



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA (UFRA)
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO (PROPED)
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA APLICADA À
AGROPECUÁRIA - PPGBAA

**BIOPROSPECÇÃO DO GENÓTIPO DE RESISTÊNCIA EM SOLO E
RIZOSFERA DE PIPER NIGRUM E A INFLUÊNCIA DO TUTOR NA
SELEÇÃO DESSES GENES**

VALÉRIA ALVES CHAVES

BELÉM/PA
2026

VALÉRIA ALVES CHAVES

**BIOPROSPECÇÃO DO GENÓTIPO DE RESISTÊNCIA EM SOLO E RIZOSFERA DE
PIPER NIGRUM E A INFLUÊNCIA DO TUTOR NA SELEÇÃO DESSES GENES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Aplicada à Agropecuária, como requisito para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Área de Concentração: Bioinformática

Orientador: Prof. Dr. Rommel Thiago Jucá Ramos

BELÉM/PA
2026

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Bibliotecas da Universidade Federal Rural da Amazônia
Gerada automaticamente mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

C512b Chaves, Valéria Alves

Bioprospecção do genótipo de resistência em solo e rizosfera de *Piper nigrum* e a influência do tutor na seleção desses genes / Valéria Alves Chaves. - 2026.
64 f. : il. color.

Dissertação (Mestrado) - Programa de PÓS-GRADUAÇÃO em Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (PPGBAA), Campus Universitário de Belém, Universidade Federal Rural Da Amazônia, Belém, 2026.

Orientador: Prof. Dr. Rommel Thiago Jucá Ramos

1. *Piper nigrum*. 2. Actinobactérias - recrutamento. 3. Rizosfera. 4. Resistoma. 5. Antimicrobianos. I. Ramos, Rommel Thiago Jucá, orient. II. Título

CDD 633.84

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer à Universidade Federal Rural da Amazônia, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Aplicada à Agropecuária, e à CAPES, por proporcionarem a possibilidade do desenvolvimento desta dissertação. Também gostaria de agradecer ao meu orientador, Rommel Ramos, por toda a orientação e apoio durante o processo de desenvolvimento deste trabalho, assim como a Oscar Cardenas-Alegria, por toda a ajuda e os ensinamentos. Este trabalho não seria possível sem vocês.

Agradeço à minha família: aos meus pais, por todo o suporte, apesar da distância; à minha tia e à minha avó, por todo o cuidado nos últimos anos; e à minha irmã, Natália Chaves, que é minha maior apoiadora em tudo. A todos vocês, o meu muito obrigada.

Também quero agradecer a todos os meus amigos pela companhia e apoio em todas as vezes em que fiquei decepcionada quando uma análise não saía do jeito que eu queria ou quando o script não funcionava — o que, honestamente, é uma terça-feira normal no mestrado. A todos os membros do SIMBIC, obrigada por tornarem os dias mais divertidos, é sempre um prazer trabalhar com vocês.

BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente



ROMMEL THIAGO JUCA RAMOS

Data: 20/03/2026 13:45:27-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr.º. Rommel Thiago Jucá Ramos
Orientador
Universidade Federal do Pará - UFPA

Documento assinado digitalmente



FABIANO CORDEIRO MOREIRA

Data: 20/03/2026 09:31:39-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Fabiano Cordeiro Moreira
Membro externo
Universidade Federal do Pará - UFPA

Documento assinado digitalmente



HELLEN KEMPFER PHILIPPSEN

Data: 20/03/2026 11:31:39-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Hellen Kempfer Philippsen
Membro interno
Universidade Federal Rural da Amazônia - UFRA

Documento assinado digitalmente



MARCUS DE BARROS BRAGA

Data: 19/03/2026 10:58:50-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Marcus Barros Braga
Membro interno
Universidade Federal Rural da Amazônia - UFRA

Joyce Kelly do Rosário da Silva
Suplente
Universidade Federal do Pará - UFPA

RESUMO

O Brasil é o segundo maior exportador mundial de pimenta-do-reino (*Piper nigrum*), com uma produção de cerca de 126.000 toneladas em 2023, destinadas tanto à exportação quanto ao consumo interno. No entanto, a produção enfrenta desafios significativos, especialmente relacionados a doenças causadas por fitopatógenos, que impactam diretamente a produtividade. O cultivo dessa espécie pode ser realizado com estacas ou com o uso de tutores vivos, que é preferido por reduzir custos, diminuir o desmatamento relacionado à extração de madeira e demandar menor volume de fertilizantes. Devido à intensificação do uso de insumos agrícolas em cultivos voltados à exportação, torna-se relevante compreender os mecanismos naturais de defesa das plantas, como o recrutamento de microrganismos benéficos pela rizosfera. Entre esses, destacam-se as Actinobactérias, conhecidas por sua capacidade de produzir compostos antimicrobianos e atuar no biocontrole de fitopatógenos. Desse modo, este estudo tem como objetivo avaliar a influência dos diferentes sistemas de tutoragem (vivo e morto) na diversidade e composição da microbiota da rizosfera de *Piper nigrum*, com ênfase no recrutamento de actinobactérias e na caracterização dos genes de resistência a antimicrobianos presentes nas amostras.

Palavras-chave: *Piper nigrum*; Actinobactérias; rizosfera; resistoma; recrutamento; antimicrobianos.

ABSTRACT

Brazil is the second largest global exporter of black pepper (*Piper nigrum*), with a production of approximately 126,000 tons in 2023, intended for both export and domestic consumption. However, production faces significant challenges, particularly those related to diseases caused by phytopathogens, which directly impact productivity. The cultivation of this species can be carried out using wooden stakes or live tutors, the latter being preferred due to lower costs, reduced deforestation associated with wood extraction, and a lower demand for fertilizers. Due to the intensified use of agricultural inputs in export-oriented cropping systems, it becomes relevant to understand the natural defense mechanisms of plants, such as the recruitment of beneficial microorganisms by the rhizosphere. Among these, Actinobacteria stand out for their ability to produce antimicrobial compounds and to act in the biocontrol of phytopathogens. Thus, this study aims to evaluate the influence of different tutoring systems (live and dead) on the diversity and composition of the rhizosphere microbiota of *Piper nigrum*, with an emphasis on the recruitment of actinobacteria and the characterization of antimicrobial resistance genes present in the samples.

Keywords: *Piper nigrum*; Actinobacteria; rhizosphere; resistome; recruitment; antimicrobials.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| FIGURA 1 – Cultivo de pimenta-do-reino, respectivamente, com tutor morto (Figura 1A) e com tutor vivo (Figura 1B) | 17 |
| FIGURA 2 – Processo de colonização bacteriana das raízes das plantas | 21 |
| FIGURA 3 – Metodologia de coleta e extração de DNA..... | 28 |
| FIGURA 4 – Metodologia de análises de diversidade..... | 29 |
| FIGURA 5 – Metodologia de análises de resistência..... | 30 |
| FIGURA 6 – Fluxograma das análises estatísticas..... | 30 |
| FIGURA 7 – Composição percentual das amostras a nível de domínio taxonômico..... | 31 |
| FIGURA 8 – Índice de alfa-diversidade Shannon para bactérias (A) em geral e especificamente para o filo das Actinobactérias (B)..... | 31 |
| FIGURA 9 – Abundância relativa da composição das amostras a nível taxonômico de filo. | 33 |
| FIGURA 10 – Heatmap da composição bacteriana (famílias taxonômicas) das amostras usando agrupamento por K-mean, (A) contendo a filtragem por outlier da Alibi-detect e (B) após a filtragem dos valores extremos através da seleção do intervalo de dados entre a mediana e o limite superior (IQR + 3) | 34 |
| FIGURA 11 – Heatmap da abundância dos gêneros de Actinobactérias em amostras de solo e rizosfera com os sistemas de suporte em tutor vivo e tutor morto..... | 35 |
| FIGURA 12 – UpSet plot demonstrando a sobreposição e exclusividade de espécies de Actinobactérias entre as amostras analisadas..... | 37 |
| FIGURA 13 – Análise de similitude entre as amostras realizada através da ferramenta Orange Data Mining v. 3.38.1 utilizando a matriz distância de Morisita com gene qacG em destaque..... | 41 |
| FIGURA 14 – Catplot-swarm da distribuição normalizada média dos tipos de mecanismos de resistência..... | 44 |
| FIGURA 15 – Análise das intersecções e exclusividades dos genes de resistência entre as amostras utilizando genes com cobertura >75% e pelo menos duas leituras alinhadas para o grupo..... | 45 |
| FIGURA 16 – Análise do componente principal utilizando os itens de maior relevância nas análises anteriores..... | 49 |
| FIGURA 17 – Matriz de correlação Pearson com dados normalizados utilizando a biblioteca Standard Scaler..... | 50 |

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO..... | 9 |
| 2. OBJETIVOS..... | 12 |
| 2.1 Objetivo geral..... | 12 |
| 2.2 Objetivos específicos..... | 12 |
| 3. REVISÃO DA LITERATURA..... | 13 |
| 3.1 Saúde do solo e diversidade microbiana..... | 13 |
| 3.1.1 Fatores que afetam a saúde do solo..... | 13 |
| 3.1.2 A participação dos microrganismos na saúde do solo..... | 14 |
| 3.2 O cultivo da pimenta-do-reino..... | 15 |
| 3.2.1 A pimenta-do-reino..... | 15 |
| 3.2.2 A cultura da pimenta-do-reino no Brasil..... | 16 |
| 3.2.3 Solo adequado ao plantio de Piper nigrum..... | 18 |
| 3.2.4 Comunidades microbianas em solo de Piper nigrum..... | 18 |
| 3.3 Mecanismos de regulação de comunidades microbianas em rizosfera..... | 19 |
| 3.3.1 Recrutamento de microrganismos benéficos do solo..... | 19 |
| 3.3.2 A regulação das comunidades rizosférica..... | 21 |
| 3.4 Ocorrência de genes de resistência no solo..... | 21 |
| 3.5 Actinobactérias..... | 23 |
| 3.6 Métodos moleculares para a caracterização do microbioma do solo e rizosfera.. | 24 |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS..... | 26 |
| 4.1 Coleta da amostra..... | 26 |
| 4.2 Extração de DNA..... | 27 |
| 4.3 Sequenciamento..... | 27 |
| 4.4 Análises bioinformáticas..... | 27 |
| 4.4.1 Análises de diversidade..... | 27 |
| 4.4.2 Análises dos genes de resistência a antibióticos..... | 28 |
| 4.4.3 Análises estatísticas..... | 29 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES..... | 31 |
| 5.1 Índices de diversidade bacteriana..... | 31 |
| 5.2 Composição bacteriana..... | 33 |
| 5.3 Perfis das espécies de Actinobactérias..... | 36 |
| 5.4 Genótipo de resistência..... | 39 |
| 5.4.1 Análise de diversidade de genes de resistência a antimicrobianos..... | 39 |
| 5.4.2 Genes de resistência a antimicrobianos..... | 40 |
| 5.4.3 Mecanismos de resistência..... | 43 |
| 5.4.4 Perfil de resistência AMRs..... | 44 |
| 5.5 Associação entre as variáveis..... | 47 |
| 6. CONCLUSÃO..... | 50 |
| REFERÊNCIAS..... | 52 |
| APÊNDICE I..... | 62 |

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o segundo maior produtor e exportador (15% da exportação mundial) de pimenta-do-reino (*Piper nigrum L.*) no mundo, atrás apenas do Vietnã (Sociedade Nacional de Agricultura, 2023). A pimenta-do-reino é comercializada no mercado interno e externo para fins alimentícios e seus subprodutos como a piperina e a oleorresina são aproveitados pelas indústrias de cosméticos e farmacêuticas. No Brasil, os estados do Espírito Santo, Pará e a Bahia se destacam como os maiores produtores de pimenta-do-reino, responsáveis pela produção de 125 mil toneladas de pimenta-do-reino, cerca de 99% da produção nacional (IBGE, 2023).

Essa cultura enfrenta obstáculos relacionados a doenças ocasionadas por patógenos, entre eles *Phytophthora capsici* e *Fusarium*, fungos causadores de apodrecimento das raízes que são dois dos maiores responsáveis por perdas em cultivos de pimenta-do-reino. Apesar disso, as plantas possuem diversos mecanismos de resistência natural ao estresse, entre eles a capacidade de se associar a microrganismos benéficos ao seu crescimento (Queiroga *et al.*, 2023; Chien & Gachomo, 2023).

A pimenta-do-reino é uma planta trepadeira, por isso em seu plantio são utilizados suportes, que podem ser de dois tipos: tutores mortos, onde são utilizadas estacas de madeira; e tutores vivos, onde é realizado um cultivo associado com outra planta. Porém, o uso de tutores mortos resulta na exploração desordenada de madeira nativa da região amazônica, em especial de madeiras nobres como acapu (*Vouacapoua americana*) e jarana (*Eicheilera jarana*) que costumam ser utilizadas para esse fim, contribuindo para o desmatamento da região amazônica. No cultivo com tutor vivo, ou cultivo sombreado, são utilizadas principalmente plantas de Gliricídia (*Gliricídia sepium*), uma variedade de leguminosa, por sua facilidade de obtenção (Kill *et al.*, 2005; Araújo *et al.*, 2024). Além da preservação da vegetação, o uso de tutor vivo exige apenas metade da dose de fertilizante recomendada para o cultivo em tutor morto (Embrapa, 2004).

Para o cultivo em larga escala de produção, a fim de proteger a lavoura de pragas que afetam a produtividade, é feito uso de insumos agrícolas como biocidas que podem ter efeitos antimicrobianos (Pignati *et al.*, 2017). Além dessa prática exigir altos investimentos, o uso de defensivos químicos também representa uma ameaça à saúde do solo e lençol freático (Zheng *et al.*, 2022). Ressalta-se ainda que o uso extensivo de antimicrobianos e biocidas na lavoura pode levar à seleção de organismos resistentes via adaptação através da aquisição de genes de

resistência cujos mecanismos podem ser compartilhados (Rad *et al.*, 2022). Portanto, a busca por alternativas mais sustentáveis é fundamental para a manutenção e melhoramento da produtividade agrícola (Rizvi *et al.*, 2024).

Nesse contexto, abordagens que exploram o potencial uso de microrganismos para a agricultura ganharam popularidade. Entre os alvos, destacam-se bactérias rizosféricas com potencial de promover o crescimento das plantas (PGPR) e bactérias que produzem compostos antimicrobianos que possam agir como biocontrole de fitopatógenos, como as Actinobactérias (Rizvi *et al.*, 2024).

O filo da Actinobactérias é um grupo de interesse devido a sua capacidade de produzir uma ampla variedade de compostos de interesse comercial. Estima-se que esse grupo esteja relacionado à produção de mais 10.000 antibióticos (Karthik, 2022). Dentre as principais classes, destacam-se macrolídeos (do tipo oligomicina e polieno), daunomicina, ciclopilactona (não-actina), aminoglicosídeos, estreptomicina, poliéteres (nigericina), ciclopilactonas, peptídeos de quinoxalina e actinomicinas. O gênero *Streptomyces*, pertencente a esse filo, é responsável pela produção de mais de 80% dos antibióticos derivados de Actinobactérias, adicionalmente o gênero também se destaca pela produção de compostos de ação antifúngica (Karthik, 2022; Syiemiong *et al.*, 2023). Essas bactérias vêm sendo estudadas por seu potencial como agentes de biocontrole contra fitopatógenos. Além disso, algumas cepas foram relatadas na literatura como potencial ação contra alguns dos principais patógenos de *Piper nigrum*, como os fungos causadores de apodrecimento das raízes (Trindade *et al.*, 2021).

A rizosfera realiza o recrutamento de microrganismos do solo que têm potencial de beneficiar a planta, podendo ter impacto direto em seu crescimento através da facilitação da aquisição de nutrientes e modulação de fitohormônios, ou de maneira indireta através da inibição de patógenos de plantas, seja através da competição ou pela produção de compostos antimicrobianos (Olanrewaju *et al.*, 2017). No entanto, ainda são escassos os estudos que investigam como esse recrutamento microbiano influencia a seleção e a manutenção de genes de resistência a antimicrobianos no microbioma rizosférico.

Nesse contexto, as actinobactérias representam um grupo de especial interesse, pois são reconhecidas pela produção de uma ampla variedade de metabólitos bioativos, incluindo antibióticos e compostos antifúngicos, que podem contribuir para o biocontrole de fitopatógenos e, potencialmente, moldar o resistoma do solo. Assim, este estudo tem como

objetivo avaliar a influência de diferentes sistemas de tutoragem (vivo e morto) na diversidade e composição da microbiota da rizosfera de *Piper nigrum*, com ênfase no recrutamento de actinobactérias e na caracterização dos genes de resistência a antimicrobianos presentes nas amostras.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o impacto de diferentes sistemas de tutoragem sobre a diversidade taxonômica e de genótipos de resistência associados à rizosfera e ao solo de *Piper nigrum*.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a diversidade e composição de rizobactérias recrutadas na pimenteira com os diferentes tutores;
- Investigar a influência da presença de actinobactérias no perfil de genes de resistência identificados nas amostras;
- Examinar as diferenças de composição dos grupos exclusivamente recrutados nas duas diferentes amostras rizosféricas;
- Comparar a composição de genes de resistência a antimicrobianos nas amostras associadas aos tipos de tutores utilizados no manejo da pimenta-do-reino.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Saúde do solo e diversidade microbiana

3.1.1 Fatores que afetam a saúde do solo

A saúde do solo depende de uma série de fatores químicos, físicos e biológicos, como o pH, temperatura, biomassa microbiana, teor de compostos orgânicos e pluviosidade que podem ser diretamente impactados pelo uso humano do solo. O manejo correto do solo para práticas agrícolas é de fundamental importância para a produção sustentável de cultivos e garantia da segurança alimentar (Gama, 2023).

Um solo saudável é um solo capaz de sustentar a produtividade agropecuária e participar e desempenhar suas funções dentro do ecossistema (Yang *et al.*, 2020). Isso está intrinsecamente relacionado às práticas agrícolas, especialmente no que diz respeito ao agronegócio e monoculturas. O plantio em larga escala leva ao desmatamento de matas nativas para sua utilização, além de fomentar práticas de aração profunda com inversão das camadas do solo, práticas estas que podem causar problemas relacionados à erosão hídrica do solo, esgotamento de nutrientes, redução do teor de matéria orgânica e também ocasionar prejuízos ao microbioma nativo (Francaviglia *et al.*, 2023).

Outra prática agrícola que representa riscos ao solo, e ao meio ambiente como um todo, é a utilização exacerbada de insumos como os fertilizantes químicos à base de NPK e pesticidas (Gama, 2023; Saath *et al.*, 2018). O Brasil, enquanto um dos maiores produtores agrícolas do mundo, também é frequentemente referido como um dos maiores consumidores de defensivos agrícolas e fertilizantes. A alta demanda de produtos agrícolas tanto para abastecimento interno quanto para a exportação torna necessária a manutenção constante das condições ótimas para o cultivo de interesse, com isso a utilização frequente de insumos agrícolas. A agricultura, de modo geral, enfrenta desafios relativos à degradação do solo e impactos ambientais resultantes do uso excessivo de agrotóxicos e fertilizantes (Saath *et al.*, 2018).

No ano de 1991, o Brasil utilizava aproximadamente sete vezes menos defensivos agrícolas do que os Estados Unidos, já no ano de 2015 se aproximaram muito, correspondendo a cerca de 10% do consumo mundial. Em 2019, cerca de 13.000 registros de defensivos agrícolas foram aprovados para utilização no Brasil, aproximadamente 80% de todo volume de agrotóxicos são utilizados em áreas de cultivo (Pignati *et al.*, 2017;

Cardenas-Alegria *et al.*, 2022).

A utilização de defensivos agrícolas para controle de fitopatógenos é um “mau necessário” para garantir que a produção agrícola não sofra grandes perdas ocasionadas por pragas e doenças. Porém, a toxicidade desses defensivos representa um risco à saúde humana e ambiental, através da contaminação do solo, água e alimentos (Ahmad *et al.*, 2024). Além disso, o uso de nitrogênio em excesso como fertilizante altera as características químicas do solo, podendo causar a sua acidificação e prejudicar a comunidade microbiana local. Todavia, sua utilização em concentrações ótimas (ajustados de acordo com a demanda do ambiente) combinada com o uso de fertilizantes orgânicos pode auxiliar na promoção da saúde do solo (Singh *et al.*, 2018).

Assim, é fundamental que as práticas agrícolas possam evoluir no desenvolvimento de técnicas mais sustentáveis de combate aos fitopatógenos de maneira que o uso de defensivos químicos tóxicos possa ser substituído. O controle biológico é uma das abordagens que vêm sendo estudadas como alternativa, ela trata da utilização de microrganismos como inibidores de fitopatógenos (Boulahouat *et al.*, 2023).

3.1.2 A participação dos microrganismos na saúde do solo

A diversidade microbiana no solo possui um papel fundamental na manutenção da ciclagem de nutrientes. O ciclo do carbono em especial sofre forte influência de diminuições na diversidade microbiana, parte da capacidade do solo de sequestrar carbono da atmosfera está diretamente relacionado às comunidades microbianas que o compõem (Maron *et al.*, 2018; Vieira *et al.*, 2021).

O ciclo do nitrogênio também sofre impacto direto das comunidades microbianas, principalmente das bactérias fixadoras de nitrogênio (diazotróficas) que são responsáveis pela captura do nitrogênio atmosférico e sua transformação para uma forma biodisponível através do processo de nitrificação, fundamental para que os demais organismos possam utilizá-lo em seu metabolismo, em especial os vegetais que frequentemente associam-se a esses microrganismos para esse fim (Singh *et al.*, 2022).

Adicionalmente, os microrganismos do solo têm papéis-chave na disponibilidade de outros nutrientes como o fósforo e o ferro, que são solubilizados por substâncias produzidas pelas bactérias, entre elas os sideróforos, substâncias quelantes que são capazes de reduzir compostos do solo em formas biodisponíveis para as bactérias (Vieira *et al.*, 2021; Sun *et al.*,

2022). Por isso, existe uma grande preocupação acerca do impacto ambiental ocasionado pela ação antrópica nas comunidades de microrganismos presentes no solo (Maron *et al.*, 2018).

Além dos impactos diretos relacionados à agricultura como a utilização de fertilizantes e pesticidas, outros fatores relacionados a mudanças climáticas podem causar alterações nas características do solo e na composição de suas comunidades microbianas. O estudo de Zhou e colaboradores indicou que as comunidades microbianas raras são mais sensíveis a alterações de fatores de mudança global (GFCs) do que as espécies mais comuns ao ambiente (Zhou *et al.*, 2020).

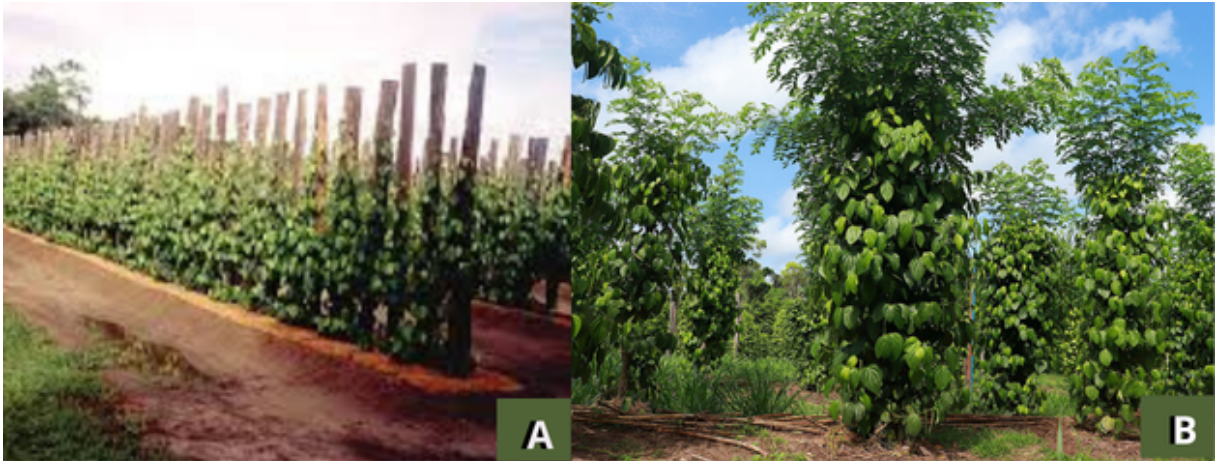
A Amazônia possui uma grande biodiversidade de microrganismos em seu solo. Essas comunidades microbianas atuam em diversas atividades biogeoquímicas necessárias a sua adaptação ambiental. A observação de variações dessas comunidades e sua distribuição gênica em áreas afetadas pelo impacto do agronegócio é fundamental para compreender os mecanismos atuais de resistência ao estresse ambiental e promover o desenvolvimento de técnicas sustentáveis de crescimento agrícola sem acarretar perda de produtividade (Cardenas-Alegria *et al.*, 2022).

3.2 O cultivo da pimenta-do-reino

3.2.1 A pimenta-do-reino

A pimenta-do-reino ou pimenta preta (*Piper nigrum L.*) pertence à família das *piperaceae*. A planta é caracterizada como uma trepadeira, com raízes pivotantes (axiais) que realizam a absorção de nutrientes e raízes aéreas (fasciculadas) que auxiliam em sua fixação, ela pode alcançar até 10m de altura. A planta começa a produzir frutos 3 anos após seu plantio, mas sua maior produtividade ocorre após 10 anos de cultivo, e pode produzir frutos por até 30 anos (Tarigan *et al.*, 2023).

Em função da característica da pimenta-do-reino de ser uma planta trepadeira, para o cultivo da pimenteira são necessárias estacas de suporte (Figura 1). De maneira geral, o cultivo desta planta pode ser realizado utilizando estacas de madeira ou estacas de outros materiais, chamado cultivo em tutor morto, ou podem utilizar árvores de baixa estatura como suporte, o que se chama cultivo com tutor vivo ou sombreado (EMBRAPA, 2004).



Fonte: Infoteca EMBRAPA

Figura 1 – Cultivo de pimenta-do-reino, respectivamente, com tutor morto (Figura 1A) e com tutor vivo (Figura 1B).

Essa especiaria é consumida em todo o mundo para fins alimentares e medicinais. A pimenta-do-reino é nativa da Ásia, mais especificamente da Índia, e é parte importante da cultura alimentar da população, além de ter aplicações na medicina tradicional onde é utilizada como estimulante de apetite, remédio para tosse, diarreia, vermes entre outras aplicações (Ashokkumar *et al.*, 2021).

A pimenta-do-reino é comercializada no mercado interno e externo, movimentando cerca de 3,6Bi em 2024 (IBGE, 2024), sendo distribuída para fins alimentícios em todo o mundo, tendo o Vietnã seguido pelo Brasil como seus dois maiores produtores (Tarigan *et al.*, 2023; Obieze *et al.*, 2023).

O sabor picante característico dessa especiaria se dá pela substância bioativa mais abundante em sua composição, a piperina. Além da piperina, a pimenta-do-reino ainda é rica em flavonoides, fenóis, terpenos e esteróis (Ashokkumar *et al.*, 2021). Seus subprodutos como a piperina e a oleorresina são aproveitados pelas indústrias de cosméticos e farmacêuticas (IBGE, 2023; Queiroga *et al.*, 2023) e vêm sendo estudados por seu potencial antifúngico, antitumoral e antioxidante (Tarigan *et al.*, 2023).

3.2.2 A cultura da pimenta-do-reino no Brasil

A pimenta-do-reino foi introduzida no Brasil por volta do século XVII, mas chegou ao Estado do Pará apenas em meados de 1930 por imigrantes japoneses. Essa cultura tem sido suporte econômico de pequenos e grandes produtores da região amazônica (EMBRAPA, 2004). Em 2004, o Pará era responsável pela produção de cerca de 30 mil toneladas de pimenta-do-reino, cerca de 85% da produção nacional. Atualmente, o estado do Espírito Santo

encabeça a produção nacional da especiaria tendo produzido cerca de 77 toneladas em 2023, aproximadamente 60% da produção brasileira (EMBRAPA, 2004; IBGE, 2023).

Na região amazônica, tradicionalmente era realizado o cultivo da pimenta-do-reino com estacas de madeira o que contribuía para o desmatamento de espécies nativas frequentemente utilizadas para esses fins, em resposta a essa problemática, a abordagem de cultivo com tutor vivo começou a ser introduzido na região (EMBRAPA, 2004). O cultivo em tutor vivo pode ser feito com diferentes tipos de plantas, na região amazônica é predominantemente utilizado a Gliricídia (*Gliricídia sepium*) por sua facilidade de obtenção e associação com melhoramento da qualidade do solo (EMBRAPA, 2004; Florentino *et al.*, 2014).

O tutor *G. sepium*, da família das *Fabaceae*, se destaca por seu potencial no melhoramento da qualidade do solo, quando comparado não apenas ao tutor morto como também a outros tipos de tutores vivos. O estudo de Dinesh e colaboradores indica que *G. sepium* melhora a disponibilidade de nutrientes essenciais ao desenvolvimento das plantas como nitrogênio. Além disso, esse estudo destaca o aumento da biomassa microbiana no cultivo com esse tutor, sugerindo que os exsudatos deste tutor vivo podem estar aumentando a atividade microbiana ao fornecer um habitat mais favorável (Dinesh *et al.*, 2010). Além da preservação da vegetação, o cultivo sombreado exige apenas 50% da dose usada para o cultivo com tutor morto, possivelmente em função de suas características de melhoramento do solo e aumento da biomassa microbiana (Queiroga *et al.*, 2023).

O cultivo de pimenta-do-reino no Brasil enfrenta obstáculos, principalmente, doenças associadas à presença de fungos e vírus, destacando-se a Podridão das raízes e ressecamento dos ramos, Podridão do pé e queima de mudas, Murcha, Podridão Brancas das raízes, Galha das raízes, Rubelose, Mosaico, Queima do fio, Queima da teia Micélica, Antracnose, Podridão preta dos frutos e Podridão das estacas (Duarte e Albuquerque, 1999; Queiroga *et al.*, 2023).

Dentre essas doenças, a Podridão das raízes e ressecamento dos ramos, ocasionada pelo fungo gênero *Fusarium*, tem um grande impacto na produção desse cultivo. Essa doença se destaca como um dos principais ocasionadores da morte precoce em pimenteiras, em geral a vida útil da planta é de em média 12 anos, porém em plantas infectadas por *Fusarium* esse número pode ser reduzido a metade (Duarte e Albuquerque, 1999; Trindade *et al.*, 2021). Essa doença é favorecida no período chuvoso onde o solo se torna mais úmido, destaca-se que a região amazônica conta com chuvas frequentes em decorrência de seu clima Equatorial úmido

e semi úmido e que esse fungo já foi identificado em plantios com *Gliricidia sepium* na República Dominicana (Fisch *et al.*, 1998; Costa *et al.*, 2020).

3.2.3 Solo adequado ao plantio de *Piper nigrum*

Existem algumas limitações quanto ao plantio de pimenta-do-reino em solos de trópicos úmidos, incluindo baixas reservas de nutrientes, a pimenteira precisa de um solo rico em nutrientes e de fácil drenagem (Dinesh *et al.*, 2010; Queiroga *et al.*, 2023). Na etapa de germinação da semente é ideal que a temperatura do solo seja pelo menos de 21°C para maior eficiência, com adubação orgânica, uma fina camada de cobertura morta protegendo-o, e com umidade constante. Essa cultura tem baixa tolerância à escassez hídrica, exigindo umidade percentual entre 60% e 95% e temperatura ideal em média de 28°C anuais (Queiroga *et al.*, 2023; Kumar *et al.*, 2021).

A pimenta-do-reino pode crescer em diferentes tipos de solo, como os latossolos amarelos e vermelhos, argilosos e basalto fértil (Queiroga *et al.*, 2023). Com relação a suas características, esse cultivo pode naturalmente reduzir o pH do solo (Zu *et al.*, 2014; Nguyen Van *et al.*, 2025), Zu e colaboradores discutem os impactos da acidez em solos de pimenta-do-reino. Eles observaram que o pH ideal para esse cultivo está entre 5.0 - 5.5, com valores inferiores a 3.5 a causando a inibição do desenvolvimento das raízes e prejudicando a absorção de nutrientes do solo. Foi concluído então que pH baixos estão associados a baixa concentração de nutrientes como Ca e Mg nas raízes, o que explicaria a redução na produtividade (Zu *et al.*, 2014).

Em 2006, Duarte e colaboradores esclareceram as condições de solo e clima adequados ao cultivo da pimenta-do-reino no Brasil. É esperado temperaturas entre 21°C e 28°C, pelo menos 1.500mm de chuva anual, umidade relativa de 80% a 88%, e mais de 2000h de brilho solar no ano. Os solos devem ter boa capacidade de drenagem e preferencialmente serem argilosos para reter a umidade durante o ano, solos de várzea não são recomendados por prejudicarem o desenvolvimento das raízes em função de sua baixa oxigenação, podendo ocasionar infecções por patógenos oportunistas (Duarte *et al.*, 2006; Duarte e Albuquerque, 1999; Queiroga *et al.*, 2023).

3.2.4 Comunidades microbianas em solo de *Piper nigrum*

O Vietnã, maior produtor de pimenta-do-reino do mundo atualmente, é uma grande fonte de informações e pesquisas a respeito dessa especiaria. Um estudo realizado nesse país buscou identificar espécies-chave na rizosfera da pimenteira que servissem como

bioindicadores da saúde ambiental, dessa maneira utilizaram amostras de um pomar doente e um saudável, curiosamente, o estudo demonstrou que as amostras de plantas doentes possuíam uma maior alfa diversidade em relação às amostras saudáveis (Obieze *et al.*, 2023).

Os filos dominantes em cultivares de pimenta-do-reino são Actinobactérias (*Actinomycetota*), Proteobacteria (*Pseudomonadota*) e Chloroflexota no Vietnã (Obieze *et al.*, 2023). Uma amostra coletada na Índia, país berço desse cultivo, indicou maior abundância dos filos *Pseudomonadota*, Firmicutes (*Bacillota*) e *Bacteroidota*. A nível de gênero, o solo rizosférico de *Piper nigrum* apresenta grande abundância de *Pseudomonas* (Parvathy *et al.*, 2024).

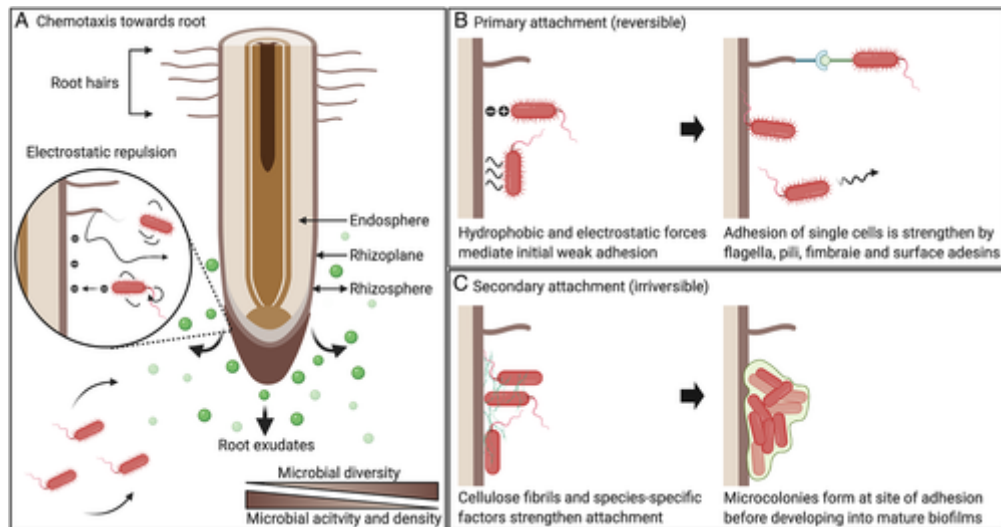
Todavia, um estudo da diversidade microbiana de solo e rizosfera em um monocultivo de *Piper nigrum* apresentou uma maior abundância relativa de *Acidobacteriota*s nos cultivares, ressalta-se que essa pesquisa foi realizada na China com cultivares pelo menos 12 anos, portanto essa variação pode ser decorrente desses fatores. Ainda, esse estudo revela uma redução da alfa diversidade nas amostras de solo onde o monocultivo ocorreu por mais tempo, inclusive houve aumento da abundância de um patógeno conhecido de pimenta-do-reino, *Fusarium*, e redução da presença de *Pseudomonas/Bacillus* benéficos (Li *et al.*, 2016).

Os estudos metagenômicos revelam que as bactérias são os organismos mais prevalentes em microbiomas associados à rizosfera. Além disso, embora diferentes filos possam compor a microbiota do solo, os filos *Actinomycetota*, *Pseudomonadota*, *Bacillota* e *Bacteroidota* são filos mais frequentemente identificados em microbiomas radiculares (Knights *et al.*, 2021).

3.3 Mecanismos de regulação de comunidades microbianas em rizosfera

3.3.1 Recrutamento de microrganismos benéficos do solo

A colonização bacteriana da rizosfera da planta pode ocorrer em múltiplas etapas (Figura 2), ele começa com a secreção do carbono fotossintetizado pelas plantas através das raízes. A disponibilidade desse nutriente no solo atrai as bactérias do solo em direção a superfície da raiz. A ligação entre as bactérias e a superfície da raiz pode ser mediada pela produção de substâncias como as adesinas de superfície e posteriormente pela produção de biofilme que proporciona maior adesão de comunidades bacterianas (Knights *et al.*, 2021).



Fonte: Knights *et al.*, 2021

Figura 2 – Processo de colonização bacteriana das raízes das plantas.

A microbiota recrutada pela rizosfera se associa positivamente com a saúde da planta, através de diferentes mecanismos, entre eles a facilitação da aquisição de nutrientes e o controle de patógenos (Knights *et al.*, 2021; Trivedi *et al.*, 2020).

O estudo de Parvathy e colaboradores avalia as diferenças na composição de rizomicrobiomas de duas espécies de *Piper*, *P. nigrum* e *P. colubrinum*, sendo a segunda resistente a patógenos que infectam os cultivos da espécie comercial. As diferenças na composição microbiana identificadas nesse estudo sugerem a influência da rizosfera no recrutamento da microbiota rizosférica (Parvathy *et al.*, 2024).

A composição microbiana da rizosfera a nível de gênero e espécie é diretamente influenciada por fatores abióticos, e as pressões seletivas impostas pelo genótipo dos hospedeiros. Em conclusão, as interações entre exsudatos radiculares e os microrganismos podem refletir em diferenças entre as comunidades microbianas no solo e na rizosfera (Knights *et al.*, 2021).

Muitos aspectos do recrutamento da microbiota rizosférica pelas plantas ainda são uma incógnita. Até 20% do carbono fotossintetizado pelas plantas pode ser liberado na forma de exsudatos, secreções ou mucilagens. A liberação desses compostos é mediada por estímulos ambientais (Knights *et al.*, 2021; Mavrodi *et al.*, 2021). Além de servirem como fontes de nutrientes para a rizomicrobiota, esses exsudatos também podem ser compostos por moléculas sinalizadoras e metabólitos secundários cujas funções ainda não estão completamente esclarecidas. Análises de expressão gênica indicaram múltiplos genes que são diferencialmente regulados pela secreção de diferentes compostos pela rizosfera (Mavrodi *et al.*, 2021).

3.3.2 A regulação das comunidades rizosférica

A rizosfera é um ambiente química e biologicamente muito ativo, uma série de reações e interações entre a planta-microrganismo ocorrem simultaneamente nela (Knights *et al.*, 2021). As zonas bióticas da rizosfera são compostas pelos microrganismos dessa região e o gradiente de substâncias bioquímicas liberadas pelas raízes chamados de rizodépósitos (York *et al.*, 2016), alterações na composição destes rizodépósitos afeta a comunidade microbiana, especialmente a comunidade aderida a superfície da raiz (York *et al.*, 2016).

A composição dos rizodépósitos pode afetar as comunidades microbianas de diferentes maneiras, seja secretando compostos antimicrobianos contra patógenos que infectam a planta ou proporcionando um ambiente apto a sobrevivência de microrganismos benéficos (York *et al.*, 2016; Knights *et al.*, 2021). Além disso, o gradiente de nutrientes da rizosfera pode ocasionar a necessidade de competição entre as comunidades rizosféricas pelo nicho. Entre os mecanismos de sobrevivência e competição dos microrganismos pelo nicho está a produção de antimicrobianos (Mullis *et al.*, 2019).

Existem dois mecanismos de competição entre os microrganismos, a competição indireta, que se dá através da disputa pelo consumo dos nutrientes, e a direta quando um dos microrganismos ativamente inibe a proliferação do outro através da produção de substâncias inibidoras e toxinas (Mullis *et al.* 2019).

Embora genes para a produção de antimicrobianos esteja amplamente distribuída entre os mais diversos táxons, os estudos em *Actinobactérias* recebe destaque pela predisposição de membros do seu filo em produzirem uma gama de metabólitos secundários com potencial antimicrobiano (Mullis *et al.*, 2019). A capacidade desse filo em aplicações biotecnológicas para regulação de comunidades de interesse através da produção de antimicrobianos vem sendo muito explorado por sua potencial aplicação no melhoramento da qualidade produtiva de cultivos agrícolas (Wang *et al.*, 2021).

3.4 Ocorrência de genes de resistência no solo

O solo é um grande reservatório de genes de resistência a antimicrobianos, muitos deles com histórico evolutivo de milhões de anos em associação com a presença de bactérias produtoras (Kunhikannan *et al.*, 2021; Chen *et al.*, 2022). A pesquisa de Yuan e colaboradores realizada na Antártica, área pouco alcançada pela ação humana, identificou a presença de genes de resistência associados a bombas de efluxo para múltiplas drogas. Ao mesmo tempo,

análises filogenéticas indicaram que alguns desses genes têm origem evolutiva anterior à descoberta da penicilina (Yuan et al., 2019).

Em função da disponibilidade de nutrientes, e por consequência a alta diversidade de microrganismos, o solo é um *hotspot* para a troca de genes entre os microrganismos através da transferência genética horizontal, o que favorece a disseminação de ARGs (Nesme and Simonet, 2014). A presença desses genes, embora natural, tem aumentado com o descarte inadequado de antibióticos nos mais diversos ambiente, isso cria uma pressão seletiva que induz a disseminação de genes de resistência na comunidade bacteriana (Shi et al., 2023; Kunhikannan et al., 2021).

A resistência a antimicrobianos pode se dar por meio da transferência vertical ou horizontal. Na transferência vertical, o gene que é parte do DNA bacteriano e está associado a um fenótipo de resistência é passado para as próximas linhagens (Pontes et al., 2018). A transferência horizontal, por outro lado, ocorre quando a bactéria adquire o gene através de mecanismos de transferência entre bactérias presentes no mesmo ambiente, esse método de transferência é fundamental para o surgimento de cepas resistentes (Shi et al., 2023; Goh et al., 2024).

A transferência horizontal de genes é mediada por elementos genéticos móveis (MGEs), como os plasmídeos, phagos e DNA extracelular (Shi et al., 2023; von Wintersdorff et al., 2016). Ela ocorre por três diferentes mecanismos: a transformação, quando ocorre a absorção de DNA livre no ambiente, por conjugação, transferência direta do DNA de uma bactéria para outra mediada por transposons ou plasmídeos, e por transdução onde a transferência de DNA é mediada por vírus (Goh et al., 2024).

Além da pressão seletiva imposta pela presença de compostos antimicrobianos, como os antibióticos, a presença de genes de resistência pode persistir no ambiente em função de outros mecanismos: como a co-seleção, quando um gene de resistência necessário à sobrevivência no ambiente está ligado em um mesmo elemento genético móvel (MGE) a outros genes que conferem diferentes capacidades adaptativas a estressores. Outro mecanismo é a resistência cruzada, quando um mesmo gene confere múltiplas capacidades de resistência a exemplo de bombas de efluxo multirresistentes. Adicionalmente, processos de co-regulação também contribuem para a permanência desses genes no ambiente, ocorrendo quando genes relacionados à resistência a diferentes compostos possuem um mesmo regulador. Nesses casos, a exposição a um único estressor leva a ativação de ambos os genes (Gilliaett et al., 2024).

Dessa maneira, o impacto antrópico tem desempenhado um papel significativo na disseminação de genes de resistência a antimicrobianos (Cardenas-Alegria et al., 2024). No contexto agropecuário, a utilização de antibióticos pela indústria pecuária e de biocidas, que contenham metais pesados em sua composição, e desinfetantes na produção agrícola são fortes impulsionadores da disseminação de genes de resistência a antimicrobianos em solo através da resistência cruzada entre esses compostos e os antibióticos (Gilliaett et al., 2024; Thomas et al., 2020).

Diante desse cenário, estratégias de manejo sustentáveis, como a utilização de bioinsumos, vêm sendo exploradas (Wang et al., 2021; Araújo et al., 2020). Nessas abordagens, destacam-se microrganismos com potencial de promover o crescimento vegetal e inibir fitopatógenos, entre os quais as *Actinobactérias* ocupam um papel-chave, não apenas por sua ampla disseminação em solos agrícolas, mas também por sua gama de metabólitos secundários com ação antimicrobiana, tornando-os elementos centrais para compreender o potencial biotecnológico e os riscos associados a disseminação de genes de resistência em solo (van Berjeik et al., 2020; Wang et al., 2021).

3.5 Actinobactérias

As *Actinomycetotas* compõem um dos filos de bactérias mais abundantes de microrganismos. Suas colônias são caracterizadas por possuírem filamentos semelhantes a micélios fúngicos, com alta variabilidade morfológica e metabólica, elas são bactérias gram-negativas de alto conteúdo G+C em seu DNA (Kathrik et al., 2022; Wang et al., 2021). As actinobactérias estão entre os filos mais abundantes em solo, inclusive em cultivos de *Piper nigrum*, e desempenham papéis fundamentais em sua saúde (Obieze et al., 2023; Araújo et al., 2020).

Esse filo é conhecido por sua capacidade de produzir uma ampla variedade de metabólitos secundários e bioativos com aplicações em diversos campos da biotecnologia (Kathrik et al., 2022; Araújo et al., 2020). Em especial, destaca-se por possuir uma diversos membros conhecidos pela capacidade de produzir antibióticos de utilização clínica e outros compostos de ação antifúngica e anti-helmíntica. Entre os membros desse filo, a família *Streptomycetaceae* destaca-se como um dos mais relevantes na produção de antimicrobianos (Kathrik et al., 2022; Bergeijk e al., 2020).

As Actinobactérias em ambiente natural podem ser induzidas a produzir antibióticos através de estímulos ecológicos. Alguns membros deste filo são capazes de estabelecer

relações de simbiose com as plantas, onde as plantas secretam exsudatos através de suas raízes e podem mediar a ativação ou inativação da biossíntese de antimicrobianos pelas bactérias, atuando como inibidores de patógenos das plantas (van Berjeik *et al.*, 2020). Pesquisas anteriores correlacionam actinobactérias produtoras de antibióticos e a presença de genes de resistência. Isso ocorre como mecanismo de defesa da própria bactéria contra o antibiótico que ela produz (Fatahi-Bafghi, 2019).

Conjuntos de estudos indicam o potencial deste filo na inibição de patógenos de plantas como o oomiceto *Phytophthora capsici* e o fungo *Sclerotium rolfsii* (Anusree *et al.*, 2017), através da produção de metabólitos de ação antimicrobiana. Dessa forma, as pesquisas sobre a capacidade de diferentes cepas desse filo atuarem como bactérias benéficas (van Berjeik *et al.*, 2020) no solo de cultivos de interesse agrícola vem se mostrando cada vez mais promissora (Anusree *et al.*, 2017; Araújo *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2021).

3.6 Métodos moleculares para a caracterização do microbioma do solo e rizosfera

Um dos métodos moleculares comumente utilizados para prospecção de microbioma trata do isolamento e sequenciamento de genomas. De maneira geral, esse método busca compreender a composição de um organismo de interesse prospectado do solo, geralmente buscando por genes ou grupos de genes de interesse (Bouchez *et al.*, 2016).

O surgimento e evolução das tecnologias de Next Generation Sequence (NGS) trouxe consigo um aumento no número de pesquisas no campo de estudos de microbiomas. Enquanto entre 2010 e 2020 haviam mais de 60.000 publicações para a busca por “Microbiome” no pubmed, entre 2020 e 2024 o número já ultrapassa 100.000 publicações. Isso se deve em grande parte à evolução dos métodos de análise molecular e o desenvolvimento de técnicas otimizadas para o estudo desses microbiomas (Bollmann-Giolai *et al.*, 2020).

O sequenciamento de próxima geração de amostras ambientais, em especial em solo onde existe uma alta diversidade de microrganismos, permite uma melhor compreensão da estrutura microbiana do ambiente e as associações entre os organismos, além de proporcionar insights valiosos sobre o impacto antropogênico nesses ambientes (Cardenas-Alegria *et al.*, 2022).

O sequenciamento genômico em ambientes pode se dar por duas técnicas diferentes: o amplicon e a metagenômica shotgun. Ambas as técnicas propiciam informações acerca da

diversidade ambiental e funcional no ambiente através de metodologias diferentes, sua utilização depende do objetivo e condições do experimento (Usik *et al.*, 2023).

A técnica de sequenciamento amplicon, realiza a amplificação de regiões específicas da amostra de DNA coletada. A amplificação acontece com base em biomarcadores das espécies, geralmente caracterizados como genes *house-keeping*. Alguns marcadores mais comuns em análises de DNA ambiental são as regiões 16S para identificar bactérias, e a região ITS, utilizada em estudos de ecologia de fungos. Todavia, a abordagem amplicon permite a análise apenas de regiões conhecidas tornando-o menos eficiente a análises funcionais mais detalhadas, gênicas ou de vias metabólicas (Chen *et al.*, 2020; Bouchez *et al.*, 2016).

A técnica metagenômica *shotgun*, por outro lado, tem se destacado por fornecer uma abordagem única da análise das comunidades microbianas como um todo, permitindo inferir relações entre as espécies encontradas nas amostras, seus mecanismos de ação e sua relação com o ambiente onde foi coletado. Essa técnica caracteriza-se pela extração e sequenciamento total das amostras de DNA ambiental, possibilitando insights a respeito das funções biológicas codificadas nos genomas. De forma geral, a abordagem metagenômica *shotgun* permite maior compreensão das dinâmicas das comunidades encontradas (Nesme *et al.*, 2016; Vieira *et al.*, 2021).

Assim, técnicas moleculares baseadas em sequenciamento de nova geração destacam-se em campos de pesquisa que visam compreender de que maneira os diferentes manejos agrícolas impactam as interações entre as plantas e os microrganismos do solo (Knights *et al.*, 2021; Cardenas-Alegria *et al.*, 2022). Essas abordagens permitem observar alterações na diversidade taxonômica, assim como na distribuição de genes funcionais, incluindo os genes associados à resistência a antimicrobianos (Cardenas-Alegria *et al.*, 2022).

Dessa maneira, a escolha entre as abordagens deve ser baseada no objetivo do estudo e na complexidade do ambiente analisado (Vieira *et al.*, 2021). Essas considerações fundamentaram a seleção das técnicas e ferramentas utilizadas no presente trabalho para identificar os possíveis impactos da seleção do sistema de tutoragem na diversidade microbiana e seleção de genes de resistência associados ao solo e rizosfera de pimenta-do-reino.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coleta da amostra

As diferentes amostras experimentais de solo foram coletadas no Plantio experimental da empresa TROPOC - Produtos Tropicais de Castanhal localizada no município de Castanhal, Pará (1°17'36.9"S 47°49'34.1"W). A coleta de solo foi realizada na fase orgânica, foram considerados dois cultivos de pimentas-do-reino cv. Bragantina (*Piper nigrum L*) com idade de 3 anos, um cultivo realizado com tutor vivo, utilizando a espécie *Gliricídia sepium L.*, e o segundo cultivo com estacas, tutor morto, mas com o mesmo manejo agrônomo. O manejo agrônomo das plantações consistia em adubação química com NPK 20-60-80 FTE 30g/L adubação orgânica com 2L Torta de Mamona por planta.

Das amostras de solo foram consideradas para as coletas dois tipos de amostras em cada um dos campos de cultivo: solo *bulk*, que são amostras de solo total, e de solo de rizosfera, cujo material está aderido às raízes (TABELA 1). Os dois tipos de amostras de solo foram coletadas, introduzindo uma draga com uma profundidade entre 15 e 30 cm, sendo repetido cinco vezes o mesmo procedimento ao redor do caule da planta com distância de 20cm, estas amostras foram colocadas em um recipiente para fazer o pool e saí compor uma das réplicas da amostra de solo e raiz. Foram feitas três réplicas biológicas (cada réplica de uma diferente planta de pimenta-do-reino) para cada tipo de amostra, totalizando 12 réplicas amostrais no total. A seguir, foram selecionadas todas as raízes da planta e amostras de solo e colocadas, separadamente, em tubos falcon de 50 mL, e depositadas em uma garrafa com nitrogênio líquido e transportadas para o laboratório.

TABELA 1 – Descrição das amostras utilizadas no estudo, indicando os códigos atribuídos a cada tipo de solo com base na presença ou ausência de rizosfera e no tipo de tutor (vivo ou morto).

| Amostra | Tipo |
|----------------|--|
| STM | Solo <i>bulk</i> com tutor morto |
| RTM | Solo rizosférico com tutor morto |
| STV | Solo <i>bulk</i> com tutor vivo (<i>Gliricídia sepium</i>) |
| RTV | Solo rizosférico com tutor vivo (<i>Gliricídia sepium</i>) |

4.2 Extração de DNA

As amostras coletadas das diferentes plantas de solo *bulk* foram conservadas em nitrogênio líquido, inicialmente foram fragmentadas em tubos eppendorf de 2 mL, e conservados à -20 °C, uma destas alíquotas foram utilizadas na extração do material genético segundo as indicações do kit comercial DNeasy PowerSoil Pro Kit (Qiagen). Para as amostras de rizosfera, no tubo contendo a raiz com solo aderido foram colocados 50 mL de buffer (0.75% KH₂PO₄, 0.95% K₂HPO₄, and 1% Triton X-100 in ddH₂O, filter-sterilized at 0.2 µM), a seguir foram colocados em shaker por 30 min com rotação de 200 rpm, a suspensão foi centrifugada e concentrada em tubos eppendorf de 2 mL para posterior extração de DNA. A qualidade do material genético foi verificada com eletroforese horizontal, e a concentração do índice de pureza foi determinada mediante absorvância.

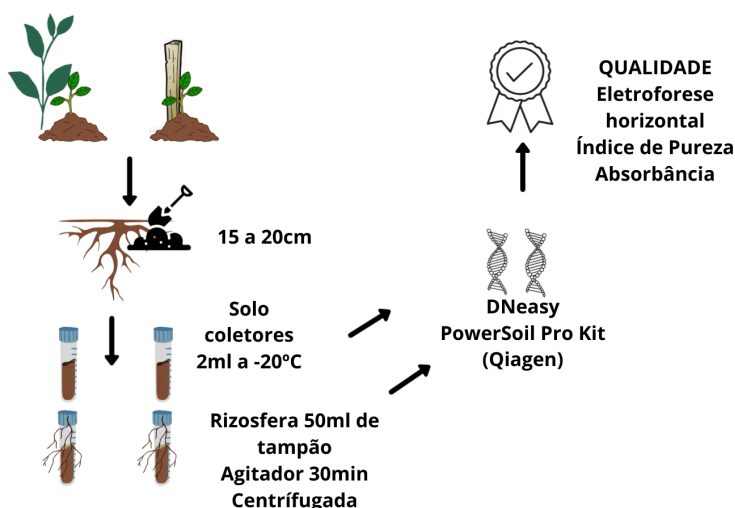


Figura 3 – Metodologia de coleta e extração de DNA.

4.3 Sequenciamento

A preparação das bibliotecas de sequenciamento foi realizada com o kit Nextera XT DNA Library (Illumina) para leituras paired-end (2x150 pb) na plataforma Illumina NextSeq 500/550 High Output.

4.4 Análises bioinformáticas

4.4.1 Análises de diversidade

As análises de diversidade foram realizadas conforme o fluxograma da figura 4. Os dados brutos foram filtrados utilizando o software Trimmomatic (Bolger *et al.*, 2014) para

remover as leituras e/ou extremidades das leituras com qualidade inferior a Phred 20 a partir de uma janela de 4 pares de bases e mantendo apenas as leituras com tamanho superior a 49 pares de base.

A atribuição taxonômica dos dados foi realizada com o software Kraken 2 (Wood *et al.*, 2019), utilizando o banco de dados "PlusPFP" (v.12/28/2024). Pela plataforma Pavian (Breitwieser and Salzberg, 2019) foram obtidas as tabelas de abundância para os níveis taxonômicos. A análise de alfa diversidade de Shannon foi calculada utilizando o pacote `alfa.diversity` da biblioteca `scikit-bio` do Python. A avaliação da beta diversidade foi realizada utilizando ANOSIM e NMDS através do Microbiome Analyst (Lu *et al.*, 2023).

Para as análises de composição das comunidades bacterianas inicialmente foi realizada a normalização dos dados com `MinMaxScaler` da biblioteca `sklearn` do python para então ser processada com um o algoritmo `IForest` da biblioteca `Alibi-detect` (v.0.12.0) que realiza a remoção de outliers extremos, daqui foi feita a filtragem para a criação da tabela com as *Actinomycetotas*. Para melhor visualização das famílias de bactérias, foi aplicado um filtro do intervalo entre a mediana dos dados e o limite superior (IQR +3). Os gráficos foram gerados pela ferramenta do Orange Data Mining (v. 3.38.1).

Análises de Diversidade

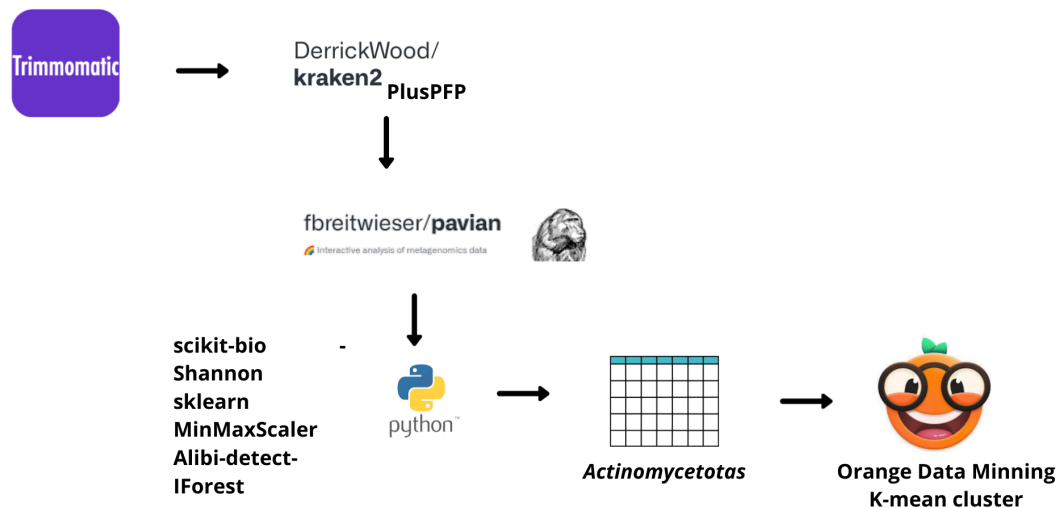


Figura 4 – Metodologia de análises de diversidade.

4.4.2 Análises dos genes de resistência a antibióticos

A análise de genes de resistência a antimicrobianos (Figura 5) foi realizada pelo CARD (Alcock *et al.*, 2023) utilizando o banco de dados WildCard (v.3.2.6). A normalização

da abundância para os genes de resistência foi realizada segundo descrito por Inda-Diaz et al. (2023), utilizando apenas aqueles com cobertura média percentual >75%.



Figura 5 – Metodologia de análises de resistência.

4.4.3 Análises estatísticas

Os testes de Shapiro-Wilk, Anova/Kruskal-Wallis e T-test para avaliação, respectivamente, da normalidade dos dados e busca por diferenças significativas foram realizados através de um script em Python utilizando as bibliotecas SciPyStats e scikit.posthocs (Figura 6).

Para a avaliação de presença das espécies de Actinobactérias, utilizou-se como critério a presença da bactéria nas três réplicas do grupo. Para genes de resistência, o critério foi a presença de pelo menos duas leituras alinhadas por grupo (abundância > 0.6), pois a análise dos genes de resistência realiza uma filtragem prévia baseada no percentual de cobertura (>75%). Os genes de resistência foram avaliados a partir do método de agrupamento hierárquico utilizando uma matriz de similitude com o método de Morisita através da ferramenta Orange Data Mining (v.3.38.1).

Os gráficos deste trabalho foram feitos por scripts em Python (3.11.11) utilizando as bibliotecas Upsetplot, Seaborn, Pandas, Numpy e Matplotlib.pyplot. E as Principal Component Analyses (PCA) foram feitas através das bibliotecas Matplotlib, com a padronização dos dados feita através do StandardScaler da biblioteca Scikit-learn.

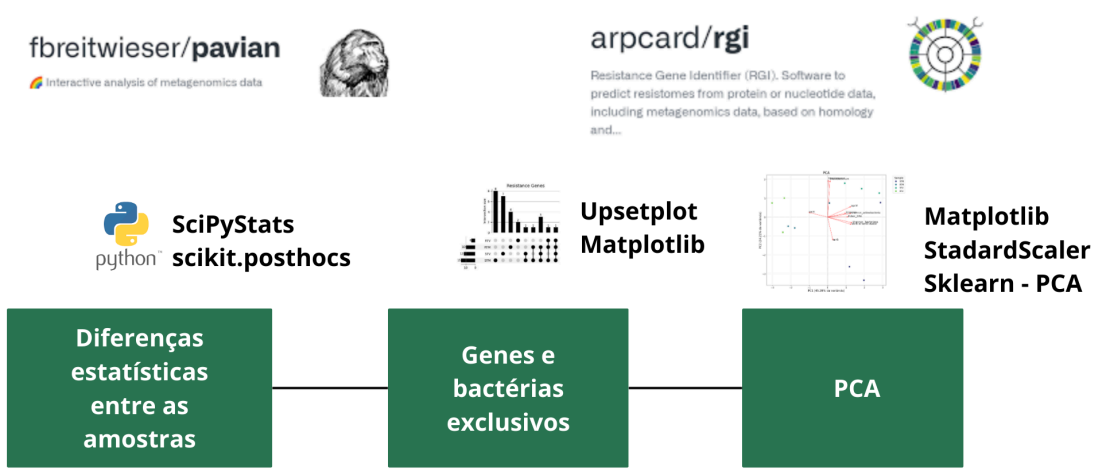


Figura 6 – Fluxograma das análises estatísticas.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Índices de diversidade bacteriana

Através do Kraken2, observou-se que os organismos identificados pertenciam majoritariamente ao domínio Bacteria, compondo em média ~97% do microbioma amostras (Figura 7), assim foi realizada a identificação taxonômica de até 9.632 e 10.019 bactérias em amostras de solo rizosférico e solo *bulk*, respectivamente.

| NOME | RANK | TID | MAX | RTM1 | RTM2 | RTM3 | RTV1 | RTV2 | RTV3 | STM1 | STM2 | STM3 | STV1 | STV2 | STV3 |
|-----------|------|-------|---------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|---------|
| Bacteria | D | 2 | 97.11 | 95.42% | 95.24% | 96.32% | 95.84% | 95.39% | 94.65% | 97.11% | 96.37% | 96.91% | 96.4% | 97.04% | 96.93% |
| Eukaryota | D | 2759 | 4.616 | 3.831% | 4.087% | 2.937% | 3.448% | 3.917% | 4.616% | 1.981% | 2.699% | 2.066% | 2.635% | 1.971% | 2.192% |
| Archaea | D | 2157 | 0.9876 | 0.7137% | 0.6398% | 0.7098% | 0.6829% | 0.658% | 0.6974% | 0.8736% | 0.8977% | 0.9876% | 0.9289% | 0.957% | 0.8436% |
| Viruses | D | 10239 | 0.03898 | 0.03189% | 0.03165% | 0.03029% | 0.03167% | 0.03042% | 0.03283% | 0.03425% | 0.03539% | 0.03898% | 0.03482% | 0.03589% | 0.0362% |

FIGURA 7 – Composição percentual das amostras a nível de domínio taxonômico.

De acordo com o índice de alfa-diversidade de Shannon (Figura 8), a diversidade em solo mostrou-se consistentemente maior que em rizosfera para ambos os sistemas de tutoragem (Kruskall-Wallis p-value= 0,03290). Dessa maneira, a diversidade microbiana das espécies que correspondem ao filo bacteriano das Actinobactérias evidenciou-se em solo *bulk* com valores de até 7.05, e em solos rizosféricos até 6.99, sendo possível observar em todas as amostras uma redução de diversidade bacteriana entre solo *bulk* e rizosfera (TABELA 2).

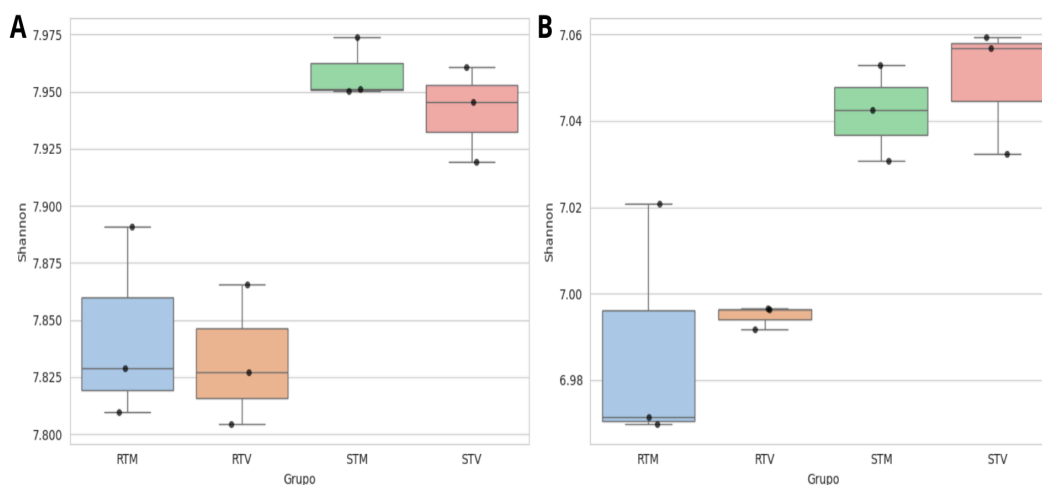


FIGURA 8 – Índice de alfa-diversidade Shannon para bactérias (A) em geral e especificamente para o filo das Actinobactérias (B).

Os índices de beta-diversidade NMDS (Stress = 0) e ANOSIM (R = 0.88889; p-value < 0.1) para solo *bulk* e rizosfera com tutor vivo indicam que os dois grupos têm sua distância bem representada pela matriz e que os dois grupos estão bem separados um do outro, ou seja, esses índices fortalecem a possibilidade de existirem diferenças entre as composições ecológicas desses grupos (solo *bulk* e rizosfera), implicando na capacidade da rizosfera de recrutar organismos de interesse em detrimento de outros. Para solo *bulk* e rizosfera com tutor morto, NMDS (Stress \approx 0) e ANOSIM (R = 0.6296) com o mesmo valor de significância anterior, indicam que o grupo também está bem representado pela matriz distância, mas não tão bem separado quanto em tutor vivo.

TABELA 2 – Índices de diversidade Shannon para as amostras de solo rizosférico e solo *bulk* para os dois sistemas de tutoragem.

| Amostra | Índice Shannon | Índice Shannon <i>Actinomycetota</i> |
|----------------|-----------------------|---|
| STM | 7.95 \pm 0.01 | 7.04 \pm 0.011 |
| RTM | 7.84 \pm 0.04 | 6.98 \pm 0.029 |
| STV | 7.94 \pm 0.02 | 7.05 \pm 0.015 |
| RTV | 7.83 \pm 0.03 | 6.99 \pm 0.002 |

A rizosfera das plantas tem capacidade de atrair microrganismos de interesse do solo por meio da liberação de substâncias através de suas raízes (rizodepósitos), esses microrganismos recrutados desempenham importantes papéis relacionados a proteção e nutrição da planta (York *et al.*, 2016; Knights *et al.*, 2021). A ausência de diferenças significativas na diversidade pela influência do tutor é corroborada por outros estudos que obtiveram resultados semelhantes ao avaliar as diferenças nas comunidades microbianas na rizosfera de espécies de plantas diferentes (French *et al.*, 2017; Fu *et al.*, 2022). O estudo de Li e colaboradores, realizado em 4 cultivos de *P. nigrum* com diferentes idades, mas mesmo manejo agrônomo, também não apresentou diferença estatística em sua alfa diversidade, embora sugira diferenças em sua composição (Li *et al.*, 2016).

O filo das *Actinomycetotas* também não apresentou diferenças significativas de diversidade entre os tutores. A homogeneidade dos resultados de diversidade bacteriana, e em especial do filo das Actinobactérias, podem ser atribuídos à distância geográfica entre os

pontos amostrais neste estudo e a forte capacidade de dispersão e resiliência dos táxons bacterianos (Araújo *et al.*, 2020; Na *et al.*, 2018).

Com base nisso, a escolha do tutor não apresentou evidências de representar um fator de risco à diversidade microbiana avaliada neste estudo. Observa-se que a substituição do tutor morto, método mais oneroso e pouco sustentável (EMBRAPA, 2004), pelo tutor de *G. sepium* não ocasionou impactos negativos nos índices de alfa-diversidade microbiana, incluindo o filo das Actinobactérias.

5.2 Composição bacteriana

Entre os filios das bactérias identificadas, a maior prevalência foi dos filios *Pseudomonadotas* (~50) e *Actinomycetota* (~35%), respectivamente (Figura 9). Estes filios identificados representam mais de 80% da composição da amostra, além disso existem evidências de que várias espécies desses filios estão associadas à síntese de moléculas com capacidade de promover o crescimento de plantas como auxinas, além da produção de antibióticos que auxiliam a proteção contra patógenos de plantas como *Fusarium*, *P. capsici* e *S. rolfsii* (Wang, 2023; Anusree e Suseela Bhai., 2017).

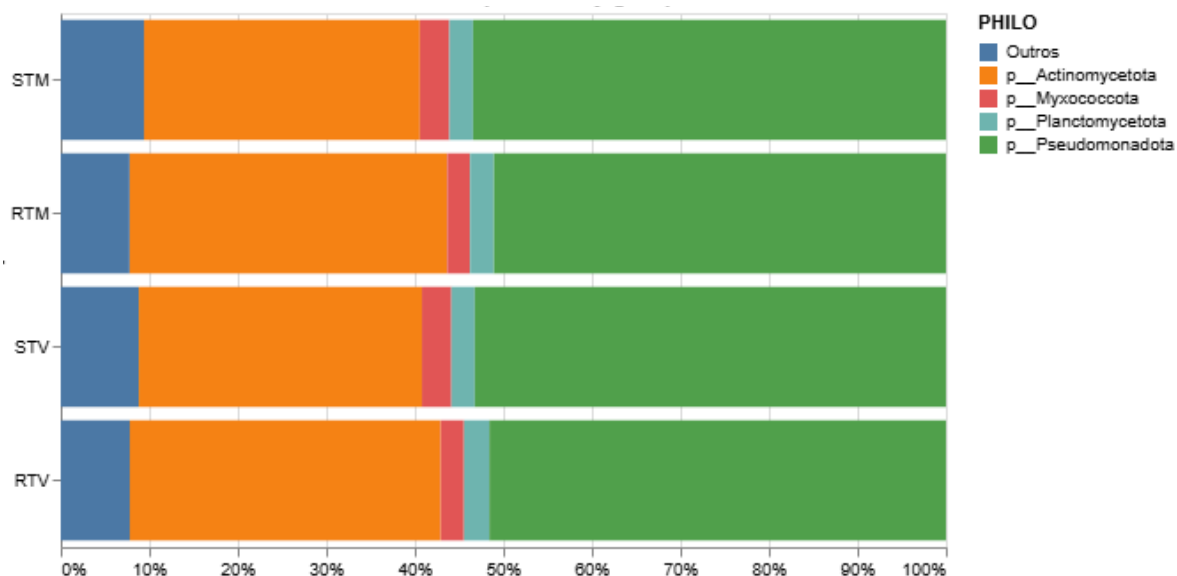


FIGURA 9 – Abundância relativa da composição das amostras a nível taxonômico de filo.

A composição bacteriana foi observada a nível de família (Figura 10), *Streptomyetaceae* destaca-se como a mais abundante em todas as amostras, com mais incidência em RTM. Ressalta-se que as amostras de solo *bulk* agrupam-se entre si, assim

como as de solo rizosférico, indicando que existem mais semelhanças a respeito do tipo de amostra (se solo *bulk* ou rizosférico) do que a cerca do sistema de tutoragem.

A prevalência da família *Streptomyetaceae* em RTM pode ser um indicativo de que essas bactérias podem estar desempenhando funções no desenvolvimento da planta. Além dela, outras bactérias são prevalentes nas amostras, sendo elas correspondentes aos filos *Actinomycetota* e *Pseudomonadota*. A abundância das Actinobactérias, teve uma distribuição semelhante entre as amostras, com exceção da família *Mycobacteriaceae* cuja prevalência ocorre em solo rizosférico (RTM e RTV). Quanto à distribuição das proteobactérias, foram consistentemente mais abundantes em STM (seguido por RTM, STV e RTV, respectivamente). Dessa forma, a menor abundância de *Pseudomonadaceae* em RTV pode indicar que a presença do tutor *G. sepium*, conhecido por sua contribuição na fertilidade do solo, influencia no recrutamento de membros dessa família (Florentino *et al.*, 2019). Ainda, a remoção das famílias com maior abundância, como dados extremos, permitiu observar mais diferenças no perfil de composição dos grupos. Sugerindo que as bactérias que desempenham funções específicas aos diferentes grupos podem não estar localizadas entre as mais abundantes.

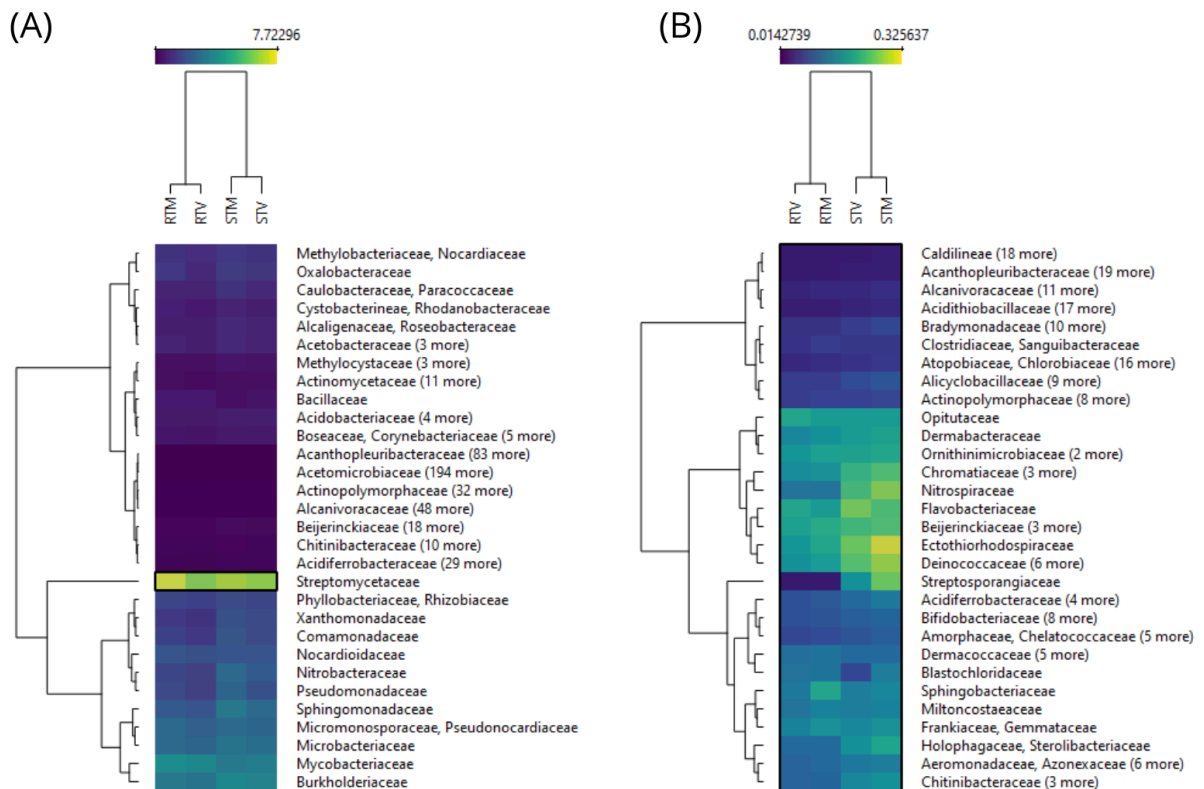


FIGURA 10 – Heatmap da composição bacteriana (famílias taxonômicas) das amostras usando agrupamento por K-mean, (A) contendo a filtragem por outlier da Alibi-detect e (B) após a filtragem dos valores extremos através da seleção do intervalo de dados entre a mediana e o limite superior (IQR + 3)

Entre as Actinobactérias, o gênero *Streptomyces* foi o de maior abundância em todas as amostras, sobretudo em RTM (Figura 11). Esse gênero é frequentemente identificado em amostras de solo (Karthik *et al.*, 2022), isso pode estar relacionado a função biológica desempenhada pelas diferentes espécies de *Streptomyces* dentro desse ambiente como a produção de antibióticos naturais, peptídeos antimicrobianos, sideróforos, fitohormônios e outros (Anusree *et al.*, 2019; Gowdar *et al.*, 2018). Assim, o recrutamento desse gênero pode estar associado à proteção contra fitopatógenos, mas também ao aumento da disponibilidade de nutrientes e promoção do crescimento das plantas.

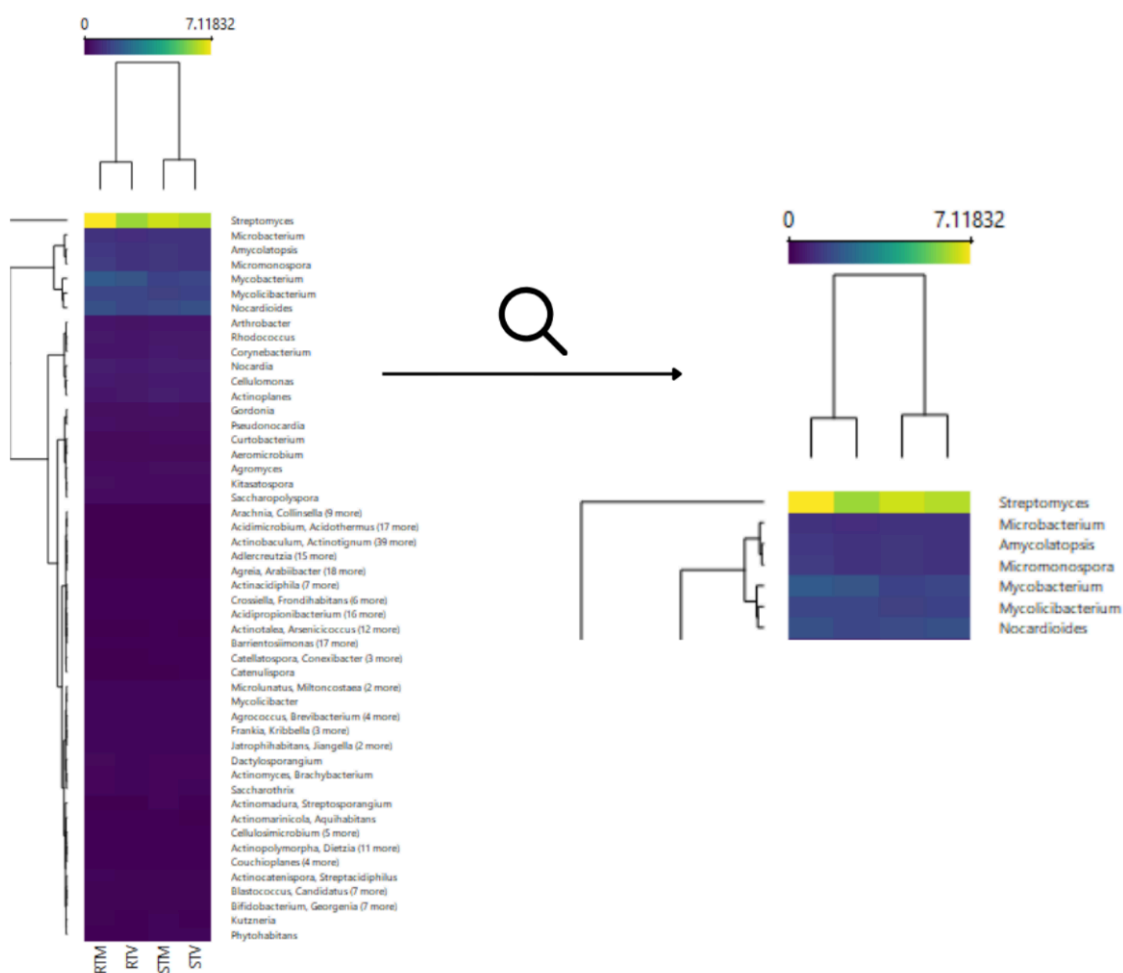


Figura 11: Heatmap da abundância dos gêneros de Actinobactérias em amostras de solo e rizosfera com os sistemas de suporte em tutor vivo e tutor morto.

5.3 Perfis das espécies de Actinobactérias

Observa-se que entre o total de 1.899 Actinobactérias identificadas nesta análise (Figura 12), 1.793 (n%) são comuns aos 4 grupos de amostras (STM, STV, RTV e RTM). Em solo, 44 espécies são comuns nas amostras de solo *bulk* e ausentes em rizosfera. Além disso, 13 bactérias são exclusivas em STM, e 8 são exclusivas a STV. A nível de tutor, apenas o solo rizosférico com tutor vivo possui a bactéria exclusiva *Streptomyces sp. 44414*.

Por outro lado, existem 18 bactérias presentes em todas as amostras mas ausentes em RTV, e outras 18 ausentes apenas em RTM. Interessantemente, Thapa *et al.* (2024) realizou uma comparação molecular entre diferentes cepas de *Streptomyces* e seus resultados indicaram que, independente da variação geográfica, pode existir uma grande semelhança entre os metabólitos produzidos pelas bactérias desse gênero quando crescidas nas mesmas condições (Thapa *et al.*, 2024). Isso poderia indicar que apesar das rizosferas recrutarem conjuntos diferentes de *Streptomyces* essas bactérias podem desempenhar funções semelhantes no ambiente. Uma análise mais aprofundada do metabolismo dessas bactérias nas diferentes amostras seria necessária para determinar quanta influência a rizosfera e o tutor têm na indução da produção de metabólitos por *Streptomyces*.

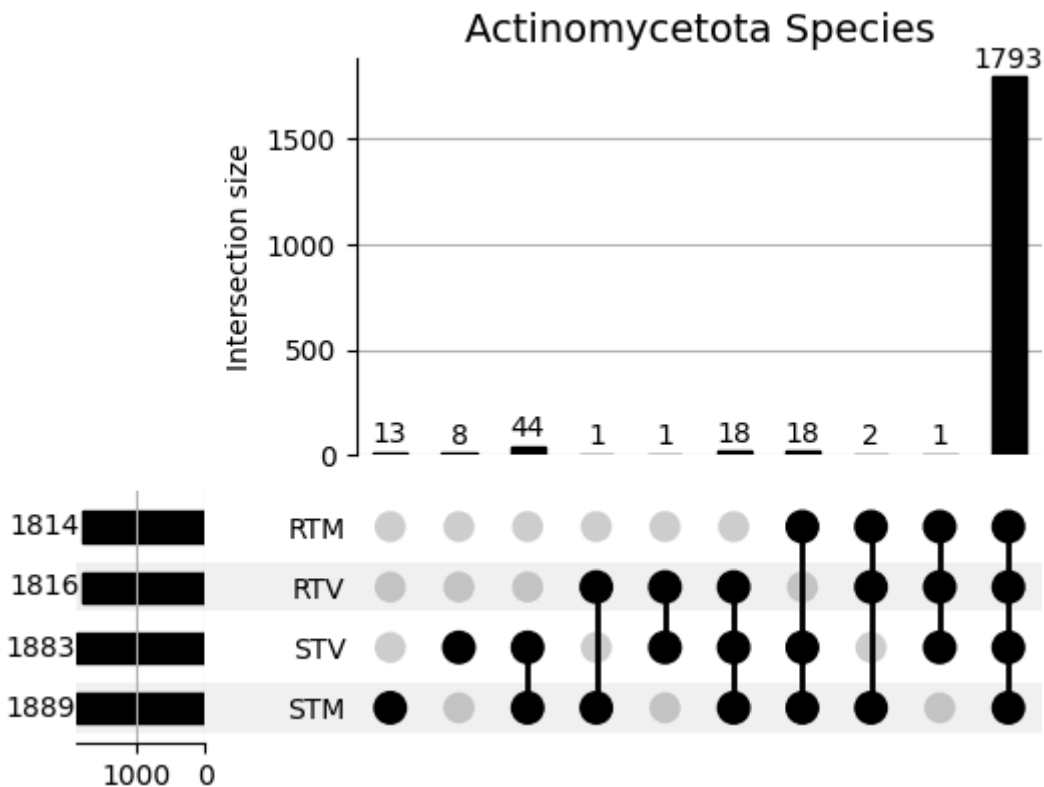


FIGURA 12 – UpSet plot demonstrando a sobreposição e exclusividade de espécies de Actinobactérias entre as amostras analisadas.

A análise do grupo recrutadas do solo por RTV (TABELA 4), mas não pela rizosfera com o tutor morto, permitiu observar o perfil de bactérias exclusivo a esse sistema de tutoragem. Entre elas, observam-se espécies associadas ao biocontrole de fitopatógenos, relacionadas à produção de compostos bioativos, com capacidade de degradar poluentes como metais pesados e sintetizar compostos de importância agrícola (Wang *et al.*, 2021). Destacam-se na literatura as bactérias *Streptomyces griseorubiginosus*, *Rhodococcus sp. 11-3*, *Paernarthrobacter sp. R1* e *Microbacterium sp. AIS03*, por sua produção de metabólitos secundários promotores do crescimento das plantas (Chai *et al.*, 2022), biocontrole de patógenos, aumento da disponibilidade de nutrientes no solo e biorremediação de poluentes como compostos organofosforados e metais pesados (Xiao *et al.*, 2022; Iyer *et al.*, 2017).

Tabela 4: Tabela de bactérias recrutadas por RTV, ou seja, presentes em RTV, STV e STM, mas ausentes em RTM.

| Actinomycetota | RTM | RTV | STM | STV |
|----------------------------------|------------|------------|------------|------------|
| Actinoplanes sichuanensis | Ausente | Presente | Presente | Presente |
| Actinoplanes sp. OR16 | Ausente | Presente | Presente | Presente |
| Arthrobacter sp. J3.49 | Ausente | Presente | Presente | Presente |
| Aurantimicrobium minutum | Ausente | Presente | Presente | Presente |
| Aurantimicrobium sp. INA4 | Ausente | Presente | Presente | Presente |
| Brevibacterium sp. Ap13 | Ausente | Presente | Presente | Presente |
| Candidatus Planktophila vernalis | Ausente | Presente | Presente | Presente |
| Gordonia ajococcus | Ausente | Presente | Presente | Presente |
| Microbacterium sp. AIS03 | Ausente | Presente | Presente | Presente |
| Microbacterium sp. Se5.02b | Ausente | Presente | Presente | Presente |
| Microbacterium sp. Se63.02b | Ausente | Presente | Presente | Presente |
| Mycobacterium orygis | Ausente | Presente | Presente | Presente |
| Paenarthrobacter sp. R1 | Ausente | Presente | Presente | Presente |
| Pseudonocardia sp. EC080619-01 | Ausente | Presente | Presente | Presente |
| Rhodococcus sp. 11-3 | Ausente | Presente | Presente | Presente |

| | | | | |
|---------------------------------------|---------|----------|----------|----------|
| <i>Streptomyces griseorubiginosus</i> | Ausente | Presente | Presente | Presente |
| <i>Streptomyces sp. ICC1</i> | Ausente | Presente | Presente | Presente |
| <i>Streptomyces sp. LBUM 1475</i> | Ausente | Presente | Presente | Presente |

Com isso, é possível que a condição RTV contribua no recrutamento de bactérias associadas à produção de compostos promotores do crescimento das plantas e mecanismos de proteção contra fitopatógenos, como a regulação da resposta enzimática de defesa da planta. A presença de *G. sepium* poderia favorecer também bactérias que ajudam ao desenvolvimento da planta, corroborando o estudo anterior de Dinesh e colaboradores (2010) que observou aumento da biomassa microbiana e disponibilidade de nutrientes no solo com o tutor *G. sepium* (Dinesh *et al.*, 2010).

As Actinobactérias recrutadas em RTM (Tabela 5), se caracterizam pela biossíntese e resistência à uma série de antibióticos entre os quais estão carbapenem, monobactam, clorafenicol e estreptomicina (Caradec *et al.*, 2022; Chen *et al.*, 2020). Dentre as bactérias recrutadas em RTM, temos: *Dactylosporangium fulvum*, *Streptomyces sp. S501* e *Nocardioides sp. LMS-CY* (Cheng *et al.*, 2021), e podem estar envolvidas na disseminação de AMRs.

Tabela 5: Tabela de bactérias recrutadas por RTM, ou seja, presentes em RTM, STV e STM, mas ausentes em RTV.

| Actinomycetota | RTM | RTV | STM | STV |
|--|------------|------------|------------|------------|
| <i>Arthrobacter sp. AQ5-05</i> | Presente | Ausente | Presente | Presente |
| <i>Arthrobacter sp. FW306-05-C</i> | Presente | Ausente | Presente | Presente |
| <i>Arthrobacter sp. H16F315</i> | Presente | Ausente | Presente | Presente |
| <i>Candidatus Planktophila sulfonica</i> | Presente | Ausente | Presente | Presente |
| <i>Corynebacterium caspium</i> | Presente | Ausente | Presente | Presente |
| <i>Corynebacterium sp. sy039</i> | Presente | Ausente | Presente | Presente |
| <i>Dactylosporangium fulvum</i> | Presente | Ausente | Presente | Presente |
| <i>Microbacterium sp. PAMC21962</i> | Presente | Ausente | Presente | Presente |
| <i>Micrococcus sp. V7</i> | Presente | Ausente | Presente | Presente |
| <i>Mycobacterium conspicuum</i> | Presente | Ausente | Presente | Presente |

| | | | | |
|-----------------------------|----------|---------|----------|----------|
| Mycolicibacterium sp. P1-18 | Presente | Ausente | Presente | Presente |
| Nocardioides sp. LMS-CY | Presente | Ausente | Presente | Presente |
| Rhodococcus sp. AD45 | Presente | Ausente | Presente | Presente |
| Rhodococcus sp. AH-ZY2 | Presente | Ausente | Presente | Presente |
| Rhodoluna sp. KAS3 | Presente | Ausente | Presente | Presente |
| Streptomyces sp. 14R-10 | Presente | Ausente | Presente | Presente |
| Streptomyces sp. S501 | Presente | Ausente | Presente | Presente |
| Streptomyces sp. Tue6028 | Presente | Ausente | Presente | Presente |

A espécie de *Streptomyces sp. 44414*, identificada nas amostras de RTV não tem informações deste tipo de relação. Todavia, essa bactéria pode apresentar funções relacionadas à transferência de genes entre as espécies por meio da disseminação intramicelial de plasmídeos (Zhang *et al.*, 2008).

5.4 Genótipo de resistência

5.4.1 Análise de diversidade de genes de resistência a antimicrobianos

Com a avaliação do genótipo de resistência através dos índices de alfa-diversidade de Fisher e riqueza (Tabela 6), observou-se que RTV, quando comparado aos demais, apresenta uma menor diversidade de genes de resistência a antimicrobianos e também menor riqueza. Também é possível observar que as amostras de solo tem uma maior riqueza de genes de resistência, possuindo um maior arcabouço genético quando comparado a rizosfera, que pode ser um indicativo de que em rizosfera apenas os genes essenciais à manutenção da sobrevivência da sua microbiota são recrutados.

A diversidade alfa dos genes de resistência identificada foi maior nas amostras de solo *bulk* comparado com as de rizosfera, assim como se observa nas amostras de STV (Fisher: 0.91 ± 0.10) e RTV (Fisher: 0.36 ± 0.06), com diferenças significativas (t-test, p-value = 0.01). No entanto, não foram identificadas diferenças na diversidade entre as amostras com o tutor morto RTM (Fisher: 0.89 ± 0.40) e STM (Fisher: 0.92 ± 0.01) e sem diferenças estatisticamente significativas (t-test; p-value = 0.89) entre os grupos.

Esses resultados implicam na potencial participação de *G. sepium* na seleção dos genes de resistência recrutados para a rizosfera em tutor vivo, mais estudos são necessários para poder entender melhor como esta planta ajuda no desenvolvimento da pimenta, como neste caso do recrutamento de microrganismos. Por sua vez, foi possível observar que as amostras de solo tem uma maior diversidade de genes de resistência, possuindo um maior arcabouço genético quando comparado à rizosfera, indicando de que em rizosfera apenas os genes essenciais à manutenção da sobrevivência da sua microbiota são recrutados.

TABELA 3 – Média dos índices de alfa-diversidade fisher para os genes de resistência.

| Amostras | Fisher | Riqueza |
|-----------------|---------------|----------------|
| RTM | 0.89 ± 0.40 | 5.0 |
| STM | 0.93 ± 0.02 | 7.3 |
| RTV | 0.36 ± 0.06 | 2.6 |
| STV | 0.91 ± 0.10 | 6.3 |

5.4.2 Genes de resistência a antimicrobianos

Os padrões de abundância dos genes de resistência a antimicrobianos (Figura 13) sugerem que a estrutura microbiana nos diferentes grupos exerce um papel fundamental na seleção dos genes de resistência. O gene *acrB* associado a uma bomba de efluxo que confere multirresistência a diversas drogas, destaca-se em ambas as amostras rizosféricas. Esse gene é amplamente identificado em diferentes ambientes, inclusive em solos pouco impactados, como o solo Antártico (Yuan *et al.*, 2019). Sua alta prevalência pode estar relacionada ao fato de que esse gene confere resistência a uma ampla gama de antibióticos, permitindo às bactérias um mecanismo de defesa versátil.

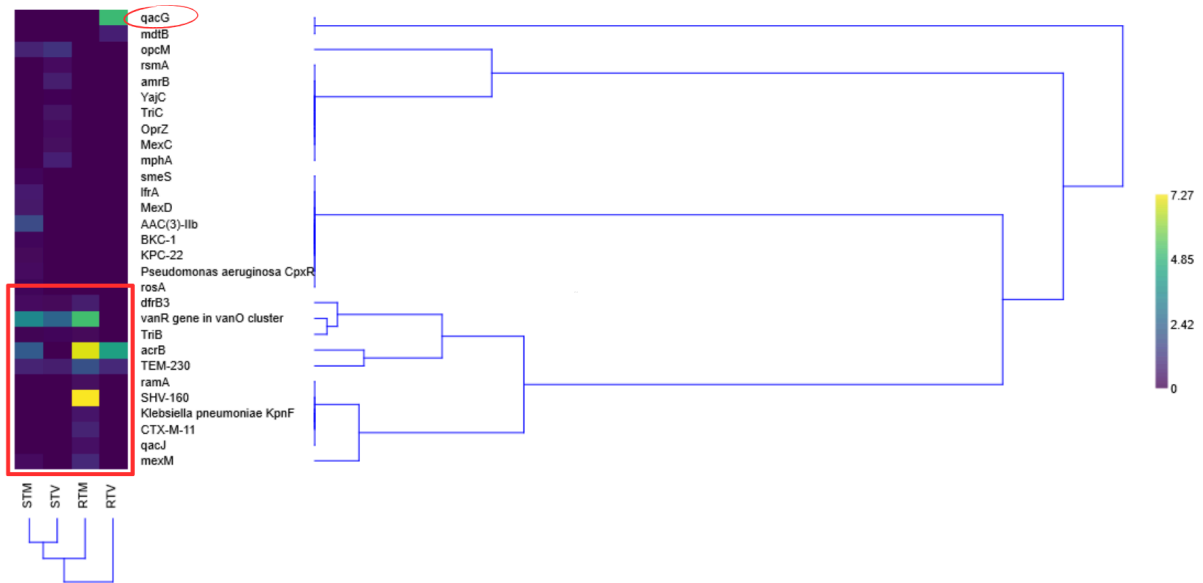


FIGURA 13 – Análise de similitude entre as amostras realizada através da ferramenta Orange Data Mining v. 3.38.1 utilizando a matriz distância de Morisita com gene *qacG* em destaque.

Além disso, Nishino e colaboradores (2021), indicam que *acrB* tem um papel na excreção do sideróforo enterobactina para o exterior da bactéria, esse sideróforo é excretado pela bactéria como mecanismo para facilitar sua obtenção de ferro do ambiente (Nishino *et al.*, 2021). A secreção de sideróforos foi destacada em estudos como um dos mecanismos de interesse em bactérias promotoras do crescimento de plantas em função de sua capacidade de aumentar a biodisponibilidade de ferro para as plantas através da quelação da forma inorgânica de Fe^{3+} (Sun *et al.*, 2022). Embora a participação deste gene tenha sido relatada na literatura em *E. coli* patogênicas (Nishino *et al.*, 2021), é possível que ele possa desempenhar diferentes funções biológicas em bactérias ambientais presentes em cultivos agrícolas.

Em RTM, os genes *SHV-160* e *VanR* destacam-se por sua abundância, e estão relacionados à resistência a betalactâmicos e glicopeptídeos através da inativação do antibiótico e da alteração do alvo, respectivamente. Isto sugere uma comunidade com maior diversidade de resistência, possivelmente associada ao maior recrutamento de espécies potencialmente relacionadas à produção de antibióticos que possam atuar como inibidores de fitopatógenos (Yasir *et al.*, 2022, Alonso-Reys *et al.*, 2021).

Por outro lado, RTV possui uma menor diversidade de genes de resistência, onde o gene *qacG* destaca-se por sua relação com uma bomba de efluxo relacionada a resistência a desinfetantes e antissépticos. A ocorrência desse gene em maior abundância em rizosfera de tutor vivo, pode indicar uma maior demanda deste gene na adaptação das comunidades

microbianas relacionadas a este cultivo, possivelmente em decorrência da aplicação de biocidas ou do protocolo de desinfecção das mudas de *G. sepium*.

Em solo com tutor morto (STM) houve prevalência de genes relacionados à resistência a aminoglicosídeos, glicopeptídeo e multirresistência a antimicrobianos através dos genes *AAC(3)-iib*, *VanR* e *acrB*. Da mesma forma, em STV, destacam-se as abundâncias relativas dos genes *opcM*, que é uma bomba de efluxo da família RND, e gene *VanR*, do cluster *VanO*.

Com base na abundância e riqueza dos genes, a amostra RTV apresenta um perfil de resistência distinto com relação às demais amostras. Isso sugere a influência do tutor vivo na seleção de AMRs na rizosfera. Adicionalmente, através dos clusters de genes é possível associar essa diferença não apenas ao gene *qacG*, cuja incidência ocorre apenas em RTV, mas também com a maior variedade e abundância de AMRs nas demais amostras.

As análises anteriores de presença de *Actinomyces* poderiam indicar que a rizosfera com tutor morto possui um maior número de bactérias exclusivas relacionadas à produção e resistência à antibióticos em comparação com o tutor vivo, cujas bactérias exclusivas são frequentemente relacionadas à promoção do crescimento da planta. A maior diversidade de genes de resistência observados na amostra RTM pode estar associada à diferença no recrutamento das actinobactérias pelas rizosferas com tutor vivo e com tutor morto.

Portanto, é possível que a seleção de AMRs esteja sendo influenciado pela presença do tutor vivo *Gliricidia sepium*, através da atenuação da necessidade de amplificação gênica adicional, ao suprir parcialmente as demandas metabólicas do microbioma (Juanico *et al.*, 2023). Em contraste, na ausência do tutor vivo, tais necessidades poderiam intensificar o incremento da abundância desses genes, favorecendo sua persistência e disseminação no ambiente.

Dessa maneira, os genes de resistência em solo agrícola não devem ser interpretados unicamente sob a ótica de resistência a antimicrobianos relacionada ao impacto antrópico, mas deve-se considerar a participação desses genes no metabolismo fundamental das comunidades microbianas presentes no solo e as interações entre elas. Assim, esses genes podem ter participação na disponibilidade de nutrientes e competição entre os microrganismos. Sugere-se, a partir desses resultados que o perfil de resistência em RTM talvez seja ocasionado pela maior disputa pelo nicho em função da menor disponibilidade de

nutrientes quando comparado ao tutor vivo que conta com o *G. sepium* além da pimenta-do-reino para a secreção de substâncias no horizonte rizosférico.

5.4.3 Mecanismos de resistência

Entre os mecanismos de resistência identificados (TABELA S1), observa-se em rizosfera a prevalência de mecanismos relacionados a bombas de efluxo em RTV e inativação do antibiótico seguido por bombas de efluxo em RTM (Figura 14). Em solo, destacam-se os mecanismos relacionados ao efluxo, inativação de antibióticos e a alteração do alvo.

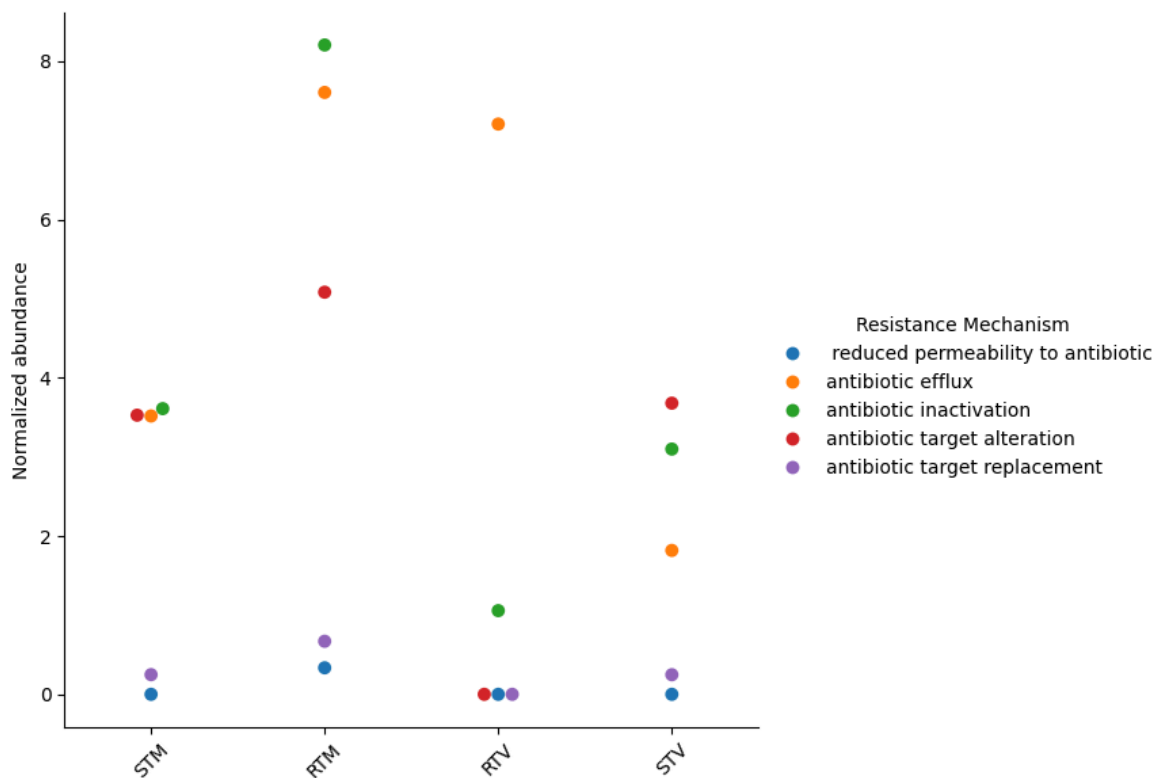


FIGURA 14 – Catplot-swarm da distribuição normalizada média dos tipos de mecanismos de resistência.

As bombas de efluxo são um mecanismo importante para a sobrevivência de bactérias em ambientes com pressão seletiva, por isso são fortemente disseminadas nos mais diversos ambientes. Desse modo, tendo em vista que esses genes possuem uma história evolutiva anterior à disseminação do uso antrópico de antimicrobianos como é sugerido por estudos realizados em solo antártico (Yuan *et al.*, 2019), a presença de genes relacionados a bombas de efluxo não são necessariamente sinais de contaminação por antibiótico causada pela ação

antrópica, mas uma resistência natural induzida pela presença de microrganismos produtores de antibióticos (Ramakrishna *et al.*, 2019).

Além da sobrevivência bacteriana a antimicrobianos, as bombas de efluxo estão envolvidas em diversas funções do metabolismo das bactérias como à excreção de substâncias que solubilizam nutrientes como o ferro (Nishino *et al.*, 2021). Sua maior incidência nas amostras rizosféricas em detrimento das de solo pode indicar que esse mecanismo realiza funções relacionadas à disponibilidade de nutrientes captados pelas raízes.

5.4.4 Perfil de resistência AMRs

Foram identificados 28 genes de resistência entre os grupos amostrais (Figura 15). Entre os resultados obtidos na análise de presença de genes (TABELA 4), observa-se a ausência de genes de resistência exclusivos de tutor vivo e a presença de apenas um gene exclusivo no conjunto tutor morto.

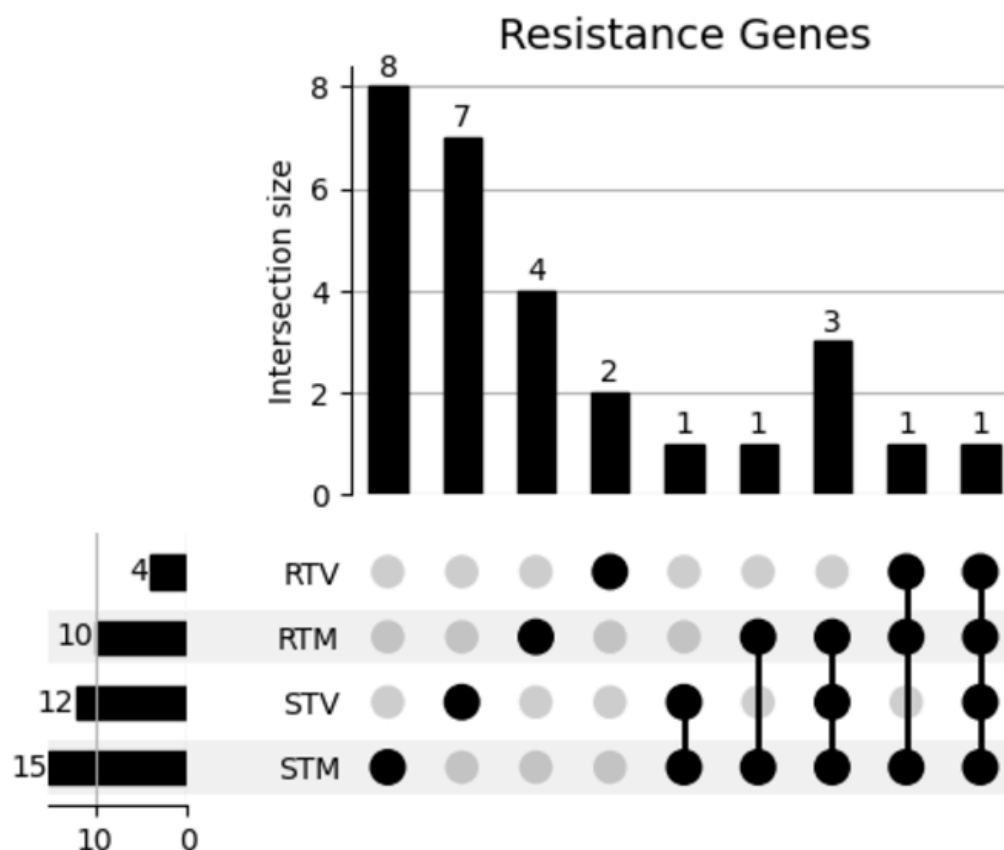


FIGURA 15 – Análise das intersecções e exclusividades dos genes de resistência entre as amostras utilizando genes com cobertura >75% e pelo menos duas leituras alinhadas para o grupo.

Todas as amostras compartilham a presença de *TEM-230*, gene relacionado à resistência a drogas da classe dos betalactâmicos: monobactam, cefalosporin, penam e penem através da inativação do antibiótico. Esse gene pertence à família TEM beta-lactamase e é comumente identificado em enterobactérias, pertencentes ao filo das *Pseudomonadotas* (Ranjbar e Sami, 2017).

TABELA 4: Genes relacionados à resistência antimicrobiana exclusivos a cada amostra.

| RTM | RTV | STM | STV |
|----------------------------|------|-----------------------------|------|
| CTX-M-11 | mdtB | AAC(3)-IIb | MexC |
| Klebsiella pneumoniae KpnF | qacG | BKC-1 | OprZ |
| SHV-160 | - | KPC-22 | TriC |
| qacJ | - | MexD | YajC |
| - | - | Pseudomonas aeruginosa CpxR | amrB |
| - | - | lfrA | mphA |
| - | - | rosA | rsmA |
| - | - | smeS | - |

O gene *opcM* está relacionado a uma bomba de efluxo que confere resistência a fluoroquinolona e aminoglicosídeo. Independente do tutor, identificou-se o gene *opcM* nas amostras de solo *bulk*, enquanto nos grupos da rizosfera o gene não foi identificado, o que poderia indicar que os microrganismos que carregam esse gene não estão envolvidos no metabolismo rizosférico nem na promoção do crescimento da planta.

O gene *dfrB3* está ausente apenas na amostra RTV (Tabela 5), esse gene tem relação a resistência a diaminopyrimidine através da alteração do alvo do antibiótico. Apesar de relatado em maior proporção em solos sem adubação com esterco bovino (Macedo *et al.*, 2021), o manejo de todas as amostras avaliadas neste estudo é realizado com adubo de torta de mamona. O estudo de Kneis e colaboradores (2023) indica a possibilidade desse gene ter parte de suas cópias compondo cassetes de resistência, assim, existe a possibilidade desse gene estar presente na amostra não por ativação pelo estressor diaminopyrimidine, mas pelo mecanismo de co-seleção de outros genes (Kneis *et al.*, 2023).

TABELA 5 – Genes identificados em bulk solo (STM e STV) e solo rizosférico com tutor morto (RTM), mas não identificados nas amostras de solo rizosférico com tutor vivo (RTV).

| GENE | Classe da Droga | RTM | RTV | STM | STV |
|---|---------------------------------------|----------|---------------|----------|----------|
| <i>TriB</i> | Agentes antissépticos e desinfetantes | Presente | Não detectado | Presente | Presente |
| <i>dfrB3</i> | Agentes antissépticos e desinfetantes | Presente | Não detectado | Presente | Presente |
| <i>vanR</i> gene in <i>vanO</i> cluster | Agentes antissépticos e desinfetantes | Presente | Não detectado | Presente | Presente |

Observa-se ainda que o gene *VanR* do cluster *VanO*, parte do cluster que codifica a resistência à vancomicina e a teicoplanina, antibióticos associados a actinobactérias, também está ausente apenas em rizosfera que utiliza o tutor vivo. A ausência desse gene em RTV pode ter relação com o fato que o grupo exclusivo de actinobactérias recrutado por RTV é principalmente composto por bactérias associadas à promoção do crescimento da planta (Binda *et al.*, 2018).

Esse padrão fortalece a hipótese de que RTV é menos propício à manutenção de genes AMRs, favorecendo microrganismos promotores do crescimento das plantas em detrimento daqueles que atuam em antagonismo químico. Da mesma maneira, o arcabouço mais diverso em RTM sugere um ambiente mais competitivo, o que pode demandar um maior arsenal de defesa microbiano.

Quanto aos genes exclusivos ao solo, em STM foram identificados 8 genes de resistência com os mecanismos de efluxo e inativação do antibiótico, relacionados às famílias RND, Beta-lactamase, aminoglicosídeos e MFS. Entre os 7 genes observados em STV houve predominância de bombas de efluxo RND, com exceção apenas *mphA*, que confere resistência a macrolídeos, através do mecanismo de inativação do antibiótico.

Observa-se em RTM, um perfil de resistência composto por bombas de efluxo multirresistentes e predominância de genes relacionados à resistência aos beta lactâmicos e agentes desinfetantes. Em RTV, por outro lado, nota-se um perfil reduzido de genes, com apenas genes relacionados à agentes desinfetantes e aminocoumarin (antibiótico derivado de *Streptomyces*), o que sugere uma possível resistência naturalmente induzida pela presença da bactéria produtora.

Outros mecanismos, além da seleção por pressão seletiva quanto a presença de bactérias produtoras de antibióticos, podem estar envolvidos na persistência de genes de resistência no ambiente, como a resistência cruzada, co-resistência e co-regulação (Maurya *et al.*, 2020). Os biocidas (frequentemente utilizados em lavouras) e desinfetantes, por exemplo, também têm capacidade de selecionar cepas resistentes como consequência da expressão de genes multirresistentes, e mesmo genes diretamente associados a antibióticos podem ser selecionados se fizerem parte de um mesmo replicon que carregue outros genes de interesse (Alonso *et al.*, 2001; Cardenas-Alegria *et al.*, 2022).

De maneira geral, os padrões observados de presença-ausência de genes de resistência nas amostras indicam que o sistema de tutoragem pode exercer influência sobre a estrutura funcional da rizosfera da pimenta-do-reino. A menor diversidade desses genes em RTV sugere que esse ambiente pode ser quimicamente menos competitivo, podendo favorecer o recrutamento de microrganismos relacionados à promoção do crescimento das plantas, onde a comunidade de actinobactérias recrutada nessa amostra se destaca, predominantemente relacionada na literatura à funções benéficas às plantas (Chai *et al.*, 2022; Xiao *et al.*, 2022; Iyer *et al.*, 2017).

5.5 Associação entre as variáveis

A análise exploratória (Figura 16) das variáveis neste estudo indica que a ocorrência e diversidade dos genes de resistência estão diretamente relacionados com a estrutura e diversidade da comunidade bacteriana, o que reflete nos diferentes perfis de resistência observados. Observou-se uma forte correlação da diversidade de Fisher dos genes de resistência com a diversidade bacteriana ($R=0,60$), assim como com o gene *VanR* ($R=0,76$), e uma correlação negativa com o gene de resistência *qacG* ($R=-0,76$), possivelmente por esse gene apresentar maior prevalência em ambientes pouco competitivos e funcionalmente mais simples. A presença do tutor *G. sepium*, e o potencial aumento na disponibilidade de exsudatos, podem estar mediando a redução da competição entre as bactérias pelo nicho, favorecendo comunidades menos dependentes de mecanismos de resistência a antimicrobianos.

De modo geral, os genes *VanR*, *TEM-230* e *OpcM* se relacionam positivamente com a diversidade de bactérias, actinobactérias e o índice de diversidade de Fisher de genes de resistência. A correlação entre esses genes e as actinobactérias pode sugerir que eles estejam

relacionados a comunidades microbianas mais complexas e nutricionalmente mais competitivas, onde os genes AMRs estejam desempenhando múltiplas funções adaptativas.

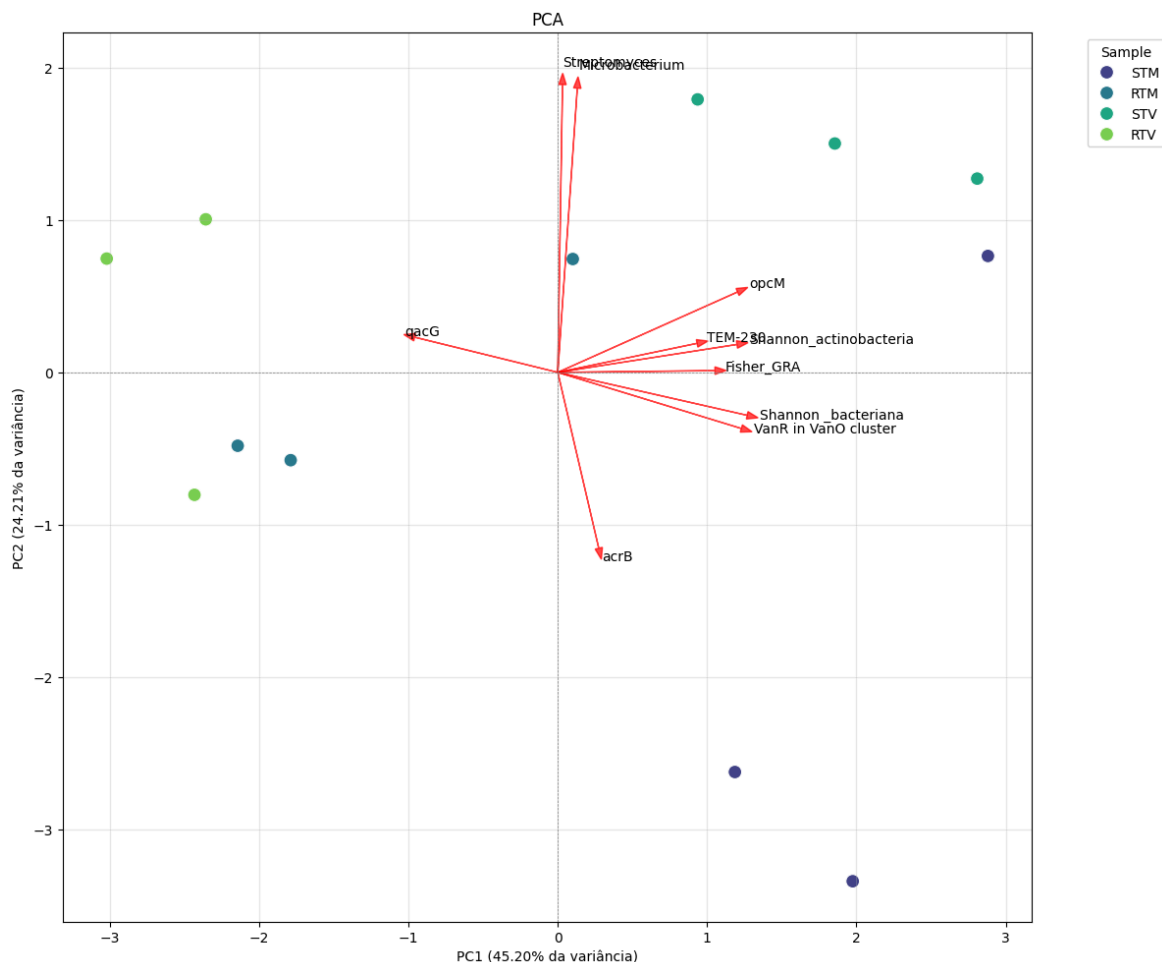


FIGURA 16 – Análise do componente principal utilizando os itens de maior relevância nas análises anteriores.

Apesar da elevada abundância de *Streptomyces* e sua associação com a produção de antibióticos na literatura, não foram observadas correlações significativas com a diversidade de genes de resistência. Isso sugere que *Streptomyces* pode desempenhar outras funções ecológicas dentro desse nicho. Além disso, sua presença não implica, necessariamente, na diversidade de AMRs, mesmo assim é importante destacar que essas bactérias têm potencial de sintetizar uma ampla variedade de antibióticos. Contudo, os resultados indicam que outros fatores além da presença de microrganismos conhecidos pela produção de antibióticos, como *Streptomyces*, podem estar mais envolvidos na indução de diversidade de genes de resistência (Rad et al., 2022).

A forte correlação entre a diversidade bacteriana e a diversidade de genes de resistência (Figura 17) poderia ser indicio de que além das bactérias produtoras de antibióticos

compondo o filo das Actinobactérias, outros fatores podem ter seu papel na disseminação de AMRs, como a transferência horizontal de genes mediada por plasmídeos entre as bactérias. Esse mecanismo de transferência gênica pode representar um risco a modelos de cultivo agrícola com grandes pressões seletivas, podendo ocasionar o surgimento de cepas oportunistas os patogênicas (Dimitriu, 2022, Meng *et al.*, 2022).

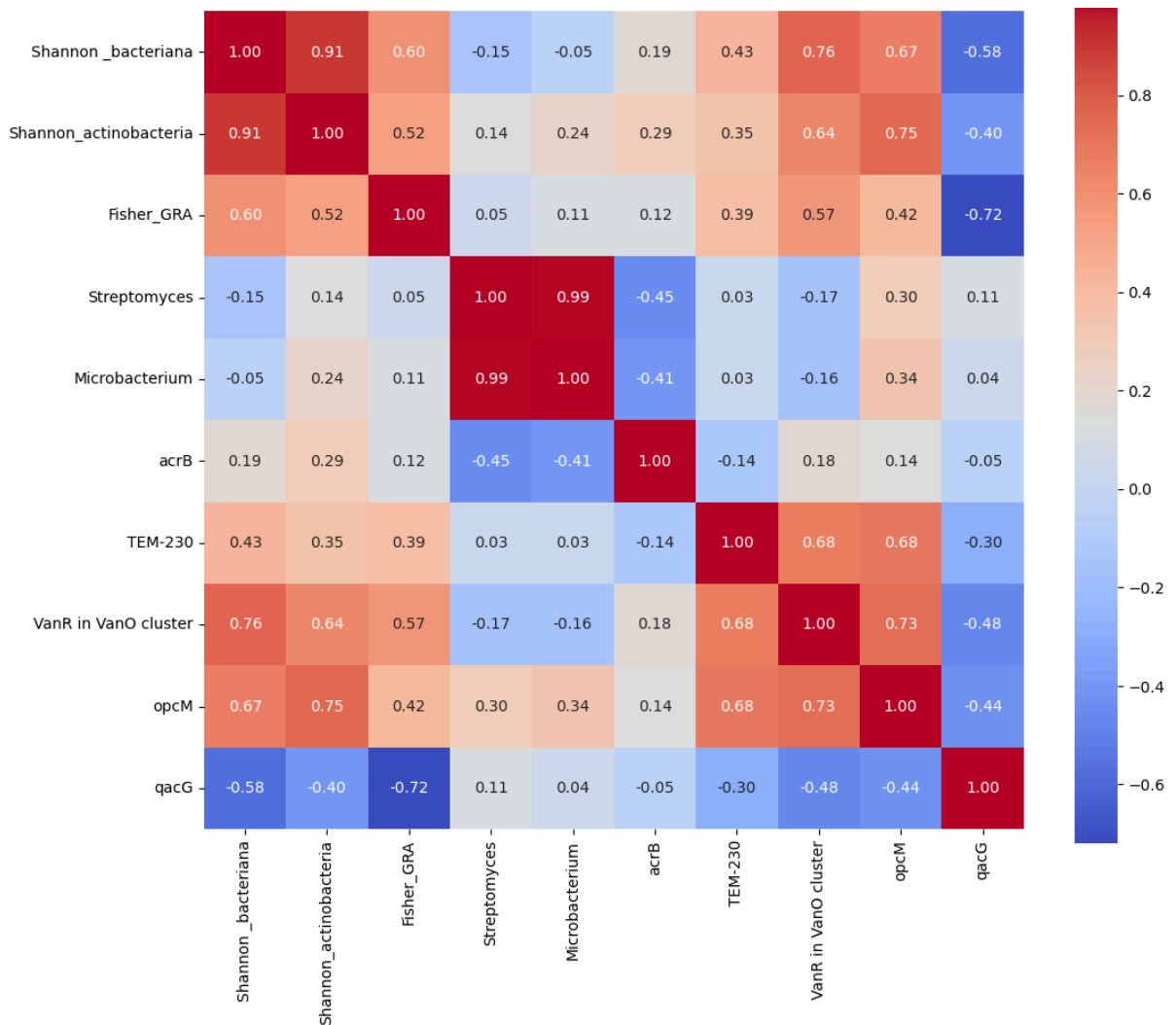


FIGURA 17 – Matriz de correlação Pearson com dados normalizados utilizando a biblioteca Standard Scaler.

Da mesma forma, a correlação moderada entre Actinobactérias e a diversidade de genes de resistência corrobora as informações na literatura de que organismos produtores de antibióticos tendem a possuir um arcabouço genético relacionado aos AMRs para promover a própria sobrevivência, contudo, é possível que outros fatores também possam estar fortemente relacionados a diversidade de AMRs, como outros filios bacterianos, fungos, MGEs ou fagos (Stanczak-Mrozek et al., 2017; Fisher et al., 2022).

6. CONCLUSÃO

Neste estudo, foi observado que a diversidade geral da comunidade bacteriana não é fortemente impactada pela escolha do sistema de tutoragem. No entanto, diferenças na composição taxonômica foram observadas entre as amostras, sugerindo que as interações microbianas mediadas pela rizosfera desempenham um papel relevante no recrutamento microbiano. Destaca-se ainda a elevada abundância do filo das Actinobactérias nessas amostras, com maior diversidade nas amostras de solo *bulk*, indicando que parte dessa comunidade faz parte do microbioma do solo, mas não é necessariamente recrutado pela rizosfera.

A análise PCA e matriz correlação de Pearson indicam associação entre a diversidade alfa de bactérias em geral, e em específico do filo das Actinobactérias, e a diversidade de genes de AMRs, reforçando a relação entre bactérias produtoras de antibióticos e a disseminação natural de genes de resistência, sugerindo que esses genes podem estar desempenhando funções ecológicas como a competição microbiana e adaptação ao ambiente e não necessariamente relacionadas ao impacto antrópico pelo uso de antimicrobianos.

A análise dos grupos exclusivamente recrutados a cada amostra revelou diferenças qualitativas entre os perfis microbianos recrutados pelas rizosferas. A rizosfera com tutor morto apresentou maior diversidade de bactérias associadas à produção de antimicrobianos, ao mesmo tempo, a rizosfera com tutor vivo recrutou principalmente bactérias associadas a mecanismos benéficos ao crescimento das plantas. Esse resultado sugere que a seleção do tutor pode ter influência na seleção da especialização funcional das bactérias que compõem sua comunidade, mesmo sem causar alterações na diversidade total.

A condição RTV apresenta um perfil de resistência diferenciado em relação às demais amostras, sugerindo um possível papel do tutor vivo (*G. sepium*) na seleção de AMRs. Em particular, entre as amostras rizosféricas, RTM apresentou maior diversidade de genes de resistência e um maior arcabouço de mecanismos, enquanto RTV houve uma menor diversidade de genes, sugerindo que esse ambiente sofre menor pressão seletiva e portanto pode contar com um conjunto menos complexo de genes e mecanismos de resistência. Assim, é possível que o tutor vivo possa reduzir a necessidade de manutenção de um repertório diverso de genes de resistência.

Com isso, os resultados desse estudo sugerem que a utilização de *G. sepium* é uma abordagem sustentável para evitar o desmatamento e altos custos relacionados à utilização de estacas, mas também pode contribuir para o desenvolvimento de *P. nigrum*, possivelmente

mediando o gradiente de nutrientes no horizonte rizosférico sem causar empobrecimento do microbioma e assim influenciando positivamente o recrutamento bacteriano e limitando a disseminação de genes de resistência. Estudos adicionais são necessários para compreender de que maneira o recrutamento desses microrganismos e a seleção do perfil de resistência influencia a produtividade e sanidade do cultivo de pimenta-do-reino.

REFERÊNCIAS

- Acosta-Durán, C., & Martínez-Romero, E. (2002). Diversity of rhizobia from nodules of the leguminous tree *Gliricidia sepium*, a natural host of *Rhizobium tropici*. *Archives of Microbiology*, 178(2), 161–164. <https://doi.org/10.1007/s00203-002-0433-3>
- Ahmad, M. F., Ahmad, F. A., Alsayegh, A. A., Zeyauallah, Md., AlShahrani, A. M., Muzammil, K., Saati, A. A., Wahab, S., Elbendary, E. Y., Kambal, N., Abdelrahman, M. H., & Hussain, S. (2024). Pesticides impacts on human health and the environment with their mechanisms of action and possible countermeasures. *Heliyon*, 10(7), e29128. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e29128>
- Alcock, B. P., Huynh, W., Chalil, R., Smith, K. W., Raphenya, A. R., Wlodarski, M. A., Edalatmand, A., Petkau, A., Syed, S. A., Tsang, K. K., Baker, S. J. C., Dave, M., McCarthy, M. C., Mukiri, K. M., Nasir, J. A., Golbon, B., Imtiaz, H., Jiang, X., Kaur, K., ... McArthur, A. G. (2023). CARD 2023: expanded curation, support for machine learning, and resistome prediction at the Comprehensive Antibiotic Resistance Database. *Nucleic Acids Research*, 51(D1), D690–D699. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac920>
- Alonso, A., Sánchez, P., & Martínez, J. L. (2001). Environmental selection of antibiotic resistance genes. *Environmental Microbiology*, 3(1), 1–9. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2001.00161.x>
- Alonso-Reyes, D. G., Galván, F. S., Portero, L. R., Alvarado, N. N., Farías, M. E., Vazquez, M. P., & Albarracín, V. H. (2021). Genomic insights into an andean multiresistant soil actinobacterium of biotechnological interest. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 37(10), 166. <https://doi.org/10.1007/s11274-021-03129-9>
- Anusree, T., & Suseela Bhai, R. (2017). Rhizosphere actinobacteria for combating *Phytophthora capsici* and *Sclerotium rolfsii*, the major soil borne pathogens of black pepper (*Piper nigrum* L.). *Biological Control*, 109, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2017.03.006>
- Anusree, T., Suseela Bhai, R., Ahammed Shabeer, T. P., & Oulkar, D. (2019). *Streptomyces* spp from Black Pepper Rhizosphere: A Boundless Reservoir of Antimicrobial and Growth Promoting Metabolites. *Journal of Biologically Active Products from Nature*, 9(1), 1–23. <https://doi.org/10.1080/22311866.2018.1561327>
- Araújo, E., Gonçalves Júnior, M., Guerra, J., Espindola, J., Alves, B., Correia, M., Risso, I., Santos, S., Silva, C., Rezende, A., Mello, G., Santos, C., & Silva, F. (2024). *Comunicado Técnico Sistema mecanizado de produção de biomassa de gliricídia*.
- Araujo, R., Gupta, V. V. S. R., Reith, F., Bissett, A., Mele, P., & Franco, C. M. M. (2020). Biogeography and emerging significance of Actinobacteria in Australia and Northern Antarctica soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 146, 107805. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2020.107805>
- Ashokkumar, K., Murugan, M., Dhanya, M. K., Pandian, A., & Warkentin, T. D. (2021). Phytochemistry and therapeutic potential of black pepper [*Piper nigrum* (L.)] essential oil and piperine: a review. *Clinical Phytoscience*, 7(1), 52. <https://doi.org/10.1186/s40816-021-00292-2>

Bignell, D. R. D., Bate, N., & Cundliffe, E. (2007). Regulation of tylosin production: role of a TylP-interactive ligand. *Molecular Microbiology*, 63(3), 838–847. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05541.x>

Binda, E., Cappelletti, P., Marinelli, F., & Marcone, G. L. (2018). Specificity of Induction of Glycopeptide Antibiotic Resistance in the Producing Actinomycetes. *Antibiotics*, 7(2), 36. <https://doi.org/10.3390/antibiotics7020036>

Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014a). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 30(15), 2114–2120. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>

Bouchez, T., Bliex, A. L., Dequiedt, S., Domaizon, I., Dufresne, A., Ferreira, S., Godon, J. J., Hellal, J., Joulain, C., Quaiser, A., Martin-Laurent, F., Mauffret, A., Monier, J. M., Peyret, P., Schmitt-Koplin, P., Sibourg, O., D'oiron, E., Bispo, A., Deportes, I., ... Ranjard, L. (2016). Molecular microbiology methods for environmental diagnosis. *Environmental Chemistry Letters*, 14(4), 423–441. <https://doi.org/10.1007/s10311-016-0581-3>

Boulahouat, S., Cherif-Silini, H., Silini, A., Bouket, A. C., Luptakova, L., Alenezi, F. N., & Belbahri, L. (2023). Biocontrol Efficiency of Rhizospheric Bacillus against the Plant Pathogen Fusarium oxysporum: A Promising Approach for Sustainable Agriculture. *Microbiology Research*, 14(3), 892–908. <https://doi.org/10.3390/microbiolres14030062>

Breitwieser, F. P., & Salzberg, S. L. (2020). Pavian: interactive analysis of metagenomics data for microbiome studies and pathogen identification. *Bioinformatics*, 36(4), 1303–1304. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz715>

Caradec, T., Anoz-Carbonell, E., Petrov, R., Billamboz, M., Antraygues, K., Cantrelle, F.-X., Boll, E., Beury, D., Hot, D., Drobecq, H., Trivelli, X., & Hartkoorn, R. C. (2023). A Novel Natural Siderophore Antibiotic Conjugate Reveals a Chemical Approach to Macromolecule Coupling. *ACS Central Science*, 9(11), 2138–2149. <https://doi.org/10.1021/acscentsci.3c00965>

Caradec, T., Trivelli, X., Desmecht, E., Peucelle, V., Khalife, J., & Hartkoorn, R. C. (2022). Dactylosporolides: Glycosylated Macrolides from Dactylosporangium fulvum. *Journal of Natural Products*, 85(12), 2714–2722. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.2c00484>

Cardenas Alegria, O., Pires Quaresma, M., Dias Dantas, C. W., Silva Guedes Lobato, E. M., de Oliveira Aragão, A., Patroca da Silva, S., Costa Barros da Silva, A., Ribeiro Cruz, A. C., Ramos, R. T. J., & Carneiro, A. R. (2022). Impacts of soybean agriculture on the resistome of the Amazonian soil. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.948188>

Cardenas-Alegria, O. V., Ferreira, V. B. C., Nogueira, W. G., Martins, D. T., Martins Neto, A. P., Monteiro Pontes, P. R., Lopes Cavalcante, R. B., Aguiar Alves, S. I., Luiz Da Costa Da Silva, A., Gomes Costa, R., Franco De Los Santos, E. F., Azevedo, V. A. D. C., & Ramos, R. T. J. (2024). Microbiome analyses of the Uraim River in the Amazon and georeferencing analyses to establish correlation with anthropogenic impacts of land use. *Frontiers in Environmental Science*, 12, 1404230. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2024.1404230>

Chai, C. H., Hong, C.-F., & Huang, J.-W. (2022). Identification and Characterization of a Multifunctional Biocontrol Agent, *Streptomyces griseorubiginosus* LJS06, Against Cucumber Anthracnose. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.923276>

- Chen, C., Chen, S., Zhang, W., Yuan, F., Yu, J., & Liu, Q. (2020). Streptomyces sp. S501, a Marine Petroleum-Degrading Actinobacterium Isolated from Sediment of Yalujiang Estuary, Northern China, and Its Genome Annotation. *Current Microbiology*, 77(11), 3643–3650. <https://doi.org/10.1007/s00284-020-02181-2>
- Chen, Q.-L., Hu, H.-W., Yan, Z.-Z., Zhu, Y.-G., He, J.-Z., & Delgado-Baquerizo, M. (2022). Cross-biome antibiotic resistance decays after millions of years of soil development. *The ISME Journal*, 16(7), 1864–1867. <https://doi.org/10.1038/s41396-022-01225-8>
- Cheng, M., Qian, Y., Xing, Z., Zylstra, G. J., & Huang, X. (2021). The low-nanomolar 4-nitrobenzoate-responsive repressor PnbX negatively regulates the actinomycete-derived 4-nitrobenzoate-degrading pnb locus. *Environmental Microbiology*, 23(11), 7028–7041. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15787>
- Chieb, M., & Gachomo, E. W. (2023). The role of plant growth promoting rhizobacteria in plant drought stress responses. *BMC Plant Biology*, 23(1), 407. <https://doi.org/10.1186/s12870-023-04403-8>
- Choulet, F., Gallois, A., Aigle, B., Mangenot, S., Gerbaud, C., Truong, C., Francou, F.-X., Borges, F., Fourier, C., Guérineau, M., Decaris, B., Barbe, V., Pernodet, J.-L., & Leblond, P. (2006). Intraspecific Variability of the Terminal Inverted Repeats of the Linear Chromosome of *Streptomyces ambofaciens*. *Journal of Bacteriology*, 188(18), 6599–6610. <https://doi.org/10.1128/JB.00734-06>
- Costa, Y. K. S. da, Santos, H. C. A., Ribeiro, N. M., Cesarin, V., & Carvalho, L. B. de. (2020). Cultivo de pimenta-do-reino. *Revista Agronomia Brasileira*, 4(2020). <https://doi.org/10.29372/rab202034>
- Dinesh, R., Srinivasan, V., Hamza, S., Parthasarathy, V. A., & Aipe, K. C. (2010a). Physico-chemical, biochemical and microbial properties of the rhizospheric soils of tree species used as supports for black pepper cultivation in the humid tropics. *Geoderma*, 158(3–4), 252–258. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2010.04.034>
- Dubey, A., Kumar, A., Khan, M. L., & Payasi, D. K. (2021). Plant Growth-promoting and Bio-control Activity of *Micrococcus luteus* Strain AKAD 3-5 Isolated from the Soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) Rhizosphere. *The Open Microbiology Journal*, 15(1), 188–197. <https://doi.org/10.2174/1874285802115010188>
- Dulmage, H. T. (1953). *The Production of Neomycin by Streptomyces Fradiae in Synthetic Media*. <https://journals.asm.org/journal/am>
- EMBRAPA. (2004). *Manual Segurança e Qualidade para a Cultura da Pimenta-do-Reino*.
- Fatahi-Bafghi, M. (2019). Antibiotic resistance genes in the Actinobacteria phylum. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 38(9), 1599–1624. <https://doi.org/10.1007/s10096-019-03580-5>
- Filipic, B., Novovic, K., Studholme, D. J., Malesevic, M., Mirkovic, N., Kojic, M., & Jovicic, B. (2020). Shotgun metagenomics reveals differences in antibiotic resistance genes among bacterial communities in Western Balkans glacial lakes sediments. *Journal of Water and Health*, 18(3), 383–397. <https://doi.org/10.2166/wh.2020.227>
- Fisch, G., Marengo, J. A., & Nobre, C. A. (1998). Uma revisão geral sobre o clima da Amazônia. *Acta Amazonica*, 28(2), 101–101. <https://doi.org/10.1590/1809-43921998282126>

- Florentino, L., Rezende, A., Mesquita, A., Lima, A., Marques, D., & Miranda, J. (2014). Diversity and potential use of rhizobia from nodules of *Gliricidia sepium*. *Revista de Ciências Agrárias*, 37 n3(2019-01–20), 320–328. <https://doi.org/10.19084/rca.16831>
- Francaviglia, R., Almagro, M., & Vicente-Vicente, J. L. (2023). Conservation Agriculture and Soil Organic Carbon: Principles, Processes, Practices and Policy Options. *Soil Systems*, 7(1), 17. <https://doi.org/10.3390/soilsystems7010017>
- French, K. E., Tkacz, A., & Turnbull, L. A. (2017). Conversion of grassland to arable decreases microbial diversity and alters community composition. *Applied Soil Ecology*, 110, 43–52. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2016.10.015>
- Fu, L., Yan, Y., Li, X., Liu, Y., & Lu, X. (2022). Rhizosphere soil microbial community and its response to different utilization patterns in the semi-arid alpine grassland of northern Tibet. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.931795>
- Fu, R., Cheng, R., Wang, S., Li, J., & Zhang, J. (2021). Succinoglycan Riclin reshaped the soil microbiota by accumulating plant probiotic species to improve the soil suppressiveness on Fusarium wilt of cucumber seedlings. *International Journal of Biological Macromolecules*, 182, 1883–1892. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.05.180>
- Gama, J. (2023). The Role of Soils in Sustainability, Climate Change, and Ecosystem Services: Challenges and Opportunities. *Ecologies*, 4(3), 552–567. <https://doi.org/10.3390/ecologies4030036>
- Gillieatt, B. F., & Coleman, N. v. (2024). Unravelling the mechanisms of antibiotic and heavy metal resistance co-selection in environmental bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 48(4). <https://doi.org/10.1093/femsre/fuae017>
- Goh, Y.-X., Anupoju, S. M. B., Nguyen, A., Zhang, H., Ponder, M., Krometis, L.-A., Pruden, A., & Liao, J. (2024). Evidence of horizontal gene transfer and environmental selection impacting antibiotic resistance evolution in soil-dwelling *Listeria*. *Nature Communications*, 15(1), 10034. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-54459-9>
- Gowdar, S. B., Deepa, H., & Amaresh, Y. S. (2018). A brief review on biocontrol potential and PGPR traits of *Streptomyces* sp. for the management of plant diseases. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 7(5).
- Guan, H., Li, Y., Zheng, J., Liu, N., Zhang, J., & Tan, H. (2019). Important role of a LAL regulator StaR in the staurosporine biosynthesis and high-production of *Streptomyces fradiae* CGMCC 4.576. *Science China Life Sciences*, 62(12), 1638–1654. <https://doi.org/10.1007/s11427-019-1597-6>
- Hima Parvathy, A., Santhoshkumar, R., & Soniya, E. v. (2024). Next-generation sequencing-based comparative mapping and culture-based screening of bacterial rhizobiome in *Phytophthora capsici*-resistant and susceptible *Piper* species. *Frontiers in Microbiology*, 15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1458454>
- Hnini, M., & Aurag, J. (2024). Genetic diversity, stress tolerance and phytobeneficial potential in rhizobacteria of *Vachellia tortilis* subsp. *raddiana*. *Environmental Microbiome*, 19(1), 73. <https://doi.org/10.1186/s40793-024-00611-3>

- Hong, H.-J., Hutchings, M. I., & Buttner, M. J. (2008). Vancomycin Resistance VanS/VanR Two-Component Systems. In *Bacterial Signal Transduction: Networks and Drug Targets* (pp. 200–213). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-0-387-78885-2_14
- Hu, D., Sun, C., Jin, T., Fan, G., Mok, K. M., Li, K., & Lee, S. M.-Y. (2020). Exploring the Potential of Antibiotic Production From Rare Actinobacteria by Whole-Genome Sequencing and Guided MS/MS Analysis. *Frontiers in Microbiology*, *11*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01540>
- Inda-Díaz, J. S., Lund, D., Parras-Moltó, M., Johnning, A., Bengtsson-Palme, J., & Kristiansson, E. (2023). Latent antibiotic resistance genes are abundant, diverse, and mobile in human, animal, and environmental microbiomes. *Microbiome*, *11*(1), 44. <https://doi.org/10.1186/s40168-023-01479-0>
- Iyer, R., Damania, A., & Iken, B. (2017). Whole genome sequencing of *Microbacterium* sp. AISO3 from polluted San Jacinto River sediment reveals high bacterial mobility, metabolic versatility and heavy metal resistance. *Genomics Data*, *14*, 10–13. <https://doi.org/10.1016/j.gdata.2017.07.009>
- Karthik, L. (2022). Actinobacteria: Microbiology to Synthetic Biology. In L. Karthik (Ed.), *Actinobacteria: Microbiology to Synthetic Biology*. Springer Nature. <https://doi.org/10.1007/978-981-16-5835-8>
- Kill, L., & Menezes, E. (2005). Gliricidia. In *Espécies vegetais exóticas com potencialidades para o semi-árido brasileiro* (pp. 301–321).
- Kim, B., Gurung, S., Han, S.-R., Lee, J.-H., & Oh, T.-J. (2023). Comparative Genomic Analysis of Biofilm-Forming Polar *Microbacterium* sp. Strains PAMC22086 and PAMC21962 Isolated from Extreme Habitats. *Microorganisms*, *11*(7), 1757. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11071757>
- Kneis, D., Lemay-St-Denis, C., Cellier-Goetghebeur, S., Elena, A. X., Berendonk, T. U., Pelletier, J. N., & Heß, S. (2023). Trimethoprim resistance in surface and wastewater is mediated by contrasting variants of the *dfxB* gene. *The ISME Journal*, *17*(9), 1455–1466. <https://doi.org/10.1038/s41396-023-01460-7>
- Knights, H. E., Jorin, B., Haskett, T. L., & Poole, P. S. (2021). Deciphering bacterial mechanisms of root colonization. *Environmental Microbiology Reports*, *13*(4), 428–444. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12934>
- Kunhikannan, S., Thomas, C. J., Franks, A. E., Mahadevaiah, S., Kumar, S., & Petrovski, S. (2021). Environmental hotspots for antibiotic resistance genes. *MicrobiologyOpen*, *10*(3). <https://doi.org/10.1002/mbo3.1197>
- Li, Z., Zu, C., Wang, C., Yang, J., Yu, H., & Wu, H. (2016). Different responses of rhizosphere and non-rhizosphere soil microbial communities to consecutive *Piper nigrum* L. monoculture. *Scientific Reports*, *6*(1), 35825. <https://doi.org/10.1038/srep35825>
- Lu, Y., Zhou, G., Ewald, J., Pang, Z., Shiri, T., & Xia, J. (2023). MicrobiomeAnalyst 2.0: comprehensive statistical, functional and integrative analysis of microbiome data. *Nucleic Acids Research*, *51*(W1), W310–W318. <https://doi.org/10.1093/nar/gkad407>
- Macedo, G., van Veelen, H. P. J., Hernandez-Leal, L., van der Maas, P., Heederik, D., Mevius, D., Bossers, A., & Schmitt, H. (2021). Targeted metagenomics reveals inferior resilience of

farm soil resistome compared to soil microbiome after manure application. *Science of The Total Environment*, 770, 145399. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145399>

Maron, P.-A., Sarr, A., Kaisermann, A., Lévêque, J., Mathieu, O., Guigue, J., Karimi, B., Bernard, L., Dequiedt, S., Terrat, S., Chabbi, A., & Ranjard, L. (2018). High Microbial Diversity Promotes Soil Ecosystem Functioning. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(9). <https://doi.org/10.1128/AEM.02738-17>

Mavrodi, O. v., McWilliams, J. R., Peter, J. O., Berim, A., Hassan, K. A., Elbourne, L. D. H., LeTourneau, M. K., Gang, D. R., Paulsen, I. T., Weller, D. M., Thomashow, L. S., Flynt, A. S., & Mavrodi, D. v. (2021). Root Exudates Alter the Expression of Diverse Metabolic, Transport, Regulatory, and Stress Response Genes in Rhizosphere *Pseudomonas*. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.651282>

Meng, M., Li, Y., & Yao, H. (2022). Plasmid-Mediated Transfer of Antibiotic Resistance Genes in Soil. *Antibiotics*, 11(4), 525. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11040525>.

Mohammed, F. A., Abu-Hussien, S. H., Dougdoug, N. K. el, Koutb, N., & Korayem, A. S. (2024). *Streptomyces fradiae* Mitigates the Impact of Potato Virus Y by Inducing Systemic Resistance in Two Egyptian Potato (*Solanum tuberosum* L.) Cultivars. *Microbial Ecology*, 87(1), 131. <https://doi.org/10.1007/s00248-024-02437-5>

Monteiro, G. P., Albuquerque, E. S. de, Silveira, T. M., Blind, A. D., Figueirêdo, P. G. J., Neves, A. F., & Santos, R. P. S. (2023). *Bacillus amyloliquefaciens*, *Microbacterium resistens* and *Stenotrophomonas maltophilia* in Biocontrol of *Corynespora cassiicola* in Tomato Culture. In *DEVELOPMENT AND ITS APPLICATIONS IN SCIENTIFIC KNOWLEDGE*. Seven Editora. <https://doi.org/10.56238/devopinterscie-282>

Mullis, M. M., Rambo, I. M., Baker, B. J., & Reese, B. K. (2019). Diversity, Ecology, and Prevalence of Antimicrobials in Nature. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02518>

Na, X., Xu, T., Li, M., Zhou, Z., Ma, S., Wang, J., He, J., Jiao, B., & Ma, F. (2018). Variations of Bacterial Community Diversity Within the Rhizosphere of Three Phylogenetically Related Perennial Shrub Plant Species Across Environmental Gradients. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00709>

Nesme, J., & Simonet, P. (2015). The soil resistome: a critical review on antibiotic resistance origins, ecology and dissemination potential in telluric bacteria. *Environmental Microbiology*, 17(4), 913–930. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12631>

Nguyen Van, L., Herrmann, L., Dinh, T. le, Nguyen Van, C., Nguyen Van, L., Enez, A., Brau, L., & Lesueur, D. (2025). Liming effect on soil chemical and biological properties, pests and diseases, and crop yields in robusta coffee and black pepper in Vietnam. *Soil Research*, 63(3). <https://doi.org/10.1071/SR24143>

Nishino, K., Yamasaki, S., Nakashima, R., Zwama, M., & Hayashi-Nishino, M. (2021). Function and Inhibitory Mechanisms of Multidrug Efflux Pumps. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.737288>

Obieze, C. C., George, P. B. L., Boyle, B., & Khasa, D. P. (2023). Black pepper rhizomicrobiome: Spectrum of plant health indicators, critical environmental factors and

community compartmentation in Vietnam. *Applied Soil Ecology*, 187, 104857. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2023.104857>

Olanrewaju, O. S., Glick, B. R., & Babalola, O. O. (2017). Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(11), 197. <https://doi.org/10.1007/s11274-017-2364-9>

Pignati, W. A., Lima, F. A. N. de S. e, Lara, S. S. de, Correa, M. L. M., Barbosa, J. R., Leão, L. H. da C., & Pignatti, M. G. (2017). Distribuição espacial do uso de agrotóxicos no Brasil: uma ferramenta para a Vigilância em Saúde. *Ciência & Saúde Coletiva*, 22(10), 3281–3293. <https://doi.org/10.1590/1413-812320172210.17742017>

Pontes, D. S., de Araujo, R. S. A., Dantas, N., Scotti, L., Scotti, M. T., de Moura, R. O., & Mendonca-Junior, F. J. B. (2018). Genetic Mechanisms of Antibiotic Resistance and the Role of Antibiotic Adjuvants. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 18(1), 42–74. <https://doi.org/10.2174/1568026618666180206095224>

Produção de Pimenta-do-reino. (2023). IBGE. <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/pimenta-do-reino/br>

Qian, Y., Cheng, M., Lai, L., Zhou, J., Zylstra, G. J., & Huang, X. (2023). ChlOR, a GMC family oxidoreductase that evolved independently from the actinomycete, confers resistance to amphenicol antibiotics. *Environmental Microbiology*, 25(12), 3019–3034. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.16493>

Queiroga, V., Veloso, N., Mendes, B., Gomes, J. P., Adelino De Melo, B., Giuliano, Ê., Esther, G., & Barros De Albuquerque, M. (2023). Sistema produtivo de pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.). In *Sistema produtivo de pimenta-do-reino (Piper nigrum L.)*. (pp. 10–126). <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/doc/1162373/1/Sistema-produtivo-pimenta-do-reino-2023.pdf>

Rad, A., Astaykina, A., Streletskii, R., Afsharyzad, Y., Etesami, H., Zarei, M., & Balasundram, S. K. (2022). An Overview of Antibiotic Resistance and Abiotic Stresses Affecting Antimicrobial Resistance in Agricultural Soils. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(8), 4666. <https://doi.org/10.3390/ijerph19084666>

Rajeswari M, & Ramakrishnan S. (2015). Influence of *Streptomyces fradiae* against Root knot nematode *Meloidogyne incognita* in Tomato. In *Research Journal of Agriculture and Forestry Sciences* (Vol. 3, Issue 1). www.isca.me

Ramakrishna, W., Yadav, R., & Li, K. (2019). Plant growth promoting bacteria in agriculture: Two sides of a coin. *Applied Soil Ecology*, 138, 10–18. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2019.02.019>

Ranjbar, R., & Sami, M. (2017). Genetic Investigation of Beta-Lactam Associated Antibiotic Resistance Among *Escherichia Coli* Strains Isolated from Water Sources. *The Open Microbiology Journal*, 11(1), 203–210. <https://doi.org/10.2174/1874285801711010203>

Ray, S., Maitra, A., Biswas, A., Panjekar, S., Mondal, J., & Anand, R. (2017). Functional insights into the mode of DNA and ligand binding of the TetR family regulator TyIP from *Streptomyces fradiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 292(37), 15301–15311. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.788000>

- Rizvi, A., Ahmed, B., Khan, M. S., El-Beltagi, H. S., Umar, S., & Lee, J. (2022). Bioprospecting Plant Growth Promoting Rhizobacteria for Enhancing the Biological Properties and Phytochemical Composition of Medicinally Important Crops. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 27(4). <https://doi.org/10.3390/molecules27041407>
- Shi, H., Hu, X., Li, W., Zhang, J., Hu, B., & Lou, L. (2023). Soil Component: A Potential Factor Affecting the Occurrence and Spread of Antibiotic Resistance Genes. *Antibiotics*, 12(2), 333. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12020333>
- Singh, B.-. (2018). Are Nitrogen Fertilizers Deleterious to Soil Health? *Agronomy*, 8(4), 48. <https://doi.org/10.3390/agronomy8040048>
- Singh, R. K. M., Singh, P., Sharma, A. K., Guo, D., Udpadhyay, S. K., Song, Q., Verma, K. K., Li, D., Malviya, M. K., & Song, X. (2022). Unraveling Nitrogen Fixing Potential of Endophytic Diazotrophs of Different Saccharum Species for Sustainable Sugarcane Growth. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(11). <https://doi.org/10.3390/ijms23116242>
- Sociedade Nacional de Agricultura. (2023, July 14). *Brasil é o 2º maior produtor e exportador de pimenta-do-reino no mundo*. Sociedade Nacional de Agricultura. <https://sna.agr.br/brasil-e-o-2o-maior-produtor-e-exportador-de-pimenta-do-reino-no-mundo/>
- Sun, Y., Wu, J., Shang, X., Xue, L., Ji, G., Chang, S., Niu, J., & Emaneghemi, B. (2022). Screening of Siderophore-Producing Bacteria and Their Effects on Promoting the Growth of Plants. *Current Microbiology*, 79(5), 150. <https://doi.org/10.1007/s00284-022-02777-w>
- Syiemiong, D., Jha, D. K., Adhikari, S., Myllemngap, D., Lyngdoh, D., Warlarpih, J. P., Paul, N., Lamare, K. M., Wahlang, C., & Lyngkhoi, R. (2022). Rhizospheres of *Rubus ellipticus* and *Ageratina riparia* from Meghalaya exhibit Actinomycetota that promote plant growth. *Journal of Applied Biology & Biotechnology*. <https://doi.org/10.7324/JABB.2023.110210>
- Tarigan, N., Wahyono, T. E., Perkasa, G., Maris, P., Rizal, M., & Kardinan, A. (2023). An overview of black pepper: cultivation and challenges. *JURNAL ILMIAH AGRINECA*, 23(2), 157–171. <https://doi.org/10.36728/afp.v23i2.2636>
- Taylor, A., Vágány, V., Jackson, A. C., Harrison, R. J., Rainoni, A., & Clarkson, J. P. (2016). Identification of pathogenicity-related genes in *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae*. *Molecular Plant Pathology*, 17(7), 1032–1047. <https://doi.org/10.1111/mpp.12346>
- Thomas, J. C., Oladeinde, A., Kieran, T. J., Finger, J. W., Bayona-Vásquez, N. J., Cartee, J. C., Beasley, J. C., Seaman, J. C., McArthur, J. V., Rhodes, O. E., & Glenn, T. C. (2020). Co-occurrence of antibiotic, biocide, and heavy metal resistance genes in bacteria from metal and radionuclide contaminated soils at the Savannah River Site. *Microbial Biotechnology*, 13(4), 1179–1200. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13578>
- Tremacoldi, C. (2010). *Principais Doenças Fúngicas da Pimenteira-do-Reino no Estado do Pará e Recomendações de Controle*. <http://www.cpatu.embrapa.br>
- Trindade, R., Almeida, L., Xavier, L., Andrade, E. H., Maia, J. G., Mello, A., Setzer, W. N., Ramos, A., & Silva, J. K. R. (2021). Influence on Secondary Metabolism of *Piper nigrum* L. by Co-Inoculation with Arbuscular Mycorrhizal Fungi and *Fusarium solani* f. sp. *piperis*. *Microorganisms*, 9(3), 484. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9030484>

- Trivedi, P., Leach, J. E., Tringe, S. G., Sa, T., & Singh, B. K. (2020). Plant–microbiome interactions: from community assembly to plant health. *Nature Reviews Microbiology*, *18*(11), 607–621. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0412-1>
- Usyk, M., Peters, B. A., Karthikeyan, S., McDonald, D., Sollecito, C. C., Vazquez-Baeza, Y., Shaffer, J. P., Gellman, M. D., Talavera, G. A., Daviglius, M. L., Thyagarajan, B., Knight, R., Qi, Q., Kaplan, R., & Burk, R. D. (2023). Comprehensive evaluation of shotgun metagenomics, amplicon sequencing, and harmonization of these platforms for epidemiological studies. *Cell Reports Methods*, *3*(1), 100391. <https://doi.org/10.1016/j.crmeth.2022.100391>
- van Bergeijk, D. A., Terlouw, B. R., Medema, M. H., & van Wezel, G. P. (2020). Ecology and genomics of Actinobacteria: new concepts for natural product discovery. *Nature Reviews Microbiology*, *18*(10), 546–558. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0379-y>
- Vieira, A. F., Moura, M., & Silva, L. (2021). Soil metagenomics in grasslands and forests – A review and bibliometric analysis. *Applied Soil Ecology*, *167*, 104047. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2021.104047>
- von Wintersdorff, C. J. H., Penders, J., van Niekerk, J. M., Mills, N. D., Majumder, S., van Alphen, L. B., Savelkoul, P. H. M., & Wolffs, P. F. G. (2016). Dissemination of Antimicrobial Resistance in Microbial Ecosystems through Horizontal Gene Transfer. *Frontiers in Microbiology*, *7*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00173>
- Wang, Z., Li, Y., Zhao, Y., Zhuang, L., Yu, Y., Wang, M., Liu, J., & Wang, Q. (2021). A microbial consortium-based product promotes potato yield by recruiting rhizosphere bacteria involved in nitrogen and carbon metabolisms. *Microbial Biotechnology*, *14*(5), 1961–1975. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13876>
- Wang, Z., Lu, K., Liu, X., Zhu, Y., & Liu, C. (2023). Comparative Functional Genome Analysis Reveals the Habitat Adaptation and Biocontrol Characteristics of Plant Growth-Promoting Bacteria in NCBI Databases. *Microbiology Spectrum*, *11*(3). <https://doi.org/10.1128/spectrum.05007-22>
- Wang, Z., Solanki, M. K., Yu, Z.-X., Anas, M., Dong, D.-F., Xing, Y.-X., Malviya, M. K., Pang, F., & Li, Y.-R. (2021). Genome Characteristics Reveal the Biocontrol Potential of Actinobacteria Isolated From Sugarcane Rhizosphere. *Frontiers in Microbiology*, *12*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.797889>
- Wood, D. E., Lu, J., & Langmead, B. (2019). Improved metagenomic analysis with Kraken 2. *Genome Biology*, *20*(1), 257. <https://doi.org/10.1186/s13059-019-1891-0>
- Xiao, Y., Lu, H., Liu, Y., Sang, Y., & Sun, J. (2022). Whole-genome sequencing and functional analysis of a novel chitin-degrading strain *Rhodococcus* sp. 11-3. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *134*(2), 167–173. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2022.04.010>
- Yang, T., Siddique, K. H. M., & Liu, K. (2020). Cropping systems in agriculture and their impact on soil health-A review. *Global Ecology and Conservation*, *23*, e01118. <https://doi.org/10.1016/j.gecco.2020.e01118>
- Yasir, M., Khan, R., Ullah, R., Bibi, F., Khan, I., Mustafa Karim, A., Al-Ghamdi, A. K., & Azhar, E. I. (2022). Bacterial diversity and the antimicrobial resistome in the southwestern

highlands of Saudi Arabia. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 29(4), 2138–2147. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.11.047>

York, L. M., Carminati, A., Mooney, S. J., Ritz, K., & Bennett, M. J. (2016). The holistic rhizosphere: integrating zones, processes, and semantics in the soil influenced by roots. *Journal of Experimental Botany*, 67(12), 3629–3643. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw108>

Yuan, K., Yu, K., Yang, R., Zhang, Q., Yang, Y., Chen, E., Lin, L., Luan, T., Chen, W., & Chen, B. (2019). Metagenomic characterization of antibiotic resistance genes in Antarctic soils. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 176, 300–308. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.03.099>

Zhang, R., Xia, H., Guo, P., & Qin, Z. (2008). Variation in the replication loci of *Streptomyces* linear plasmids. *FEMS Microbiology Letters*, 290(2), 209–216. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01432.x>

Zheng, D., Yin, G., Liu, M., Hou, L., Yang, Y., van Boeckel, T. P., Zheng, Y., & Li, Y. (2022). Global biogeography and projection of soil antibiotic resistance genes. *Science Advances*, 8(46). <https://doi.org/10.1126/sciadv.abq8015>

Zhou, Z., Wang, C., & Luo, Y. (2020). Meta-analysis of the impacts of global change factors on soil microbial diversity and functionality. *Nature Communications*, 11(1), 3072. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16881-7>

Zhou, Z., Wu, X., Li, J., Zhang, Y., Huang, Y., Zhang, W., Shi, Y., Wang, J., & Chen, S. (2022). A novel quorum quencher, *Rhodococcus pyridinivorans* XN-36, is a powerful agent for the biocontrol of soft rot disease in various host plants. *Biological Control*, 169, 104889. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2022.104889>

Zu, C., Li, Z., Yang, J., Yu, H., Sun, Y., Tang, H., Yost, R., & Wu, H. (2014). Acid Soil Is Associated with Reduced Yield, Root Growth and Nutrient Uptake in Black Pepper (<i>Piper nigrum</i> L.). *Agricultural Sciences*, 05(05), 466–473. <https://doi.org/10.4236/as.2014.55047>

APÊNDICE I

Tabela S1: Genes relacionados à resistência antimicrobiana, seus mecanismos e o número de classes de drogas aos quais são resistentes.

| ARO Term | Mecanismo | Família do Gene | Nº Dclass |
|-----------------|----------------------------------|---|------------------|
| TriB | Bombas de efluxo de antibióticos | resistance-nodulation-cell division (RND) | 1 |
| TriC | Bombas de efluxo de antibióticos | resistance-nodulation-cell division (RND) | 1 |
| YajC | Bombas de efluxo de antibióticos | resistance-nodulation-cell division (RND) | 10 |
| acrB | Bombas de efluxo de antibióticos | resistance-nodulation-cell division (RND) | 7 |
| amrB | Bombas de efluxo de antibióticos | resistance-nodulation-cell division (RND) | 1 |
| mdtB | Bombas de efluxo de antibióticos | resistance-nodulation-cell division (RND) | 1 |
| mexM | Bombas de efluxo de antibióticos | resistance-nodulation-cell division (RND) | 1 |
| opcM | Bombas de efluxo de antibióticos | resistance-nodulation-cell division (RND) | 2 |
| rsmA | Bombas de efluxo de antibióticos | resistance-nodulation-cell division (RND) | 3 |
| smeS | Bombas de efluxo de antibióticos | resistance-nodulation-cell division (RND) | 4 |
| MexC | Bombas de efluxo de antibióticos | resistance-nodulation-cell division (RND) | 9 |
| MexD | Bombas de efluxo de antibióticos | resistance-nodulation-cell division (RND) | 9 |

| | | | |
|------------------------------|----------------------------------|--|----|
| OprZ | Bombas de efluxo de antibióticos | resistance-nodulation-cell division (RND) | 4 |
| Pseudomonas aeruginosa CpxR | Bombas de efluxo de antibióticos | resistance-nodulation-cell division (RND) | 15 |
| lfrA | Bombas de efluxo de antibióticos | major facilitator superfamily (MFS) | 1 |
| rosA | Bombas de efluxo de antibióticos | major facilitator superfamily (MFS) | 1 |
| qacG | Bombas de efluxo de antibióticos | small multidrug resistance (SMR) | 1 |
| qacJ | Bombas de efluxo de antibióticos | small multidrug resistance (SMR) | 1 |
| Klebsiella pneumoniae e KpnF | Bombas de efluxo de antibióticos | small multidrug resistance (SMR) | 7 |
| BKC-1 | Inativação do antibiótico | BKC Beta-lactamase | 1 |
| CTX-M-11 | Inativação do antibiótico | CTX-M beta-lactamase | 1 |
| KPC-22 | Inativação do antibiótico | KPC beta-lactamase | 4 |
| SHV-160 | Inativação do antibiótico | SHV beta-lactamase | 3 |
| TEM-230 | Inativação do antibiótico | TEM beta-lactamase | 4 |
| AAC(3)-IIb | Inativação do antibiótico | AAC(3) | 1 |
| mphA | Inativação do antibiótico | macrolide phosphotransferase (MPH) | 1 |
| ramA | Inativação do antibiótico | rifampin ADP-ribosyltransferase (Arr) | 1 |
| vanR gene in vanO cluster | Alteração do alvo do antibiótico | glycopeptide resistance gene cluster; vanR | 1 |

| | | | |
|-------|-------------------------------------|--|---|
| dfrB3 | Substituição do alvo do antibiótico | trimethoprim resistant dihydrofolate reductase dfr | 1 |
|-------|-------------------------------------|--|---|