicolor* A3(2) genome sequence for discovery of new natural products and biosynthetic pathways. J

- Ind Microbiol Biotechnol. 41:219-232. <https://doi.org/10.1007/s10295-013-1383-2>
- Duetz WA, Rüedi L, Hermann R, O'Connor K, Büchs J, Witholt B. 2000. Methods for Intense Aeration, Growth, Storage, and Replication of Bacterial Strains in Microtiter Plates. *App Environ Microbiol* 66(6):2641-2646. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.6.2641-2646.2000>
- Encheva-Malinova M, Stoyanova M, Avramova H, Pavlova Y, Gocheva B, Ivanova I, Moncheva P. 2014. Antibacterial potential of streptomycete strains from Antarctic soils. *Biotechnol Biotec Eq.* 28(4):721-727. <https://doi.org/10.1080/13102818.2014.947066>
- Graupner PR, Thornburgh S, Mathieson JT, Chapin EL, Kemmitt GM, Brown JM, Snipes CE. 1997. Dihydromaltophilin; A Novel Fungicidal Tetramic Acid Containing Metabolite from *Streptomyces* sp. *J Antibiot* 50:1014-1019.
- Graven SN, Lardy HA, Johnson D, Rutter A. 1966. Antibiotics As Tools for Metabolic Studies. V. Effect of Nonactin, Monactin, Dinactin, and Trinactin on Oxidative Phosphorylation and Adenosine Triphosphatase Induction. *Biochemistry* 5(5):1729–1735. <https://doi.org/10.1021/bi00869a040>
- Hahn D. Induction of cryptic natural product fungicide from Actinomycetes. *In* Beck JJ, Coats JR, Duke SO, Koivunen ME. **Pest Management with Natural Products**. Washington, DC: American Chemical Society, 2013. p.217-236.
- Jakobi M, Winkelmann G, Kaiser D, Kempter C, Jung G, Berg G, Bahl H. 1996. Maltophilin: A New Antifungal Compound Produced by *Stenotrophomonas maltophilia* R3089. *J Antibiot* 49:1101-1104. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.49.1101>
- Jose PA and Jha B. 2016. New Dimensions of Research on Actinomycetes: Quest for Next Generation Antibiotics. *Front. Microbiol.* 7:1295. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01295>
- Koepff J, Keller M, Tsolis KC, Busche T, Rückert C, Hamed MB, Anné J, Kalinowski J, Wiechert W, Economou A, Oldiges M. 2017. Fast and Reliable Strain Characterization of *Streptomyces lividans* Through Micro-Scale Cultivation. *Biotechnology and Bioengineering* 114(9): 2011-2022. <https://doi.org/10.1002/bit.26321>
- Kwon H, Smith WC, Xiang L, Shen B. 2001. Cloning and Heterologous Expression of the Macrotetrolide Biosynthetic Gene Cluster Revealed a Novel Polyketide

- Synthase that Lacks an Acyl Carrier Protein. *J Am Chem Soc* 123:3385-3386. <https://doi.org/10.1021/ja0100827>
- Lacret R, Oves-Costales D, Gómez C, Díaz C, Cruz M, Pérez-Victoria I, Vicente F, Genilloud O, Reyes F. 2015. New Ikarugamycin Derivatives with Antifungal and Antibacterial Properties from *Streptomyces zhaozhouensis*. *Mar Drugs* 13:128-140. <https://doi.org/10.3390/md13010128>
- Lamilla C, Braga D, Castro R, Guimarães C, Castilho LVA, Freire DMG, Barrientos L. 2018. *Streptomyces luridus* So3.2 from Antarctic soil as a novel producer of compounds with bioemulsification potential. *PLoS ONE* 13(4):e0196054. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196054>
- Lavin PL, Yong ST, Wong CMVL, Stefano M. 2016. Isolation and characterization of Antarctic psychrotroph *Streptomyces* sp. strain INACH3013. *Antarct Sci*. <https://doi.org/10.1017/S0954102016000250>
- Lee L, Chan K, Stach J, Wellington EMH, Goh B. 2021. Editorial: The Search for Biological Active Agent(s) From Actinobacteria. *Front Microbiol* 9:824. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00824>
- Lianza M, Leroy R, Rodrigues CM, Borie N, Sayagh C, Remy S, Kuhn S, Renault J, Nuzillard J. 2021. The Three Pillars of Natural Product Dereplication. Alkaloids from the Bulbs of *Ureceolina peruviana* (C. Presl) J.F. Macbr. as a Preliminary Test Case. *Molecules* 26:637 <https://doi.org/10.3390/molecules26030637>
- Mohimani H, Gurevich A, Shlemov A, Mikheenko A, Korobeynikov A, Cao L, Shcherbin E, Nothias L, Dorrestein PC, Pevzner PA. 2018. Dereplication of microbial metabolites through database search of mass spectra. *Nat Comm* 9:4035. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06082-8>
- Ochi K, Tanaka Y, Tojo S. 2014. Activating the expression of bacterial cryptic genes by *rpoB* mutation in RNA polymerase or by rare earth elements. *J Ind Microbiol biotechnol*. 41:403-414. <https://doi.org/10.1007/s10295-013-1349-4>
- Pérez-Victoria I, Martín J, Reyes F. 2016. Combined LC/UV/MS and NMR Strategies for the Dereplication of Marine Natural Products. *Planta Med* 82:857-871. <https://doi.org/10.1055/s-0042-101763>
- Purves K, Macintyre L, Brennan D, Hreggviðsson GÓ, Kuttner E, Ásgeirsdóttir ME, Young LC, Green DH, Edrada-Ebel R, Duncan KR. 2016. Using molecular networking for microbial secondary metabolite bioprospecting. *Metabolites* 6:1-18. <https://doi.org/10.3390/metabo6010002>

- Quezada M, Licon-Cassani C, Cruz-Morales P, Salim AA, Marcellin E, Capon RJ, Barona-Gómez F. 2017. Diverse Cone-Snail Species Harbor Closely Related *Streptomyces* Species with Conserved Chemical and Genetic Profiles, Including Polycyclic Tetramic Acid Macrolactams. *Front Microbiol* 8:2305. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02305>
- Silva LJ, Crevelin EJ, Souza DT, Lacerda-Júnior GV, Oliveira VM, Ruiz ALTG, Rosa LH, Moraes LABM, Melo IS. 2020. Actinobacteria from Antarctica as a source for anticancer discovery. *Sci Rep* 10:13870. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69786-2>
- Silva NBS, Marques LA, Röder DDB. 2020. Antibiofilm Activity of Natural Products: Promising Strategies for Combating Microbial Biofilms. *Ann Public Health Reports* 4(1):92-99. <https://doi.org/10.36959/856/502>
- Tang Y, Sattler I, Thiericke R, Grabley S. 2000. Feigrisolides A, B, C and D, New Lactones with Antibacterial Activities from *Streptomyces griseus*. *J Antibiot* 53:934-943. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.53.934>
- Walczak RJ, Woo AJ, Strohl WR, Priestley ND. 2000. Nonactin biosynthesis: the potential nonactin biosynthesis gene cluster contains type II polyketide synthase-like genes. *FEMS Microbiol Lett* 183:171-175. [https://doi.org/10.1016/S0924-6460\(00\)00109-7](https://doi.org/10.1016/S0924-6460(00)00109-7)
- Yang C, Qian R, Xu Y, Yi J, Gu Y, Liu X, Yu H, Jiao B, Lu X, Zhang W. 2019. Marine Actinomycetes-derived Natural Products. *Curr Top Med Chem* 19:2868-2918. <https://doi.org/10.2174/1568026619666191114102359>
- Zhang J, Marcin C, Shifflet MA, Salmon P, Brix T, Greasham R, Buckland B, Chartrain M. 1996. Development of a defined medium fermentation process for physostigmine production by *Streptomyces griseofuscus*. *Appl Microbiol Biotechnol* 44:456-575. <https://doi.org/10.1007/BF00172487>
- Zhang K, Gu L, Zhang Y, Liu Z, Li X. 2020. Dinactin from a new producer, *Streptomyces badius* gz-8, and its antifungal activity against the rubber anthracnose fungus *Colletotrichum gloeosporioides*. *Microbiol Res* 240:126548. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126548>
- Zizka Z. 1998. Biological Effects of Macrotetrolide Antibiotics and Nonactic Acids. *Folia Microbiol* 43(1):7-14. <https://doi.org/10.1007/BF02815533>

Supplementary Material

Overview on natural products from Antarctic *Streptomyces* isolates

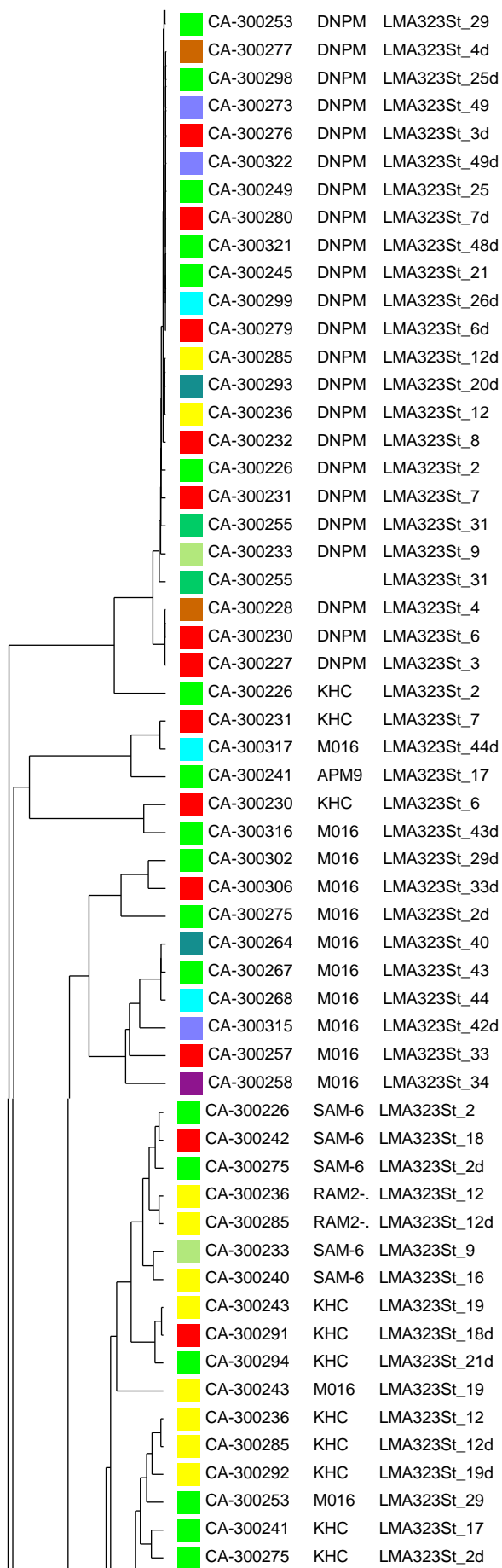
Marcela Proença Borba¹, Ignacio Gonzalez², Caridad Diaz², Mercedes de la Cruz²,
Jesús Martín², Rúben Tormo², Olga Genilloud², Sueli Van Der Sand¹

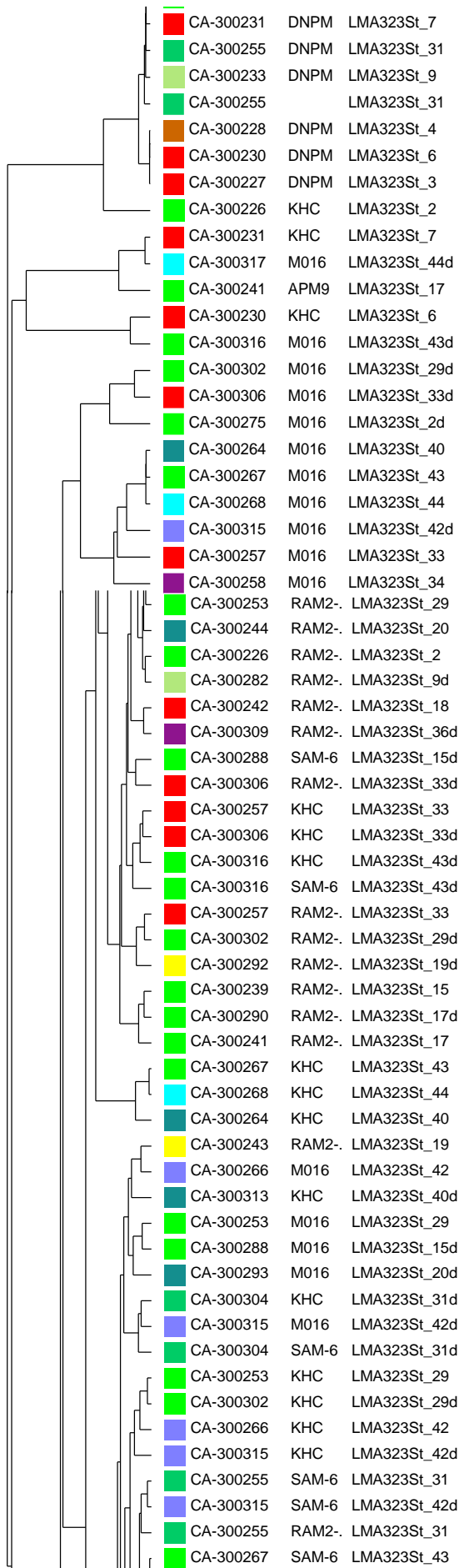
3- Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente,
Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do
Sul, Porto Alegre, Brazil

4- Fundación MEDINA, Parque Tecnológico Ciencias de la Salud, Granada, Spain

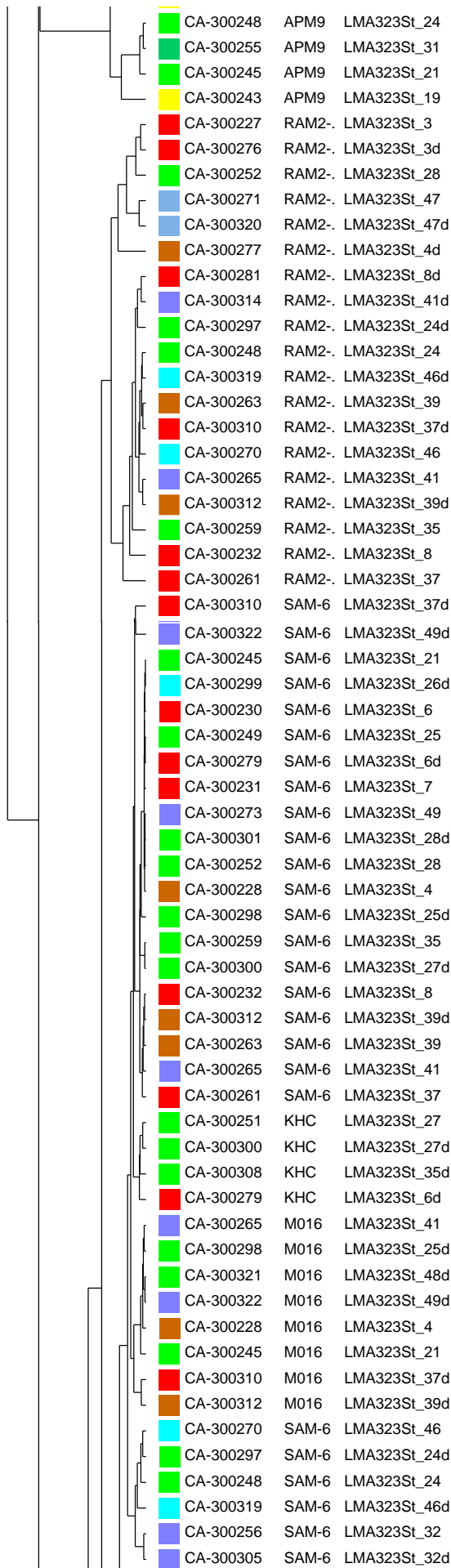
Figure 1: Dendrogram mass/charge ratio of the compounds identified in LC/UV/LRMS. Similarity matrix calculated with Pearson Correlation and dendrogram constructed through UPGMA method with BioNumerics software.











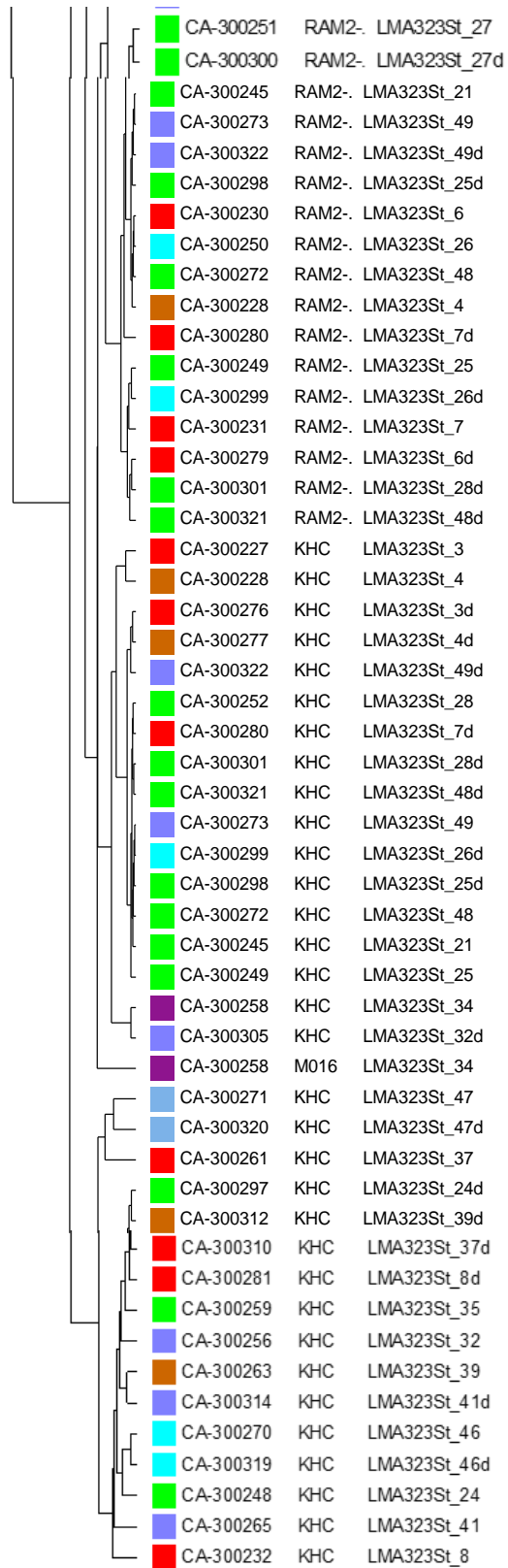


Table 1: Antimicrobial activities of *Streptomyces* active extracts from Duetz fermentation. Numbers are percentage of inhibition. MRSA: methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, MSSA: methicillin susceptible *Staphylococcus aureus* CA: *Candida albicans*. AF: *Aspergillus fumigatus*.

| ID Isolate | ID Extract | Media | MRSA | MSSA | CA | AF |
|--------------------|----------------------------|------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| LMA323St_2 | CA-300226-a01-MO006 | KHC | 99,3 | 100 | 56,7 | 46 |
| LMA323St_2 | CA-300226-a01-MO007 | M016 | 0 | 0 | 90,1 | 88,6 |
| LMA323St_2 | CA-300226-a01-MO009 | RAM2-P V2 | 22,7 | 46,8 | 99,5 | 69 |
| LMA323St_2 | CA-300226-a01-MO010 | SAM-6 | 100 | 100 | 91,8 | 91,5 |
| LMA323St_2d | CA-300275-a01-MO006 | KHC | 93,2 | 99,1 | 0 | 13,6 |
| LMA323St_2d | CA-300275-a01-MO007 | M016 | 0 | 9,5 | 95,3 | 71 |
| LMA323St_2d | CA-300275-a01-MO009 | RAM2-P V2 | 73,6 | 100 | 97,4 | 84 |
| LMA323St_2d | CA-300275-a01-MO010 | SAM-6 | 40,4 | 100 | 95,8 | 94 |
| LMA323St_3 | CA-300227-a01-MO004 | DNPM | 92,6 | 99,3 | 98,2 | 62,9 |
| LMA323St_3 | CA-300227-a01-MO006 | KHC | 99,9 | 100 | 0 | 35,2 |
| LMA323St_3 | CA-300227-a01-MO009 | RAM2-P V2 | 82,4 | 98,8 | 94,9 | 55,4 |
| LMA323St_3d | CA-300276-a01-MO004 | DNPM | 61,5 | 99,3 | 97,1 | 74,7 |
| LMA323St_3d | CA-300276-a01-MO006 | KHC | 99,8 | 93,9 | 0 | 61,2 |
| LMA323St_3d | CA-300276-a01-MO009 | RAM2-P V2 | 99 | 100 | 96,2 | 51,4 |
| LMA323St_4 | CA-300228-a01-MO004 | DNPM | 22,7 | 99,1 | 94,2 | 52,2 |
| LMA323St_4 | CA-300228-a01-MO006 | KHC | 100 | 100 | 0 | 35,8 |
| LMA323St_4 | CA-300228-a01-MO007 | M016 | 0 | 0 | 95,9 | 39,9 |
| LMA323St_4 | CA-300228-a01-MO009 | RAM2-P V2 | 99,5 | 99,3 | 89,6 | 75,3 |
| LMA323St_4 | CA-300228-a01-MO010 | SAM-6 | 0 | 23 | 93,4 | 83,2 |
| LMA323St_4d | CA-300277-a01-MO004 | DNPM | 24,4 | 98,8 | 94,7 | 64,4 |
| LMA323St_4d | CA-300277-a01-MO006 | KHC | 100 | 100 | 0 | 41,1 |
| LMA323St_6 | CA-300230-a01-MO014 | DNPM | 31,6 | 99,2 | 94,8 | 63,1 |
| LMA323St_6 | CA-300230-a01-MO016 | KHC | 99,8 | 99,1 | 0 | 45,8 |
| LMA323St_6 | CA-300230-a01-MO019 | RAM2-P V2 | 83,3 | 99,4 | 90,2 | 73,2 |
| LMA323St_6 | CA-300230-a01-MO020 | SAM-6 | 11,2 | 68 | 79,5 | 23,7 |
| LMA323St_6d | CA-300279-a01-MO014 | DNPM | 82,3 | 99,1 | 90,9 | 62,9 |
| LMA323St_6d | CA-300279-a01-MO016 | KHC | 99,6 | 98,4 | 0 | 38,1 |
| LMA323St_6d | CA-300279-a01-MO019 | RAM2-P V2 | 4,6 | 23,7 | 98,1 | 44,7 |
| LMA323St_6d | CA-300279-a01-MO020 | SAM-6 | 36,5 | 91,5 | 52,1 | 38,4 |
| LMA323St_7 | CA-300231-a01-MO004 | DNPM | 7,9 | 35,2 | 89 | 46,3 |
| LMA323St_7 | CA-300231-a01-MO006 | KHC | 99,9 | 98,8 | 57 | 17,6 |
| LMA323St_7 | CA-300231-a01-MO010 | SAM-6 | 9,8 | 74,8 | 56,6 | 0 |
| LMA323St_7d | CA-300280-a01-MO001 | APM9 | 91,4 | 98,5 | 0 | 0 |
| LMA323St_7d | CA-300280-a01-MO004 | DNPM | 13,5 | 35,3 | 73,2 | 70,6 |
| LMA323St_7d | CA-300280-a01-MO006 | KHC | 100 | 98,8 | 0 | 55,7 |
| LMA323St_7d | CA-300280-a01-MO009 | RAM2-P V2 | 99,6 | 99 | 91,3 | 77,5 |
| LMA323St_8 | CA-300232-a01-MO014 | DNPM | 0 | 17,1 | 99 | 94,2 |
| LMA323St_8 | CA-300232-a01-MO016 | KHC | 100 | 100 | 100 | 75,3 |
| LMA323St_8 | CA-300232-a01-MO020 | SAM-6 | 5,8 | 14,8 | 98,4 | 30,1 |
| LMA323St_8d | CA-300281-a01-MO011 | APM9 | 82,9 | 99,2 | 24 | 0 |
| LMA323St_8d | CA-300281-a01-MO014 | DNPM | 0 | 7,2 | 95,6 | 97,9 |
| LMA323St_8d | CA-300281-a01-MO016 | KHC | 100 | 100 | 0 | 28,7 |
| LMA323St_8d | CA-300281-a01-MO019 | RAM2-P V2 | 5,4 | 3 | 98,2 | 92,3 |
| LMA323St_9 | CA-300233-a01-MO004 | DNPM | 3,9 | 97,9 | 97,8 | 72,5 |
| LMA323St_9 | CA-300233-a01-MO006 | KHC | 99,6 | 97,4 | 0 | 35,6 |
| LMA323St_9 | CA-300233-a01-MO009 | RAM2-P V2 | 100 | 99 | 97,4 | 87,7 |
| LMA323St_9 | CA-300233-a01-MO010 | SAM-6 | 99,8 | 98,7 | 94,8 | 52,8 |
| LMA323St_9d | CA-300282-a01-MO004 | DNPM | 3,4 | 98,5 | 98,3 | 80,3 |

| | | | | | | |
|---------------------|----------------------------|------------------|-------------|-------------|-------------|--------------|
| LMA323St_9d | CA-300282-a01-MO006 | KHC | 99,2 | 97,3 | 0 | 30,5 |
| LMA323St_9d | CA-300282-a01-MO009 | RAM2-P V2 | 93,4 | 99,5 | 99,5 | 86,3 |
| LMA323St_9d | CA-300282-a01-MO010 | SAM-6 | 99,5 | 100 | 89,3 | 47,6 |
| LMA323St_12 | CA-300236-a01-MO014 | DNPM | 98,7 | 95,3 | 94,5 | 90,8 |
| LMA323St_12 | CA-300236-a01-MO016 | KHC | 100 | 99,9 | 0 | 54,1 |
| LMA323St_12 | CA-300236-a01-MO019 | RAM2-P V2 | 98,9 | 100 | 98,4 | 80,5 |
| LMA323St_12 | CA-300236-a01-MO020 | SAM-6 | 99,9 | 100 | 81,3 | 36,8 |
| LMA323St_12d | CA-300285-a01-MO014 | DNPM | 100 | 98,9 | 99,6 | 92,8 |
| LMA323St_12d | CA-300285-a01-MO016 | KHC | 100 | 98,9 | 0 | 56,3 |
| LMA323St_12d | CA-300285-a01-MO019 | RAM2-P V2 | 98,6 | 98,4 | 97,5 | 91,6 |
| LMA323St_12d | CA-300285-a01-MO020 | SAM-6 | 99,3 | 100 | 89,1 | 45,9 |
| LMA323St_15 | CA-300239-a01-MO004 | DNPM | 5,3 | 15,2 | 95,9 | 45,8 |
| LMA323St_15 | CA-300239-a01-MO007 | M016 | 0 | 0 | 93,2 | 85,5 |
| LMA323St_15 | CA-300239-a01-MO009 | RAM2-P V2 | 90,3 | 99,1 | 95,4 | 85,2 |
| LMA323St_15 | CA-300239-a01-MO010 | SAM-6 | 100 | 100 | 92,9 | 93,6 |
| LMA323St_15d | CA-300288-a01-MO006 | KHC | 99,8 | 100 | 0 | 31,7 |
| LMA323St_15d | CA-300288-a01-MO007 | M016 | 68 | 98,9 | 0 | 3,1 |
| LMA323St_15d | CA-300288-a01-MO009 | RAM2-P V2 | 99,8 | 99 | 98,2 | 54,4 |
| LMA323St_15d | CA-300288-a01-MO010 | SAM-6 | 99,3 | 100 | 0 | 38,2 |
| LMA323St_16 | CA-300240-a01-MO004 | DNPM | 50,6 | 99,1 | 98,4 | 92,2 |
| LMA323St_16 | CA-300240-a01-MO006 | KHC | 99,3 | 95,8 | 0 | 43,3 |
| LMA323St_16 | CA-300240-a01-MO009 | RAM2-P V2 | 99,9 | 99,1 | 96,3 | 87,8 |
| LMA323St_16 | CA-300240-a01-MO010 | SAM-6 | 98,6 | 99,2 | 95,6 | 94,6 |
| LMA323St_16d | CA-300289-a01-MO001 | APM9 | 82,9 | 99,8 | 0 | 0 |
| LMA323St_16d | CA-300289-a01-MO004 | DNPM | 5,4 | 100 | 96,8 | 90,3 |
| LMA323St_16d | CA-300289-a01-MO006 | KHC | 98,7 | 98,3 | 0 | 31,1 |
| LMA323St_16d | CA-300289-a01-MO009 | RAM2-P V2 | 92,5 | 99,3 | 95 | 77,2 |
| LMA323St_16d | CA-300289-a01-MO010 | SAM-6 | 100 | 100 | 83,6 | 50,7 |
| LMA323St_17 | CA-300241-a01-MO011 | APM9 | 100 | 99,1 | 16,5 | 0 |
| LMA323St_17 | CA-300241-a01-MO014 | DNPM | 84,4 | 98,8 | 98,3 | 74,3 |
| LMA323St_17 | CA-300241-a01-MO016 | KHC | 88,3 | 100 | 0 | 20 |
| LMA323St_17 | CA-300241-a01-MO017 | M016 | 3,1 | 0 | 92,9 | 93,8 |
| LMA323St_17 | CA-300241-a01-MO019 | RAM2-P V2 | 98,9 | 99,8 | 97,1 | 87,5 |
| LMA323St_17 | CA-300241-a01-MO020 | SAM-6 | 100 | 89 | 94,3 | 97,6 |
| LMA323St_17d | CA-300290-a01-MO014 | DNPM | 99,4 | 100 | 95,2 | 66 |
| LMA323St_17d | CA-300290-a01-MO017 | M016 | 2 | 0 | 98,1 | 96 |
| LMA323St_17d | CA-300290-a01-MO019 | RAM2-P V2 | 49,3 | 80,2 | 98,1 | 77 |
| LMA323St_17d | CA-300290-a01-MO020 | SAM-6 | 100 | 100 | 93,3 | 95,2 |
| LMA323St_18 | CA-300242-a01-MO009 | RAM2-P V2 | 99,6 | 99,8 | 92,5 | 15,1 |
| LMA323St_18 | CA-300242-a01-MO010 | SAM-6 | 99,2 | 99,5 | 91,1 | 29,7 |
| LMA323St_18d | CA-300291-a01-MO004 | DNPM | 0 | 92,3 | 98,6 | 95,9 |
| LMA323St_18d | CA-300291-a01-MO006 | KHC | 99,6 | 97,6 | 0 | 34,8 |
| LMA323St_18d | CA-300291-a01-MO009 | RAM2-P V2 | 97,9 | 99,2 | 98,7 | 91,12 |
| LMA323St_18d | CA-300291-a01-MO010 | SAM-6 | 99,6 | 100 | 92,9 | 50 |
| LMA323St_19 | CA-300243-a01-MO001 | APM9 | 99,5 | 99,5 | 16,6 | 0 |
| LMA323St_19 | CA-300243-a01-MO004 | DNPM | 100 | 98,8 | 97,9 | 29 |
| LMA323St_19 | CA-300243-a01-MO006 | KHC | 99 | 97,6 | 0 | 35 |
| LMA323St_19 | CA-300243-a01-MO007 | M016 | 46,1 | 97,5 | 0 | 11,3 |
| LMA323St_19 | CA-300243-a01-MO009 | RAM2-P V2 | 99,5 | 99 | 69,6 | 52,2 |
| LMA323St_19 | CA-300243-a01-MO010 | SAM-6 | 99,6 | 93 | 45,3 | 41,4 |
| LMA323St_19d | CA-300292-a01-MO001 | APM9 | 100 | 98 | 25 | 0 |
| LMA323St_19d | CA-300292-a01-MO004 | DNPM | 33,6 | 99 | 98,8 | 97,6 |
| LMA323St_19d | CA-300292-a01-MO006 | KHC | 99 | 96,8 | 0 | 31,3 |
| LMA323St_19d | CA-300292-a01-MO009 | RAM2-P V2 | 38,2 | 98,3 | 98,8 | 84,8 |
| LMA323St_19d | CA-300292-a01-MO010 | SAM-6 | 99,1 | 99,2 | 34,5 | 46 |
| LMA323St_20 | CA-300244-a01-MO004 | DNPM | 0 | 99,1 | 98,1 | 86,8 |
| LMA323St_20 | CA-300244-a01-MO006 | KHC | 99 | 99,9 | 0 | 35,1 |
| LMA323St_20 | CA-300244-a01-MO009 | RAM2-P V2 | 99,6 | 100 | 99,2 | 89,7 |
| LMA323St_20 | CA-300244-a01-MO010 | SAM-6 | 99,5 | 99,2 | 94,7 | 48,7 |
| LMA323St_20d | CA-300293-a01-MO004 | DNPM | 100 | 99,8 | 99,5 | 54 |

| | | | | | | |
|---------------------|----------------------------|------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| LMA323St_20d | CA-300293-a01-MO006 | KHC | 98,7 | 97,8 | 0 | 21,1 |
| LMA323St_20d | CA-300293-a01-MO007 | M016 | 95,2 | 99,7 | 0 | 24,4 |
| LMA323St_20d | CA-300293-a01-MO009 | RAM2-P V2 | 99,5 | 99,4 | 98,6 | 50,1 |
| LMA323St_20d | CA-300293-a01-MO010 | SAM-6 | 99,5 | 100 | 89 | 45,5 |
| LMA323St_21 | CA-300245-a01-MO001 | APM9 | 78,6 | 98,8 | 0 | 0 |
| LMA323St_21 | CA-300245-a01-MO004 | DNPM | 20,5 | 100 | 94,2 | 57,6 |
| LMA323St_21 | CA-300245-a01-MO006 | KHC | 86,9 | 100 | 0 | 67,4 |
| LMA323St_21 | CA-300245-a01-MO007 | M016 | 0 | 0 | 96,6 | 32,6 |
| LMA323St_21 | CA-300245-a01-MO009 | RAM2-P V2 | 25,8 | 45,4 | 92,9 | 68,9 |
| LMA323St_21 | CA-300245-a01-MO010 | SAM-6 | 0 | 20,5 | 93,8 | 46,4 |
| LMA323St_21d | CA-300294-a01-MO004 | DNPM | 0 | 100 | 98,1 | 97,8 |
| LMA323St_21d | CA-300294-a01-MO006 | KHC | 100 | 99,6 | 0 | 20,9 |
| LMA323St_21d | CA-300294-a01-MO009 | RAM2-P V2 | 99,6 | 100 | 96,5 | 85 |
| LMA323St_21d | CA-300294-a01-MO010 | SAM-6 | 99,9 | 100 | 92,7 | 57 |
| LMA323St_24 | CA-300248-a01-MO011 | APM9 | 88 | 99,4 | 0 | 0 |
| LMA323St_24 | CA-300248-a01-MO014 | DNPM | 6,5 | 73,8 | 96,8 | 87,8 |
| LMA323St_24 | CA-300248-a01-MO016 | KHC | 100 | 100 | 94,8 | 42,5 |
| LMA323St_24 | CA-300248-a01-MO019 | RAM2-P V2 | 36,5 | 44,4 | 95 | 28,8 |
| LMA323St_24 | CA-300248-a01-MO020 | SAM-6 | 99,5 | 99,7 | 0 | 36,3 |
| LMA323St_24d | CA-300297-a01-MO011 | APM9 | 100 | 99,4 | 68,6 | 24,9 |
| LMA323St_24d | CA-300297-a01-MO014 | DNPM | 4,2 | 99,6 | 98 | 97,1 |
| LMA323St_24d | CA-300297-a01-MO016 | KHC | 100 | 100 | 6,4 | 40,6 |
| LMA323St_24d | CA-300297-a01-MO019 | RAM2-P V2 | 38 | 82,8 | 97,4 | 93,9 |
| LMA323St_24d | CA-300297-a01-MO020 | SAM-6 | 99,6 | 100 | 45,2 | 56,1 |
| LMA323St_25 | CA-300249-a01-MO014 | DNPM | 12,2 | 99,9 | 93,3 | 62,3 |
| LMA323St_25 | CA-300249-a01-MO016 | KHC | 100 | 100 | 0 | 57,2 |
| LMA323St_25 | CA-300249-a01-MO019 | RAM2-P V2 | 95,2 | 99,2 | 96,4 | 71,7 |
| LMA323St_25 | CA-300249-a01-MO020 | SAM-6 | 0 | 23,8 | 81 | 40,3 |
| LMA323St_25d | CA-300298-a01-MO014 | DNPM | 7 | 20,4 | 96,6 | 67,2 |
| LMA323St_25d | CA-300298-a01-MO016 | KHC | 100 | 100 | 0 | 68,8 |
| LMA323St_25d | CA-300298-a01-MO017 | M016 | 0 | 0 | 94,9 | 24,2 |
| LMA323St_25d | CA-300298-a01-MO019 | RAM2-P V2 | 48,3 | 52,8 | 91,6 | 71,4 |
| LMA323St_25d | CA-300298-a01-MO020 | SAM-6 | 0 | 8,9 | 75,5 | 60,5 |
| LMA323St_26 | CA-300250-a01-MO006 | KHC | 100 | 99,9 | 0 | 37,9 |
| LMA323St_26 | CA-300250-a01-MO009 | RAM2-P V2 | 99,2 | 98,1 | 92,9 | 75,1 |
| LMA323St_26d | CA-300299-a01-MO004 | DNPM | 19,5 | 44,5 | 89,6 | 53,9 |
| LMA323St_26d | CA-300299-a01-MO006 | KHC | 99,9 | 100 | 0 | 49,7 |
| LMA323St_26d | CA-300299-a01-MO009 | RAM2-P V2 | 45,8 | 50,6 | 94,7 | 72,2 |
| LMA323St_26d | CA-300299-a01-MO010 | SAM-6 | 0 | 10,5 | 94 | 16,3 |
| LMA323St_27 | CA-300251-a01-MO006 | KHC | 100 | 99,6 | 0 | 13,7 |
| LMA323St_27 | CA-300251-a01-MO009 | RAM2-P V2 | 57,7 | 83,5 | 17 | 57,4 |
| LMA323St_27d | CA-300300-a01-MO006 | KHC | 100 | 100 | 0 | 10,3 |
| LMA323St_27d | CA-300300-a01-MO009 | RAM2-P V2 | 62,4 | 50,7 | 55,7 | 74,2 |
| LMA323St_28 | CA-300252-a01-MO004 | DNPM | 30,1 | 97,5 | 96,6 | 68,9 |
| LMA323St_28 | CA-300252-a01-MO006 | KHC | 100 | 100 | 0 | 58,4 |
| LMA323St_28 | CA-300252-a01-MO009 | RAM2-P V2 | 98,6 | 97,6 | 92,1 | 77,4 |
| LMA323St_28 | CA-300252-a01-MO010 | SAM-6 | 8,6 | 27,8 | 94,9 | 41 |
| LMA323St_28d | CA-300301-a01-MO006 | KHC | 99,9 | 100 | 0 | 46,7 |
| LMA323St_28d | CA-300301-a01-MO009 | RAM2-P V2 | 11,1 | 14,3 | 97,5 | 75,8 |
| LMA323St_28d | CA-300301-a01-MO010 | SAM-6 | 0 | 7,1 | 73,1 | 14,1 |
| LMA323St_29 | CA-300253-a01-MO004 | DNPM | 99,6 | 98,8 | 99,3 | 95,4 |
| LMA323St_29 | CA-300253-a01-MO006 | KHC | 99,5 | 99,4 | 100 | 68,2 |
| LMA323St_29 | CA-300253-a01-MO008 | M016 AC NAL | 98,8 | 99,3 | 6 | 44,7 |
| LMA323St_29 | CA-300253-a01-MO007 | M016 | 97,3 | 97,9 | 0 | 48,2 |
| LMA323St_29 | CA-300253-a01-MO009 | RAM2-P V2 | 98,3 | 97,8 | 98,8 | 87,8 |
| LMA323St_29 | CA-300253-a01-MO010 | SAM-6 | 100 | 95,1 | 91,4 | 92,3 |
| LMA323St_29d | CA-300302-a01-MO004 | DNPM | 100 | 99,3 | 99 | 93,4 |
| LMA323St_29d | CA-300302-a01-MO006 | KHC | 99,2 | 99,3 | 99 | 83,7 |
| LMA323St_29d | CA-300302-a01-MO007 | M016 | 1,5 | 98,4 | 99,8 | 97,7 |
| LMA323St_29d | CA-300302-a01-MO009 | RAM2-P V2 | 19,3 | 44 | 98,5 | 80 |

| | | | | | | |
|---------------------|----------------------------|------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| LMA323St_29d | CA-300302-a01-MO010 | SAM-6 | 99,8 | 100 | 94,4 | 93,4 |
| LMA323St_31 | CA-300255-a01-MO011 | APM9 | 76,2 | 100 | 27,3 | 0 |
| LMA323St_31 | CA-300255-a01-MO014 | DNPM | 100 | 99,8 | 52,8 | 14,6 |
| LMA323St_31 | CA-300255-a01-MO015 | ACA | 38,6 | 87,8 | 0 | 0 |
| LMA323St_31 | CA-300255-a01-MO016 | KHC | 88,1 | 98,8 | 0 | 0 |
| LMA323St_31 | CA-300255-a01-MO018 | M016 AC NAL | 97,9 | 98,9 | 11,1 | 44,8 |
| LMA323St_31 | CA-300255-a01-MO017 | M016 | 85,8 | 98 | 0 | 0 |
| LMA323St_31 | CA-300255-a01-MO019 | RAM2-P V2 | 99,6 | 98,3 | 36,5 | 12,2 |
| LMA323St_31 | CA-300255-a01-MO020 | SAM-6 | 99,6 | 99,3 | 40,4 | 17,5 |
| LMA323St_31d | CA-300304-a01-MO014 | DNPM | 95 | 99,1 | 0 | 0 |
| LMA323St_31d | CA-300304-a01-MO016 | KHC | 98 | 97,9 | 13,4 | 35,3 |
| LMA323St_31d | CA-300304-a01-MO018 | M016 AC NAL | 99 | 98,7 | 4,4 | 40,2 |
| LMA323St_31d | CA-300304-a01-MO020 | SAM-6 | 98,9 | 100 | 96 | 34,3 |
| LMA323St_32 | CA-300256-a01-MO006 | KHC | 100 | 100 | 0 | 46,3 |
| LMA323St_32 | CA-300256-a01-MO010 | SAM-6 | 100 | 100 | 0 | 43,8 |
| LMA323St_32d | CA-300305-a01-MO001 | APM9 | 100 | 99,1 | 0 | 0 |
| LMA323St_32d | CA-300305-a01-MO006 | KHC | 100 | 100 | 0 | 28,7 |
| LMA323St_32d | CA-300305-a01-MO010 | SAM-6 | 99,1 | 100 | 0 | 59,9 |
| LMA323St_33 | CA-300257-a01-MO014 | DNPM | 21,9 | 98,5 | 96,1 | 89,5 |
| LMA323St_33 | CA-300257-a01-MO016 | KHC | 100 | 97,8 | 95,9 | 36,6 |
| LMA323St_33 | CA-300257-a01-MO018 | M016 AC NAL | 3,5 | 7,8 | 82,5 | 0 |
| LMA323St_33 | CA-300257-a01-MO017 | M016 | 7,3 | 50,6 | 98,3 | 96,5 |
| LMA323St_33 | CA-300257-a01-MO019 | RAM2-P V2 | 5,4 | 29 | 98,9 | 82,6 |
| LMA323St_33 | CA-300257-a01-MO020 | SAM-6 | 100 | 100 | 98,9 | 93,4 |
| LMA323St_33d | CA-300306-a01-MO011 | APM9 | 99,9 | 100 | 0 | 1,2 |
| LMA323St_33d | CA-300306-a01-MO014 | DNPM | 58,3 | 98,5 | 96,9 | 92,4 |
| LMA323St_33d | CA-300306-a01-MO016 | KHC | 100 | 98,6 | 95,2 | 47,5 |
| LMA323St_33d | CA-300306-a01-MO017 | M016 | 0 | 21,8 | 97,4 | 97,6 |
| LMA323St_33d | CA-300306-a01-MO019 | RAM2-P V2 | 99,2 | 98,4 | 99,2 | 89,7 |
| LMA323St_33d | CA-300306-a01-MO020 | SAM-6 | 99,2 | 100 | 91,6 | 96,1 |
| LMA323St_34 | CA-300258-a01-MO011 | APM9 | 98,8 | 97,1 | 1,7 | 0 |
| LMA323St_34 | CA-300258-a01-MO016 | KHC | 100 | 100 | 0 | 37,4 |
| LMA323St_34 | CA-300258-a01-MO018 | M016 AC NAL | 89,5 | 98,7 | 23,7 | 30,9 |
| LMA323St_34 | CA-300258-a01-MO017 | M016 | 77 | 99,7 | 25,4 | 25,6 |
| LMA323St_35 | CA-300259-a01-MO006 | KHC | 100 | 100 | 0 | 27,7 |
| LMA323St_35 | CA-300259-a01-MO009 | RAM2-P V2 | 70,9 | 99,1 | 0 | 0 |
| LMA323St_35d | CA-300308-a01-MO006 | KHC | 87,5 | 100 | 0 | 35,4 |
| LMA323St_36 | CA-300260-a01-MO011 | APM9 | 100,6 | 99,1 | 12,3 | 0 |
| LMA323St_36 | CA-300260-a01-MO014 | DNPM | 1,3 | 96,8 | 96 | 88,5 |
| LMA323St_36 | CA-300260-a01-MO016 | KHC | 98,6 | 97,3 | 0 | 36,4 |
| LMA323St_36 | CA-300260-a01-MO019 | RAM2-P V2 | 82,1 | 99,8 | 97,9 | 88,1 |
| LMA323St_36 | CA-300260-a01-MO020 | SAM-6 | 99,5 | 99,6 | 5,4 | 30,6 |
| LMA323St_36d | CA-300309-a01-MO014 | DNPM | 70,5 | 100 | 98,2 | 87,2 |
| LMA323St_36d | CA-300309-a01-MO016 | KHC | 99,3 | 95,3 | 0 | 41,1 |
| LMA323St_36d | CA-300309-a01-MO019 | RAM2-P V2 | 87,3 | 99,6 | 98,3 | 90,5 |
| LMA323St_36d | CA-300309-a01-MO020 | SAM-6 | 99,1 | 99,2 | 0 | 40,8 |
| LMA323St_37 | CA-300261-a01-MO016 | KHC | 100 | 100 | 17,6 | 31 |
| LMA323St_37 | CA-300261-a01-MO019 | RAM2-P V2 | 87,9 | 88,2 | 0 | 0 |
| LMA323St_37 | CA-300261-a01-MO020 | SAM-6 | 87,1 | 99,7 | 0 | 10,4 |
| LMA323St_37d | CA-300310-a01-MO011 | APM9 | 97,7 | 98,4 | 0 | 0 |
| LMA323St_37d | CA-300310-a01-MO014 | DNPM | 8,4 | 21,1 | 95,5 | 29,2 |
| LMA323St_37d | CA-300310-a01-MO016 | KHC | 100 | 99,4 | 92,3 | 48,9 |
| LMA323St_37d | CA-300310-a01-MO017 | M016 | 0 | 0 | 75,8 | 26,5 |
| LMA323St_37d | CA-300310-a01-MO019 | RAM2-P V2 | 27,3 | 28,8 | 98,4 | 42,3 |
| LMA323St_37d | CA-300310-a01-MO020 | SAM-6 | 9,9 | 66,4 | 92,6 | 0 |
| LMA323St_39 | CA-300263-a01-MO014 | DNPM | 6 | 67,2 | 99,8 | 79,3 |
| LMA323St_39 | CA-300263-a01-MO016 | KHC | 99,9 | 99,1 | 0 | 22,9 |
| LMA323St_39 | CA-300263-a01-MO019 | RAM2-P V2 | 44,8 | 60,2 | 96,6 | 56,1 |
| LMA323St_39 | CA-300263-a01-MO020 | SAM-6 | 22,8 | 100 | 98,5 | 0 |
| LMA323St_39d | CA-300312-a01-MO011 | APM9 | 99,1 | 98,3 | 0 | 0 |

| | | | | | | |
|--------------|---------------------|-------------|------|------|------|------|
| LMA323St_39d | CA-300312-a01-MO014 | DNPM | 0 | 84,6 | 99,1 | 93,8 |
| LMA323St_39d | CA-300312-a01-MO016 | KHC | 100 | 99,1 | 86,6 | 33,9 |
| LMA323St_39d | CA-300312-a01-MO017 | M016 | 4,3 | 0 | 91,7 | 28,6 |
| LMA323St_39d | CA-300312-a01-MO019 | RAM2-P V2 | 20,3 | 14,9 | 98,2 | 68,5 |
| LMA323St_39d | CA-300312-a01-MO020 | SAM-6 | 1,3 | 11,3 | 86,4 | 0 |
| LMA323St_40 | CA-300264-a01-MO014 | DNPM | 100 | 99,8 | 0 | 0 |
| LMA323St_40 | CA-300264-a01-MO016 | KHC | 76,3 | 98,4 | 0 | 0 |
| LMA323St_40 | CA-300264-a01-MO018 | M016 AC NAL | 100 | 100 | 30,5 | 21,6 |
| LMA323St_40 | CA-300264-a01-MO017 | M016 | 98,2 | 100 | 8,5 | 22,1 |
| LMA323St_40 | CA-300264-a01-MO019 | RAM2-P V2 | 99,6 | 99,2 | 93,4 | 0 |
| LMA323St_40 | CA-300264-a01-MO020 | SAM-6 | 99,8 | 100 | 36,9 | 29,9 |
| LMA323St_40d | CA-300313-a01-MO014 | DNPM | 99,6 | 98,8 | 0 | 0 |
| LMA323St_40d | CA-300313-a01-MO016 | KHC | 99,1 | 97,8 | 3,3 | 28,7 |
| LMA323St_40d | CA-300313-a01-MO018 | M016 AC NAL | 98,8 | 97,8 | 0 | 25,5 |
| LMA323St_40d | CA-300313-a01-MO017 | M016 | 100 | 100 | 8,8 | 37,3 |
| LMA323St_40d | CA-300313-a01-MO019 | RAM2-P V2 | 96,7 | 98,9 | 0 | 0 |
| LMA323St_40d | CA-300313-a01-MO020 | SAM-6 | 99,3 | 100 | 82,4 | 37,6 |
| LMA323St_41 | CA-300265-a01-MO014 | DNPM | 7,3 | 29,8 | 99,6 | 98,5 |
| LMA323St_41 | CA-300265-a01-MO016 | KHC | 100 | 100 | 0 | 31,5 |
| LMA323St_41 | CA-300265-a01-MO017 | M016 | 0 | 0 | 99,7 | 89,2 |
| LMA323St_41 | CA-300265-a01-MO019 | RAM2-P V2 | 17,2 | 25,8 | 98,1 | 81,6 |
| LMA323St_41 | CA-300265-a01-MO020 | SAM-6 | 19,3 | 50 | 98,4 | 0 |
| LMA323St_41d | CA-300314-a01-MO014 | DNPM | 0 | 0 | 97,3 | 62,6 |
| LMA323St_41d | CA-300314-a01-MO016 | KHC | 99,9 | 98,9 | 0 | 9,3 |
| LMA323St_41d | CA-300314-a01-MO019 | RAM2-P V2 | 29,2 | 26,2 | 97,8 | 87,1 |
| LMA323St_42 | CA-300266-a01-MO001 | APM9 | 74,6 | 98 | 0 | 0 |
| LMA323St_42 | CA-300266-a01-MO004 | DNPM | 78,5 | 98,6 | 0 | 2,1 |
| LMA323St_42 | CA-300266-a01-MO006 | KHC | 99,7 | 99,1 | 100 | 59,6 |
| LMA323St_42 | CA-300266-a01-MO008 | M016 AC NAL | 98,2 | 97,8 | 0 | 29,8 |
| LMA323St_42 | CA-300266-a01-MO007 | M016 | 98,6 | 97,1 | 0 | 6 |
| LMA323St_42 | CA-300266-a01-MO009 | RAM2-P V2 | 89,4 | 97,6 | 0 | 13,6 |
| LMA323St_42 | CA-300266-a01-MO010 | SAM-6 | 99,1 | 100 | 88,1 | 30,8 |
| LMA323St_42d | CA-300315-a01-MO004 | DNPM | 82 | 98,9 | 0 | 0 |
| LMA323St_42d | CA-300315-a01-MO006 | KHC | 100 | 100 | 96,2 | 0 |
| LMA323St_42d | CA-300315-a01-MO008 | M016 AC NAL | 100 | 99,9 | 74,4 | 31,8 |
| LMA323St_42d | CA-300315-a01-MO007 | M016 | 78,1 | 99,3 | 0 | 0 |
| LMA323St_42d | CA-300315-a01-MO010 | SAM-6 | 98,9 | 100 | 36,9 | 20,2 |
| LMA323St_43 | CA-300267-a01-MO004 | DNPM | 49,2 | 99,3 | 87,4 | 0 |
| LMA323St_43 | CA-300267-a01-MO006 | KHC | 100 | 99,1 | 0 | 7 |
| LMA323St_43 | CA-300267-a01-MO008 | M016 AC NAL | 99,9 | 98,4 | 6,6 | 26,9 |
| LMA323St_43 | CA-300267-a01-MO007 | M016 | 100 | 100 | 100 | 33,8 |
| LMA323St_43 | CA-300267-a01-MO009 | RAM2-P V2 | 99,5 | 99,8 | 90,3 | 19 |
| LMA323St_43 | CA-300267-a01-MO010 | SAM-6 | 99,3 | 99,7 | 0 | 38,2 |
| LMA323St_43d | CA-300316-a01-MO004 | DNPM | 100 | 99,8 | 0 | 2,4 |
| LMA323St_43d | CA-300316-a01-MO006 | KHC | 77,7 | 99,6 | 0 | 0,5 |
| LMA323St_43d | CA-300316-a01-MO008 | M016 AC NAL | 98,1 | 97,6 | 0 | 26,8 |
| LMA323St_43d | CA-300316-a01-MO009 | RAM2-P V2 | 98,9 | 97,6 | 0 | 0 |
| LMA323St_43d | CA-300316-a01-MO010 | SAM-6 | 99,3 | 99,2 | 94 | 25,3 |
| LMA323St_44 | CA-300268-a01-MO014 | DNPM | 46 | 99,8 | 87,1 | 0 |
| LMA323St_44 | CA-300268-a01-MO016 | KHC | 95,7 | 99,4 | 0 | 1,2 |
| LMA323St_44 | CA-300268-a01-MO018 | M016 AC NAL | 97,8 | 97,4 | 13,4 | 25,2 |
| LMA323St_44 | CA-300268-a01-MO017 | M016 | 100 | 100 | 27,4 | 25,7 |
| LMA323St_44 | CA-300268-a01-MO019 | RAM2-P V2 | 98,4 | 97,1 | 0 | 0 |
| LMA323St_44 | CA-300268-a01-MO020 | SAM-6 | 99,8 | 99,6 | 0 | 35,2 |
| LMA323St_44d | CA-300317-a01-MO016 | KHC | 99,6 | 100 | 100 | 34,7 |
| LMA323St_44d | CA-300317-a01-MO018 | M016 AC NAL | 99 | 98,1 | 0 | 15,9 |
| LMA323St_44d | CA-300317-a01-MO017 | M016 | 98,6 | 100 | 0 | 5,6 |
| LMA323St_44d | CA-300317-a01-MO020 | SAM-6 | 99,3 | 99,1 | 0 | 39,2 |
| LMA323St_46 | CA-300270-a01-MO014 | DNPM | 8,9 | 79,1 | 98,3 | 68,6 |
| LMA323St_46 | CA-300270-a01-MO016 | KHC | 100 | 99,6 | 0 | 36,2 |

| | | | | | | |
|--------------------|----------------------------|------------------|-------------|------------|-------------|-----------|
| LMA323St_46 | CA-300270-a01-MO019 | RAM2-P V2 | 13,7 | 38,8 | 95,7 | 35,9 |
| LMA323St_46 | CA-300270-a01-MO020 | SAM-6 | 99,9 | 100 | 0 | 38,4 |
| LMA323St_46d | CA-300319-a01-MO014 | DNPM | 0 | 9 | 92,9 | 68,6 |
| LMA323St_46d | CA-300319-a01-MO016 | KHC | 100 | 99,1 | 99,4 | 48,8 |
| LMA323St_46d | CA-300319-a01-MO019 | RAM2-P V2 | 22,6 | 29,2 | 78,4 | 10,6 |
| LMA323St_46d | CA-300319-a01-MO020 | SAM-6 | 66 | 99,4 | 95,2 | 14,8 |
| LMA323St_47 | CA-300271-a01-MO006 | KHC | 100 | 98,9 | 0 | 40,4 |
| LMA323St_47 | CA-300271-a01-MO009 | RAM2-P V2 | 42,2 | 99,2 | 97,1 | 27,2 |
| LMA323St_47d | CA-300320-a01-MO004 | DNPM | 67,2 | 99,3 | 47,9 | 21,5 |
| LMA323St_47d | CA-300320-a01-MO006 | KHC | 100 | 99,1 | 93,1 | 46,5 |
| LMA323St_47d | CA-300320-a01-MO009 | RAM2-P V2 | 38,5 | 98,5 | 98,7 | 10,3 |
| LMA323St_48 | CA-300272-a01-MO006 | KHC | 100 | 99,4 | 98,6 | 44,5 |
| LMA323St_48 | CA-300272-a01-MO009 | RAM2-P V2 | 74,5 | 100 | 93,7 | 72 |
| LMA323St_48d | CA-300321-a01-MO004 | DNPM | 22,8 | 96,3 | 96,8 | 61,8 |
| LMA323St_48d | CA-300321-a01-MO006 | KHC | 99,2 | 99,4 | 0 | 55 |
| LMA323St_48d | CA-300321-a01-MO009 | RAM2-P V2 | 4,5 | 18,3 | 99,2 | 79,3 |
| LMA323St_49 | CA-300273-a01-MO014 | DNPM | 20,3 | 98,5 | 95,6 | 68,5 |
| LMA323St_49 | CA-300273-a01-MO016 | KHC | 82,6 | 100 | 0 | 59,8 |
| LMA323St_49 | CA-300273-a01-MO019 | RAM2-P V2 | 20 | 36,6 | 93,7 | 68,5 |
| LMA323St_49 | CA-300273-a01-MO020 | SAM-6 | 0 | 1,2 | 97,5 | 56,1 |
| LMA323St_49d | CA-300322-a01-MO014 | DNPM | 6,8 | 7,7 | 97,6 | 76 |
| LMA323St_49d | CA-300322-a01-MO016 | KHC | 100 | 100 | 21,3 | 59,2 |
| LMA323St_49d | CA-300322-a01-MO019 | RAM2-P V2 | 7,6 | 21,9 | 93,5 | 67,6 |
| LMA323St_49d | CA-300322-a01-MO020 | SAM-6 | 0 | 0 | 97,4 | 72,6 |

Table 2: Antimicrobial activities of *Streptomyces* active extracts from EPA vials fermentation. Numbers are percentage of inhibition. AF: *Aspergillus fumigatus*. CA: *Candida albicans*. CG: *Candida glabrata*. CP: *Candida parapsilosis*.

| ID Isolate | ID Extract | Media | AF | CA | CG | CP |
|--------------|------------------------------|-----------|-------|-------|-------|-------|
| LMA323St_2 | CA-300226-a01-MO012-EC01-a01 | SAM-6 | 84,8 | 99,1 | 98,93 | 31,99 |
| LMA323St_2d | CA-300275-a01-MO011-EC01-a01 | RAM2-P V2 | 49 | 82,65 | 99,73 | 33,6 |
| LMA323St_3 | CA-300227-a01-MO012-EC01-a01 | RAM2-P V2 | 81,4 | 92,47 | 99,47 | 75,89 |
| LMA323St_3d | CA-300276-a01-MO012-EC01-a01 | RAM2-P V2 | 87,64 | 89,12 | 98,67 | 59,6 |
| LMA323St_4 | CA-300228-a01-MO011-EC01-a01 | RAM2-P V2 | 79,7 | 95,57 | 99,47 | 76,16 |
| LMA323St_6 | CA-300230-a01-MO022-EC01-a01 | RAM2-P V2 | 79,4 | 22,57 | 98,13 | 47,55 |
| LMA323St_9 | CA-300233-a01-MO011-EC01-a01 | RAM2-P V2 | 9,1 | 0 | 100 | 38,99 |
| LMA323St_9 | CA-300233-a01-MO014-EC01-a01 | SAM-6 | 8 | 72,35 | 99,6 | 31,35 |
| LMA323St_9d | CA-300282-a01-MO011-EC01-a01 | RAM2-P V2 | 10,4 | 0 | 100 | 37,4 |
| LMA323St_12 | CA-300236-a01-MO023-EC01-a01 | RAM2-P V2 | 93,2 | 99,08 | 99,47 | 99,2 |
| LMA323St_12d | CA-300285-a01-MO022-EC01-a01 | RAM2-P V2 | 7,9 | 0 | 99,61 | 32,59 |
| LMA323St_16d | CA-300289-a01-MO011-EC01-a01 | RAM2-P V2 | 6,8 | 0 | 99,19 | 34,08 |
| LMA323St_17 | CA-300241-a01-MO024-EC01-a01 | SAM-6 | 90,4 | 88,93 | 100 | 37,32 |
| LMA323St_17d | CA-300290-a01-MO021-EC01-a01 | SAM-6 | 3,7 | 89,1 | 99,2 | 29,05 |
| LMA323St_18d | CA-300291-a01-MO011-EC01-a01 | RAM2-P V2 | 8 | 2,6 | 98,93 | 36,19 |
| LMA323St_19 | CA-300243-a01-MO012-EC01-a01 | RAM2-P V2 | 5,9 | 0 | 99,06 | 18,81 |
| LMA323St_20 | CA-300244-a01-MO012-EC01-a01 | RAM2-P V2 | 8,6 | 0 | 99,2 | 34,14 |
| LMA323St_24 | CA-300248-a01-MO021-EC01-a01 | KHC | 14,6 | 2,99 | 97,73 | 43,23 |
| LMA323St_25 | CA-300249-a01-MO022-EC01-a01 | RAM2-P V2 | 84 | 90,05 | 99,07 | 65,32 |
| LMA323St_26 | CA-300250-a01-MO011-EC01-a01 | RAM2-P V2 | 80,3 | 91,06 | 100 | 65,54 |
| LMA323St_28 | CA-300252-a01-MO012-EC01-a01 | RAM2-P V2 | 72,4 | 95,41 | 98,8 | 72,67 |
| LMA323St_29d | CA-300302-a01-MO011-EC01-a01 | DNPM | 0 | 93,9 | 99,33 | 0 |
| LMA323St_29d | CA-300302-a01-MO012-EC01-a01 | KHC | 0 | 0 | 81,72 | 0 |
| LMA323St_29d | CA-300302-a01-MO013-EC01-a01 | SAM-6 | 0 | 93,6 | 99,6 | 0 |
| LMA323St_31d | CA-300304-a01-MO022-EC01-a01 | SAM-6 | 5,6 | 22,1 | 99,07 | 32,55 |
| LMA323St_33 | CA-300257-a01-MO021-EC01-a01 | SAM-6 | 88,7 | 100 | 100 | 36,51 |

| | | | | | | |
|--------------|------------------------------|-----------|------|-------|-------|-------|
| LMA323St_33d | CA-300306-a01-MO021-EC01-a01 | RAM2-P V2 | 74,2 | 99,09 | 100 | 27,96 |
| LMA323St_33d | CA-300306-a01-MO023-EC01-a01 | SAM-6 | 83,3 | 99,9 | 100 | 51,49 |
| LMA323St_35 | CA-300259-a01-MO012-EC01-a01 | KHC | 38,1 | 18,21 | 49,3 | 98,91 |
| LMA323St_35 | CA-300259-a01-MO014-EC01-a01 | RAM2-P V2 | 79,6 | 19,25 | 95,98 | 44,19 |
| LMA323St_36 | CA-300260-a01-MO021-EC01-a01 | RAM2-P V2 | 7,1 | 0 | 97,73 | 25,26 |
| LMA323St_36d | CA-300309-a01-MO021-EC01-a01 | DNPM | 0 | 0 | 98,52 | 0 |
| LMA323St_36d | CA-300309-a01-MO022-EC01-a01 | RAM2-P V2 | 0 | 15,71 | 100 | 27,57 |
| LMA323St_40 | CA-300264-a01-MO022-EC01-a01 | RAM2-P V2 | 5,8 | 0 | 98,53 | 12,39 |
| LMA323St_41 | CA-300265-a01-MO021-EC01-a01 | RAM2-P V2 | 63,3 | 99,23 | 100 | 52,42 |
| LMA323St_42 | CA-300266-a01-MO011-EC01-a01 | SAM-6 | 4,8 | 0 | 98,39 | 18,27 |
| LMA323St_43d | CA-300316-a01-MO012-EC01-a01 | SAM-6 | 0 | 77,77 | 99,71 | 36,41 |
| LMA323St_44d | CA-300317-a01-MO022-EC01-a01 | KHC | 2,2 | 0 | 94,87 | 49,32 |
| LMA323St_48 | CA-300272-a01-MO012-EC01-a01 | RAM2-P V2 | 82,5 | 90,49 | 99,59 | 67,89 |

6. DISCUSSÃO GERAL

A Antártica é conhecida por ser um continente inóspito, devido principalmente a baixa temperatura e falta de água (Durán et al., 2019), tais condições climáticas são únicas, o local possui uma grande diversidade de organismos endêmicos e acredita-se que muitos destes ainda são desconhecidos (Encheva-Malinova et al., 2014). Neste trabalho, todos os pontos de coleta de solo antártico e todos os meios de cultivo utilizados apresentaram o crescimento de fungos e bactérias com diversas morfologias. Tendo em vista as bruscas mudanças climáticas sazonais, são geralmente encontrados no continente microrganismos mesófilos adaptados a baixas temperaturas, capazes de crescer em diversas condições (Martinez et al., 2016), tal qual os isolados estudados.

Diversos estudos já apresentaram a aplicabilidade das técnicas de *fingerprinting* em diferentes microrganismos (Chapaval et al., 2006), apesar de existir certas limitações e a necessidade de uma base de dados confiável para comparação de resultados (Yang e Yen, 2012). O uso do *primer* BOX-A1R já se mostrou eficiente para elucidar sinonímias entre espécies do gênero *Streptomyces* (Lanoot et al., 2004), demonstrando a alta capacidade de diferenciação entre microrganismos, até mesmo congêneres, da técnica de BOX-PCR. Neste trabalho, fragmentos obtidos com o *primer* BOX-A1R apresentaram um maior peso molecular e um menor número de grupos observados no dendrograma. A outra técnica utilizada, REP-PCR, apresentou fragmentos com pesos moleculares menores e uma maior diversidade genética quando comparado ao BOX-PCR.

A fim de identificar os estreptomicetos isolados do solo da Antártica, sequenciamos o gene 16S rRNA e utilizamos duas diferentes bases de dados (GenBank e EzBioCloud) para comparar as espécies encontradas. Porém, como já esperado quando se trata do uso do 16S neste gênero, a identificação em nível de espécie dos isolados não foi completamente esclarecida. Poucos isolados foram considerados identificados através do 16S. Quando se analisam os grupos formados nos dendrogramas, podemos observar a formação de grupos com 70% de similaridade quanto aos padrões genéticos obtidos, porém estes grupos não são totalmente relacionáveis entre as duas técnicas *fingerprinting* utilizadas e nem entre as espécies obtidas no estudo do 16S. Porém, o grupo que contém os isolados relacionados a *S. fildesensis* (LMA323St_12, LMA323St_13, LMA323St_16,

LMA323St_19 e LMA323St_45) permaneceu unido no BOX e no REP. Com a observação da permanência destes grupos em diferentes reações podemos inferir que utilizar diferentes técnicas moleculares em conjunto auxilia no processo de caracterização e identificação das espécies do gênero *Streptomyces*, relacionando os padrões genéticos e as similaridades de sequência. Estes mesmos isolados foram relacionados a *S. urticae* quando analisados no EzBioCloud, embora *S. fildesensis* no GenBank. Este grupo é um ótimo exemplo da dificuldade de se estabelecer a identificação de espécies de *Streptomyces*, visto que ambas as espécies citadas são fortemente aparentadas (Piao et al., 2018). *S. urticae* foi descrita como uma nova espécie da rizosfera de *Urtica urens* por Piao et al. (2018) e mostrou alta similaridade com sequências de 16S de *S. fildesensis* e *Streptomyces abietis*. Além do 16S, essas similaridades foram confirmadas com o uso do *gyrB*, e então Piao et al. (2018) realizou estudos quimiotaxonômicos e bioquímicos entre as três espécies e também hibridização de DNA. Já *S. fildesensis* foi isolada pela primeira vez na Península Fildes na Antártica por Li et al. (2011) e tendo em vista a origem dos isolados deste trabalho, os estreptomicetos em questão possivelmente são membros de *S. fildesensis*.

Dificuldades relatadas sobre o uso do gene 16S já eram esperadas, tais como o baixo número de isolados que alcançaram o ponto de corte previamente definido (seja o *default* do EzBioCloud ou os 97% de similaridade do GenBank) e a existência de mais uma espécie que tenha preenchido igualmente as definições estabelecidas, fazendo com que um isolado tenha sido relacionado com mais 2 espécies distintas. Apesar do uso comum do 16S, Chevrette et al. (2019) fez uma interessante e importante analogia com os estudos de 18S rRNA em Eukarya onde se utilizarmos os mesmos critérios que usamos para agrupar estreptomicetos, golfinhos e humanos seriam considerados pelo menos pertencentes ao mesmo gênero. Isto demonstra que estamos subestimando a diversidade presente dentro deste gene bacteriano utilizando somente uma característica molecular que não representa toda complexidade genética do grupo.

O uso de bases de dados é uma indispensável ferramenta para estudos moleculares, porém, em um gênero tão distinto e com tantas espécies representantes como é o caso do *Streptomyces*, há sempre um fator de defasagem, seja ou pela submissão de novas sequências ou pela curadoria. Por exemplo, podemos observar um número maior de espécies quando analisamos os isolados

no GenBank em comparação com o EzBioCloud, visto que este último não permite o envio de sequências e só publica genes oriundos de genomas completos advindos do NCBI. Uma base de dados possibilita a comparação com um maior número de dados e a outra com sequências profundamente analisadas, ambas então com prós e contras.

Já estabelecido que o 16S sozinho não é capaz de identificar espécies de *Streptomyces*, outros genes são conhecidos por serem fortes marcadores moleculares, como o *gyrB* (Kirby et al., 2010) e o *recA* (Thompson et al., 2004). Além destes, *rpoB*, *trpB* e *atpD* são utilizados no MLSA dos estreptomicetos. O gene *atpD* foi amplamente utilizado para esclarecer relações filogenéticas (Labeda, 2011; Labeda et al., 2014), para detectar estreptomicetos (Laskaris et al., 2012) e para identificar isolados (Jin et al. 2019; Kamjam et al. 2019). O *rpoB*, além de fornecer informações sobre taxonomia (Ayed et al., 2018) ainda é utilizado em estudos sobre compostos bioativos (Liu et al. 2018; Shentu et al. 2018). Apesar da clara falta de dados encontrada no GenBank na busca por similaridade de sequência destes genes *housekeeping*, o uso de um número maior de informação genética possibilitou a construção de árvores filogenéticas mais robustas. Apesar disso, Zhang et al. (2020) utilizou os genes 16S, *atpD*, *rpoB* e *recA* para identificar isolados de *Streptomyces* e mostrou que ainda assim os dados não são suficientes, sugerindo o sequenciamento do genoma completo.

No que diz respeito ao estudo dos produtos naturais oriundos de estreptomicetos, um dos pontos de maior preocupação é o tempo de crescimento dos isolados e a re-identificação de compostos bioativos. Para driblar o tempo e trabalho decorrente do cultivo dos isolados em frascos do tipo Erlenmeyer, microplacas (Duetz, 2007) vêm sendo utilizadas visando aumentar a diversidade das condições de crescimento em um único lote de cultivo, dessa forma acessando mais vias metabólicas distintas de uma única vez. Neste trabalho, testamos 10 meios de cultivo e observamos que em ambos os meios em que a fonte de carbono era a sacarose (Czapek e DEF-15) não foi observada nenhuma atividade antimicrobiana nos extratos resultantes. Apesar de produzir biomassa em pequenas quantidades, maiores quantidades de sacarose parecem ser necessárias para que ocorra a produção de antimicrobianos (Yi et al., 2015)

A aquisição de carbono desempenha um papel central no metabolismo bacteriano e nos estreptomicetos a produção de metabólitos bioativos está ligada

ao desenvolvimento celular complexo do grupo, com micélio vegetativo e hifas segmentadas, sendo então altamente dependente das condições de crescimento oferecidas em laboratório (Urem et al., 2016). Um dos metabólitos identificados neste trabalho, o sideróforo norcardamine, é produzido em meio de cultivo que contenha glicose (Genilloud et al., 2010) e é altamente estudado com mineração de genoma (Zhang et al., 2019). Além disso, quando a produção de norcardamine é alterada, o estreptomiceto não consegue esporular, estando este composto então fortemente ligado ao desenvolvimento do organismo (Lambert et al., 2014).

Na dereplicação, os microrganismos escolhidos como alvo são os responsáveis por guiar todo o processo até a obtenção do extrato ativo. Maltofilina é um antifúngico, produzido também por *Streptomyces*, eficaz contra *C. albicans* (Quezada et al., 2017) e apresentou alta capacidade de inibição contra *C. glabrata* neste trabalho e contra os demais fungos testados. Podemos observar que o isolado LMA323St_35 produziu monactina e dinactina e estes dois compostos são responsáveis pela inibição de MRSA, o que difere do que encontrado nos outros isolados quando cultivados em tubos do tipo EPA. Estes compostos são conhecidamente produzidos por *Streptomyces* (Zhang et al., 2020) e fazem parte da família dos macrolídeos que desempenham diversas funções biológicas como antifúngicos (Silva et al., 2020) e atividade antiproliferativa (Yang et al., 2020). Entretanto, poucos estudos mostraram atividade antibacteriana contra *Staphylococcus* spp. Além disso, o isolado LMA323St_35 mostrou relação com *S. globisporus*, espécie conhecida pela produção destes compostos (Zhang et al., 2020). Feigrisolides C e D também são classificados como macrolídeos e foram encontrados em mais da metade dos nossos isolados. Estes foram isolados pela primeira vez em *Streptomyces griseus* (Tang et al., 2000) e então identificados em estreptomicetos marinhos (Blunt et al., 2006). Ao final, destaco o isolado LMA323St_43d que apesar de ter demonstrado atividade antibacteriana em ambas as fermentações não apresentou nenhum produto natural nas bases de dados de espectrometria de massas utilizadas.

7. CONCLUSÃO

Foram isolados 49 estreptomicetos de seis pontos de coleta de solo da Antártica que apresentaram grande diversidade genética de acordo com o padrão de fragmentos de amplificação obtidos com a utilização das técnicas de PCR *fingerprinting* BOX-PCR e REP-PCR, porém o mesmo resultado não foi alcançado quando utilizamos MLST. Poucos isolados foram identificados quando o gene 16S rRNA foi comparado aos bancos de dados do GenBank e do EzBioCloud e a utilização dos genes *housekeeping* não esclareceu as incongruências. No entanto, a utilização de vários genes permitiu estudar com maior clareza as relações filogenéticas entre os isolados. Os isolados produzem diversos compostos com atividade antimicrobiana, com destaque à ação antifúngica contra *Candida* spp.

8. REFERÊNCIAS

- Acar J, Röstel B. 2001. Antimicrobial resistance: an overview. *Rev Sci Tech int Epiz.* 20(3):797-810. <https://doi.org/10.20506/rst.20.3.1309>
- Aigle B, Lautru S, Spiteller D, Dickschat JS, Challis GL, Leblond P, Pernodet JL. 2014 Genome mining of *Streptomyces ambofaciens*. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 41:251-263. <https://doi.org/10.1007/s10295-013-1379-y>
- Amaro E, Padeiro A, Ferro AM, Mota AM, Leppe M, Verkulich S, Hughes KA, Peter HU, Canário J. 2015. Assessing trace element contamination in Fildes Peninsula (King George Island) and Ardley Island, Antarctic. *Mar Pollut Bull.* 97:523-527. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2015.05.018>
- Antony-Babu S, Stien D, Eparvier V, Parrot D, Tomasi S, Suzuki MT. 2017. Multiple *Streptomyces* species with distinct secondary metabolomes have identical 16S rRNA gene sequences. *Sci Rep.* 7(1):11089. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11363-1>
- Ayed A, Slama N, Mankai H, Bachkouel S, ElKahoui S, Tabbene O, Liman F. 2018. *Streptomyces tunisialbus* sp. nov.; a novel *Streptomyces* species with antimicrobial activity. *A Van Leeu* 111:1571-1581. <https://doi.org/10.1007/s10482-018-1046-4>
- Baltz RH. 2016. Genetic manipulation of secondary metabolite biosynthesis for improved production in *Streptomyces* and other actinomycetes. *J Ind Microbiol Technol.* 43:343-370. <https://doi.org/10.1007/s10295-015-1682-x>
- Baltz RH. 2019. Natural product drug discovery in the genomic era: realities, conjectures, misconceptions, and opportunities. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 46:281-299. <https://doi.org/10.1007/s10295-018-2115-4>
- Barka EA, Vatsa P, Sanchez L, Gaveau-Vaillant N, Jacquard C, Klenk HP, Clément C, Ouhdouch Y, Wezel GP. 2016. Taxonomy, Physiology and Natural Products of Actinobacteria. *Microbiol Mol Bio Rev.* 80(1):1-43. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00044-16>
- Beck PJ. 1990. Regulating one of the last tourism frontiers: Antarctica. *Appl Geogr.* 10:343-356. [https://doi.org/10.1016/0143-6228\(90\)90034-M](https://doi.org/10.1016/0143-6228(90)90034-M)
- Bentley SD, Chater KF, Cerdeño-Tárraga AM, Challis GL, Thomson NR, James KD, Harris DE, Quail MA, Kieser H, Harper D, Bateman A, Brown S, Chandra G, Chen CW, Collins M, Cronin A, Fraser A, Goble A, Hidalgo J, Hornsby T,

- Howarth S, Huang CH, Kieser T, Larke L, Murphy L, Oliver K, O'Neil S, Rabinowitsch E, Rajandream MA, Rutherford K, Rutter S, Seeger K, Saunders D, Sharp S, Squares R, Squares S, Taylor K, Warren T, Wietzorrek A, Woodward J, Barrell BG, Parkhill J, Hopwood DA. 2002. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature*. 417:141-147. <https://doi.org/10.1038/417141a>
- Bérdy J. 2012. Thoughts and facts about antibiotics: Where we are now and where we are heading. *J Antibiot*. 65:385-95. <https://doi.org/10.1038/ja.2012.27>
- Blunt JW, Copp BR, Hu W, Munro MHG, Northcore PT, Prinsep MR. 2006. Marine Natural Products. *Nat Prod Rep* 24:31-86. <https://doi.org/10.1039/b603047p>
- Bode HB, Bethe B, Höfs R, Zeeck A. 2002. Big effects from small changes: possible ways to explore nature's chemical diversity. *Chem biochem*. 3(7):619-27. [https://doi.org/10.1002/1439-7633\(20020703\)3:7<619::AID-CBIC619>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/1439-7633(20020703)3:7<619::AID-CBIC619>3.0.CO;2-9)
- Bratchkova A, Ivanova V. 2011. Bioactive Metabolites Produced by Microorganisms Collected in Antarctica and the Artic. *Biotechnol Biotec Eq*. 25:1-7. <https://doi.org/10.5504/BBEQ.2011.0116>
- Braun C, Mustafa O, Nordt A, Pfeiffer S, Peter HU. 2012. Environmental monitoring and management proposals for the Fildes Region, King George Island, Antarctica. *Pol Res*. 31:1. <https://doi.org/10.3402/polar.v3li0.18206>
- Bruntner C, Binder T, Pathom-aree W, Goodfellow M, Bull AT, Potterat O, Puder C, Hörer S, Schimid A, Bolek W, Wagner K, Mihm G, Fiedler HP. 2005. Frigocyclinone, a Novel Angucyclinone Antibiotic Produced by a *Streptomyces griseus* Strain from Antarctica. *J Antibiot* 58(5):346-349.
- Buchanan RE. 1917. Studies in the nomenclature and classification of the bacteria. II. The primary subdivisions of the Schizomycetes. *J Bacteriol*. 2:155-64. <https://doi.org/10.1128/JB.2.2.155-164.1917>
- Challis GL. 2014. Exploitation of the *Streptomyces coelicolor* A3(2) genome sequence for discovery of new natural products and biosynthetic pathways. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 41:219-232. <https://doi.org/10.1007/s10295-013-1383-2>
- Chapaval L, Moon D, Gomes J, Duarte F, Tsai S. 2006. Using the REP-PCR technique in the tracking of *Staphylococcus aureus* in a milking room, for milk

- quality production. *Braz J Vet Res Anim Sci* 43:309–320.
<https://doi.org/10.11606/issn.1678-4456.bjvras.2006.26478>
- Chater KF, Biró S, Lee KJ, Palmer T, Schrempf H (2010) The complex extracellular biology of *Streptomyces*. *FEMS Microbiol Rev.* 34:171-198.
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00206.x>
- Chen J, Liu H, Xia Z, Zhao X, Wu Y, An M. 2019. Purification and Structural Analysis of the Effective Anti-TMV Compound γ -Poly-L-lysine Produced by *Streptomyces hygroscopicus*. *Molecules.* 24(1156).
<https://doi.org/10.3390/molecules24061156>
- Chevrette MG, Carlos-Shanley C, Louie KB, Bower BP, Northen TR, Currie CR (2019) Taxonomic and Metabolic Incongruence in the Ancient Genus *Streptomyces*. *Front Microbiol* 10:2170.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02170>
- Choi S, Katsuyama Y, Bai L, Deng Z, Ohnishi Y, Kim E. 2018. Genome engineering for microbial natural product discovery. *Curr Opin Microbiol.* 45:53-60.
<https://doi.org/10.1016/j.mib.2018.02.007>
- Claessen D, Rozen DE, Kuipers OP, Sogaard-Andersen L, van Wezel GP. 2014. Bacterial solutions to multicellularity: a tale of biofilms, filament sand fruiting bodies. *Nat Rev Microbiol* 12:115–124. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3178>
- Davies J. 2011. How to discover new antibiotics: harvesting the parvome. *Curr Opin Chem Biol.* 15:5-10. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2010.11.001>
- Deiner K, Walser JC, Machler W, Altermatt F. 2015. Choice of capture and extraction methods affect detection of freshwater biodiversity from environmental DNA. *Biol Cons.* 183:53-63.
<https://doi.org/10.1016/j.biocon.2014.11.018>
- Dochhil H, Dkhar MS, Barman D. 2013. Seed germination enhancing activity of endophytic *Streptomyces* isolated from indigenous ethno-medicinal plant *Centella asiatica*. *Int J Pharm Bio Sci.* 4(1):256-262.
- Ducklow HW, Baker K, Martinson DG, Quetin LB, Ross RM, Smith RC, Stammerjohn SE, Vernet M, Fraser W. 2007. Marine pelagic ecosystems: The West Antarctic Peninsula. *Phil Trans R Soc B.* 362:67-94.
<https://doi.org/10.1098/rstb.2006.1955>

- Duetz WA. 2007. Microtiter plates as mini-bioreactors: miniaturization of fermentation methods. *TRENDS in Microbiol* 15:469-475. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2007.09.004>
- Durán P, Barra PJ, Jorquera MA, Viscardi S, Fernandez C, Paz C, Mora ML, Bol R. 2019. Occurrence of soil fungi in Antarctic pristine environments. *Front Bioeng Biotechnol*. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00028>
- Encheva-Malinova M, Stoyanova M, Avramova H, Pavlova Y, Gocheva B, Ivanova I, Moncheva P. 2014. Antibacterial potential of streptomycete strains from Antarctic soils. *Biotechnol Biotec Eq*. 28(4):721-727. <https://doi.org/10.1080/13102818.2014.947066>
- Genilloud O, González I, Salazar O, Martín J, Tormo JR, Vicente F. 2011. Current approaches to exploit actinomycetes as a source of novel natural products. *J Ind Microbiol Biotechnol* 38:375-389. <https://doi.org/10.1007/s10295-010-0882-7>
- Genilloud O, Vicente F. 2012. Novel approaches to exploit natural products from microbial resources, p 221-248. In: Genilloud O, Vicente F (ed), *Drug Discovery from Natural Products*. RSC series.
- Genilloud O. 2014. The re-emerging role of microbial natural products in antibiotic discovery. *A Van Leeuw*. 106:173-188. <https://doi.org/10.1007/s10482-014-0204-6>
- Golinska P, Wypij M, Agarkar G, Rathod D, Dahm H, Rai M. 2015. Endophytic actinobacteria of medicinal plants: diversity and bioactivity. *A Van Leeuw*. 108:267-289. <https://doi.org/10.1007/s10482-015-0502-7>
- Goodfellow M, Williams, ST. 1983. Ecology of Actinomycetes. *Ann Rev Microbiol*. 37:189-216. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.37.100183.001201>
- Goodge JW. 2020. Geological and tectonic evolution of the Transantarctic Mountains, from ancient craton to recent enigma. *Gond Res*. 80:50-122. <https://doi.org/10.1016/j.gr.2019.11.001>
- Guo Y, Zheng W, Rong X, Huang Y. 2008. A multilocus phylogeny of the clade *Streptomyces griseus* 16S rRNA gene clade: use of multilocus sequence analysis for streptomycete systematics. *Int J Syst Evol Microbiol*. 58:149-159. <https://doi.org/>
- Hosaka T, Ohnishi-Kameyama M, Muramatsu H, Murakami K, Tsurumi Y, Kodani S, Yoshida M, F Akihiko, Ochi K. 2009. Antibacterial discovery in

- actinomycetes strains with mutations in RNA polymerase or ribosomal protein S12. *Nat Biotechnol.* 27(5). <https://doi.org/10.1038/nbt.1538>
- Hussain A, Rather MA, Dar MS, Dangroo NA, Aga MA, qayum A, Shah AM, Ahmad Z, Dar MJ, Hassan QP. 2018. *Streptomyces puniceus* strain AS13., Production, characterization and evaluation of bioactive metabolites: A new face of dinactin as an antitumor antibiotic. *Microbiol Res.* 207:196-202. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.12.004>
- Ivanova V, Oriol M, Montes M, García A, Guinea J. 2001. Secondary Metabolites from a *Streptomyces* Strain Isolated from Livingston Island, Antarctica. *Z Naturforsch.* 56:1-5.
- Jensen PR. 2016. Natural Products and the Gene Cluster Revolution. *Trends Microbiol.* 24(12). <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.07.006>
- Jin L, Zhao Y, Song W, Duan L, Jiang S, Wang X, Zhao J, Xiang W. 2019. *Streptomyces inhibens* sp. nov., a novel actinomycete isolated from rhizosphere soil of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Int J Syst Evol Microbiol* 69:688-695. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003204>
- Jolley KA, Bray JE, Maiden MCJ. 2018. Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications. *Wellcome Open Res* 3:124. <https://doi.org/10.12688/wellcomeopenres.14826.1>
- Jose PA, Jha B. 2016. New Dimensions of Research on Actinomycetes: Quest for Next Generation Antibiotics. *Front. Microbiol.* 7:1295. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01295>
- Kamjam M, Nopnakorn P, Zhang L, Peng F, Deng Z, Hong K. 2019. *Streptomyces polaris* sp. nov. and *Streptomyces septentrionalis* sp. nov.; isolated from frozen soil. *A Van Leeu* 112:375-387. <https://doi.org/10.1007/s10482-018-1166-x>
- Kämpfer, P. 2010. Genus I: *Streptomyces*, p. 1455-1767. In: Goodfellow M, Kämpfer P, Busse HJ, Trujillo ME, Suzuki KI, Ludwig W, Whitman WB (ed), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol 5., Springer-Verlag. 2083 p.
- Kaup O, Gräfen I, Zellermann E-M, Eichenlaub R, Gartemann K-H. 2005. Identification of a tomatinase in the tomato-pathogenic actinomycete *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* NCPPB382. *Mol Plant-Microbe Interact.* 18:1090–1098. <https://doi.org/10.1094/MPMI-18-1090>

- Kirby BM, Everest GJ, Meyers PR. 2010. Phylogenetic analysis of the genus *Kribbella* based on the *gyrB* gene: proposal of a *gyrB*-sequence threshold for species delineation in the genus *Kribbella*. *A Van Leeu* 97:131-142. <https://doi.org/10.1007/s10482-009-9393-9>
- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol Biol Evol* 35(6):1547-1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Labeda DP, Doroghazi JR, Ju KS, Metcalf WW. 2014. Taxonomic evaluation of *Streptomyces albus* and related species using multilocus sequence analysis and proposals to emend the description of *Streptomyces albus* and describe *Streptomyces pathocidini* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*. 64: 894-900. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.058107-0>
- Labeda DP. 2011. Multilocus sequence analysis of phytopathogenic species of the genus *Streptomyces*. *Int J Syst Evol Microbiol* 61:2525-2531. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.028514-0>
- Lambert S, Traxler MF, Craig M, Maciejewska M, Ongena M, Wezel GP, Kolter R, Rigali S. 2014. Altered desferrioxamine-mediated iron utilization is a common trait of bald mutants of *Streptomyces coelicolor*. *Metallomics* 6: 1390-1399. <https://doi.org/10.1039/c4mt00068d>
- Lamilla C, Braga D, Castro R, Guimarães C, Castilho LVA, Freire DMG, Barrientos L. 2018. *Streptomyces luridus* So3.2 from Antarctic soil as a novel producer of compounds with bioemulsification potential. *PLoS ONE* 13(4):e0196054. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196054>
- Lanoot B, Vancanneyt M, Dawyndt P, Cnockaert M, Zhang J, Huang Y, Liu Z, Swings J. 2004. BOX-PCR fingerprinting as a powerful tool to reveal synonymous names in the genus *Streptomyces*. emended descriptions are proposed for the species *Streptomyces cinereorectus*, *S. fradiae*, *S. tricolor*, *S. colombiensis*, *S. filamentosus*, *S. vinaceus* and *S. phaeopurpureus*. *Syst Appl Microbiol* 27:84–92. <https://doi.org/10.1078/0723-2020-00257>
- Laskaris P, Sekine T, Wellington EMH. 2012. Diversity Analysis of Streptomycetes and Associated Phosphotransferase Genes in Soil. *PLoS ONE* 7(4):e35756. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035756>

- Lavin PL, Yong ST, Wong CMVL, Stefano M. 2016. Isolation and characterization of Antarctic psychrotroph *Streptomyces* sp. strain INACH3013. *Antarct Sci.* <https://doi.org/10.1017/S0954102016000250>
- Lee L, Chan K, Stach J, Wellington EMH, Goh B. 2021. Editorial: The Search for Biological Active Agent(s) From Actinobacteria. *Front Microbiol* 9:824. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00824>
- Li J, Tian X, Zhu T, Yang L, Li W. 2011. *Streptomyces fildesensis* sp. nov., a novel streptomycetes isolated from Antarctic soil. *A van Leeu* 100:537-543. <https://doi.org/10.1007/s10482-011-9609-7>
- Liao L, Su S, Zhao B, Fan C, Zhang J, Li H, Chen B. 2019. Biosynthetic Potential of a Novel Antarctic Actinobacterium *Marisediminicola antarctica* ZS314T Revealed by Genomic Data Mining and Pigment Characterization. *Mar Drugs*. 17(388): <https://doi.org/10.3390/md17070388>
- Liu JT, Lu XL, Liu XY, Gao Y, Hu B, Jiao BH, Zheng H. 2013. Bioactive Natural Products from the Antarctic and Arctic Organisms. *Mini-Rev Med Chem*. 13:617-626. <https://doi.org/10.2174/1389557511313040013>
- Liu L, Wang Z, Yan X, Yang D, Zhu X, Shen B, Duan Y, Huang Y. 2018. Ribosome engineering and fermentation optimization leads to overproduction of tiancimycin A, a new enediyne natural product from *Streptomyces* sp. CB03234. *J Ind Microbiol Biotechnol* 45:141-151. <https://doi.org/10.1007/s10295-018-2014-8>
- Maiden MCJ, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russell JE, Urwin R, Zhang Q, Zhou J, Zurth K, Caugant DA, Feavers IM, Achtman M, Spratt BG. 1998. Multilocus sequence typing: A portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci*. 95(6):3140-<https://doi.org/3145>. [10.1073/pnas.95.6.3140](https://doi.org/10.1073/pnas.95.6.3140)
- Martinez A, Cavello I, Garmendia G, Rufo C, Cavalito S, Vero S. 2016. Yeasts from sub-Antarctic region: biodiversity, enzymatic activities and their potential as oleaginous microorganisms. *Extremophiles* 20:759–769. <https://doi.org/10.1007/s00792-016-0865-3>
- McNeil MM, Brown, JM. 1994. The medically important aerobic actinomycetes: epidemiology and microbiology. *Clin Microbiol Rev*. 7(3):357-417. <https://doi.org/10.1128/cmr.7.3.357>

- Medema MH, Blin K, Cimermancic P, Jager V, Zakrzewski P, Fischbach MA, Weber T, Takano E, Breitling R. 2011. antiSMASH: rapid identification, annotation and analysis of secondary metabolite biosynthesis gene clusters in bacterial and fungal genome sequences. *Nucleic Acids Res* 39:W339–W346. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr466>
- Millán-Aguiñaga N, Soldatou S, Brozio S, Munnoch JT, Howe J, Hoskisson PA, Duncan KR. 2019. Awakening ancient polar Actinobacteria: diversity, evolution and specialized metabolite potential. *Microbiol.* <https://doi.org/10.1099/mic.0.000845>
- Moncheva P, Tishkov S, Dimitrova N, Chipeva V, Antonova-Nikolova A, Bogatzevska N. 2002. Characteristics of Soil Actinomycetes from Antarctica. *J Cult Collec.* 3:3-14.
- Mulani MS, Kamble EE, Kumkar SG, Tware MS, Pardesi KR. 2019. Emerging Strategies to Combat ESKAPE Pathogens in the Era of Antimicrobial Resistance: A Review. *Front Microbiol.* <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00539>
- Nett M, Ikeda H, Moore BS. 2009. Genomic basis for natural product biosynthetic diversity in the actinomycetes. *Nat Prod Rep.* 26:1362-1384. <https://doi.org/10.1039/b817069j>
- Núñez-Montero K, Lamilla C, Abanto M, Maruyama F, Jorquera MA, Santos A, Martínez-Urtaza J, Barrientos L. 2019. Antarctic *Streptomyces fildesensis* So13.3 strain as a promising source for antimicrobials discovery. *Sci Rep.* 9:7488. <https://doi.org/10.1038/s4158-019-43960-7>
- O'Brien TF. 2002. Emergence, Spread, and Environmental Effect of Antimicrobial Resistance: How Use of an Antimicrobial Anywhere Can Increase Resistance to Any Antimicrobial Anywhere Else. *Clin Infect Dis.* 34:S78-84. <https://doi.org/10.1086/340244>
- Ochi K, Hosaka T. 2013. New strategies for drug discovery: activation of silent or weakly expressed microbial gene clusters. *Appl Microbiol Biotechnol.* 97:87-98. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4551-9>
- Ochi K, Tanaka Y, Tojo S. 2014. Activating the expression of bacterial cryptic genes by *rpoB* mutation in RNA polymerase or by rare earth elements. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 41:403-414. <https://doi.org/10.1007/s10295-013-1349-4>

- Ortega HE, Ferreira LLG, Melo WGP, Oliveira ANL, Alvarenga RFR, Lopes NPL, Andrécopulo AD, Pupo MT. 2019. Antifungal compounds from *Streptomyces* associated with attine ants also inhibit *Leishmania donovani*. PLoS Negl Trop Dis. 13(8):e0007643. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007643>
- Piao C, Ling L, Zhao J, Jin L, Jiang S, Guo X, Wang X, Xiang W. 2018. *Streptomyces urticae* sp. nov., isolated from rhizosphere soil of *Urtica urens* L. A Van Lee 111:1835-1843. <https://doi.org/10.1007/s10482-018-1072-2>
- Procópio REL, Silva, IR, Martins MK, Azevedo JL, Araújo, JM. 2012. Antibiotics produced by *Streptomyces*. Braz J Infect Dis. 16(5):466-71. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2012.08.014>
- Purves K, Macintyre L, Brennan D, Hreggviðsson GÓ, Kuttner E, Ásgeirsdóttir ME, Young LC, Green DH, Edrada-Ebel R, Duncan KR. 2016. Using molecular networking for microbial secondary metabolite bioprospecting. Metabolites 6:1-18. <https://doi.org/10.3390/metabo6010002>
- Quezada M, Licon-Cassani C, Cruz-Morales P, Salim AA, Marcellin E, Capon RJ, Barona-Gómez F. 2017. Diverse Cone-Snail Species Harbor Closely Related *Streptomyces* Species with Conserved Chemical and Genetic Profiles, Including Polycyclic Tetramic Acid Macrolactams. Front Microbiol 8:2305. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02305>
- Rigali S, Anderssen S, Naômé A, Wezel GP. 2018. Cracking the regulatory code of biosynthetic gene clusters as a strategy for natural product discovery. Biochem Pharmacol. 153:24-34. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2018.01.007>
- Santajit S, Indrawattana N. 2016. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. Biomed Res Int. <https://doi.org/10.1155/2016/2475067>
- Scambos TA, Hulbe C, Fahnestock M, Bohlander J. 2000. The link between climate warming and break-up of ice shelves in the Antarctic Peninsula. J Glaciol. 154(46):516-530. <https://doi.org/10.3189/172756500781833043>
- Scott HM, Acuff G, Bergeron G, Bourassa MW, Simjee S, Singer RS. 2019. Antimicrobial resistance in a One Health context: exploring complexities, seeking solutions, and communicating risks. Ann NY Acad Sci. 1441:3-7. <https://doi.org/10.1111/nyas.14057>
- Shentu XP, Cao ZY, Xiao Y, Tang G, Ochi Z, Yu XP. 2018. Substantial improvement of toyocamycin production in *Streptomyces*

- diastatochromogenes* by cumulative drug resistance mutations. PLoS ONE 13(8):e0203006. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203006>
- Shirling EB, Gottlieb D. 1966. Methods for Characterization of *Streptomyces* Species. Int J Syst Bacteriol 16(3):313-340.
- Silva NBS, Marques LA, Röder DDB. 2020. Antibiofilm Activity of Natural Products: Promising Strategies for Combating Microbial Biofilms. Ann Public Health Reports 4(1):92-99. <https://doi.org/10.36959/856/502>
- Silver LL. 2011. Challenges of Antibacterial Discovery. Clin Microbiol Rev. 24:71-109. <https://doi.org/10.1128/CMR.00030-10>
- Sivalingam P, Hong K, Pote J, Prabakar K. 2019. Extreme Environment *Streptomyces*: Potential Sources for New Antibacterial and Anticancer Drug Leads? Int J Microbiol. <https://doi.org/10.1155/2019/5283948>
- Srinivasan R, Karaoz U, Volegova M, MacKichan J, Kadori-Maeda M, Nadarajan R, Brodie EL, Lynch SV. 2015. Use of 16S rRNA Gene for Identification of a Broad Range of Clinically Relevant Bacterial Pathogens. PLOS ONE 10(2):e0117617. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117617>
- Tanaka Y, Kasahara K, Hirose Y, Murakami K, Kugimiya R, Ochi K. 2013. Activation and Products of the Cryptic Secondary Metabolite Biosynthetic Gene Clusters by Rifampin Resistance (*rpoB*) Mutations in Actinomycetes. J Bacteriol. 195(13):2959-2970. <https://doi.org/10.1128/JB.00147-13>
- Tang Y, Sattler I, Thiericke R, Grabley S. 2000. Feigrisolides A, B, C and D, New Lactones with Antibacterial Activities from *Streptomyces griseus*. J Antibiot 53:934-943. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.53.934>
- Tanvir R, Sajid I, Hasnain S. 2014. Larvicidal potential of Asteraceae family endophytic actinomycetes against *Culex quinquefasciatus* mosquito larvae. Nat Prod Res. 28(22):2048–52. <https://doi.org/10.1080/14786419.2014.919579>
- Thakur S, Gray GC. 2019. The Mandate for a Global “One Health” Approach to Antimicrobial Resistance Surveillance. Am J Trop Med Hyg. 100(2):227-228. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.18-0973>
- Thompson CC, Thompson FL, Vandemeulebroecke K, Hoste B, Dawyndt P, Swings J. 2004. Use of *recA* as an alternative phylogenetic marker in the family Vibrionaceae. Int J Syst Evol Microbiol 54:919-924. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02963-0>

- Urem M, Swiątek-Połatynska MA, Rigali S, Wezel GP. 2016. Intertwining nutrient-sensory networks and the control of antibiotic production in *Streptomyces*. *Mol Microbiol* 102:183-195. <https://doi.org/10.1111/mmi.13464>
- Ventura M, Canchaya C, Tauch A, Chandra G, Fitzgerald GF, Chater KF, Sinderen D. 2007. Genomics of Actinobacteria: tracing the evolutionary history of an ancient phylum. *Microbiol Mol Bio Ver.* 71(3):495-48. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00005-07>
- Vikesland P, Garner E, Gupta S, Kang S, Maile-Moskowitz A, Zhu N. 2019. Differential Drivers of Antimicrobial Resistance across the World. *Acc Chem Res.* 52:916–924. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.8b00643>
- WHO – World Health Organization, 2015. Global Antimicrobial Resistance Surveillance System.
- WHO – World Health Organization. 2014. Antimicrobial resistance: global report on surveillance. Geneva:
- Wright GD. 2019. Unlocking the potential of natural products in drug discovery. *Microbial Biotechnol.* 12(1):55-57. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13351>
- Yang A, Yen C. 2012. PCR optimization of BOX-A1R PCR for microbial source tracking of *Escherichia coli* in waterways. *JEMI*16:58–89
- Yang C, Qian R, Xu Y, Yi J, Gu Y, Liu X, Yu H, Jiao B, Lu X, Zhang W. 2019. Marine Actinomycetes derived Natural Products. *Curr Top Med Chem* 19:2868-2918. <https://doi.org/10.2174/1568026619666191114102359>
- Yi JS, Kim M, Kim S, Kim B. 2015. Effects of Sucrose, Phosphate, and Calcium Carbonate on the Production of Pikromycin from *Streptomyces venezuelae*. *J Microbiol Biotechnol* 25:496-502. <http://dx.doi.org/10.4014/jmb.1409.09009>
- Yoon S, Ha S, Kwon S, Lim J, Kim Y, Seo H, Chun J. 2017. Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genomes assemblies. *Int J Syst Evol Microbiol* 67:1613-1617. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001755>
- Zankari E, Hasman H, Cosentino S, Vestergaard M, Rasmussen S, Lund O, Aarestrup FM, Larsen MV. 2012; Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *J Antimicrob Chemoter* 67:2640-2644. <https://doi.org/10.1093/jac/dks261>
- Zhang Z, Li C, Hao J, Li Y, Li D, Zhang D, Xing X, Liang Y. 2020. A Novel *Streptomyces* sp. Strain PSSH9 for Controlling Potato Common Scab

Caused by *Streptomyces galilaeus*. Plant Dis. <https://doi.org/10.1094/PDIS-07-19-1469-RE>

Zhu H, Sandiford SK, Wezel GP. 2014. Triggers and cues that activate antibiotic production by actinomycetes. J Ind Microbiol Biotechnol. 41:371-386. <https://doi.org/10.1007/s10295-013-1309-z>

9. APÊNDICES

9.1 Resultados por isolado

Visando facilitar futuros estudos que façam uso dos isolados obtidos neste doutorado, seguem abaixo os resultados de cada estreptomiceto de forma simplificada e resumida.

LMA323ST_1

Ilha Rei George: ponto 58

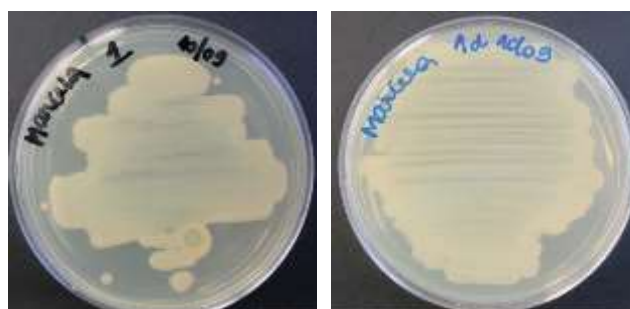
62°19'58.47S, 58°95.83.33W

Meio de cultivo: ACA

BOX: grupo B

REP: sem grupo

ST 31



YME

Identificação molecular

| Gene | T (bp) | Nº acesso | Id (%) | Espécie |
|-------------|--------|-----------|--------|---|
| 16S EzBio | 1161 | - | 97,96 | <i>S. fulvissimus</i> |
| 16S GBank | 1161 | MW055589 | 97,19 | <i>S. lunaelactis</i> , <i>S. globisporus</i> , <i>S. griseus</i> |
| <i>rpoB</i> | 790 | MZ613357 | 99 | <i>S. praecox</i> |
| <i>recA</i> | 826 | MZ575663 | 99 | <i>S. praecox</i> |
| <i>atpD</i> | 834 | MZ566574 | 93 | <i>Streptomyces</i> sp. |
| <i>trpB</i> | 759 | MZ645877 | 100 | <i>S. longispororuber</i> |
| <i>gyrB</i> | 989 | MZ596363 | 97 | <i>S. anulatus</i> |

Atividade antimicrobiana: Não avaliada

Compostos produzidos: Não pesquisado

LMA323ST_2

Ilha Rei George: ponto 58

62°19'58.47S, 58°95.83.33W

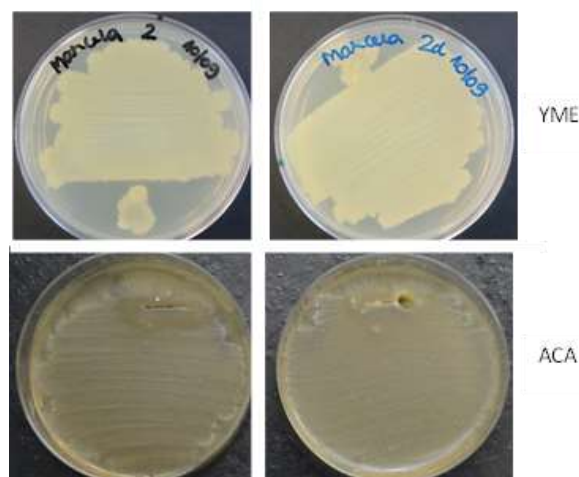
Meio de cultivo: ACA

BOX: grupo B

Menor nº de fragmentos

REP: grupo 4

ST 31



Identificação molecular

| Gene | T (pb) | Nº acesso | Id (%) | Espécie |
|-------------|--------|-----------|--------|---|
| 16S EzBio | 1281 | - | 96,23 | <i>S. globisporus</i> |
| 16S GBank | 1281 | MT612461 | 95,57 | <i>S. globisporus</i> , <i>S. griseus</i> |
| <i>RpoB</i> | 788 | MZ613358 | 99 | <i>S. praecox</i> |
| <i>RecA</i> | 827 | MZ575664 | 99 | <i>S. praecox</i> |
| <i>AtpD</i> | 859 | MZ566575 | 94 | <i>Streptomyces</i> sp. |
| <i>TrpB</i> | 759 | MZ645878 | 98 | <i>S. praecox</i> |
| <i>GyrB</i> | 996 | MZ596364 | 98 | <i>S. anulatus</i> |

Atividade antimicrobiana em porcentagem de inibição

| | Extrato | | Meio | | | |
|-------|------------------------------|-----------|------|-------|-------|-------|
| | Extrato | Meio | MRSA | MSSA | CA | AF |
| Duetz | CA-300226-a01-MO006 | KHC | 99,3 | 100 | 56,7 | 46 |
| | CA-300226-a01-MO007 | M016 | 0 | 0 | 90,1 | 88,6 |
| | CA-300226-a01-MO009 | RAM2-P V2 | 22,7 | 46,8 | 99,5 | 69 |
| | CA-300226-a01-MO010 | SAM-6 | 100 | 100 | 91,8 | 91,5 |
| | CA-300275-a01-MO006 | KHC | 93,2 | 99,1 | 0 | 13,6 |
| | CA-300275-a01-MO007 | M016 | 0 | 9,5 | 95,3 | 71 |
| | CA-300275-a01-MO009 | RAM2-P V2 | 73,6 | 100 | 97,4 | 84 |
| | CA-300275-a01-MO010 | SAM-6 | 40,4 | 100 | 95,8 | 94 |
| EPA | Extrato | | Meio | | | |
| | Extrato | Meio | AF | CA | CG | CP |
| | CA-300226-a01-MO012-EC01-a01 | SAM-6 | 84,8 | 99,1 | 98,93 | 31,99 |
| | CA-300275-a01-MO011-EC01-a01 | RAM2-P V2 | 49 | 82,65 | 99,73 | 33,6 |

Compostos produzidos: Feigrisolide C e D, Skyllamicin A, Alteramide A e B

LMA323ST_3

Península Antártica: ponto Brown II

64°82'34S, 62°85'73.83W

Meio de cultivo: ACA

BOX: grupo B

REP: grupo 5

ST 38



YME

Identificação molecular

| Gene | T (pb) | Nº acesso | Id (%) | Espécie |
|-------------|--------|-----------|--------|---|
| 16S EzBio | 1168 | - | 97,70 | <i>S. fulvissimus</i> |
| 16S GBank | 1168 | MT612462 | 97,19 | <i>S. lunaelactis</i> , <i>S. globisporus</i> , <i>S. griseus</i> |
| <i>rpoB</i> | 786 | MZ613359 | 99 | <i>S. fulvissimus</i> |
| <i>recA</i> | 828 | MZ575665 | 98 | <i>S. fulvissimus</i> |
| <i>atpD</i> | 851 | MZ566576 | 96 | <i>Streptomyces</i> sp. |
| <i>trpB</i> | 760 | MZ645879 | 98 | <i>S. fulvissimus</i> |
| <i>gyrB</i> | 995 | MZ596365 | 99 | <i>S. fulvissimus</i> |

Atividade antimicrobiana em porcentagem de inibição

| | Extrato | | Meio | MRSA | MSSA | CA | AF |
|-------|------------------------------|-----------|------|-------|-------|-------|-------|
| | | | | | | | |
| Duetz | CA-300227-a01-MO004 | DNPM | | 92,6 | 99,3 | 98,2 | 62,9 |
| | CA-300227-a01-MO006 | KHC | | 99,9 | 100 | 0 | 35,2 |
| | CA-300227-a01-MO009 | RAM2-P V2 | | 82,4 | 98,8 | 94,9 | 55,4 |
| | CA-300276-a01-MO004 | DNPM | | 61,5 | 99,3 | 97,1 | 74,7 |
| | CA-300276-a01-MO006 | KHC | | 99,8 | 93,9 | 0 | 61,2 |
| | CA-300276-a01-MO009 | RAM2-P V2 | | 99 | 100 | 96,2 | 51,4 |
| EPA | Extrato | | Meio | AF | CA | CG | CP |
| | CA-300227-a01-MO012-EC01-a01 | RAM2-P V2 | | 81,4 | 92,47 | 99,47 | 75,89 |
| | CA-300276-a01-MO012-EC01-a01 | RAM2-P V2 | | 87,64 | 89,12 | 98,67 | 59,6 |

Compostos produzidos: Maltophilin, Feigrisolide C e D, Alteramide A e B

LMA323ST_4

Península Antártica: ponto Brown II

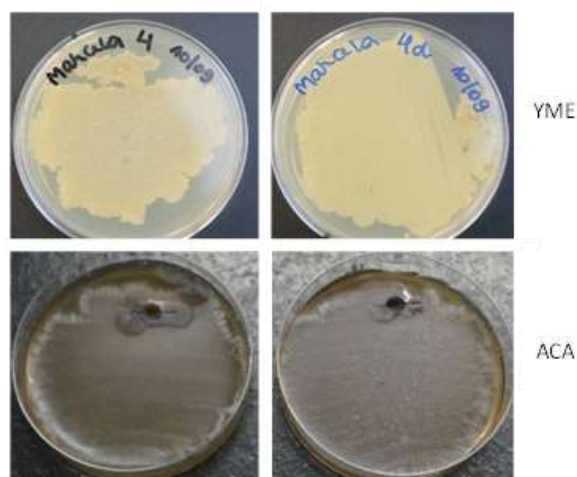
64°82'34S, 62°85'73.83W

Meio de cultivo: ACA

BOX: grupo A, subgrupo 1

REP: grupo 5

ST 38



Identificação molecular

| Gene | T (pb) | Nº acesso | Id (%) | Espécie |
|-------------|--------|-----------|--------|-----------------------------------|
| 16S EzBio | 1260 | - | 95,50 | <i>S. griseus</i> |
| 16S GBank | 1260 | MW055590 | 94,19 | <i>S. globisporus, S. griseus</i> |
| <i>rpoB</i> | 788 | MZ613360 | 99 | <i>S. fulvissimus</i> |
| <i>recA</i> | 808 | MZ575666 | 96 | <i>Streptomyces</i> sp. |
| <i>atpD</i> | 855 | MZ566577 | 94 | <i>Streptomyces</i> sp. |
| <i>trpB</i> | 759 | MZ645880 | 98 | <i>S. fulvissimus</i> |
| <i>gyrB</i> | 988 | MZ596366 | 98 | <i>S. fulvissimus</i> |

Atividade antimicrobiana em porcentagem de inibição

| | Extrato | | Meio | MRSA | MSSA | CA | AF |
|---------------------|------------------------------|---------------------|------|------|-------|-------|-------|
| | Duetz | CA-300228-a01-MO004 | DNPM | | 22,7 | 99,1 | 94,2 |
| CA-300228-a01-MO006 | | KHC | | 100 | 100 | 0 | 35,8 |
| CA-300228-a01-MO007 | | M016 | | 0 | 0 | 95,9 | 39,9 |
| CA-300228-a01-MO009 | | RAM2-P V2 | | 99,5 | 99,3 | 89,6 | 75,3 |
| CA-300228-a01-MO010 | | SAM-6 | | 0 | 23 | 93,4 | 83,2 |
| CA-300277-a01-MO004 | | DNPM | | 24,4 | 98,8 | 94,7 | 64,4 |
| CA-300277-a01-MO006 | | KHC | | 100 | 100 | 0 | 41,1 |
| EPA | Extrato | | Meio | AF | CA | CG | CP |
| | CA-300228-a01-MO011-EC01-a01 | RAM2-P V2 | | 79,7 | 95,57 | 99,47 | 76,16 |

Compostos produzidos: Feigrisolide C e D

LMA323ST_5

Península Antártica: ponto Brown II

64°82'34S, 62°85'73.83W

Meio de cultivo: ACA

BOX: grupo A, subgrupo 1

REP: grupo 5

ST 38



YME

Identificação molecular

| Gene | T (pb) | Nº acesso | Id (%) | Espécie |
|-------------|--------|-----------|--------|---|
| 16S EzBio | 1259 | - | 98,12 | <i>S. fulvissimus</i> |
| 16S GBank | 1259 | MW055591 | 97,55 | <i>S. globisporus</i> , <i>S. griseus</i> |
| <i>rpoB</i> | 786 | MZ613361 | 99 | <i>S. fulvissimus</i> |
| <i>recA</i> | 828 | MZ575667 | 98 | <i>S. fulvissimus</i> |
| <i>atpD</i> | 856 | MZ566578 | 97 | <i>S. puniscabiei</i> , <i>S. luridiscabiei</i> |
| <i>trpB</i> | 760 | MZ645881 | 98 | <i>S. fulvissimus</i> |
| <i>gyrB</i> | 997 | MZ596367 | 99 | <i>S. fulvissimus</i> |

Atividade antimicrobiana: Não avaliada

Compostos produzidos: Não pesquisado

LMA323ST_6

Península Antártica: ponto Brown II

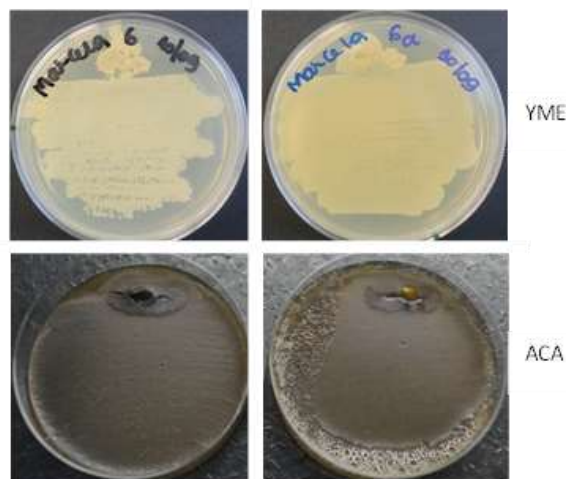
64°82'34S, 62°85'73.83W

Meio de cultivo: ACA

BOX: grupo B

REP: grupo 5

ST 38



Identificação molecular

| Gene | T (pb) | Nº acesso | Id (%) | Espécie |
|-------------|--------|-----------|--------|---|
| 16S EzBio | 1270 | - | 99,35 | <i>S. fulvissimus</i> |
| 16S GBank | 1270 | MT612463 | 98,82 | <i>S. globisporus</i> , <i>S. griseus</i> |
| <i>rpoB</i> | 785 | MZ613362 | 99 | <i>S. fulvissimus</i> |
| <i>recA</i> | 825 | MZ575668 | 98 | <i>S. fulvissimus</i> |
| <i>atpD</i> | 853 | MZ566579 | 98 | <i>S. fulvissimus</i> |
| <i>trpB</i> | 759 | MZ645882 | 98 | <i>S. fulvissimus</i> |
| <i>gyrB</i> | 996 | MZ596368 | 98 | <i>S. fulvissimus</i> |

Atividade antimicrobiana em porcentagem de inibição

| | Extrato | | Meio | MRSA | MSSA | CA | AF |
|-------|------------------------------|-----------|------|------|------|------|------|
| | | | | | | | |
| Duetz | CA-300230-a01-MO014 | DNPM | | 31,6 | 99,2 | 94,8 | 63,1 |
| | CA-300230-a01-MO016 | KHC | | 99,8 | 99,1 | 0 | 45,8 |
| | CA-300230-a01-MO019 | RAM2-P V2 | | 83,3 | 99,4 | 90,2 | 73,2 |
| | CA-300230-a01-MO020 | SAM-6 | | 11,2 | 68 | 79,5 | 23,7 |
| | CA-300279-a01-MO014 | DNPM | | 82,3 | 99,1 | 90,9 | 62,9 |
| | CA-300279-a01-MO016 | KHC | | 99,6 | 98,4 | 0 | 38,1 |
| | CA-300279-a01-MO019 | RAM2-P V2 | | 4,6 | 23,7 | 98,1 | 44,7 |
| | CA-300279-a01-MO020 | SAM-6 | | 36,5 | 91,5 | 52,1 | 38,4 |
| EPA | Extrato | | Meio | AF | CA | CG | CP |
| | CA-300230-a01-MO022-EC01-a01 | RAM2-P V2 | | | | | |

Compostos produzidos: Feigrisolide C e D

LMA323ST_7

Península Antártica: ponto Brown II

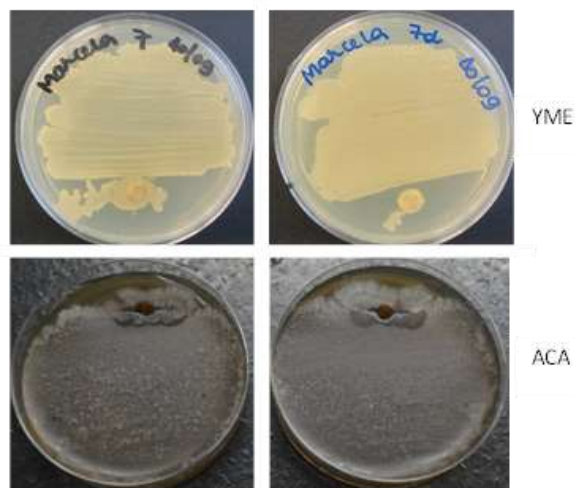
64°82'34S, 62°85'73.83W

Meio de cultivo: ACA

BOX: grupo A, subgrupo 1

REP: grupo 5

ST 38



YME

ACA

Identificação molecular

| Gene | T (pb) | Nº acesso | Id (%) | Espécie |
|-------------|--------|-----------|--------|---|
| 16S EzBio | 1271 | - | 99,51 | <i>S. fulvissimus</i> |
| 16S GBank | 1271 | MW055592 | 99,14 | <i>S. globisporus</i> , <i>S. griseus</i> |
| <i>rpoB</i> | 787 | MZ613363 | 99 | <i>S. fulvissimus</i> |
| <i>recA</i> | 828 | MZ575669 | 98 | <i>S. fulvissimus</i> |
| <i>atpD</i> | 857 | MZ566580 | 96 | <i>Streptomyces</i> sp. |
| <i>trpB</i> | 760 | MZ645883 | 98 | <i>S. fulvissimus</i> |
| <i>gyrB</i> | 1003 | MZ596369 | 99 | <i>S. fulvissimus</i> |

Atividade antimicrobiana em porcentagem de inibição

| | Extrato | Meio | Atividade antimicrobiana (%) | | | |
|-------|---------------------|-----------|------------------------------|------|------|------|
| | | | MRSA | MSSA | CA | AF |
| Duetz | CA-300231-a01-MO004 | DNPM | 7,9 | 35,2 | 89 | 46,3 |
| | CA-300231-a01-MO006 | KHC | 99,9 | 98,8 | 57 | 17,6 |
| | CA-300231-a01-MO010 | SAM-6 | 9,8 | 74,8 | 56,6 | 0 |
| | CA-300280-a01-MO001 | APM9 | 91,4 | 98,5 | 0 | 0 |
| | CA-300280-a01-MO004 | DNPM | 13,5 | 35,3 | 73,2 | 70,6 |
| | CA-300280-a01-MO006 | KHC | 100 | 98,8 | 0 | 55,7 |
| | CA-300280-a01-MO009 | RAM2-P V2 | 99,6 | 99 | 91,3 | 77,5 |

Compostos produzidos: Não pesquisado

LMA323ST_8

Península Antártica: ponto Brown II

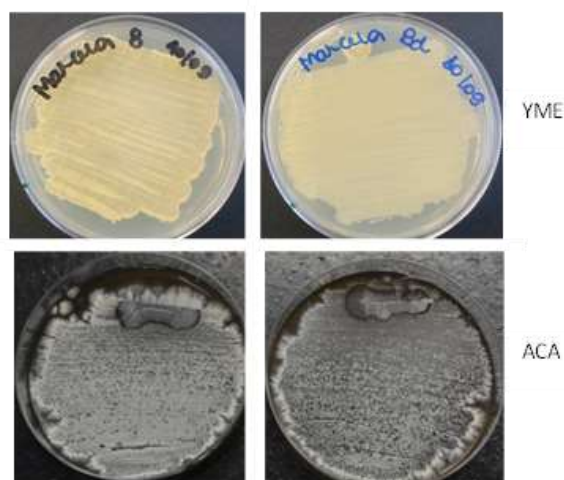
64°82'34S, 62°85'73.83W

Meio de cultivo: ACA

BOX: grupo B

REP: grupo 4

ST 38



Identificação molecular

| Gene | T (pb) | Nº acesso | Id (%) | Espécie |
|-------------|--------|-----------|--------|---|
| 16S EzBio | 1263 | - | 99,92 | <i>S. fulvissimus</i> |
| 16S GBank | 1263 | MW055593 | 98,74 | <i>S. globisporus</i> , <i>S. griseus</i> |
| <i>rpoB</i> | 788 | MZ613364 | 99 | <i>S. fulvissimus</i> |
| <i>recA</i> | 827 | MZ575670 | 98 | <i>S. fulvissimus</i> |
| <i>atpD</i> | 856 | MZ566581 | 90 | <i>Streptomyces</i> sp. |
| <i>trpB</i> | 760 | MZ645884 | 97 | <i>S. fulvissimus</i> |
| <i>gyrB</i> | 1006 | MZ596370 | 98 | <i>S. fulvissimus</i> |

Atividade antimicrobiana em porcentagem de inibição

| | Extrato | Meio | Atividade antimicrobiana (%) | | | |
|-------|---------------------|-----------|------------------------------|------|------|------|
| | | | MRSA | MSSA | CA | AF |
| Duetz | CA-300232-a01-MO014 | DNPM | 0 | 17,1 | 99 | 94,2 |
| | CA-300232-a01-MO016 | KHC | 100 | 100 | 100 | 75,3 |
| | CA-300232-a01-MO020 | SAM-6 | 5,8 | 14,8 | 98,4 | 30,1 |
| | CA-300281-a01-MO011 | APM9 | 82,9 | 99,2 | 24 | 0 |
| | CA-300281-a01-MO014 | DNPM | 0 | 7,2 | 95,6 | 97,9 |
| | CA-300281-a01-MO016 | KHC | 100 | 100 | 0 | 28,7 |
| | CA-300281-a01-MO019 | RAM2-P V2 | 5,4 | 3 | 98,2 | 92,3 |

Compostos produzidos: Não pesquisado

LMA323ST_9

Península Antártica: ponto Brown II

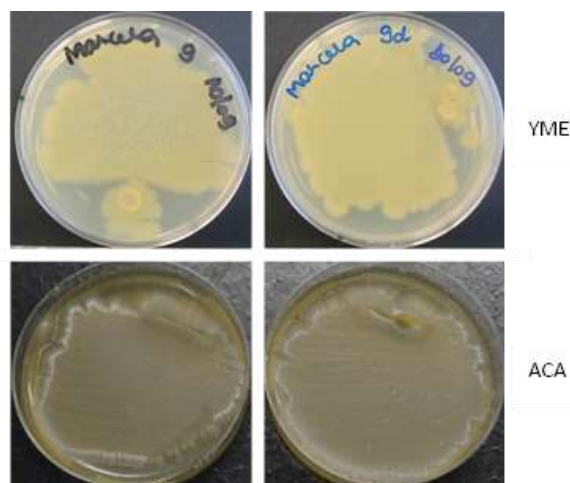
64°82'34S, 62°85'73.83W

Meio de cultivo: ACA

BOX: grupo B

REP: grupo 4

ST 31



YME

ACA

Identificação molecular nova espécie?

| Gene | T (pb) | Nº acesso | Id (%) | Espécie |
|-------------|--------|-----------|--------|-------------------------|
| 16S EzBio | 1474 | - | 85,96 | <i>S. yanii</i> |
| 16S GBank | 1474 | MW055594 | 88,64 | <i>S. globisporus</i> |
| <i>rpoB</i> | 788 | MZ613365 | 99 | <i>S. praecox</i> |
| <i>recA</i> | 827 | MZ575671 | 99 | <i>S. praecox</i> |
| <i>atpD</i> | 858 | MZ566582 | 96 | <i>Streptomyces</i> sp. |
| <i>trpB</i> | 759 | MZ645885 | 98 | <i>S. praecox</i> |
| <i>gyrB</i> | 992 | MZ596371 | 98 | <i>S. anulatus</i> |

Atividade antimicrobiana em porcentagem de inibição

| | Extrato | | Meio | MRSA | MSSA | CA | AF |
|---------------------|------------------------------|---------------------|------|------|-------|------|-------|
| | Duetz | CA-300233-a01-MO004 | DNPM | | 3,9 | 97,9 | 97,8 |
| CA-300233-a01-MO006 | | KHC | | 99,6 | 97,4 | 0 | 35,6 |
| CA-300233-a01-MO009 | | RAM2-P V2 | | 100 | 99 | 97,4 | 87,7 |
| CA-300233-a01-MO010 | | SAM-6 | | 99,8 | 98,7 | 94,8 | 52,8 |
| CA-300282-a01-MO004 | | DNPM | | 3,4 | 98,5 | 98,3 | 80,3 |
| CA-300282-a01-MO006 | | KHC | | 99,2 | 97,3 | 0 | 30,5 |
| CA-300282-a01-MO009 | | RAM2-P V2 | | 93,4 | 99,5 | 99,5 | 86,3 |
| CA-300282-a01-MO010 | | SAM-6 | | 99,5 | 100 | 89,3 | 47,6 |
| EPA | Extrato | | Meio | AF | CA | CG | CP |
| | CA-300233-a01-MO011-EC01-a01 | RAM2-P V2 | | 9,1 | 0 | 100 | 38,99 |
| | CA-300233-a01-MO014-EC01-a01 | SAM-6 | | 8 | 72,35 | 99,6 | 31,35 |
| | CA-300282-a01-MO011-EC01-a01 | RAM2-P V2 | | 10,4 | 0 | 100 | 37,4 |

Compostos produzidos: Maltophilin, Alteramide A e B, Feigrisolide C e D

LMA323ST_10

Península Antártica: ponto Brown II

64°82'34S, 62°85'73.83W

Meio de cultivo: ACA

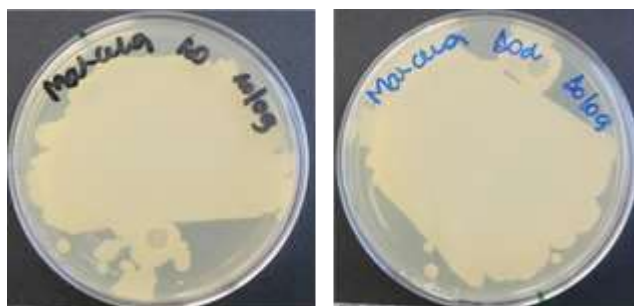
BOX: grupo A, subgrupo 1

REP: grupo 4

Menor nº de fragmentos

Similar ao LMA323St_12 no BOX e no REP

ST 38



YME

Identificação molecular

| Gene | T (pb) | Nº acesso | Id (%) | Espécie |
|-------------|--------|-----------|--------|---|
| 16S EzBio | 1166 | - | 99,56 | <i>S. fulvissimus</i> |
| 16S GBank | 1166 | MW055595 | 99,15 | <i>S. lunaelactis</i> , <i>S. globisporus</i> , <i>S. griseus</i> |
| <i>rpoB</i> | 789 | MZ613366 | 98 | <i>S. praecox</i> |
| <i>recA</i> | 830 | MZ575672 | 97 | <i>S. fulvissimus</i> |
| <i>atpD</i> | 861 | MZ566583 | 85 | <i>Streptomyces</i> sp. |
| <i>trpB</i> | 760 | MZ645886 | 97 | <i>S. fulvissimus</i> |
| <i>gyrB</i> | 497 | MZ596372 | 94 | <i>Streptomyces</i> sp. |

Atividade antimicrobiana: Não avaliada

Compostos produzidos: Não pesquisado

LMA323ST_11

Ilha Rei George: ponto CI

62°20'11.96S, 58°96'19.98W

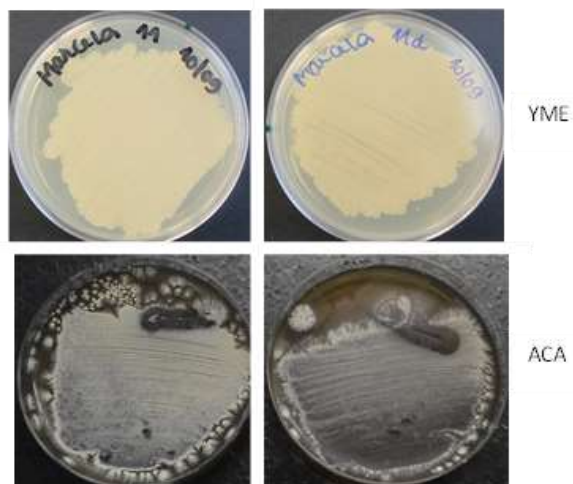
Meio de cultivo: ACA

BOX: grupo B

REP: grupo 4

Menor nº de fragmentos

ST 38



Identificação molecular

| Gene | T (pb) | Nº acesso | Id (%) | Espécie |
|-------------|--------|-----------|--------|---|
| 16S EzBio | 1263 | - | 97,22 | <i>S. globisporus</i> |
| 16S GBank | 1263 | MW055596 | 96,70 | <i>S. globisporus</i> , <i>S. griseus</i> |
| <i>rpoB</i> | 783 | MZ613367 | 97 | <i>S. fulvissimus</i> |
| <i>recA</i> | 828 | MZ575673 | 98 | <i>S. fulvissimus</i> |
| <i>atpD</i> | 860 | MZ566584 | 95 | <i>Streptomyces</i> sp. |
| <i>trpB</i> | 759 | MZ645887 | 98 | <i>S. fulvissimus</i> |
| <i>gyrB</i> | 990 | MZ596373 | 97 | <i>S. fulvissimus</i> |

Atividade antimicrobiana: Não avaliada

Compostos produzidos: Não pesquisado

LMA323St_12

Ilha Rei George: ponto CII

62°20'05.98S, 58°96'37.68W

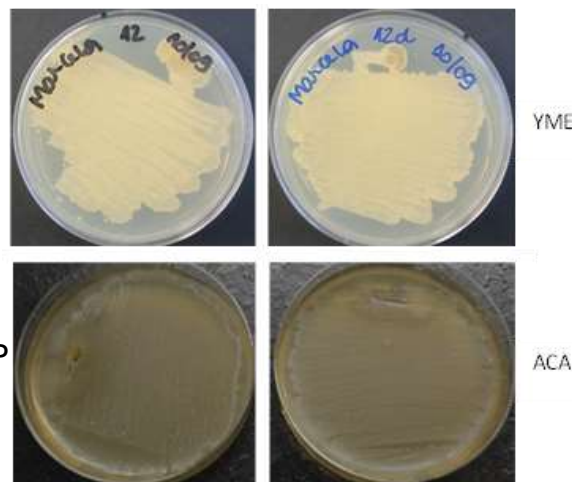
Meio de cultivo: ACA

BOX: grupo A, subgrupo 1

REP: grupo 4

Similar ao LMA323St_10 no BOX e no REP

ST 38



Identificação molecular

| Gene | T (pb) | Nº acesso | Id (%) | Espécie |
|-------------|--------|-----------|--------|-------------------------|
| 16S EzBio | 1258 | - | 97,71 | <i>S. urticae</i> |
| 16S GBank | 1258 | MW055597 | 96,91 | <i>S. fildesensis</i> |
| <i>rpoB</i> | 785 | MZ613368 | 97 | <i>S. fulvissimus</i> |
| <i>recA</i> | 815 | MZ575674 | 97 | <i>S. fulvissimus</i> |
| <i>atpD</i> | 855 | MZ566585 | 80 | <i>Streptomyces</i> sp. |
| <i>trpB</i> | 760 | MZ645888 | 98 | <i>S. fulvissimus</i> |
| <i>gyrB</i> | 1014 | MZ596374 | 89 | <i>Streptomyces</i> sp. |

Atividade antimicrobiana em porcentagem de inibição

| | Extrato | | Meio | MRSA | MSSA | CA | AF |
|---------------------|------------------------------|---------------------|------|------|-------|-------|-------|
| | Duetz | CA-300236-a01-MO014 | DNPM | | 98,7 | 95,3 | 94,5 |
| CA-300236-a01-MO016 | | KHC | | 100 | 99,9 | 0 | 54,1 |
| CA-300236-a01-MO019 | | RAM2-P V2 | | 98,9 | 100 | 98,4 | 80,5 |
| CA-300236-a01-MO020 | | SAM-6 | | 99,9 | 100 | 81,3 | 36,8 |
| CA-300285-a01-MO014 | | DNPM | | 100 | 98,9 | 99,6 | 92,8 |
| CA-300285-a01-MO016 | | KHC | | 100 | 98,9 | 0 | 56,3 |
| CA-300285-a01-MO019 | | RAM2-P V2 | | 98,6 | 98,4 | 97,5 | 91,6 |
| CA-300285-a01-MO020 | | SAM-6 | | 99,3 | 100 | 89,1 | 45,9 |
| EPA | Extrato | | Meio | AF | CA | CG | CP |
| | CA-300236-a01-MO023-EC01-a01 | RAM2-P V2 | | 93,2 | 99,08 | 99,47 | 99,2 |
| | CA-300285-a01-MO022-EC01-a01 | RAM2-P V2 | | 7,9 | 0 | 99,61 | 32,59 |

Compostos: Maltophilin, Norcardamine, Alteramide A e B, Feigrisolide C e D

LMA323ST_13

Ilha Rei George: ponto CII

62°20'05.98S, 58°96'37.68W

Meio de cultivo: ACA

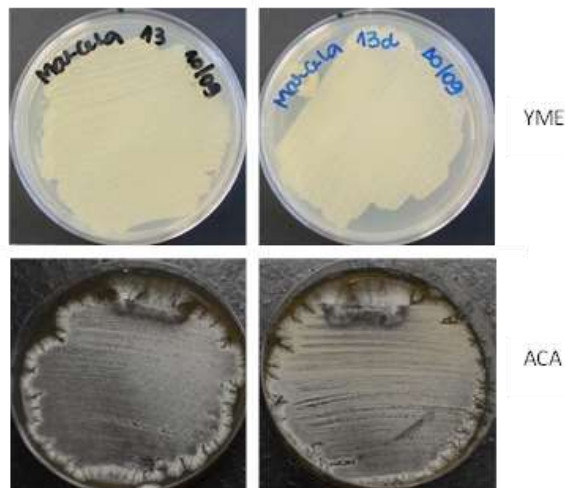
BOX: grupo A, subgrupo 1

REP: grupo 4

Similar a LMA323St_16, LMA323St_17

e LMA323St_19 no BOX e REP

ST não definida



YME

ACA

Identificação molecular

| Gene | T (pb) | Nº acesso | Id (%) | Espécie |
|-------------|--------|-----------|--------|-------------------------|
| 16S EzBio | 1254 | - | 95,39 | <i>S. urticae</i> |
| 16S GBank | 1254 | MW055598 | 94,39 | <i>S. fildesensis</i> |
| <i>rpoB</i> | 713 | MZ613369 | 92 | <i>Streptomyces</i> sp. |
| <i>recA</i> | 828 | MZ575675 | 98 | <i>S. fildesensis</i> |
| <i>atpD</i> | 853 | MZ566586 | 91 | <i>Streptomyces</i> sp. |
| <i>trpB</i> | 759 | MZ645889 | 97 | <i>S. fildesensis</i> |
| <i>gyrB</i> | 993 | MZ596375 | 93 | <i>Streptomyces</i> sp. |

Atividade antimicrobiana: Não avaliada

Compostos produzidos: Não pesquisado

LMA323ST_14

Ilha Rei George: ponto CII

62°20'05.98S, 58°96'37.68W

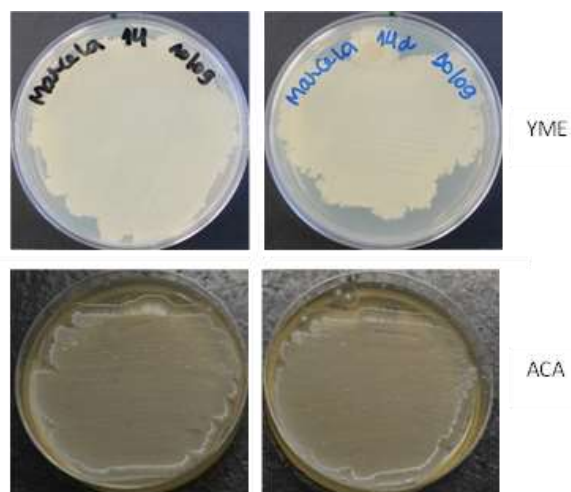
Meio de cultivo: ACA

BOX: grupo A, subgrupo 1

REP: grupo 4

Menor nº de fragmentos

ST 31



YME

ACA

Identificação molecular

| Gene | T. (pb) | Nº acesso | Id (%) | Espécie |
|-------------|---------|-----------|--------|---|
| 16S EzBio | 1260 | - | 99,35 | <i>S. fulvissimus</i> |
| 16S GBank | 1260 | MW055599 | 98,66 | <i>S. globisporus</i> , <i>S. griseus</i> |
| <i>rpoB</i> | 788 | MZ613370 | 98 | <i>S. praecox</i> |
| <i>recA</i> | 822 | MZ575676 | 98 | <i>S. praecox</i> |
| <i>atpD</i> | 853 | MZ566587 | 96 | <i>Streptomyces</i> sp. |
| <i>trpB</i> | 760 | MZ645890 | 97 | <i>S. praecox</i> |
| <i>gyrB</i> | 997 | MZ596376 | 99 | <i>S. anulatus</i> , <i>S. praecox</i> |

Atividade antimicrobiana: Não avaliada

Compostos produzidos: Não pesquisado

LMA323ST_15

Ilha Rei George: ponto CII

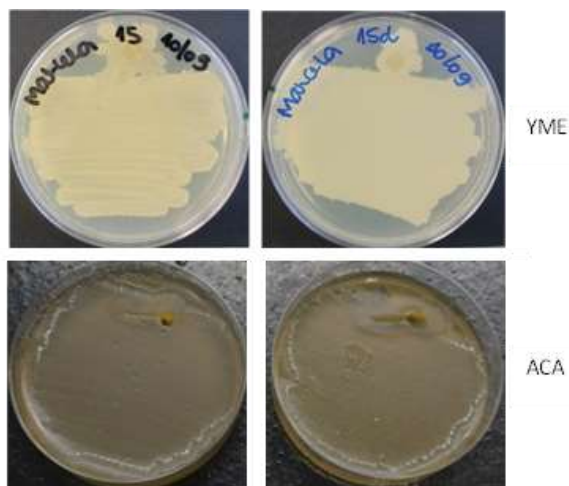
62°20'05.98S, 58°96'37.68W

Meio de cultivo: ACA

BOX: grupo B

REP: grupo 4

ST 31



YME

ACA

Identificação molecular

| Gene | T (pb) | Nº acesso | Id (%) | Espécie |
|-------------|--------|-----------|--------|---|
| 16S EzBio | 1256 | - | 96,30 | <i>S. globisporus</i> |
| 16S GBank | 1256 | MW055600 | 95,83 | <i>S. globisporus</i> , <i>S. griseus</i> |
| <i>rpoB</i> | 788 | MZ613371 | 99 | <i>S. praecox</i> |
| <i>recA</i> | 827 | MZ575677 | 99 | <i>S. praecox</i> |
| <i>atpD</i> | 856 | MZ566588 | 97 | <i>S. griseus</i> |
| <i>trpB</i> | 759 | MZ645891 | 100 | <i>S. longispororuber</i> |
| <i>gyrB</i> | 1007 | MZ596377 | 98 | <i>S. anulatus</i> |

Atividade antimicrobiana em porcentagem de inibição

| | Extrato | Meio | Atividade antimicrobiana (%) | | | |
|-------|---------------------|-----------|------------------------------|------|------|------|
| | | | MRSA | MSSA | CA | AF |
| Duetz | CA-300239-a01-MO004 | DNPM | 5,3 | 15,2 | 95,9 | 45,8 |
| | CA-300239-a01-MO007 | M016 | 0 | 0 | 93,2 | 85,5 |
| | CA-300239-a01-MO009 | RAM2-P V2 | 90,3 | 99,1 | 95,4 | 85,2 |
| | CA-300239-a01-MO010 | SAM-6 | 100 | 100 | 92,9 | 93,6 |
| | CA-300288-a01-MO006 | KHC | 99,8 | 100 | 0 | 31,7 |
| | CA-300288-a01-MO007 | M016 | 68 | 98,9 | 0 | 3,1 |
| | CA-300288-a01-MO009 | RAM2-P V2 | 99,8 | 99 | 98,2 | 54,4 |
| | CA-300288-a01-MO010 | SAM-6 | 99,3 | 100 | 0 | 38,2 |

Compostos produzidos: Não pesquisado

LMA323ST_16

Ilha Rei George: ponto Hill II

62°04'31.7W,58°24'14.9S

Meio de cultivo: ACA

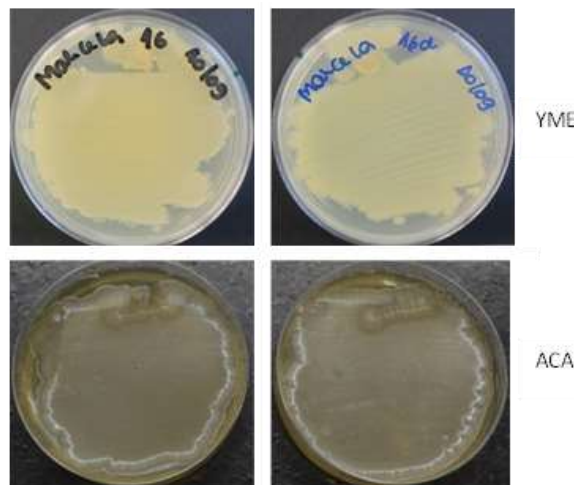
BOX: grupo A, subgrupo 1

REP: grupo 4

Similar a LMA323St_13, LMA323St_17

e LMA323St_19 no BOX e REP

ST não definida



Identificação molecular

| Gene | T (pb) | Nº acesso | Id (%) | Espécie |
|-------------|--------|-----------|--------|-------------------------|
| 16S EzBio | 1265 | - | 93,85 | <i>S. urticae</i> |
| 16S GBank | 1265 | MW055601 | 93,63 | <i>S. fildesensis</i> |
| <i>rpoB</i> | 457 | MZ613372 | 86 | <i>Streptomyces</i> sp. |
| <i>recA</i> | 807 | MZ575678 | 99 | <i>S. fildesensis</i> |
| <i>atpD</i> | 853 | MZ566589 | 79 | <i>Streptomyces</i> sp. |
| <i>trpB</i> | 759 | MZ645892 | 97 | <i>S. fildesensis</i> |
| <i>gyrB</i> | 999 | MZ596378 | 91 | <i>Streptomyces</i> sp. |

Atividade antimicrobiana em porcentagem de inibição

| | Extrato | | Meio | MRSA | MSSA | CA | AF |
|------------------------------|---------------------|-----------|-----------|------|------|-------|-------|
| | | | | | | | |
| Duetz | CA-300240-a01-MO004 | DNPM | | 50,6 | 99,1 | 98,4 | 92,2 |
| | CA-300240-a01-MO006 | KHC | | 99,3 | 95,8 | 0 | 43,3 |
| | CA-300240-a01-MO009 | RAM2-P V2 | | 99,9 | 99,1 | 96,3 | 87,8 |
| | CA-300240-a01-MO010 | SAM-6 | | 98,6 | 99,2 | 95,6 | 94,6 |
| | CA-300289-a01-MO001 | APM9 | | 82,9 | 99,8 | 0 | 0 |
| | CA-300289-a01-MO004 | DNPM | | 5,4 | 100 | 96,8 | 90,3 |
| | CA-300289-a01-MO006 | KHC | | 98,7 | 98,3 | 0 | 31,1 |
| | CA-300289-a01-MO009 | RAM2-P V2 | | 92,5 | 99,3 | 95 | 77,2 |
| | CA-300289-a01-MO010 | SAM-6 | | 100 | 100 | 83,6 | 50,7 |
| | EPA | Extrato | | Meio | AF | CA | CG |
| CA-300289-a01-MO011-EC01-a01 | | | RAM2-P V2 | 6,8 | 0 | 99,19 | 34,08 |

Compostos produzidos: Maltophilin, Alteramide A e B, Feigrisolide C e D

LMA323ST_17

Ilha Rei George: ponto Hill II

62°04'31.7W,58°24'14.9S

Meio de cultivo: ACA

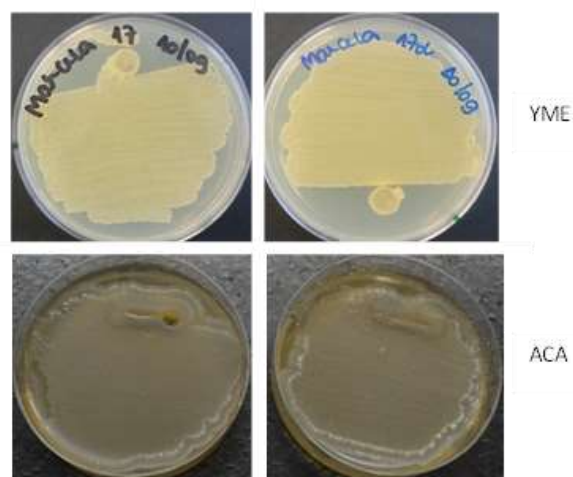
BOX: grupo A, subgrupo 1

REP: grupo 4

Similar a LMA323St_13, LMA323St_16

e LMA323St_19 no BOX e REP

ST 38



Identificação molecular

| Gene | T (pb) | Nº acesso | Id (%) | Espécie |
|-------------|--------|-----------|--------|-------------------------|
| 16S EzBio | 1263 | - | 95,91 | <i>S. globisporus</i> |
| 16S GBank | 1263 | MW055602 | 95,45 | <i>S. globisporus</i> |
| <i>rpoB</i> | 421 | MZ613373 | 88 | <i>Streptomyces</i> sp. |
| <i>recA</i> | 891 | MZ575679 | 98 | <i>S. fulvissimus</i> |
| <i>atpD</i> | 860 | MZ566590 | 93 | <i>Streptomyces</i> sp. |
| <i>trpB</i> | 758 | MZ645893 | 98 | <i>S. fulvissimus</i> |
| <i>gyrB</i> | 901 | MZ596379 | 98 | <i>S. fulvissimus</i> |

Atividade antimicrobiana em porcentagem de inibição

| | Extrato | | Meio | MRSA | MSSA | CA | AF |
|---------------------|------------------------------|---------------------|------|------|-------|------|-------|
| | Duetz | CA-300241-a01-MO011 | APM9 | | 100 | 99,1 | 16,5 |
| CA-300241-a01-MO014 | | DNPM | | 84,4 | 98,8 | 98,3 | 74,3 |
| CA-300241-a01-MO016 | | KHC | | 88,3 | 100 | 0 | 20 |
| CA-300241-a01-MO017 | | M016 | | 3,1 | 0 | 92,9 | 93,8 |
| CA-300241-a01-MO019 | | RAM2-P V2 | | 98,9 | 99,8 | 97,1 | 87,5 |
| CA-300241-a01-MO020 | | SAM-6 | | 100 | 89 | 94,3 | 97,6 |
| CA-300290-a01-MO014 | | DNPM | | 99,4 | 100 | 95,2 | 66 |
| CA-300290-a01-MO017 | | M016 | | 2 | 0 | 98,1 | 96 |
| CA-300290-a01-MO019 | | RAM2-P V2 | | 49,3 | 80,2 | 98,1 | 77 |
| CA-300290-a01-MO020 | | SAM-6 | | 100 | 100 | 93,3 | 95,2 |
| EPA | Extrato | | Meio | AF | CA | CG | CP |
| | CA-300241-a01-MO024-EC01-a01 | SAM-6 | | 90,4 | 88,93 | 100 | 37,32 |
| | CA-300290-a01-MO021-EC01-a01 | SAM-6 | | 3,7 | 89,1 | 99,2 | 29,05 |

Compostos: Maltophilin, Norcardamine, Skyllamicin A, Alteramide A e B, Feigrisolide C e D

LMA323St_18

Ilha Rei George: ponto 58

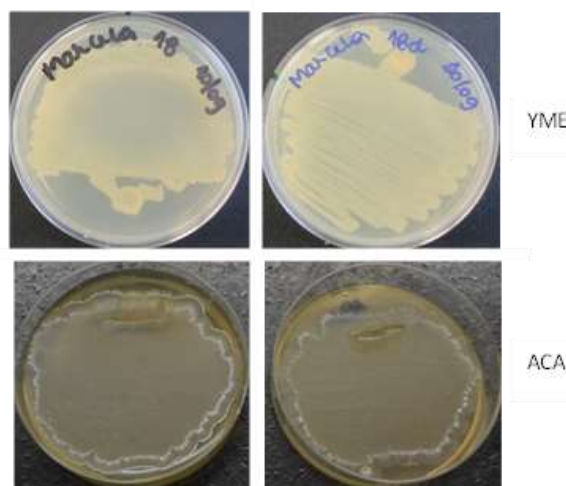
62°19'58.47S,58°95.83.33W

Meio de cultivo: Agar Aveia

BOX: grupo A, subgrupo 2

REP: grupo 4

ST 31



Identificação molecular

| Gene | T (pb) | Nº acesso | Id (%) | Espécie |
|-------------|--------|-----------|--------|-----------------------------------|
| 16S EzBio | 1293 | - | 98,57 | <i>S. fulvissimus</i> |
| 16S GBank | 1293 | MT612464 | 98,16 | <i>S. globisporus, S. griseus</i> |
| <i>rpoB</i> | 788 | MZ613374 | 99 | <i>S. praecox</i> |
| <i>recA</i> | 789 | MZ575680 | 90 | <i>Streptomyces</i> sp. |
| <i>atpD</i> | 856 | MZ566591 | 96 | <i>Streptomyces</i> sp. |
| <i>trpB</i> | 541 | MZ645894 | 98 | <i>S. longispororuber</i> |
| <i>gyrB</i> | 1004 | MZ596380 | 98 | <i>S. anulatus</i> |

Atividade antimicrobiana em porcentagem de inibição

| | Extrato | | Meio | MRSA | MSSA | CA | AF |
|---------------------|------------------------------|---------------------|-----------|------|------|-------|-------|
| | Duetz | CA-300242-a01-MO009 | RAM2-P V2 | | 99,6 | 99,8 | 92,5 |
| CA-300242-a01-MO010 | | SAM-6 | | 99,2 | 99,5 | 91,1 | 29,7 |
| CA-300291-a01-MO004 | | DNPM | | 0 | 92,3 | 98,6 | 95,9 |
| CA-300291-a01-MO006 | | KHC | | 99,6 | 97,6 | 0 | 34,8 |
| CA-300291-a01-MO009 | | RAM2-P V2 | | 97,9 | 99,2 | 98,7 | 91,12 |
| CA-300291-a01-MO010 | | SAM-6 | | 99,6 | 100 | 92,9 | 50 |
| EP | Extrato | | Meio | AF | CA | CG | CP |
| | CA-300291-a01-MO011-EC01-a01 | RAM2-P V2 | | 8 | 2,6 | 98,93 | 36,19 |

Compostos produzidos: Alteramide A e B, Feigrisolide C e D

LMA323ST_19

Ilha Rei George: ponto CI

62°20'05.98S, 58°96'37.68W

Meio de cultivo: Agar Aveia

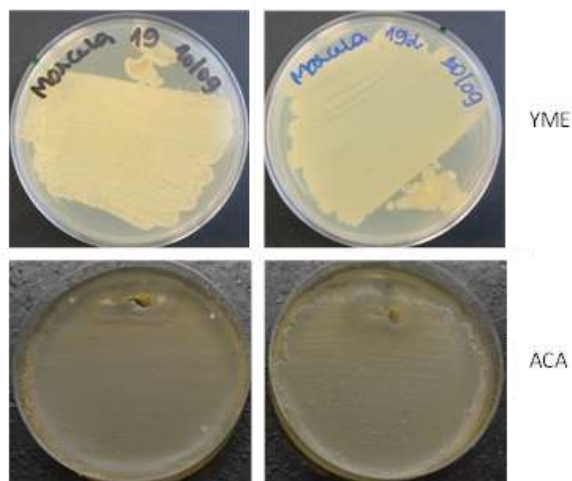
BOX: grupo A, subgrupo 1

REP: grupo 4

Similar a LMA323St_13, LMA323St_16

e LMA323St_17 no BOX e REP

ST não definida



YME

ACA

Identificação molecular

| Gene | T (pb) | Nº acesso | Id (%) | Espécie |
|-------------|--------|-----------|--------|-------------------------|
| 16S EzBio | 1268 | - | 95,09 | <i>S. urticae</i> |
| 16S GBank | 1268 | MW055603 | 94,34 | <i>S. fildesensis</i> |
| <i>rpoB</i> | 703 | MZ613375 | 95 | <i>Streptomyces</i> sp. |
| <i>recA</i> | 923 | MZ575681 | 96 | <i>Streptomyces</i> sp. |
| <i>atpD</i> | 854 | MZ566592 | 90 | <i>Streptomyces</i> sp. |
| <i>trpB</i> | 759 | MZ645895 | 97 | <i>S. fildesensis</i> |
| <i>gyrB</i> | 949 | MZ596381 | 86 | <i>Streptomyces</i> sp. |

Atividade antimicrobiana em porcentagem de inibição

| | Extrato | Meio | MRSA | MSSA | CA | AF |
|---------------------|------------------------------|---------------------|------|------|-------|-------|
| | Duetz | CA-300243-a01-MO001 | APM9 | 99,5 | 99,5 | 16,6 |
| CA-300243-a01-MO004 | | DNPM | 100 | 98,8 | 97,9 | 29 |
| CA-300243-a01-MO006 | | KHC | 99 | 97,6 | 0 | 35 |
| CA-300243-a01-MO007 | | M016 | 46,1 | 97,5 | 0 | 11,3 |
| CA-300243-a01-MO009 | | RAM2-P V2 | 99,5 | 99 | 69,6 | 52,2 |
| CA-300243-a01-MO010 | | SAM-6 | 99,6 | 93 | 45,3 | 41,4 |
| CA-300292-a01-MO001 | | APM9 | 100 | 98 | 25 | 0 |
| CA-300292-a01-MO004 | | DNPM | 33,6 | 99 | 98,8 | 97,6 |
| CA-300292-a01-MO006 | | KHC | 99 | 96,8 | 0 | 31,3 |
| CA-300292-a01-MO009 | | RAM2-P V2 | 38,2 | 98,3 | 98,8 | 84,8 |
| CA-300292-a01-MO010 | SAM-6 | 99,1 | 99,2 | 34,5 | 46 | |
| EPA | Extrato | Meio | AF | CA | CG | CP |
| | CA-300243-a01-MO012-EC01-a01 | RAM2-P V2 | 5,9 | 0 | 99,06 | 18,81 |

Compostos produzidos: Norcardamine, Alteramide A, Feigrisolide C e D

LMA323ST_20

Ilha Rei George: ponto Hill II

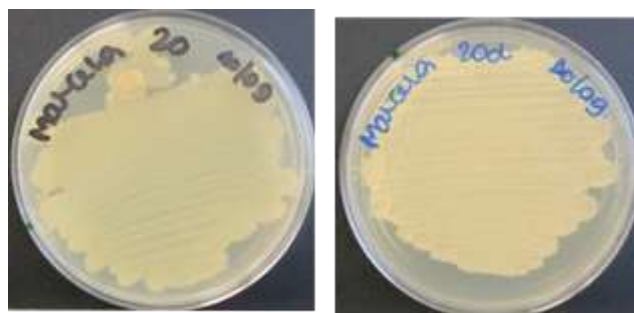
62°04'31.7W,58°24'14.9S

Meio de cultivo: Agar Aveia

BOX: grupo B

REP: grupo 2

ST 31



YME

Identificação molecular

| Gene | T (pb) | Nº acesso | Id (%) | Espécie |
|-------------|--------|-----------|--------|-------------------------|
| 16S EzBio | 1261 | - | 94,46 | <i>S. pratensis</i> |
| 16S GBank | 1261 | MT612465 | 94,71 | <i>S. parvus</i> |
| <i>rpoB</i> | 788 | MZ613376 | 99 | <i>S. praecox</i> |
| <i>recA</i> | 683 | MZ575682 | 87 | <i>Streptomyces</i> sp. |
| <i>atpD</i> | 859 | MZ566593 | 99 | <i>S. griseus</i> |
| <i>trpB</i> | 759 | MZ645896 | 98 | <i>S. praecox</i> |
| <i>gyrB</i> | 1009 | MZ596382 | 97 | <i>S. anulatus</i> |

Atividade antimicrobiana em porcentagem de inibição

| | Extrato | Meio | MRSA | MSSA | CA | AF |
|------------------------------|---------------------|-----------|------|------|------|-------|
| | | | | | | |
| Duetz | CA-300244-a01-MO004 | DNPM | 0 | 99,1 | 98,1 | 86,8 |
| | CA-300244-a01-MO006 | KHC | 99 | 99,9 | 0 | 35,1 |
| | CA-300244-a01-MO009 | RAM2-P V2 | 99,6 | 100 | 99,2 | 89,7 |
| | CA-300244-a01-MO010 | SAM-6 | 99,5 | 99,2 | 94,7 | 48,7 |
| | CA-300293-a01-MO004 | DNPM | 100 | 99,8 | 99,5 | 54 |
| | CA-300293-a01-MO006 | KHC | 98,7 | 97,8 | 0 | 21,1 |
| | CA-300293-a01-MO007 | M016 | 95,2 | 99,7 | 0 | 24,4 |
| | CA-300293-a01-MO009 | RAM2-P V2 | 99,5 | 99,4 | 98,6 | 50,1 |
| | CA-300293-a01-MO010 | SAM-6 | 99,5 | 100 | 89 | 45,5 |
| | EPA | Extrato | Meio | AF | CA | CG |
| CA-300244-a01-MO012-EC01-a01 | | RAM2-P V2 | 8,6 | 0 | 99,2 | 34,14 |

Compostos produzidos: Maltophilin, Alteramide A e B, Feigrisolide C e D

LMA323ST_21

Península Antártica: ponto Brown III

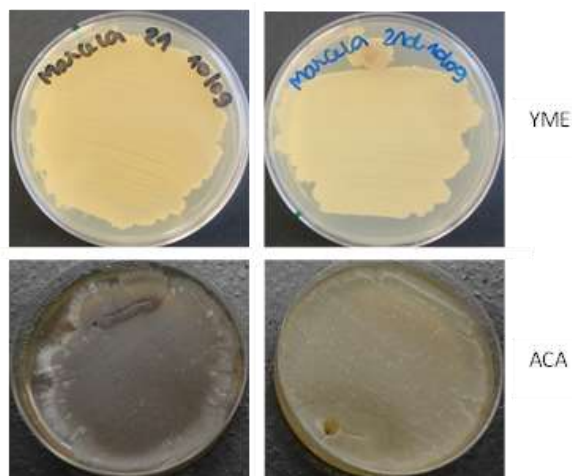
64°82'31.83S, 62°85'77.33W

Meio de cultivo: Agar ISP2

BOX: grupo A, subgrupo 1

REP: grupo 6

ST 38



Identificação molecular

| Gene | T (pb) | Nº acesso | Id (%) | Espécie |
|-------------|--------|-----------|--------|---|
| 16S EzBio | 1295 | - | 95,29 | <i>S. globisporus</i> |
| 16S GBank | 1295 | MT612466 | 94,71 | <i>S. globisporus</i> , <i>S. griseus</i> |
| <i>rpoB</i> | 785 | MZ613377 | 98 | <i>S. fulvissimus</i> |
| <i>recA</i> | 907 | MZ575683 | 95 | <i>Streptomyces</i> sp. |
| <i>atpD</i> | 861 | MZ566594 | 89 | <i>Streptomyces</i> sp. |
| <i>trpB</i> | 761 | MZ645897 | 98 | <i>S. fulvissimus</i> |
| <i>gyrB</i> | 364 | MZ596383 | 93 | <i>Streptomyces</i> sp. |

Atividade antimicrobiana em porcentagem de inibição

| | Extrato | Meio | Atividade antimicrobiana (%) | | | |
|-------|---------------------|-----------|------------------------------|------|------|------|
| | | | MRSA | MSSA | CA | AF |
| Duetz | CA-300245-a01-MO001 | APM9 | 78,6 | 98,8 | 0 | 0 |
| | CA-300245-a01-MO004 | DNPM | 20,5 | 100 | 94,2 | 57,6 |
| | CA-300245-a01-MO006 | KHC | 86,9 | 100 | 0 | 67,4 |
| | CA-300245-a01-MO007 | M016 | 0 | 0 | 96,6 | 32,6 |
| | CA-300245-a01-MO009 | RAM2-P V2 | 25,8 | 45,4 | 92,9 | 68,9 |
| | CA-300245-a01-MO010 | SAM-6 | 0 | 20,5 | 93,8 | 46,4 |
| | CA-300294-a01-MO004 | DNPM | 0 | 100 | 98,1 | 97,8 |
| | CA-300294-a01-MO006 | KHC | 100 | 99,6 | 0 | 20,9 |
| | CA-300294-a01-MO009 | RAM2-P V2 | 99,6 | 100 | 96,5 | 85 |
| | CA-300294-a01-MO010 | SAM-6 | 99,9 | 100 | 92,7 | 57 |

Compostos produzidos: Não pesquisado

LMA323ST_22

Ilha Rei George: ponto CII

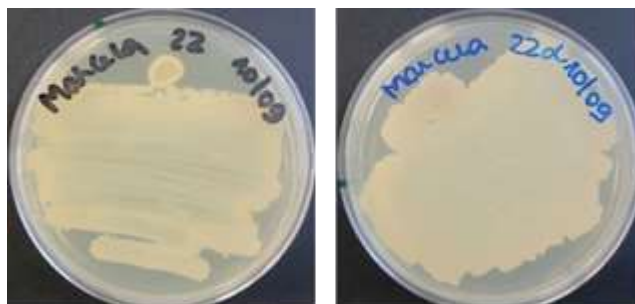
62°20'05.98S, 58°96'37.68W

Meio de cultivo: Agar ISP2

BOX: grupo B

REP: grupo 4

ST 31



YME

Identificação molecular

| Gene | T (pb) | Nº acesso | Id (%) | Espécie |
|-------------|--------|-----------|--------|---|
| 16S EzBio | 1294 | - | 95,53 | <i>S. globisporus</i> |
| 16S GBank | 1294 | MW055604 | 95,49 | <i>S. globisporus</i> , <i>S. griseus</i> |
| <i>rpoB</i> | 787 | MZ613378 | 98 | <i>S. praecox</i> |
| <i>recA</i> | 877 | MZ575684 | 97 | <i>S. praecox</i> |
| <i>atpD</i> | 861 | MZ566595 | 94 | <i>Streptomyces</i> sp. |
| <i>trpB</i> | 759 | MZ645898 | 98 | <i>S. praecox</i> |
| <i>gyrB</i> | 1013 | MZ596384 | 97 | <i>S. anulatus</i> |

Atividade antimicrobiana: Não avaliada

Compostos produzidos: Não pesquisado

LMA323ST_23

Ilha Rei George: ponto Hill II

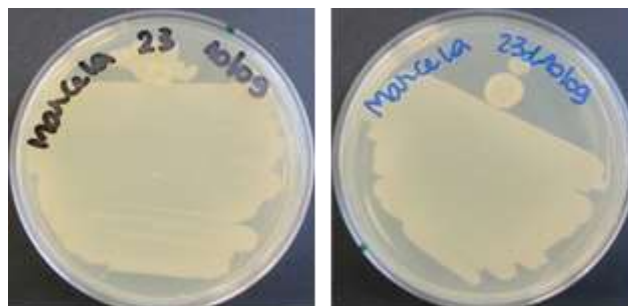
62°04'31.7W,58°24'14.9S

Meio de cultivo: Agar ISP2

BOX: grupo B

REP: grupo 4

ST 31



YME

Identificação molecular

| Gene | T (pb) | Nº acesso | Id (%) | Espécie |
|-------------|--------|-----------|--------|---|
| 16S EzBio | 1290 | - | 95,76 | <i>S. globisporus</i> |
| 16S GBank | 1290 | MW055605 | 95,34 | <i>S. globisporus</i> , <i>S. griseus</i> |
| <i>rpoB</i> | 788 | MZ613379 | 99 | <i>S. praecox</i> |
| <i>recA</i> | 774 | MZ575685 | 85 | <i>Streptomyces</i> sp. |
| <i>atpD</i> | 859 | MZ566596 | 93 | <i>Streptomyces</i> sp. |
| <i>trpB</i> | 547 | MZ645899 | 97 | <i>S. longispororuber</i> |
| <i>gyrB</i> | 1009 | MZ596385 | 98 | <i>S. anulatus</i> |

Atividade antimicrobiana: Não avaliada

Compostos produzidos: Não pesquisado

LMA323ST_24

Península Antártica: ponto Brown II

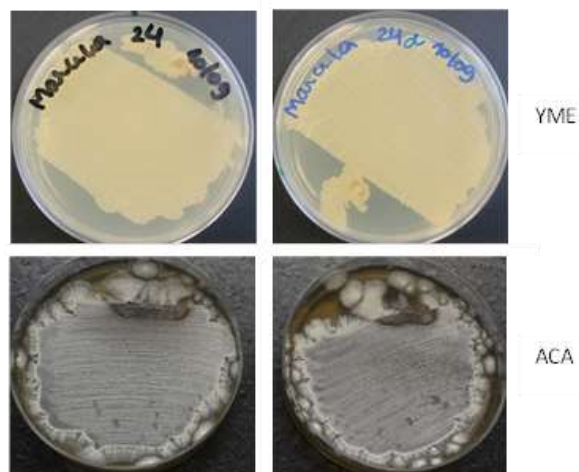
64°82'34S, 62°85'73.83W

Meio de cultivo: ACA

BOX: grupo B

REP: sem grupo

ST 38



Identificação molecular

| Gene | T (pb) | Nº acesso | Id (%) | Espécie |
|-------------|--------|-----------|--------|-------------------------|
| 16S EzBio | 1295 | - | 93,71 | <i>S. globisporus</i> |
| 16S GBank | 1295 | MW055606 | - | - |
| <i>rpoB</i> | 538 | MZ613380 | 92 | <i>Streptomyces</i> sp. |
| <i>recA</i> | 888 | MZ575686 | 97 | <i>S. fulvissimus</i> |
| <i>atpD</i> | 851 | MZ566597 | 95 | <i>Streptomyces</i> sp. |
| <i>trpB</i> | 760 | MZ645900 | 98 | <i>S. fulvissimus</i> |
| <i>gyrB</i> | 425 | MZ596386 | 97 | <i>S. luridiscabiei</i> |

Atividade antimicrobiana em porcentagem de inibição

| | Extrato | | Meio | MRSA | MSSA | CA | AF |
|-------|------------------------------|-----------|------|------|------|------|------|
| | | | | | | | |
| Duetz | CA-300248-a01-MO011 | APM9 | | 88 | 99,4 | 0 | 0 |
| | CA-300248-a01-MO014 | DNPM | | 6,5 | 73,8 | 96,8 | 87,8 |
| | CA-300248-a01-MO016 | KHC | | 100 | 100 | 94,8 | 42,5 |
| | CA-300248-a01-MO019 | RAM2-P V2 | | 36,5 | 44,4 | 95 | 28,8 |
| | CA-300248-a01-MO020 | SAM-6 | | 99,5 | 99,7 | 0 | 36,3 |
| | CA-300297-a01-MO011 | APM9 | | 100 | 99,4 | 68,6 | 24,9 |
| | CA-300297-a01-MO014 | DNPM | | 4,2 | 99,6 | 98 | 97,1 |
| | CA-300297-a01-MO016 | KHC | | 100 | 100 | 6,4 | 40,6 |
| | CA-300297-a01-MO019 | RAM2-P V2 | | 38 | 82,8 | 97,4 | 93,9 |
| | CA-300297-a01-MO020 | SAM-6 | | 99,6 | 100 | 45,2 | 56,1 |
| EPA | Extrato | | Meio | AF | CA | CG | CP |
| | CA-300248-a01-MO021-EC01-a01 | KHC | | | | | |

Compostos produzidos: Alteramide A e B, Feigrisolide C e D

LMA323ST_25

Península Antártica: ponto Brown II

64°82'34S, 62°85'73.83W

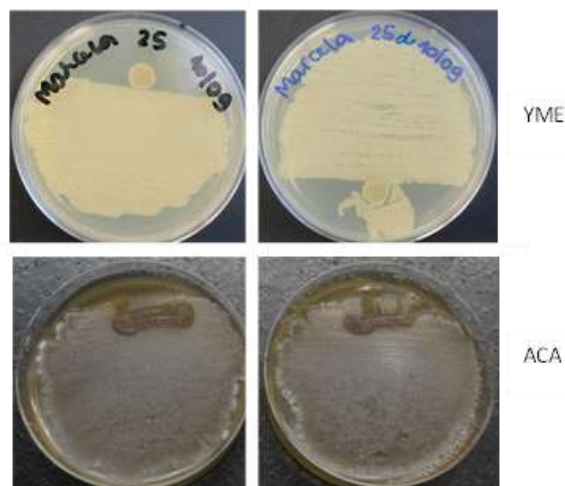
Meio de cultivo: Agar Rafinose Histidina

BOX: grupo B

REP: grupo 6

Similar ao LMA323St_26 no BOX e no REP

ST 38



YME

ACA

Identificação molecular

| Gene | T. (pb) | Nº acesso | Id (%) | Espécie |
|-------------|---------|-----------|--------|-------------------------|
| 16S EzBio | 1292 | - | 95,27 | <i>S. globisporus</i> |
| 16S GBank | 1292 | MW055607 | 93,09 | <i>S. cavourensis</i> |
| <i>rpoB</i> | 777 | MZ613381 | 94 | <i>Streptomyces</i> sp. |
| <i>recA</i> | 874 | MZ575687 | 96 | <i>Streptomyces</i> sp. |
| <i>atpD</i> | 856 | MZ566598 | 96 | <i>Streptomyces</i> sp. |
| <i>trpB</i> | 760 | MZ645901 | 98 | <i>S. fulvissimus</i> |
| <i>gyrB</i> | 994 | MZ596387 | 99 | <i>S. fulvissimus</i> |

Atividade antimicrobiana em porcentagem de inibição

| | Extrato | | Meio | MRSA | MSSA | CA | AF |
|---------------------|------------------------------|---------------------|------|------|-------|-------|-------|
| | Duetz | CA-300249-a01-MO014 | DNPM | | 12,2 | 99,9 | 93,3 |
| CA-300249-a01-MO016 | | KHC | | 100 | 100 | 0 | 57,2 |
| CA-300249-a01-MO019 | | RAM2-P V2 | | 95,2 | 99,2 | 96,4 | 71,7 |
| CA-300249-a01-MO020 | | SAM-6 | | 0 | 23,8 | 81 | 40,3 |
| CA-300298-a01-MO014 | | DNPM | | 7 | 20,4 | 96,6 | 67,2 |
| CA-300298-a01-MO016 | | KHC | | 100 | 100 | 0 | 68,8 |
| CA-300298-a01-MO017 | | M016 | | 0 | 0 | 94,9 | 24,2 |
| CA-300298-a01-MO019 | | RAM2-P V2 | | 48,3 | 52,8 | 91,6 | 71,4 |
| CA-300298-a01-MO020 | | SAM-6 | | 0 | 8,9 | 75,5 | 60,5 |
| EPA | | Extrato | | Meio | AF | CA | CG |
| | CA-300249-a01-MO022-EC01-a01 | RAM2-P V2 | | 84 | 90,05 | 99,07 | 65,32 |

Compostos produzidos: Alteramide A e B, Feigrisolide C e D

LMA323ST_26

Península Antártica: ponto Brown II

64°82'34S, 62°85'73.83W

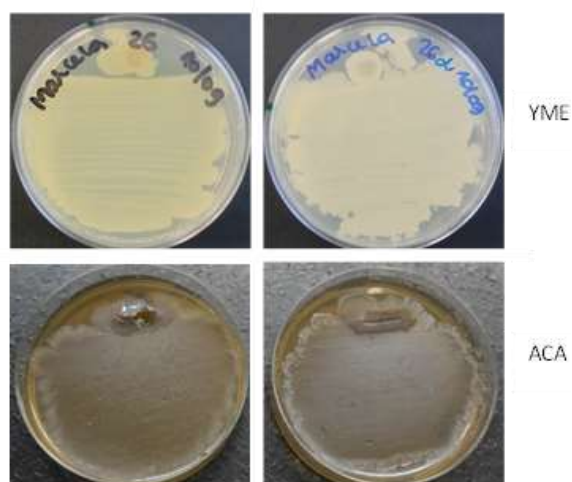
Meio de cultivo: Agar Rafinose Histidina

BOX: grupo B

REP: grupo 6

Similar ao LMA323St_25 no BOX e no REP

ST 38



Identificação molecular

| Gene | T (pb) | Nº acesso | Id (%) | Espécie |
|-------------|--------|-----------|--------|-------------------------|
| 16S EzBio | 1435 | - | 96,42 | <i>S. fulvorobeus</i> |
| 16S GBank | 1435 | MW055608 | 95,92 | <i>S. microflavus</i> |
| <i>rpoB</i> | 614 | MZ613382 | 88 | <i>Streptomyces</i> sp. |
| <i>recA</i> | 873 | MZ575688 | 96 | <i>Streptomyces</i> sp. |
| <i>atpD</i> | 855 | MZ566599 | 96 | <i>Streptomyces</i> sp. |
| <i>trpB</i> | 760 | MZ645902 | 98 | <i>S. fulvissimus</i> |
| <i>gyrB</i> | 999 | MZ596388 | 99 | <i>S. fulvissimus</i> |

Atividade antimicrobiana em porcentagem de inibição

| | Extrato | | Meio | | | |
|-------|------------------------------|-----------|------|-------|------|-------|
| | Extrato | Meio | MRSA | MSSA | CA | AF |
| Duetz | CA-300250-a01-MO006 | KHC | 100 | 99,9 | 0 | 37,9 |
| | CA-300250-a01-MO009 | RAM2-P V2 | 99,2 | 98,1 | 92,9 | 75,1 |
| | CA-300299-a01-MO004 | DNPM | 19,5 | 44,5 | 89,6 | 53,9 |
| | CA-300299-a01-MO006 | KHC | 99,9 | 100 | 0 | 49,7 |
| | CA-300299-a01-MO009 | RAM2-P V2 | 45,8 | 50,6 | 94,7 | 72,2 |
| | CA-300299-a01-MO010 | SAM-6 | 0 | 10,5 | 94 | 16,3 |
| EPA | Extrato | | Meio | | | |
| | Extrato | Meio | AF | CA | CG | CP |
| | CA-300250-a01-MO011-EC01-a01 | RAM2-P V2 | 80,3 | 91,06 | 100 | 65,54 |

Compostos produzidos: Feigrisolide C e D

LMA323ST_27

Península Antártica: ponto Brown II

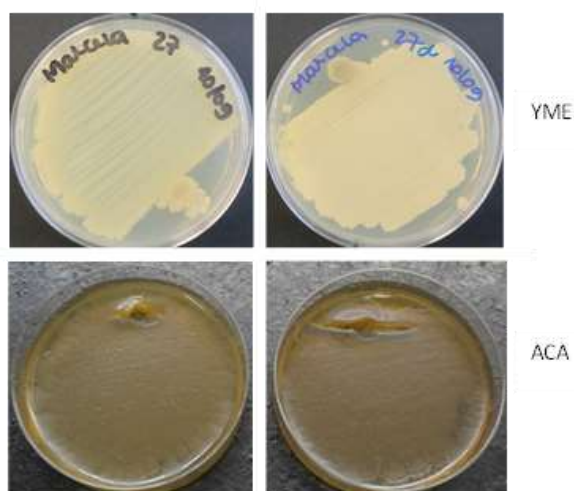
64°82'34S, 62°85'73.83W

Meio de cultivo: Agar Rafinose Histidina

BOX: grupo B

REP: grupo 6

ST 38



YME

ACA

Identificação molecular

| Gene | T (pb) | Nº acesso | Id (%) | Espécie |
|-------------|--------|-----------|--------|-------------------------|
| 16S EzBio | 1259 | - | 95,42 | <i>S. globisporus</i> |
| 16S GBank | 1259 | MW055609 | - | - |
| <i>rpoB</i> | 770 | MZ613383 | 98 | <i>S. fulvissimus</i> |
| <i>recA</i> | 942 | MZ575689 | 96 | <i>Streptomyces</i> sp. |
| <i>atpD</i> | 858 | MZ566600 | 97 | <i>S. fulvissimus</i> |
| <i>trpB</i> | 760 | MZ645903 | 98 | <i>S. fulvissimus</i> |
| <i>gyrB</i> | 1001 | MZ596389 | 99 | <i>S. fulvissimus</i> |

Atividade antimicrobiana em porcentagem de inibição

| Duetz | Extrato | Meio | MRSA | MSSA | CA | AF |
|---------------------|---------------------|------|------|------|------|------|
| | CA-300251-a01-MO006 | KHC | 100 | 99,6 | 0 | 13,7 |
| CA-300251-a01-MO009 | RAM2-P V2 | 57,7 | 83,5 | 17 | 57,4 | |
| CA-300300-a01-MO006 | KHC | 100 | 100 | 0 | 10,3 | |
| CA-300300-a01-MO009 | RAM2-P V2 | 62,4 | 50,7 | 55,7 | 74,2 | |

Compostos produzidos: Não pesquisado

LMA323ST_28

Península Antártica: ponto Brown II

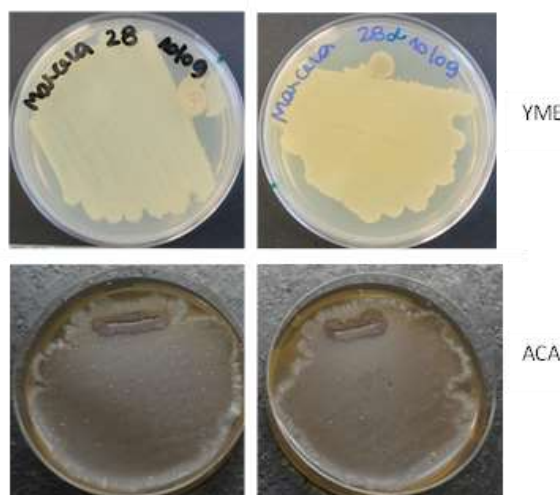
64°82'34S, 62°85'73.83W

Meio de cultivo: Agar Rafinose Histidina

BOX: grupo B

REP: grupo 1

ST 38



Identificação molecular

| Gene | T (pb) | Nº acesso | Id (%) | Espécie |
|-------------|--------|-----------|--------|---|
| 16S EzBio | 1263 | - | 95,02 | <i>S. globisporus</i> |
| 16S GBank | 1263 | MT612467 | 95,06 | <i>S. globisporus</i> , <i>S. griseus</i> |
| <i>rpoB</i> | 784 | MZ613384 | 97 | <i>S. fulvissimus</i> |
| <i>recA</i> | 892 | MZ575690 | 98 | <i>S. fulvissimus</i> |
| <i>atpD</i> | 859 | MZ566601 | 95 | <i>Streptomyces</i> sp. |
| <i>trpB</i> | 759 | MZ645904 | 98 | <i>S. fulvissimus</i> |
| <i>gyrB</i> | 1002 | MZ596390 | 99 | <i>S. fulvissimus</i> |

Atividade antimicrobiana em porcentagem de inibição

| | Extrato | | Meio | MRSA | MSSA | CA | AF |
|---------------------|------------------------------|---------------------|-----------|------|-------|------|-------|
| | Duetz | CA-300252-a01-MO004 | DNPM | | 30,1 | 97,5 | 96,6 |
| CA-300252-a01-MO006 | | KHC | | 100 | 100 | 0 | 58,4 |
| CA-300252-a01-MO009 | | RAM2-P V2 | | 98,6 | 97,6 | 92,1 | 77,4 |
| CA-300252-a01-MO010 | | SAM-6 | | 8,6 | 27,8 | 94,9 | 41 |
| CA-300301-a01-MO006 | | KHC | | 99,9 | 100 | 0 | 46,7 |
| CA-300301-a01-MO009 | | RAM2-P V2 | | 11,1 | 14,3 | 97,5 | 75,8 |
| CA-300301-a01-MO010 | | SAM-6 | | 0 | 7,1 | 73,1 | 14,1 |
| EPA | Extrato | | Meio | AF | CA | CG | CP |
| | CA-300252-a01-MO012-EC01-a01 | | RAM2-P V2 | 72,4 | 95,41 | 98,8 | 72,67 |

Compostos produzidos: Maltophilin, Alteramide A e B, Feigrisolide C e D

LMA323ST_29

Ilha Rei George: ponto CI

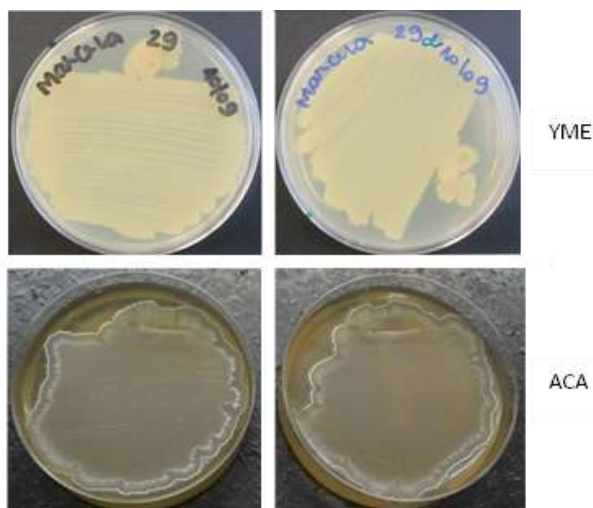
62°20'11.96S, 58°96'19.98W

Meio de cultivo: Agar Rafinose Histidina

BOX: grupo A, subgrupo 1

REP: grupo 1

ST 38



Identificação molecular

| Gene | T (pb) | Nº acesso | Id (%) | Espécie |
|-------------|--------|-----------|--------|---|
| 16S EzBio | 1261 | - | 96,24 | <i>S. globisporus</i> |
| 16S GBank | 1261 | MW055610 | 95,76 | <i>S. globisporus</i> , <i>S. griseus</i> |
| <i>rpoB</i> | 789 | MZ613385 | 99 | <i>S. fulvissimus</i> |
| <i>recA</i> | 884 | MZ575691 | 97 | <i>S. fulvissimus</i> |
| <i>atpD</i> | 857 | MZ566602 | 97 | <i>S. fulvissimus</i> |
| <i>trpB</i> | 760 | MZ645905 | 98 | <i>S. fulvissimus</i> |
| <i>gyrB</i> | 1005 | MZ596391 | 98 | <i>S. fulvissimus</i> |

Atividade antimicrobiana em porcentagem de inibição

| | Extrato | Meio | MRSA | MSSA | CA | AF |
|---------------------|------------------------------|-------------|------|------|-------|------|
| | | | | | | |
| Duetz | CA-300253-a01-MO004 | DNPM | 99,6 | 98,8 | 99,3 | 95,4 |
| | CA-300253-a01-MO006 | KHC | 99,5 | 99,4 | 100 | 68,2 |
| | CA-300253-a01-MO008 | M016 AC NAL | 98,8 | 99,3 | 6 | 44,7 |
| | CA-300253-a01-MO007 | M016 | 97,3 | 97,9 | 0 | 48,2 |
| | CA-300253-a01-MO009 | RAM2-P V2 | 98,3 | 97,8 | 98,8 | 87,8 |
| | CA-300253-a01-MO010 | SAM-6 | 100 | 95,1 | 91,4 | 92,3 |
| | CA-300302-a01-MO004 | DNPM | 100 | 99,3 | 99 | 93,4 |
| | CA-300302-a01-MO006 | KHC | 99,2 | 99,3 | 99 | 83,7 |
| | CA-300302-a01-MO007 | M016 | 1,5 | 98,4 | 99,8 | 97,7 |
| | CA-300302-a01-MO009 | RAM2-P V2 | 19,3 | 44 | 98,5 | 80 |
| CA-300302-a01-MO010 | SAM-6 | 99,8 | 100 | 94,4 | 93,4 | |
| EPA | Extrato | Meio | AF | CA | CG | CP |
| | | | | | | |
| EPA | CA-300302-a01-MO011-EC01-a01 | DNPM | 0 | 93,9 | 99,33 | 0 |
| | CA-300302-a01-MO012-EC01-a01 | KHC | 0 | 0 | 81,72 | 0 |
| | CA-300302-a01-MO013-EC01-a01 | SAM-6 | 0 | 93,6 | 99,6 | 0 |

Compostos produzidos: Maltophilin, Norcardamine, Feigrisolide C e D

LMA323ST_30

Ilha Rei George: ponto CI

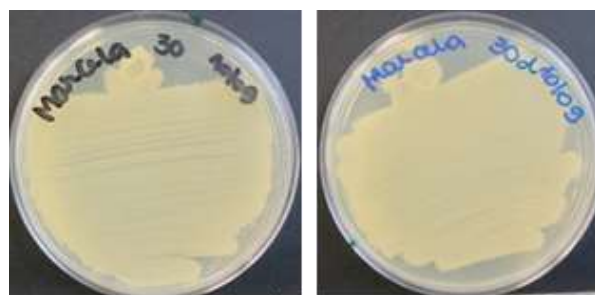
62°20'11.96S, 58°96'19.98W

Meio de cultivo: Agar Rafinose Histidina

BOX: grupo A, subgrupo 2

REP: grupo 3

ST 31



YME

Identificação molecular

| Gene | T (pb) | Nº acesso | Id (%) | Espécie |
|-------------|--------|-----------|--------|---------------------------|
| 16S EzBio | 1071 | - | 93,31 | <i>S. globisporus</i> |
| 16S GBank | 1071 | MW055611 | 95,88 | <i>S. microflavus</i> |
| <i>rpoB</i> | 789 | MZ613386 | 99 | <i>S. praecox</i> |
| <i>recA</i> | 892 | MZ575692 | 98 | <i>S. praecox</i> |
| <i>atpD</i> | 861 | MZ566603 | 97 | <i>S. griseus</i> |
| <i>trpB</i> | 759 | MZ645906 | 99 | <i>S. longispororuber</i> |
| <i>gyrB</i> | 1003 | MZ596392 | 98 | <i>S. anulatus</i> |

Atividade antimicrobiana: Não avaliada

Compostos produzidos: Não pesquisado

LMA323ST_31

Ilha Rei George: ponto CI

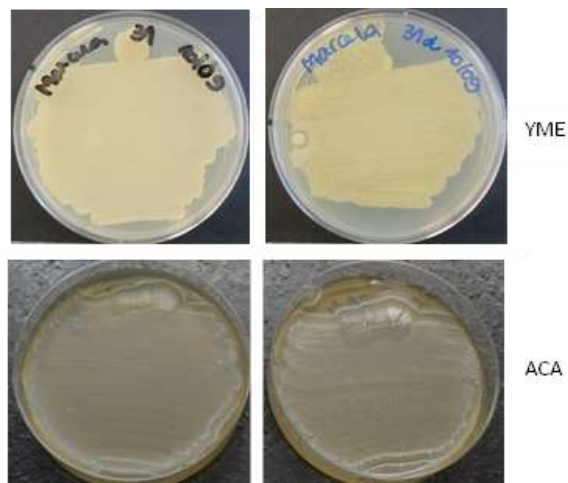
62°20'11.96S, 58°96'19.98W

Meio de cultivo: Agar Rafinose Histidina

BOX: grupo A, subgrupo 2

REP: grupo 3

ST 31



Identificação molecular

| Gene | T (pb) | Nº acesso | Id (%) | Espécie |
|-------------|--------|-----------|--------|---------------------------|
| 16S EzBio | 1432 | - | 98,85 | <i>S. fulvissimus</i> |
| 16S GBank | 1432 | MW055612 | 98,47 | <i>S. griseus</i> |
| <i>rpoB</i> | 788 | MZ613387 | 99 | <i>S. praecox</i> |
| <i>recA</i> | 561 | MZ575693 | 88 | <i>Streptomyces</i> sp. |
| <i>atpD</i> | 860 | MZ566604 | 99 | <i>S. griseus</i> |
| <i>trpB</i> | 300 | MZ645907 | 99 | <i>S. longispororuber</i> |
| <i>gyrB</i> | 1005 | MZ596393 | 98 | <i>S. anulatus</i> |

Atividade antimicrobiana em porcentagem de inibição

| | Extrato | Meio | MRSA | MSSA | CA | AF | |
|-------|---------------------|-----------------------------|-------|------|------|-------|-------|
| | | | | | | | |
| Duetz | CA-300255-a01-MO011 | APM9 | 76,2 | 100 | 27,3 | 0 | |
| | CA-300255-a01-MO014 | DNPM | 100 | 99,8 | 52,8 | 14,6 | |
| | CA-300255-a01-MO015 | ACA | 38,6 | 87,8 | 0 | 0 | |
| | CA-300255-a01-MO016 | KHC | 88,1 | 98,8 | 0 | 0 | |
| | CA-300255-a01-MO018 | M016 AC NAL | 97,9 | 98,9 | 11,1 | 44,8 | |
| | CA-300255-a01-MO017 | M016 | 85,8 | 98 | 0 | 0 | |
| | CA-300255-a01-MO019 | RAM2-P V2 | 99,6 | 98,3 | 36,5 | 12,2 | |
| | CA-300255-a01-MO020 | SAM-6 | 99,6 | 99,3 | 40,4 | 17,5 | |
| | CA-300304-a01-MO014 | DNPM | 95 | 99,1 | 0 | 0 | |
| | CA-300304-a01-MO016 | KHC | 98 | 97,9 | 13,4 | 35,3 | |
| | CA-300304-a01-MO018 | M016 AC NAL | 99 | 98,7 | 4,4 | 40,2 | |
| | CA-300304-a01-MO020 | SAM-6 | 98,9 | 100 | 96 | 34,3 | |
| | EPA | Extrato | Meio | AF | CA | CG | CP |
| | | CA-300304-a01-MO22-EC01-a01 | SAM-6 | 5,6 | 22,1 | 99,07 | 32,55 |

Compostos produzidos: Feigrisolide C e D

LMA323ST_32

Ilha Rei George: ponto CII

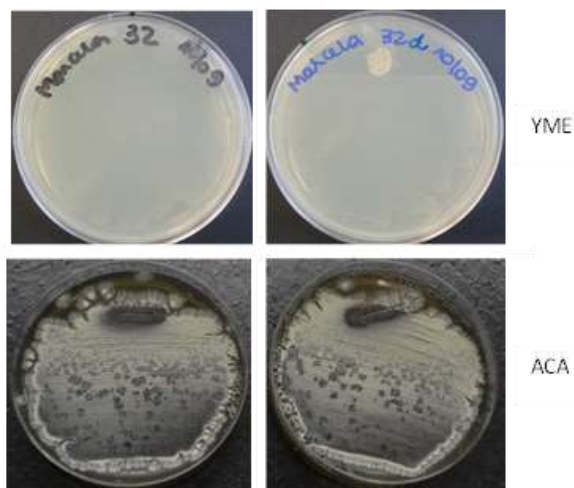
62°20'05.98S, 58°96'37.68W

Meio de cultivo: Agar Rafinose Histidina

BOX: grupo B

REP: grupo 3

ST 31



Identificação molecular

| Gene | T (pb) | Nº acesso | Id (%) | Espécie |
|-------------|--------|-----------|--------|-----------------------------------|
| 16S EzBio | 1268 | - | 99,75 | <i>S. fulvissimus</i> |
| 16S GBank | 1268 | MW055613 | 98,82 | <i>S. globisporus, S. griseus</i> |
| <i>rpoB</i> | 783 | MZ613388 | 91 | <i>Streptomyces</i> sp. |
| <i>recA</i> | 706 | MZ575694 | 91 | <i>Streptomyces</i> sp. |
| <i>atpD</i> | 856 | MZ566605 | 96 | <i>Streptomyces</i> sp. |
| <i>trpB</i> | 759 | MZ645908 | 97 | <i>S. praecox</i> |
| <i>gyrB</i> | 1001 | MZ596394 | 98 | <i>S. anulatus</i> |

Atividade antimicrobiana em porcentagem de inibição

| | Extrato | Meio | Atividade antimicrobiana (%) | | | |
|-------|---------------------|-------|------------------------------|------|----|------|
| | | | MRSA | MSSA | CA | AF |
| Duetz | CA-300256-a01-MO006 | KHC | 100 | 100 | 0 | 46,3 |
| | CA-300256-a01-MO010 | SAM-6 | 100 | 100 | 0 | 43,8 |
| | CA-300305-a01-MO001 | APM9 | 100 | 99,1 | 0 | 0 |
| | CA-300305-a01-MO006 | KHC | 100 | 100 | 0 | 28,7 |
| | CA-300305-a01-MO010 | SAM-6 | 99,1 | 100 | 0 | 59,9 |

Compostos produzidos: Não pesquisado

LMA323ST_33

Ilha Rei George: ponto CI

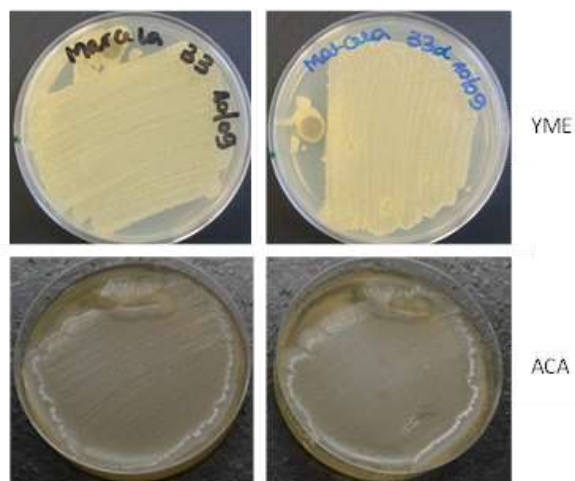
62°20'11.96S, 58°96'19.98W

Meio de cultivo: Agar Rafinose Histidina

BOX: grupo B

REP: grupo 3

ST 31



Identificação molecular

| Gene | T (pb) | Nº acesso | Id (%) | Espécie |
|-------------|--------|-----------|--------|-------------------------|
| 16S EzBio | 1466 | - | 92,22 | <i>S. yanii</i> |
| 16S GBank | 1466 | MZ409521 | 90,50 | <i>S. griseus</i> |
| <i>rpoB</i> | 788 | MZ613389 | 99 | <i>S. praecox</i> |
| <i>recA</i> | 813 | MZ575695 | 92 | <i>Streptomyces</i> sp. |
| <i>atpD</i> | 853 | MZ566606 | 94 | <i>Streptomyces</i> sp. |
| <i>trpB</i> | 759 | MZ645909 | 98 | <i>S. praecox</i> |
| <i>gyrB</i> | 1006 | MZ596395 | 98 | <i>S. anulatus</i> |

Atividade antimicrobiana em porcentagem de inibição

| | Extrato | Meio | MRSA | MSSA | CA | AF | |
|------------------------------|---------------------|------------------------------|---------------------|-------|------|-------|-------|
| | | | CA-300257-a01-MO014 | DNPM | 21,9 | 98,5 | 96,1 |
| | CA-300257-a01-MO016 | KHC | 100 | 97,8 | 95,9 | 36,6 | |
| | CA-300257-a01-MO018 | M016 AC NAL | 3,5 | 7,8 | 82,5 | 0 | |
| | CA-300257-a01-MO017 | M016 | 7,3 | 50,6 | 98,3 | 96,5 | |
| Duetz | CA-300257-a01-MO019 | RAM2-P V2 | 5,4 | 29 | 98,9 | 82,6 | |
| | CA-300257-a01-MO020 | SAM-6 | 100 | 100 | 98,9 | 93,4 | |
| | CA-300306-a01-MO011 | APM9 | 99,9 | 100 | 0 | 1,2 | |
| | CA-300306-a01-MO014 | DNPM | 58,3 | 98,5 | 96,9 | 92,4 | |
| | CA-300306-a01-MO016 | KHC | 100 | 98,6 | 95,2 | 47,5 | |
| | CA-300306-a01-MO017 | M016 | 0 | 21,8 | 97,4 | 97,6 | |
| | CA-300306-a01-MO019 | RAM2-P V2 | 99,2 | 98,4 | 99,2 | 89,7 | |
| | CA-300306-a01-MO020 | SAM-6 | 99,2 | 100 | 91,6 | 96,1 | |
| | | Extrato | Meio | AF | CA | CG | CP |
| | EPA | CA-300257-a01-MO021-EC01-a01 | SAM-6 | 88,7 | 100 | 100 | 36,51 |
| CA-300306-a01-MO021-EC01-a01 | | RAM2-P V2 | 74,2 | 99,09 | 100 | 27,96 | |
| CA-300306-a01-MO023-EC01-a01 | | SAM-6 | 83,3 | 99,9 | 100 | 51,49 | |

Compostos produzidos: Maltophilin, Dihydromaltophilin, Skyllamicin A, Alteramide A e B, Feigrisolide C e D

LMA323ST_34

Ilha Rei George: ponto CI

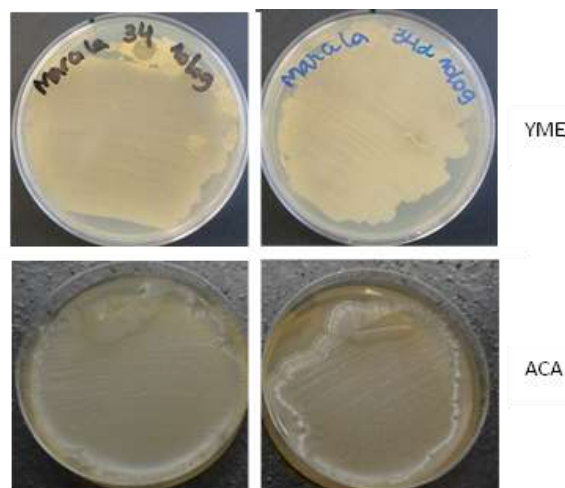
62°20'11.96S, 58°96'19.98W

Meio de cultivo: ACA

BOX: grupo B

REP: grupo 3

ST 38



YME

ACA

Identificação molecular

| Gene | T (pb) | Nº acesso | Id (%) | Espécie |
|-------------|--------|-----------|--------|-------------------------|
| 16S EzBio | 1440 | - | 95,94 | <i>S. fulvorobeus</i> |
| 16S GBank | 1440 | MT612468 | 94,81 | <i>S. anulatus</i> |
| <i>rpoB</i> | 783 | MZ613390 | 99 | <i>S. fulvissimus</i> |
| <i>recA</i> | 826 | MZ575696 | 98 | <i>S. fulvissimus</i> |
| <i>atpD</i> | 854 | MZ566607 | 96 | <i>Streptomyces</i> sp. |
| <i>trpB</i> | 760 | MZ645910 | 98 | <i>S. fulvissimus</i> |
| <i>gyrB</i> | 1006 | MZ596396 | 98 | <i>S. fulvissimus</i> |

Atividade antimicrobiana em porcentagem de inibição

| Duetz | Extrato | | Meio | MRSA | MSSA | CA | AF |
|---------------------|---------------------|-------------|------|------|------|------|----|
| | CA-300258-a01-MO011 | APM9 | APM9 | 98,8 | 97,1 | 1,7 | 0 |
| CA-300258-a01-MO016 | KHC | KHC | 100 | 100 | 0 | 37,4 | |
| CA-300258-a01-MO018 | M016 AC NAL | M016 AC NAL | 89,5 | 98,7 | 23,7 | 30,9 | |
| CA-300258-a01-MO017 | M016 | M016 | 77 | 99,7 | 25,4 | 25,6 | |

Compostos produzidos: Não pesquisado

LMA323ST_35

Ilha Rei George: ponto CII

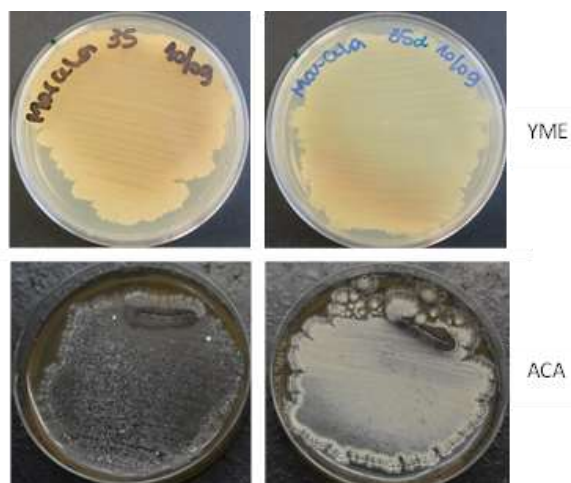
62°20'05.98S, 58°96'37.68W

Meio de cultivo: Agar Aveia

BOX: grupo A, subgrupo 2

REP: grupo 3

ST 38



YME

ACA

Identificação molecular

| Gene | T (pb) | Nº acesso | Id (%) | Espécie |
|-------------|--------|-----------|--------|---|
| 16S EzBio | 1257 | - | 97,29 | <i>S. globisporus</i> |
| 16S GBank | 1257 | MW055614 | 96,62 | <i>S. globisporus</i> , <i>S. griseus</i> |
| <i>rpoB</i> | 782 | MZ613391 | 98 | <i>S. fulvissimus</i> |
| <i>recA</i> | 828 | MZ575697 | 98 | <i>S. fulvissimus</i> |
| <i>atpD</i> | 858 | MZ566608 | 97 | <i>S. fulvissimus</i> |
| <i>trpB</i> | 760 | MZ645911 | 98 | <i>S. fulvissimus</i> |
| <i>gyrB</i> | 1008 | MZ596397 | 98 | <i>S. fulvissimus</i> |

Atividade antimicrobiana em porcentagem de inibição

| | Extrato | | Meio | MRSA | MSSA | CA | AF |
|-----|------------------------------|---------------------|------|------|-------|-------|-------|
| | Duetz | CA-300259-a01-MO006 | KHC | | 100 | 100 | 0 |
| | CA-300259-a01-MO009 | RAM2-P V2 | | 70,9 | 99,1 | 0 | 0 |
| | CA-300308-a01-MO006 | KHC | | 87,5 | 100 | 0 | 35,4 |
| EPA | Extrato | | Meio | AF | CA | CG | CP |
| | CA-300259-a01-MO012-EC01-a01 | KHC | | 38,1 | 18,21 | 49,3 | 98,91 |
| | CA-300259-a01-MO014-EC01-a01 | RAM2-P V2 | | 79,6 | 19,25 | 95,98 | 44,19 |

Compostos produzidos: Dinactin, Monactin, Feigrisolide C e D, Nonactins

LMA323ST_36

Ilha Rei George: ponto CI

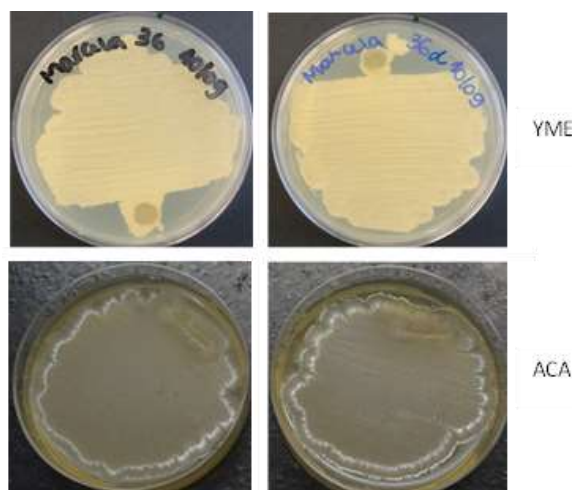
62°20'11.96S, 58°96'19.98W

Meio de cultivo: ACA

BOX: grupo A, subgrupo 2

REP: grupo 3

ST 38



Identificação molecular

| Gene | T (pb) | Nº acesso | Id (%) | Espécie |
|-------------|--------|-----------|--------|-----------------------|
| 16S EzBio | 1426 | - | 95,95 | <i>S. fulvorobeus</i> |
| 16S GBank | 1426 | MW055615 | 95,01 | <i>S. microflavus</i> |
| <i>rpoB</i> | 788 | MZ613392 | 99 | <i>S. fulvissimus</i> |
| <i>recA</i> | 827 | MZ575698 | 98 | <i>S. fulvissimus</i> |
| <i>atpD</i> | 852 | MZ566609 | 97 | <i>S. fulvissimus</i> |
| <i>trpB</i> | 760 | MZ645912 | 98 | <i>S. fulvissimus</i> |
| <i>gyrB</i> | 1001 | MZ596398 | 99 | <i>S. fulvissimus</i> |

Atividade antimicrobiana em porcentagem de inibição

| | Extrato | | Meio | MRSA | MSSA | CA | AF |
|------------------------------|---------|------------------------------|-----------|-------|-------|-------|-------|
| | Duetz | CA-300260-a01-MO011 | APM9 | | 100,6 | 99,1 | 12,3 |
| CA-300260-a01-MO014 | | DNPM | | 1,3 | 96,8 | 96 | 88,5 |
| CA-300260-a01-MO016 | | KHC | | 98,6 | 97,3 | 0 | 36,4 |
| CA-300260-a01-MO019 | | RAM2-P V2 | | 82,1 | 99,8 | 97,9 | 88,1 |
| CA-300260-a01-MO020 | | SAM-6 | | 99,5 | 99,6 | 5,4 | 30,6 |
| CA-300309-a01-MO014 | | DNPM | | 70,5 | 100 | 98,2 | 87,2 |
| CA-300309-a01-MO016 | | KHC | | 99,3 | 95,3 | 0 | 41,1 |
| CA-300309-a01-MO019 | | RAM2-P V2 | | 87,3 | 99,6 | 98,3 | 90,5 |
| CA-300309-a01-MO020 | | SAM-6 | | 99,1 | 99,2 | 0 | 40,8 |
| | Extrato | | Meio | AF | CA | CG | CP |
| | EPA | CA-300260-a01-MO021-EC01-a01 | RAM2-P V2 | 7,1 | 0 | 97,73 | 25,26 |
| CA-300309-a01-MO021-EC01-a01 | | DNPM | 0 | 0 | 98,52 | 0 | |
| CA-300309-a01-MO022-EC01-a01 | | RAM2-P V2 | 0 | 15,71 | 100 | 27,57 | |

Compostos produzidos: Maltophilin, Norcardamine, Alteramide A e B, Feigrisolide C e D

LMA323ST_37

Ilha Rei George: ponto CII

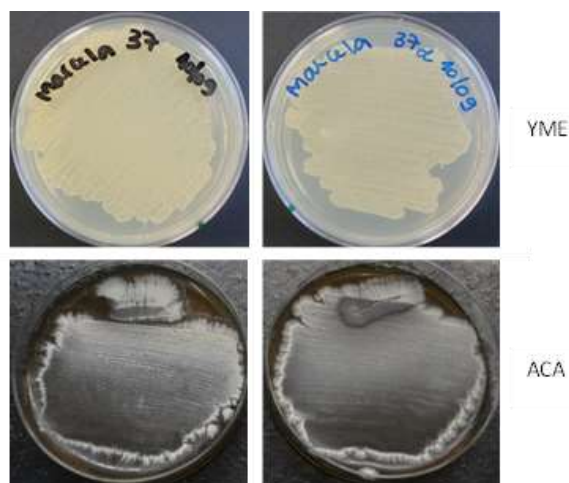
62°20'05.98S, 58°96'37.68W

Meio de cultivo: Agar ISP2

BOX: grupo B

REP: grupo 2

ST 38



YME

ACA

Identificação molecular

| Gene | T (pb) | Nº acesso | Id (%) | Espécie |
|-------------|--------|-----------|--------|-------------------------|
| 16S EzBio | 1271 | - | 96,91 | <i>S. fulvissimus</i> |
| 16S GBank | 1271 | MW055616 | - | - |
| <i>rpoB</i> | 787 | MZ613393 | 99 | <i>S. fulvissimus</i> |
| <i>recA</i> | 625 | MZ575699 | 88 | <i>Streptomyces</i> sp. |
| <i>atpD</i> | 856 | MZ566610 | 98 | <i>S. fulvissimus</i> |
| <i>trpB</i> | 760 | MZ645913 | 98 | <i>S. fulvissimus</i> |
| <i>gyrB</i> | 1002 | MZ596399 | 99 | <i>S. fulvissimus</i> |

Atividade antimicrobiana em porcentagem de inibição

| | Extrato | Meio | Atividade antimicrobiana (%) | | | |
|-------|---------------------|-----------|------------------------------|------|------|------|
| | | | MRSA | MSSA | CA | AF |
| Duetz | CA-300261-a01-MO016 | KHC | 100 | 100 | 17,6 | 31 |
| | CA-300261-a01-MO019 | RAM2-P V2 | 87,9 | 88,2 | 0 | 0 |
| | CA-300261-a01-MO020 | SAM-6 | 87,1 | 99,7 | 0 | 10,4 |
| | CA-300310-a01-MO011 | APM9 | 97,7 | 98,4 | 0 | 0 |
| | CA-300310-a01-MO014 | DNPM | 8,4 | 21,1 | 95,5 | 29,2 |
| | CA-300310-a01-MO016 | KHC | 100 | 99,4 | 92,3 | 48,9 |
| | CA-300310-a01-MO017 | M016 | 0 | 0 | 75,8 | 26,5 |
| | CA-300310-a01-MO019 | RAM2-P V2 | 27,3 | 28,8 | 98,4 | 42,3 |
| | CA-300310-a01-MO020 | SAM-6 | 9,9 | 66,4 | 92,6 | 0 |

Compostos produzidos: Não pesquisado

LMA323ST_38

Península Antártica: ponto Brown III

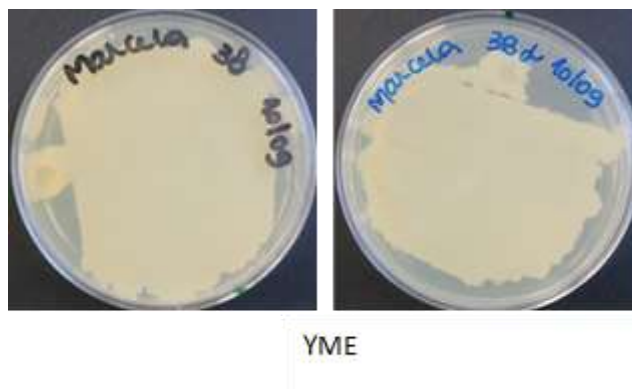
64°82'31.83S, 62°85'77.33W

Meio de cultivo: ACA

BOX: grupo B

REP: grupo 3

ST 38



Identificação molecular

| Gene | T (pb) | Nº acesso | Id (%) | Espécie |
|-------------|--------|-----------|--------|---|
| 16S EzBio | 1265 | - | 95,32 | <i>S. globisporus</i> |
| 16S GBank | 1265 | MW055617 | 94,52 | <i>S. globisporus</i> , <i>S. griseus</i> |
| <i>rpoB</i> | 782 | MZ613394 | 97 | <i>S. fulvissimus</i> |
| <i>recA</i> | 961 | MZ575700 | 98 | <i>S. fulvissimus</i> |
| <i>atpD</i> | 858 | MZ566611 | 96 | <i>Streptomyces</i> sp. |
| <i>trpB</i> | 760 | MZ645914 | 98 | <i>S. fulvissimus</i> |
| <i>gyrB</i> | 1003 | MZ596400 | 99 | <i>S. fulvissimus</i> |

Atividade antimicrobiana: Não avaliada

Compostos produzidos: Não pesquisado

LMA323ST_39

Península Antártica: ponto Brown III

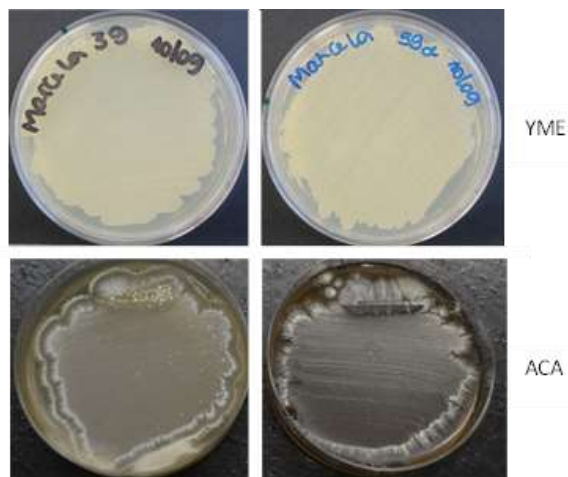
64°82'31.83S, 62°85'77.33W

Meio de cultivo: Agar ISP2

BOX: grupo B

REP: grupo 2

ST 38



Identificação molecular

| Gene | T (pb) | Nº acesso | Id (%) | Espécie |
|-------------|--------|-----------|--------|-------------------------|
| 16S EzBio | 1297 | - | 94,28 | <i>S. griseus</i> |
| 16S GBank | 1297 | MW055618 | - | - |
| <i>rpoB</i> | 788 | MZ613395 | 99 | <i>S. fulvissimus</i> |
| <i>recA</i> | 849 | MZ575701 | 88 | <i>Streptomyces</i> sp. |
| <i>atpD</i> | 857 | MZ566612 | 98 | <i>S. fulvissimus</i> |
| <i>trpB</i> | 760 | MZ645915 | 98 | <i>S. fulvissimus</i> |
| <i>gyrB</i> | 999 | MZ596401 | 99 | <i>S. fulvissimus</i> |

Atividade antimicrobiana em porcentagem de inibição

| | Extrato | Meio | Atividade antimicrobiana (%) | | | |
|-------|---------------------|-----------|------------------------------|------|------|------|
| | | | MRSA | MSSA | CA | AF |
| Duetz | CA-300263-a01-MO014 | DNPM | 6 | 67,2 | 99,8 | 79,3 |
| | CA-300263-a01-MO016 | KHC | 99,9 | 99,1 | 0 | 22,9 |
| | CA-300263-a01-MO019 | RAM2-P V2 | 44,8 | 60,2 | 96,6 | 56,1 |
| | CA-300263-a01-MO020 | SAM-6 | 22,8 | 100 | 98,5 | 0 |
| | CA-300312-a01-MO011 | APM9 | 99,1 | 98,3 | 0 | 0 |
| | CA-300312-a01-MO014 | DNPM | 0 | 84,6 | 99,1 | 93,8 |
| | CA-300312-a01-MO016 | KHC | 100 | 99,1 | 86,6 | 33,9 |
| | CA-300312-a01-MO017 | M016 | 4,3 | 0 | 91,7 | 28,6 |
| | CA-300312-a01-MO019 | RAM2-P V2 | 20,3 | 14,9 | 98,2 | 68,5 |
| | CA-300312-a01-MO020 | SAM-6 | 1,3 | 11,3 | 86,4 | 0 |

Compostos produzidos: Não pesquisado

LMA323ST_40

Península Antártica: ponto Brown III

64°82'31.83S, 62°85'77.33W

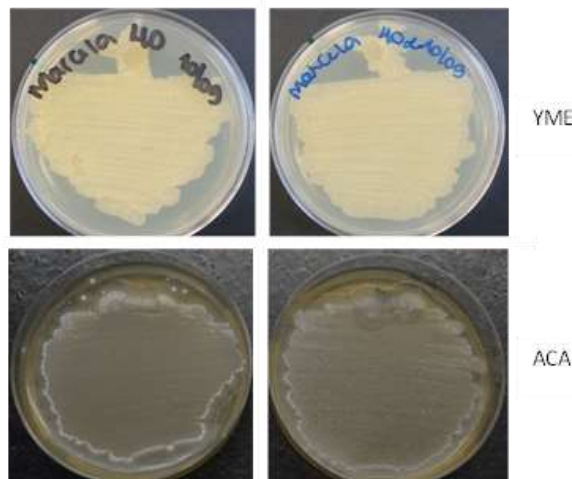
Meio de cultivo: Agar ISP2

BOX: grupo A, subgrupo 2

REP: sem grupo

Maior nº de fragmentos: 19

ST 38



Identificação molecular

| Gene | T (pb) | Nº acesso | Id (%) | Espécie |
|-------------|--------|-----------|--------|-------------------------|
| 16S EzBio | 1471 | - | 94,64 | <i>S. pratensis</i> |
| 16S GBank | 1471 | MW055619 | 94,68 | <i>S. microflavus</i> |
| <i>rpoB</i> | 767 | MZ613396 | 89 | <i>Streptomyces</i> sp. |
| <i>recA</i> | 890 | MZ575702 | 97 | <i>S. fulvissimus</i> |
| <i>atpD</i> | 852 | MZ566613 | 93 | <i>Streptomyces</i> sp. |
| <i>trpB</i> | 459 | MZ645916 | 94 | <i>Streptomyces</i> sp. |
| <i>gyrB</i> | 999 | MZ596402 | 99 | <i>S. fulvissimus</i> |

Atividade antimicrobiana em porcentagem de inibição

| | Extrato | Meio | MRSA | MSSA | CA | AF | |
|-------|---------------------|------------------------------|-----------|------|------|-------|-------|
| | | | | | | | |
| Duetz | CA-300264-a01-MO014 | DNPM | 100 | 99,8 | 0 | 0 | |
| | CA-300264-a01-MO016 | KHC | 76,3 | 98,4 | 0 | 0 | |
| | CA-300264-a01-MO018 | M016 AC NAL | 100 | 100 | 30,5 | 21,6 | |
| | CA-300264-a01-MO017 | M016 | 98,2 | 100 | 8,5 | 22,1 | |
| | CA-300264-a01-MO019 | RAM2-P V2 | 99,6 | 99,2 | 93,4 | 0 | |
| | CA-300264-a01-MO020 | SAM-6 | 99,8 | 100 | 36,9 | 29,9 | |
| | CA-300313-a01-MO014 | DNPM | 99,6 | 98,8 | 0 | 0 | |
| | CA-300313-a01-MO016 | KHC | 99,1 | 97,8 | 3,3 | 28,7 | |
| | CA-300313-a01-MO018 | M016 AC NAL | 98,8 | 97,8 | 0 | 25,5 | |
| | CA-300313-a01-MO017 | M016 | 100 | 100 | 8,8 | 37,3 | |
| | CA-300313-a01-MO019 | RAM2-P V2 | 96,7 | 98,9 | 0 | 0 | |
| | CA-300313-a01-MO020 | SAM-6 | 99,3 | 100 | 82,4 | 37,6 | |
| | EPA | Extrato | Meio | AF | CA | CG | CP |
| | | CA-300264-a01-MO022-EC01-a01 | RAM2-P V2 | 5,8 | 0 | 98,53 | 12,39 |

Compostos produzidos: Feigrisolide C e D

LMA323ST_41

Ilha Rei George: ponto CII

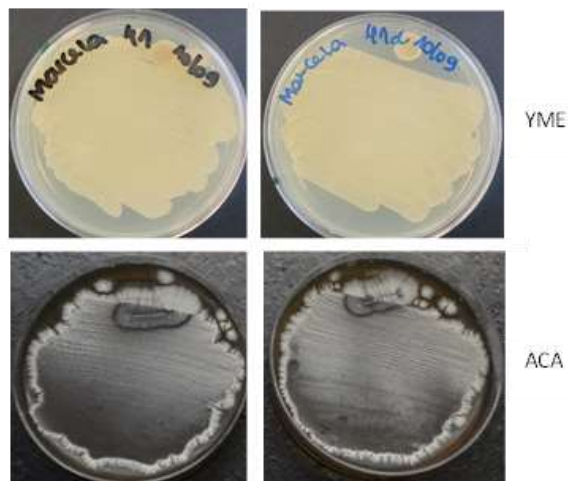
62°20'05.98S, 58°96'37.68W

Meio de cultivo: Agar Aveia

BOX: grupo B

REP: grupo 3

ST 38



YME

ACA

Identificação molecular

| Gene | T (pb) | Nº acesso | Id (%) | Espécie |
|-------------|--------|-----------|--------|-------------------------|
| 16S EzBio | 1311 | - | 96,20 | <i>S. fulvissimus</i> |
| 16S GBank | 1311 | MT612469 | 98,92 | <i>S. anulatus</i> |
| <i>rpoB</i> | 786 | MZ613397 | 98 | <i>S. fulvissimus</i> |
| <i>recA</i> | 823 | MZ575703 | 99 | <i>S. fulvissimus</i> |
| <i>atpD</i> | 853 | MZ566614 | 91 | <i>Streptomyces</i> sp. |
| <i>trpB</i> | 760 | MZ645917 | 98 | <i>S. fulvissimus</i> |
| <i>gyrB</i> | 1003 | MZ596403 | 99 | <i>S. fulvissimus</i> |

Atividade antimicrobiana em porcentagem de inibição

| | Extrato | Meio | MRSA | MSSA | CA | AF |
|-------|------------------------------|-----------|------|-------|------|-------|
| | | | | | | |
| Duetz | CA-300265-a01-MO014 | DNPM | 7,3 | 29,8 | 99,6 | 98,5 |
| | CA-300265-a01-MO016 | KHC | 100 | 100 | 0 | 31,5 |
| | CA-300265-a01-MO017 | M016 | 0 | 0 | 99,7 | 89,2 |
| | CA-300265-a01-MO019 | RAM2-P V2 | 17,2 | 25,8 | 98,1 | 81,6 |
| | CA-300265-a01-MO020 | SAM-6 | 19,3 | 50 | 98,4 | 0 |
| | CA-300314-a01-MO014 | DNPM | 0 | 0 | 97,3 | 62,6 |
| | CA-300314-a01-MO016 | KHC | 99,9 | 98,9 | 0 | 9,3 |
| | CA-300314-a01-MO019 | RAM2-P V2 | 29,2 | 26,2 | 97,8 | 87,1 |
| EPA | Extrato | Meio | AF | CA | CG | CP |
| | CA-300265-a01-MO021-EC01-a01 | RAM2-P V2 | 63,3 | 99,23 | 100 | 52,42 |

Compostos produzidos: Maltophilin, Alteramide A e B, Feigrisolide C e D

LMA323ST_42

Península Antártica: ponto Brown II

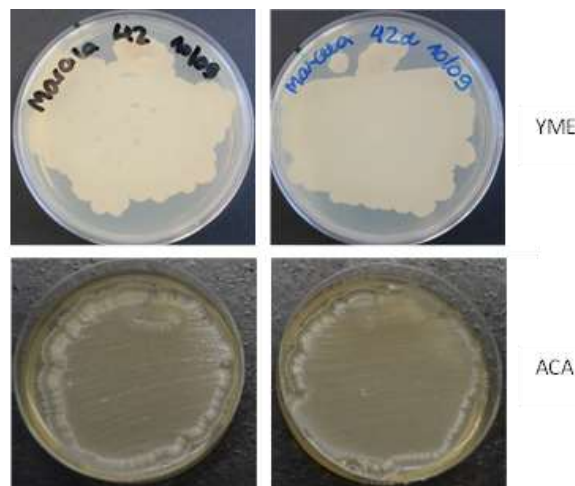
64°82'34S, 62°85'73.83W

Meio de cultivo: ACA

BOX: grupo B

REP: grupo 2

ST 31



Identificação molecular

| Gene | T (pb) | Nº acesso | Id (%) | Espécie |
|-------------|--------|-----------|--------|-----------------------------------|
| 16S EzBio | 1268 | - | 97,17 | <i>S. fulvissimus</i> |
| 16S GBank | 1268 | MW055620 | 94,61 | <i>S. globisporus, S. griseus</i> |
| <i>rpoB</i> | 777 | MZ613398 | 88 | <i>Streptomyces</i> sp. |
| <i>recA</i> | 823 | MZ575704 | 99 | <i>S. praecox</i> |
| <i>atpD</i> | 859 | MZ566615 | 96 | <i>Streptomyces</i> sp. |
| <i>trpB</i> | 758 | MZ645918 | 97 | <i>S. praecox</i> |
| <i>gyrB</i> | 999 | MZ596404 | 99 | <i>S. anulatus</i> |

Atividade antimicrobiana em porcentagem de inibição

| | Extrato | | Meio | MRSA | MSSA | CA | AF | |
|-------|---------------------|------------------------------|------|-------|------|------|-------|-------|
| | | | | | | | | |
| Duetz | CA-300266-a01-MO001 | APM9 | | 74,6 | 98 | 0 | 0 | |
| | CA-300266-a01-MO004 | DNPM | | 78,5 | 98,6 | 0 | 2,1 | |
| | CA-300266-a01-MO006 | KHC | | 99,7 | 99,1 | 100 | 59,6 | |
| | CA-300266-a01-MO008 | M016 AC NAL | | 98,2 | 97,8 | 0 | 29,8 | |
| | CA-300266-a01-MO007 | M016 | | 98,6 | 97,1 | 0 | 6 | |
| | CA-300266-a01-MO009 | RAM2-P V2 | | 89,4 | 97,6 | 0 | 13,6 | |
| | CA-300266-a01-MO010 | SAM-6 | | 99,1 | 100 | 88,1 | 30,8 | |
| | CA-300315-a01-MO004 | DNPM | | 82 | 98,9 | 0 | 0 | |
| | CA-300315-a01-MO006 | KHC | | 100 | 100 | 96,2 | 0 | |
| | CA-300315-a01-MO008 | M016 AC NAL | | 100 | 99,9 | 74,4 | 31,8 | |
| | CA-300315-a01-MO007 | M016 | | 78,1 | 99,3 | 0 | 0 | |
| | CA-300315-a01-MO010 | SAM-6 | | 98,9 | 100 | 36,9 | 20,2 | |
| | EPA | Extrato | | Meio | AF | CA | CG | CP |
| | | CA-300266-a01-MO011-EC01-a01 | | SAM-6 | 4,8 | 0 | 98,39 | 18,27 |

Compostos produzidos: Feigrisolide C e D

LMA323ST_43

Ilha Rei George: ponto CII

62°20'05.98S, 58°96'37.68W

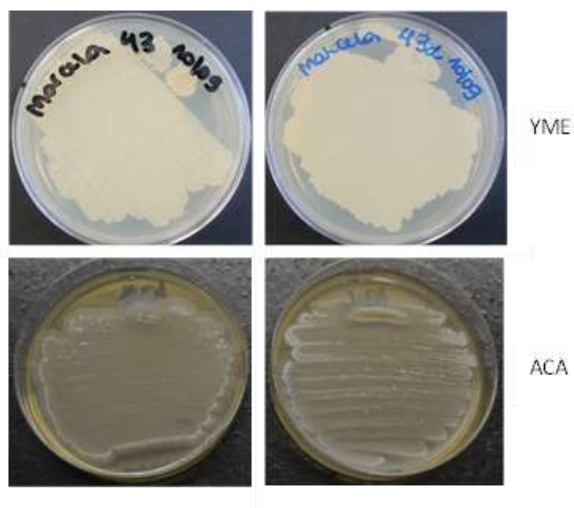
Meio de cultivo: ACA

BOX: grupo A, subgrupo 1

REP: grupo 4

Menor nº de fragmentos

ST 31



Identificação molecular

| Gene | T. (pb) | Nº acesso | Id (%) | Espécie |
|-------------|---------|-----------|--------|-------------------------|
| 16S EzBio | 1268 | - | 97,27 | <i>S. globisporus</i> |
| 16S GBank | 1268 | MW055621 | - | - |
| <i>rpoB</i> | 783 | MZ613399 | 96 | <i>Streptomyces</i> sp. |
| <i>recA</i> | 817 | MZ575705 | 98 | <i>S. praecox</i> |
| <i>atpD</i> | 854 | MZ566616 | 94 | <i>Streptomyces</i> sp. |
| <i>trpB</i> | 759 | MZ645919 | 97 | <i>S. praecox</i> |
| <i>gyrB</i> | 996 | MZ596405 | 98 | <i>S. anulatus</i> |

Atividade antimicrobiana em porcentagem de inibição

| | Extrato | Meio | Atividade antimicrobiana (%) | | | |
|---------------------|------------------------------|-------------|------------------------------|-------|-------|-------|
| | | | MRSA | MSSA | CA | AF |
| Duetz | CA-300267-a01-MO004 | DNPM | 49,2 | 99,3 | 87,4 | 0 |
| | CA-300267-a01-MO006 | KHC | 100 | 99,1 | 0 | 7 |
| | CA-300267-a01-MO008 | M016 AC NAL | 99,9 | 98,4 | 6,6 | 26,9 |
| | CA-300267-a01-MO007 | M016 | 100 | 100 | 100 | 33,8 |
| | CA-300267-a01-MO009 | RAM2-P V2 | 99,5 | 99,8 | 90,3 | 19 |
| | CA-300267-a01-MO010 | SAM-6 | 99,3 | 99,7 | 0 | 38,2 |
| | CA-300316-a01-MO004 | DNPM | 100 | 99,8 | 0 | 2,4 |
| | CA-300316-a01-MO006 | KHC | 77,7 | 99,6 | 0 | 0,5 |
| | CA-300316-a01-MO008 | M016 AC NAL | 98,1 | 97,6 | 0 | 26,8 |
| | CA-300316-a01-MO009 | RAM2-P V2 | 98,9 | 97,6 | 0 | 0 |
| CA-300316-a01-MO010 | SAM-6 | 99,3 | 99,2 | 94 | 25,3 | |
| EPA | Extrato | Meio | AF | CA | CG | CP |
| | CA-300316-a01-MO012-EC01-a01 | SAM-6 | 0 | 77,77 | 99,71 | 36,41 |

Compostos produzidos: Não pesquisado

LMA323ST_44

Ilha Rei George: ponto CII

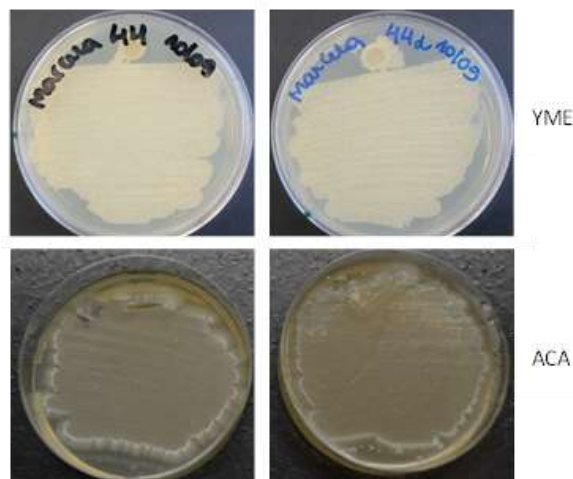
62°20'05.98S, 58°96'37.68W

Meio de cultivo: Agar Rafinose Histidina

BOX: grupo A, subgrupo 2

REP: grupo 2

ST 31



Identificação molecular

| Gene | T (pb) | Nº acesso | Id (%) | Espécie |
|-------------|--------|-----------|--------|--------------------------|
| 16S EzBio | 1436 | - | 97,21 | <i>S. fulvorobeus</i> |
| 16S GBank | 1436 | MW055622 | 99,49 | <i>S. cyaneofuscatus</i> |
| <i>rpoB</i> | 787 | MZ613400 | 98 | <i>S. praecox</i> |
| <i>recA</i> | 811 | MZ575706 | 97 | <i>S. praecox</i> |
| <i>atpD</i> | 857 | MZ566617 | 98 | <i>S. griseus</i> |
| <i>trpB</i> | 759 | MZ645920 | 97 | <i>S. praecox</i> |
| <i>gyrB</i> | 1003 | MZ596406 | 99 | <i>S. anulatus</i> |

Atividade antimicrobiana em porcentagem de inibição

| | Extrato | | Meio | MRSA | MSSA | CA | AF |
|-------|------------------------------|-------------|------|------|------|------|------|
| | | | | | | | |
| Duetz | CA-300268-a01-MO014 | DNPM | | 46 | 99,8 | 87,1 | 0 |
| | CA-300268-a01-MO016 | KHC | | 95,7 | 99,4 | 0 | 1,2 |
| | CA-300268-a01-MO018 | M016 AC NAL | | 97,8 | 97,4 | 13,4 | 25,2 |
| | CA-300268-a01-MO017 | M016 | | 100 | 100 | 27,4 | 25,7 |
| | CA-300268-a01-MO019 | RAM2-P V2 | | 98,4 | 97,1 | 0 | 0 |
| | CA-300268-a01-MO020 | SAM-6 | | 99,8 | 99,6 | 0 | 35,2 |
| | CA-300317-a01-MO016 | KHC | | 99,6 | 100 | 100 | 34,7 |
| | CA-300317-a01-MO018 | M016 AC NAL | | 99 | 98,1 | 0 | 15,9 |
| | CA-300317-a01-MO017 | M016 | | 98,6 | 100 | 0 | 5,6 |
| | CA-300317-a01-MO020 | SAM-6 | | 99,3 | 99,1 | 0 | 39,2 |
| EPA | Extrato | | Meio | AF | CA | CG | CP |
| | CA-300317-a01-MO022-EC01-a01 | KHC | | | | | |

Compostos produzidos: Feigrisolide C e D

LMA323ST_45

Ilha Rei George: ponto CII

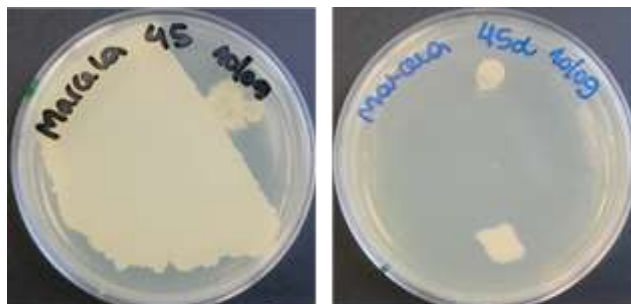
62°20'05.98S, 58°96'37.68W

Meio de cultivo: Agar ISP2

BOX: grupo A, subgrupo 1

REP: grupo 4

ST não definida



YME

Identificação molecular

| Gene | T (pb) | Nº acesso | Id (%) | Espécie |
|-------------|--------|-----------|--------|-------------------------|
| 16S EzBio | 1266 | - | 95,81 | <i>S. urticae</i> |
| 16S GBank | 1266 | MT612470 | 94,58 | <i>S. fildesensis</i> |
| <i>rpoB</i> | 691 | MZ613401 | 87 | <i>Streptomyces</i> sp. |
| <i>recA</i> | 571 | MZ575707 | - | - |
| <i>atpD</i> | 857 | MZ566618 | - | - |
| <i>trpB</i> | 380 | MZ645921 | 93 | <i>Streptomyces</i> sp. |
| <i>gyrB</i> | 994 | MZ596407 | 92 | <i>Streptomyces</i> sp. |

Atividade antimicrobiana: Não avaliada

Compostos produzidos: Não pesquisado

LMA323ST_46

Península Antártica: ponto Brown II

64°82'34S, 62°85'73.83W

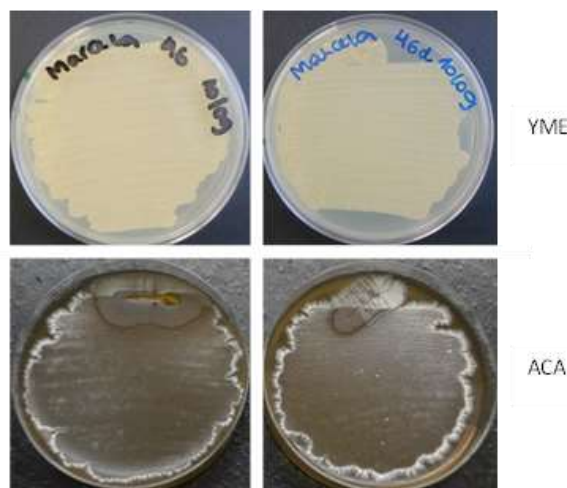
Meio de cultivo: Agar ISP2

BOX: grupo B

Maior nº de fragmentos

REP: grupo 4

ST 31



Identificação molecular

| Gene | T (pb) | Nº acesso | Id (%) | Espécie |
|-------------|--------|-----------|--------|-----------------------|
| 16S EzBio | 1447 | - | 96,80 | <i>S. fulvorobeus</i> |
| 16S GBank | 1447 | MW055623 | 96,35 | <i>S. griseus</i> |
| <i>rpoB</i> | 790 | MZ613402 | 99 | <i>S. praecox</i> |
| <i>recA</i> | 888 | MZ575708 | 98 | <i>S. praecox</i> |
| <i>atpD</i> | 851 | MZ566619 | 97 | <i>S. griseus</i> |
| <i>trpB</i> | 759 | MZ645922 | 97 | <i>S. praecox</i> |
| <i>gyrB</i> | 996 | MZ596408 | 98 | <i>S. anulatus</i> |

Atividade antimicrobiana em porcentagem de inibição

| | Extrato | Meio | Atividade antimicrobiana (%) | | | |
|-------|---------------------|-----------|------------------------------|------|------|------|
| | | | MRSA | MSSA | CA | AF |
| Duetz | CA-300270-a01-MO014 | DNPM | 8,9 | 79,1 | 98,3 | 68,6 |
| | CA-300270-a01-MO016 | KHC | 100 | 99,6 | 0 | 36,2 |
| | CA-300270-a01-MO019 | RAM2-P V2 | 13,7 | 38,8 | 95,7 | 35,9 |
| | CA-300270-a01-MO020 | SAM-6 | 99,9 | 100 | 0 | 38,4 |
| | CA-300319-a01-MO014 | DNPM | 0 | 9 | 92,9 | 68,6 |
| | CA-300319-a01-MO016 | KHC | 100 | 99,1 | 99,4 | 48,8 |
| | CA-300319-a01-MO019 | RAM2-P V2 | 22,6 | 29,2 | 78,4 | 10,6 |
| | CA-300319-a01-MO020 | SAM-6 | 66 | 99,4 | 95,2 | 14,8 |

Compostos produzidos: Não pesquisado

LMA323ST_47

Península Antártica: ponto Brown II

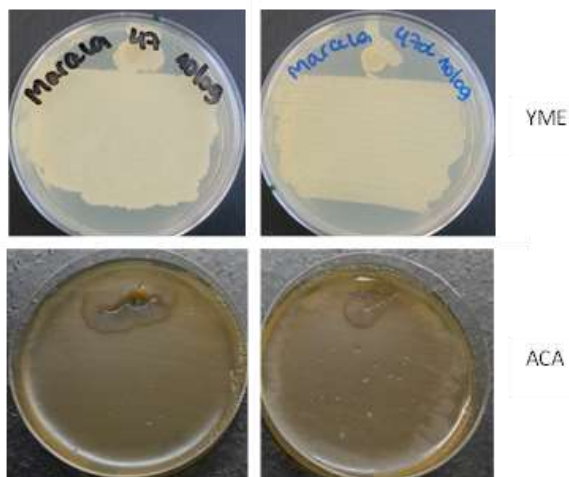
64°82'34S, 62°85'73.83W

Meio de cultivo: ACA

BOX: grupo A, subgrupo 1

REP: grupo 4

ST 31



YME

ACA

Identificação molecular

| Gene | T (pb) | Nº acesso | Id (%) | Espécie |
|-------------|--------|-----------|--------|---|
| 16S EzBio | 1267 | - | 96,49 | <i>S. globisporus</i> |
| 16S GBank | 1267 | MW055624 | 95,75 | <i>S. globisporus</i> , <i>S. griseus</i> |
| <i>rpoB</i> | 790 | MZ613403 | 99 | <i>S. praecox</i> |
| <i>recA</i> | 788 | MZ575709 | 92 | <i>Streptomyces</i> sp. |
| <i>atpD</i> | 861 | MZ566620 | 96 | <i>Streptomyces</i> sp. |
| <i>trpB</i> | 759 | MZ645923 | 97 | <i>S. praecox</i> |
| <i>gyrB</i> | 1006 | MZ596409 | 97 | <i>S. anulatus</i> |

Atividade antimicrobiana em porcentagem de inibição

| | Extrato | Meio | Atividade antimicrobiana (%) | | | |
|-------|---------------------|-----------|------------------------------|------|------|------|
| | | | MRSA | MSSA | CA | AF |
| Duetz | CA-300271-a01-MO006 | KHC | 100 | 98,9 | 0 | 40,4 |
| | CA-300271-a01-MO009 | RAM2-P V2 | 42,2 | 99,2 | 97,1 | 27,2 |
| | CA-300320-a01-MO004 | DNPM | 67,2 | 99,3 | 47,9 | 21,5 |
| | CA-300320-a01-MO006 | KHC | 100 | 99,1 | 93,1 | 46,5 |
| | CA-300320-a01-MO009 | RAM2-P V2 | 38,5 | 98,5 | 98,7 | 10,3 |

Compostos produzidos: Não pesquisado

LMA323ST_48

Ilha Rei George: ponto Hill II

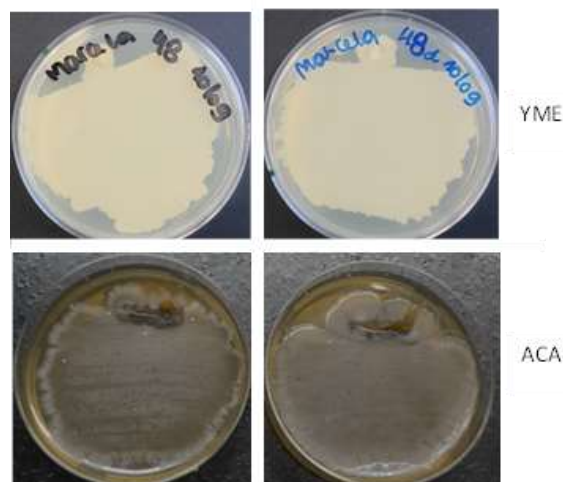
62°04'31.7W,58°24'14.9S

Meio de cultivo: Agar ISP2

BOX: grupo A, subgrupo 2

REP: grupo 4

ST 38



Identificação molecular

| Gene | T (pb) | Nº acesso | Id (%) | Espécie |
|-------------|--------|-----------|--------|---|
| 16S EzBio | 1263 | - | 95,82 | <i>S. globisporus</i> |
| 16S GBank | 1263 | MW055625 | 95,28 | <i>S. globisporus</i> , <i>S. griseus</i> |
| <i>rpoB</i> | 789 | MZ613404 | 98 | <i>S. fulvissimus</i> |
| <i>recA</i> | 793 | MZ575710 | 93 | <i>Streptomyces</i> sp. |
| <i>atpD</i> | 859 | MZ566621 | 96 | <i>Streptomyces</i> sp. |
| <i>trpB</i> | 759 | MZ645924 | 98 | <i>S. fulvissimus</i> |
| <i>gyrB</i> | 1000 | MZ596410 | 99 | <i>S. fulvissimus</i> |

Atividade antimicrobiana em porcentagem de inibição

| | Extrato | | Meio | MRSA | MSSA | CA | AF |
|-------|------------------------------|-----------|------|------|------|------|------|
| | | | | | | | |
| Duetz | CA-300272-a01-MO006 | KHC | | 100 | 99,4 | 98,6 | 44,5 |
| | CA-300272-a01-MO009 | RAM2-P V2 | | 74,5 | 100 | 93,7 | 72 |
| | CA-300321-a01-MO004 | DNPM | | 22,8 | 96,3 | 96,8 | 61,8 |
| | CA-300321-a01-MO006 | KHC | | 99,2 | 99,4 | 0 | 55 |
| | CA-300321-a01-MO009 | RAM2-P V2 | | 4,5 | 18,3 | 99,2 | 79,3 |
| EPA | Extrato | | Meio | AF | CA | CG | CP |
| | CA-300272-a01-MO012-EC01-a01 | RAM2-P V2 | | | | | |

Compostos produzidos: Feigrisolide C e D

LMA323ST_49

Península Antártica: ponto Brown III

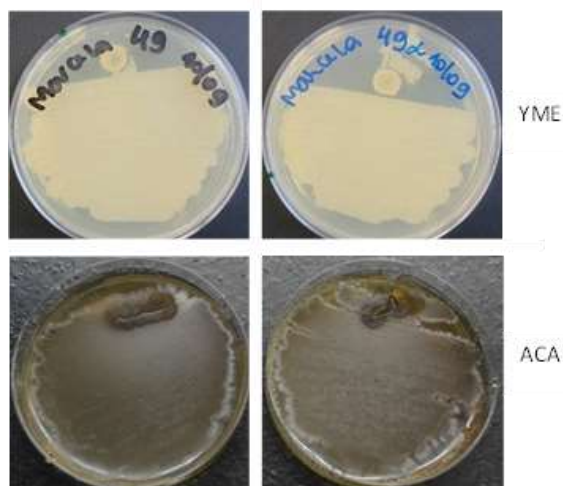
64°82'31.83S, 62°85'77.33W

Meio de cultivo: ACA

BOX: grupo B

REP: sem grupo

ST 38



Identificação molecular

| Gene | T. (pb) | Nº acesso | Id (%) | Espécie |
|-------------|---------|-----------|--------|---|
| 16S EzBio | 1265 | - | 98,61 | <i>S. fulvissimus</i> |
| 16S GBank | 1265 | MW055626 | 98,11 | <i>S. globisporus</i> , <i>S. griseus</i> |
| <i>rpoB</i> | 783 | MZ613405 | 97 | <i>S. fulvissimus</i> |
| <i>recA</i> | 562 | MZ575711 | 80 | <i>Streptomyces</i> sp. |
| <i>atpD</i> | 855 | MZ566622 | 98 | <i>S. fulvissimus</i> |
| <i>trpB</i> | 271 | MZ645925 | 97 | <i>S. fulvissimus</i> |
| <i>gyrB</i> | 1003 | MZ596411 | 98 | <i>S. fulvissimus</i> |

Atividade antimicrobiana em porcentagem de inibição

| | Extrato | Meio | Atividade antimicrobiana (%) | | | |
|-------|---------------------|-----------|------------------------------|------|------|------|
| | | | MRSA | MSSA | CA | AF |
| Duetz | CA-300273-a01-MO014 | DNPM | 20,3 | 98,5 | 95,6 | 68,5 |
| | CA-300273-a01-MO016 | KHC | 82,6 | 100 | 0 | 59,8 |
| | CA-300273-a01-MO019 | RAM2-P V2 | 20 | 36,6 | 93,7 | 68,5 |
| | CA-300273-a01-MO020 | SAM-6 | 0 | 1,2 | 97,5 | 56,1 |
| | CA-300322-a01-MO014 | DNPM | 6,8 | 7,7 | 97,6 | 76 |
| | CA-300322-a01-MO016 | KHC | 100 | 100 | 21,3 | 59,2 |
| | CA-300322-a01-MO019 | RAM2-P V2 | 7,6 | 21,9 | 93,5 | 67,6 |
| | CA-300322-a01-MO020 | SAM-6 | 0 | 0 | 97,4 | 72,6 |

Compostos produzidos: Dyhidromaltophilin

9.2 Meios de cultivo e reagentes

| | | | |
|--------------------------------------|----------------------|---|----------------------|
| <u>APM-9</u> | 250 mL pH 7,0 | <u>KHC</u> | 250 mL pH 7,2 |
| Glicose | 12,5 g | Dextrina de milho | 5 g |
| Amido solúvel de batata | 3 g | β -ciclodextrina | 2,5 g |
| Farinha fina de soja | 7,5 g | Extrato de tomate | 5 g |
| CoCl ₂ . H ₂ O | 0,0005 g | CoCl ₂ .6H ₂ O | 0,00125 g |
| CaCO ₃ | 1,75 g | Extrato de levedura | 2,5 g |
| <u>DEF-15</u> | 250 mL pH 7,0 | <u>Elementos-traço 1</u> | 100 mL |
| Sacarose | 10 g | MnCl ₂ .4H ₂ O | 100 mg |
| NH ₄ Cl | 0,5 g | ZnCl ₂ | 100 mg |
| K ₂ HPO ₄ | 0,5 g | FeCl ₂ .4H ₂ O | 100 mg |
| MgCl ₂ .6H ₂ O | 0,25 g | Nal | 50 mg |
| NaCl | 0,25 g | | |
| CaCO ₃ | 0,5 g | | |
| Elementos-traço 1 | 0,25 mL | | |
| <u>DNPM</u> | 250 mL pH 7,0 | <u>RAM2-P V2</u> | 250 mL pH 7,0 |
| Dextrina de milho | 10 g | Glicose | 2,5 g |
| N-Z Soy BL | 1,875 g | Maltose | 3,75 g |
| Extrato de levedura | 1,25 g | Farinha de milho | 1 g |
| MOPS | 5,25 g | Extrato de levedura | 1,25 g |
| | | Peptona | 1,25 g |
| <u>SAM-6</u> | 250 mL pH 7,0 | <u>Czapek</u> | 250 mL pH 7,5 |
| Glicose | 2,5 g | Sacarose | 7,5 g |
| Amido solúvel de batata | 7,5 g | NaNO ₃ | 0,75 g |
| Extrato de levedura | 1,25 g | MgSO ₄ | 0,125g |
| NZ amina de tipo E | 1,25 g | NaCl | 0,125 g |
| CoCl ₂ .6H ₂ O | 0,0025 g | K ₂ HPO ₄ | 0,25 g |
| CaCO ₃ | 1,25 g | FeSO ₄ | 0,0025 g |
| <u>M016</u> | 500 mL pH 5,8 | <u>Elementos-traço 2</u> | 1 L |
| Glicose | 5 g | SnCl ₂ | 0,005 g |
| Amido solúvel de batata | 5 g | H ₃ BO ₃ | 0,01 g |
| Maltose | 5 g | Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O | 0,012 g |
| Extrato de levedura | 0,5 g | CuSO ₄ | 0,015 g |
| Bacto Soytone | 2,5 g | CoCl ₂ .6H ₂ O | 0,02 g |
| Triptona | 2 g | KCl | 0,02 g |
| KH ₂ PO ₄ | 0,05 g | ZnCl ₂ | 0,02 g |
| K ₂ HPO ₄ | 0,1 g | MnSO ₄ .4H ₂ O | 0,1 g |
| MgSO ₄ .6H ₂ O | 0,025 g | FeCl ₃ | 5,8 g |
| NaCl | 0,01 g | HCl | 2 mL |
| CaCl ₂ .2H ₂ O | 0,025 g | | |
| Elementos-traço 2 | 0,5 mL | | |
| <u>YME</u> | 1 L pH 7,0 | <u>ATCC-2</u> | 1 L pH7,0 |
| Extrato de levedura | 4 g | Amido solúvel de batata | 20 g |
| Extrato de malte | 10 g | Dextrose | 10 g |
| Glicose | 4 g | NZ amina tipo E | 5 g |
| Agar | 20 g | Peptona | 5 g |
| Antes de autoclavar | | Extrato de levedura | 5 g |
| Diieldril 2% acetona | 3 gotas | Extrato de carne | 3 g |

Depois de autoclavar
Cicloheximida 1% 8 mL
filtrado

ACA 1 L
Amido 10 g
Caseína 0,3 g
Nitrato de potássio 2 g
Cloreto de sódio 2 g
Fosfato dipotássico 2 g
Sulfato de magnésio 0,05 g
Sulfato ferroso 0,01 g
Agar 15g

Rafinose Histidina 1 L
Rafinose 2 g
L-histidina 0,2 g
Sulfato de magnésio 0,1 g
Sulfato ferroso 0,002 g
Sulfato dipotássico 0,2 g
Agar 4g

YEME 1 L
Extrato de levedura 3 g
Extrato de malte 3 g
Peptona 5 g
Glicose 10 g
Agar 20 g
0,5% Glicina 5 g
5 mM MgCl₂.6H₂O 1,2 g

Aveia 1 L
Aveia 16 g
Agar 14,4 g

Tampão SET
NaCl 75 mM
EDTA pH 8,0 25 mM
Tris-HCl pH 7,5 20 mM

Solução de lise
Lisozima 0,05 g
Te25Suc 50 mL

NDS 1 L
Tris 1,2 g
EDTA 186,1 g
Lauril sarcosinato 1 %

CaCO₃ 1 g

ISP2 1 L
Extrato de levedura 4 g
Extrato de malte 10 g
Glicose 4 g
Agar 20 g

*Para **AC** – retirar Agar

GYM 1 L
Glicose 4 g
Extrato de levedura 4 g
Extrato de malte 10 g
Carbonato de cálcio 2 g
Agar 12 g

Meios de cultivo comerciais:

MHII

LB

RPMI

BHI

TSB

TE pH 7,0
Tris 5 mM
EDTA 0,5 mM

Te25Suc 1 L
Sacarose 102,69 g
Tris 3 g
EDTA 9,3 g

Solução de digestão
Proteinase K 1 mg/mL 1,125 g
NDS 45 mL

TBE 5x 1 L pH 8,4
Tris base 60,6 g
Ácido bórico 30,9 g
EDTA 3,722 g