

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL



**Produção de compostos antimicrobianos em solos
supressivos: Efeito da diversidade nutricional**

Ana Patrícia Carvalho Correia

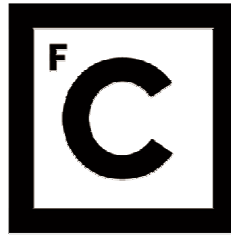
Mestrado em Microbiologia Aplicada

Dissertação orientada por:

Doutor Luís Carvalho (FCUL)

Professora Doutora Maria Manuela Carolino (FCUL)

2016



**Ciências
ULisboa**

Produção de compostos antimicrobianos em solos supressivos: Efeito da diversidade nutricional

Ana Patrícia Carvalho Correia

2016

Esta tese foi integralmente realizada no cE3c (Centre for Ecology, Evolution and Environmental Changes), Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, sob a supervisão direta do Doutor Luís Carvalho no âmbito do Mestrado em Microbiologia Aplicada da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.

Professora Doutora Maria Manuela Carolino foi designada como orientadora interna no âmbito do Mestrado em Microbiologia Aplicada da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.

Agradecimentos

A dissertação de mestrado aqui apresentada é o culminar de um trabalho que só foi possível devido ao empenho e dedicação de inúmeras pessoas, que de uma forma ou outra, tiveram um papel muito importante. Como tal, gostaria de agradecer:

Ao Departamento de Biologia Vegetal (DBV) e ao grupo cE3c (Centre for Ecology, Evolution and Environmental Changes) da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa por me acolherem e apoiarem o trabalho para o desenvolvimento da minha tese de mestrado.

O meu profundo agradecimento à Professora Doutora Maria Manuela Carolino que supervisionou diretamente o meu trabalho, pela orientação e sabedoria, por me ajudar em todas as etapas, pela amizade, pelo tempo que generosamente dedicou à minha tese, transmitindo-me os melhores e mais úteis ensinamentos e pelo carinho demonstrado todos estes meses.

Ao Doutor Luís Carvalho, pela coorientação, ajuda na resolução de alguns contratempos e pela disponibilidade e partilha de conhecimentos na análise estatística relacionada com este trabalho.

À Professora Doutora Cristina Cruz pelas perguntas oportunas que me permitiram avançar no trabalho.

À Professora Doutora Ana Reis pela simpatia e interesse no meu trabalho, pelas perguntas levantadas que permitiram tirar conclusões.

Às minhas colegas Ana Soares e Paula Paulino, pela amizade e simpatia, por transformarem o laboratório 15 num ambiente divertido para trabalhar e por me animarem em dias mais complicados. À Rita Simões, Raquel Maia e Pedro Silva pela ajuda em algumas tarefas laboratoriais que permitiram a realização e conclusão deste trabalho.

À Herculana Velez, Marta Costa, Teresa Granja e Catarina Gouveia pela ajuda indispensável relacionada com o funcionamento do laboratório.

Queria agradecer em especial aos meus pais por sempre me apoiarem e por todos os esforços feitos para que pudesse prosseguir a minha formação, à minha avó pelos ensinamentos de vida que me fizeram chegar a esta etapa e aos meus tios pelo interesse no meu trabalho e me fazerem pensar no futuro.

Aos meus amigos, principalmente à Andreia, Ricardo, Pedro e Inês por sempre me apoiarem, embora nem sempre percebam o que faço.

Por fim, aos meus afilhados, André e Diogo, por serem a luz dos meus olhos e me fazerem rir em dias mais complicados.

O meu sincero agradecimento a todas as pessoas que contribuíram para a minha formação, que me estimularam emocional e intelectualmente, que me permitiram evoluir como estudante e investigadora ao longo deste trabalho.

Obrigada!

Resumo

Pseudomonas spp. e *Streptomyces* spp. são microrganismos frequentemente encontrados em abundância em solos supressivos. A diversidade e a limitação de nutrientes têm sido sugeridas como possíveis fatores que influenciam o surgimento de fenótipos antagonistas destas bactérias presentes em solos supressivos.

O primeiro objetivo deste trabalho foi estudar o efeito de diferentes fontes de carbono (Glucose, Sacarose, Maltose, Manitol ou Xilose) em três concentrações (1%; 0,4% ou 0,04%) no aparecimento de novos fenótipos em *Streptomyces* sp. e *Pseudomonas* spp. com consequente alteração do perfil de atividade antagonista.

O segundo objetivo foi estudar a dinâmica co-evolutiva num ensaio à escala laboratorial de modo a verificar a influência da co-cultura na alteração de fenótipos de duas espécies.

Utilizaram-se diversas estirpes isoladas de diferentes solos referenciadas como estirpes produtoras de compostos com atividade antimicrobiana (*Pseudomonas fluorescens* CG2013; *P. jessenii* 13 A; *P. kilonensis* 3 A; *P. kilonensis* CAP1; *P. migulae* 13 B; *P. putida* CAP4 e *Streptomyces* sp.).

Foram realizados ensaios de interação entre microrganismos, em meio de cultura sólido com as diferentes fontes de carbono e concentrações. Os resultados foram expressos qualitativamente (inibição, redução ou sem efeito no crescimento) e convertidos quantitativamente de modo a realizar análises estatísticas (ANOVA com um, dois e três fatores).

De um modo geral, verificou-se que tanto a fonte de carbono, como a concentração e a estirpe de bactéria produtora tiveram influência na inibição de estirpes bacterianas e fúngicas, assim como as diferentes interações entre esses três fatores.

Foi realizado um ensaio de co-evolução à escala laboratorial, simulando um microcosmo em mono e em co-cultura, com duas estirpes de *Pseudomonas* (*P. kilonensis* CAP1 e *P. putida* CAP4) em meio de cultura BSM suplementado com Manitol, Xilose ou ambos. Ao longo do tempo foram realizados ensaios de interação entre as estirpes produtoras e estirpes indicadoras.

De uma forma geral, verificou-se que o número de gerações, o inóculo de estirpes produtoras e a interação entre esses fatores influenciaram significativamente a atividade antimicrobiana sobre *B. subtilis*. Os resultados obtidos sugerem que houve influência da dinâmica co-evolutiva na alteração dos fenótipos de *P. kilonensis* CAP1 e *P. putida* CAP4 uma vez que a co-cultura (em manitol e manitol com xilose) após 70 gerações apresentou maior efeito antagonista do que as estirpes em mono cultura.

Palavras-chave: *Streptomyces* spp., *Pseudomonas* spp., Solos supressivos, Interações microbianas, Co-evolução.

Abstract

Pseudomonas spp. and *Streptomyces* spp. are frequently found in high quantities in suppressive soils, and may have a key role in determining their pathogenic suppressive soil characteristics. Diversity and limitation of nutrients have been suggested as possible factors that influence the emergence of antagonist's phenotypes of bacteria in suppressive soils.

The first aim of this work was to study the effect of different carbon sources (Glucose, Saccharose, Maltose, Mannitol or Xylose) in three concentrations (1%; 0.4% or 0.04%) and its contribution to the expression of new phenotypes exhibited by *Streptomyces* sp. and *Pseudomonas* spp. with amendment of antagonist activity profile.

The second aim was to study the co-evolutionary dynamics in a laboratory scale in order to verify the effect of co-culture in changing phenotypes of two species with different antagonist's activities.

We used several strains isolated from agricultural soils referred as producer strains of compounds with antimicrobial activity (*Pseudomonas fluorescens* CG2013; *P. jessenii* 13 A; *P. kilonensis* 3 A; *P. kilonensis* CAP1; *P. migulae* 13 B; *P. putida* CAP4 e *Streptomyces* sp.).

Co-culture interactions were conducted between antimicrobial producer and susceptible strains (bacteria and fungi) in solid culture media with each carbon source at different concentrations. The results were expressed qualitatively (inhibition, reduction or non effect on growth) and quantitatively converted to perform statistical analysis.

In general, it was found that factors such as carbon source, concentration and antimicrobial producer strain have influence on the inhibition of bacterial and fungal strains, as well as the different interactions of these three factors.

The co-evolutionary dynamics in a laboratory scale was conducted simulating a microcosm in mono and co-culture with two strains of *Pseudomonas* (*P. kilonensis* CAP1 e *P. putida* CAP4) in BSM culture medium supplemented with Mannitol, Xylose or both. Over time interactions tests were conducted between the antimicrobial producer and susceptible strains.

In general, it was found that the number of generations, the antimicrobial producer strain and the interaction among these factors significantly influence the antimicrobial activity against *B. subtilis*. The results suggest an influence of the co-evolutionary dynamics in changing *P. kilonensis* CAP1 e *P. putida* CAP4 phenotypes, since that co-culture (in Mannitol and Mannitol with Xylose) after 70 generations had higher antagonistic effect than the strains in mono-culture.

Overall, these results suggest that antagonistic microbial and co-evolution interactions among microorganisms can play an important role in biological control of plant disease in suppressive soils.

Keywords: *Streptomyces* spp., *Pseudomonas* spp., Suppressive soils, Microbial interactions, Co-evolution.

Índice

Agradecimentos	i
Resumo	ii
Abstract	iii
1. Introdução	1
1.1 Rizosfera	
1.2 Solos Supressivos	
1.3 Interações entre microrganismos e Biocontrole	
1.4 Características Gerais de <i>Streptomyces</i> spp. e <i>Pseudomonas</i> spp.	
1.4.1 <i>Streptomyces</i> spp.	
1.4.2 <i>Pseudomonas</i> spp.	
1.5 Objetivos da tese	
2. Materiais e Métodos	6
2.1 Culturas bacterianas	
2.2 Meios de cultura	
2.3 Conservação de culturas	
2.4 Revitalização das culturas	
2.5 Ensaio de interação entre microrganismos	
2.5.1 Interação Bactéria / Bactéria	
2.5.2 Interação Bactéria / Fungo	
2.6 Efeito de fatores abióticos na atividade antagonista	
2.6.1 Influência da fonte de carbono e da limitação de nutrientes na interação entre microrganismos	
2.6.2 Expressão de resultados e análise estatística	
2.7 Perfis de crescimento dos microrganismos	
2.7.1 Efeito da limitação da fonte de carbono nas taxas de crescimento das bactérias produtoras do género <i>Pseudomonas</i> e bactérias indicadoras	
2.7.2 Efeito da limitação da fonte de carbono no crescimento de <i>Streptomyces</i> sp.	
2.7.3 Efeito da limitação da fonte de carbono nas taxas de crescimento dos fungos	
2.8 Ensaio de co-evolução à escala laboratorial	
2.8.1 Estirpes	
2.8.2 Desenho experimental	
2.8.3 Influência da dinâmica co-evolutiva na alteração dos fenótipos de <i>P. kilonensis</i> CAP1 e <i>P. putida</i> CAP4	
2.8.4 Quantificação da atividade antimicrobiana	
2.8.4.1 Obtenção dos extratos extracelulares	
2.8.4.2 Teste de difusão em agar	
2.8.4.3 Curva de calibração de cloranfenicol	
2.8.5 Influência da dinâmica co-evolutiva na viabilidade e permanência de <i>P. kilonensis</i> CAP1 e <i>P. putida</i> CAP4 em co-cultura ao longo do ensaio	

3.Resultados e Discussão.....	14
3.1 Ensaio de interação entre microrganismos	
3.1.1 Interação Bactéria / Bactéria	
3.1.2 Interação Bactéria / Fungo	
3.2 Efeito de fatores abióticos na atividade antagonista	
3.2.1 Influência da fonte de carbono e da limitação de nutrientes no desenvolvimento dos microrganismos	
3.2.2 Influência da fonte de carbono e da limitação de nutrientes na interação Bactéria / Bactérias Gram Positivas	
3.2.3 Influência da fonte de carbono e da limitação de nutrientes na interação Bactéria / Bactérias Gram Negativas	
3.2.4 Influência da fonte de carbono e da limitação de nutrientes na interação Bactéria / Fungos	
3.3 Perfis de crescimento dos microrganismos	
3.3.1 Efeito da limitação da fonte de carbono nas taxas de crescimento das bactérias produtoras do género <i>Pseudomonas</i>	
3.3.2 Efeito da limitação da fonte de carbono no crescimento de <i>Streptomyces</i> sp.	
3.3.3 Efeito da limitação da fonte de carbono nas taxas de crescimento das bactérias indicadoras	
3.3.4 Efeito da limitação da fonte de carbono nas taxas de crescimento dos fungos	
3.4 Ensaio de co-evolução à escala laboratorial	
3.4.1 Influência da dinâmica co-evolutiva na alteração dos fenótipos de <i>P. kilonensis</i> CAP1 e <i>P. putida</i> CAP4	
3.4.2 Influência da dinâmica co-evolutiva na viabilidade e permanência de <i>P. kilonensis</i> CAP1 e <i>P. putida</i> CAP4 em co-cultura ao longo do ensaio	
4. Conclusão.....	39
5. Referências Bibliográficas.....	41
Anexos.....	44

1. Introdução

Com o aumento da população humana, a produção de alimentos em larga escala tornou-se essencial para suprimir as necessidades nutricionais. No entanto a produtividade agrícola tem sido severamente condicionada por microrganismos patogênicos que podem causar doenças nas plantas e muitas perdas com consequentes custos. Para os combater são utilizados pesticidas químicos que por sua vez causam poluição e diminuição da diversidade de organismos benéficos (Khamna *et al.*,2009).

Cada vez mais se torna importante utilizar tecnologias que não provoquem danos no ambiente e no Homem. Deste modo, tem-se recorrido ao uso de microrganismos benéficos e respetivos produtos do metabolismo para conferir proteção às plantas contra as doenças infecciosas causadas por numerosas bactérias, fungos ou vírus (Rakesh *et al.*,2013).

Assim, os microrganismos que controlam o crescimento de organismos patogênicos podem substituir o uso de químicos na agricultura, podendo recorrer-se à sua aplicação ou mesmo utilizar-se enzimas ou produtos metabólicos por si produzidos em vez de se utilizar o microrganismo completo (Scherlach *et al.*,2013).

1.1 Rizosfera

A rizosfera é a região do solo que está sob a influência das raízes das plantas. É um ambiente complexo, com uma imensa diversidade microbiana (Lima,S.,2013), onde se podem encontrar inúmeras interações, quer positivas quer negativas, entre as raízes e os microrganismos que lhes estão associados (Philippot *et al.*,2013). As interações positivas com microrganismos são benéficas ao crescimento e desenvolvimento das plantas, enquanto as interações negativas com microrganismos patogênicos podem prejudicar o desenvolvimento da planta.

As raízes das plantas determinam a natureza e abundância da microbiota rizosférica no solo e quando as condições afetam o crescimento das raízes ou o seu metabolismo, essa situação será refletida nas populações microbianas na rizosfera (Rakesh *et al.*,2013). Os microrganismos geralmente preferem colonizar a rizosfera uma vez que os exsudatos das raízes são a maior fonte de nutrientes nos solos, tornando a rizosfera numa área de intensa atividade (Rakesh *et al.*,2013). São as plantas que determinam a disponibilidade de nutrientes no solo uma vez que as raízes podem libertar açúcares, iões, vitaminas e aminoácidos para o solo, que posteriormente serão utilizados pelos microrganismos (Coelho *et al.*,2007). Os compostos libertados pelas raízes das plantas podem influenciar o tamanho da população microbiana, a sua composição e função ecológica, que se pode refletir numa maior ou menor inibição de organismos patogênicos (Schalatter *et al.*,2009).

1.2 Solos Supressivos

Segundo (Baker & Cook,1974) a designação de solo supressivo não significa necessariamente a eliminação do patogénio do solo, mas a ausência ou a supressão da doença nos casos em que plantas suscetíveis sejam cultivadas nesse solo. Assim, o solo supressivo será aquele que apresenta inospitalidade a alguns fitopatogénios.

A supressividade é detetada através de uma menor população de patogénios ou menor incidência da doença em relação a um outro solo, opostamente designado de solo condutivo ((Hornby,D.,1983) (Corrêa *et al.*,2000)). Num extremo, está o solo supressivo no qual a planta resiste completamente à presença do patogénio e no extremo oposto está o solo condutivo, no qual a planta é afetada muito rapidamente ao ser exposta ao patogénio (Mendes *et al.*,2011).

Os solos supressivos são locais naturalmente particulares pois apesar de nesses solos os agentes patogénicos estarem presentes, causam poucos danos nas plantas (Mendes *et al.*,2011). Segundo (Mendes *et al.*,2011) há estudos que sugerem que sob um ataque de patogénios, as plantas para se protegerem contra as infeções, recrutam uma combinação de microrganismos específicos presentes nesses solos, que lhes fornecem a proteção necessária.

De acordo com (Mendes *et al.*,2011) à medida que são infetadas, as plantas expostas aos patogénios do solo sofrem uma pressão seletiva para recrutar as bactérias necessárias para a sua proteção. O solo é considerado supressivo quando essa comunidade de bactérias é de tal forma selecionada, que mesmo na presença do patogénio, a planta não é infetada.

O aumento da supressão das doenças em plantas pode estar relacionado com o enriquecimento de atividades antagonistas ou competitivas de um ou mais componentes da comunidade microbiana do solo (Kinkel *et al.*,2011). Para (Kinkel *et al.*,2011), a eficácia de um solo supressivo, depende de diversos fatores como a planta hospedeira, o tipo de solo e o ambiente físico, de modo a que as interações microbianas sejam favorecidas.

Também há estudos que sugerem que o sucesso na supressividade de doenças pode estar relacionado com as características iniciais das comunidades microbianas presentes nesses solos, através das interações entre espécies, do aparecimento de fenótipos antagonistas e da utilização de nutrientes que medeiam essas interações (Kinkel *et al.*,2012).

1.3 Interações entre microrganismos e Biocontrolo

Os microrganismos são ubíquos colonizando quase todos os nichos ecológicos. Devido à sua abundância, diferentes espécies co-habitam em certos habitats e interagem entre si (Scherlach *et al.*,2013). Nessas comunidades de microrganismos há produção de metabolitos secundários relacionados com a inibição ou estimulação do crescimento, em resposta à competição por nutrientes ou defesa, que regulam a coexistência e sobrevivência de diferentes espécies ((Scherlach *et al.*,2013) (Bertrand *et al.*,2014)).

Uma alternativa para o controlo químico de patógenos do solo é o controlo biológico que pode ser obtido pela manipulação do ambiente e pela introdução de antagonistas, tanto no solo como nos órgãos de propagação das plantas. Os microrganismos selecionados no mesmo ambiente onde serão utilizados têm mais hipóteses de se adaptarem e serem eficientes, sendo designados como microrganismos residentes (Lazarotto *et al.*,2009).

A manipulação do ambiente, através das alterações nas composições do solo, tem sido utilizada como meio para alterar as comunidades microbianas desse solo, de modo a fomentar plantas saudáveis (Schalatter *et al.*,2009). Alguns estudos revelaram que a qualidade e quantidade dos recursos disponíveis no solo têm influência na dimensão e composição das comunidades microbianas presentes nesse mesmo solo (Schalatter *et al.*,2009). Segundo (Hol *et al.*,2013), as condições abióticas como o pH do solo, a temperatura e a humidade também são fatores que influenciam a composição das comunidades no solo.

A introdução de antagonistas, como por exemplo estirpes de *Streptomyces* e de *Pseudomonas*, tem sido descrita como responsável pela supressão de doenças em plantas, devido à produção de compostos antimicrobianos ou à competição por nutrientes e nichos ecológicos (Lugtenberg & Kamilova,2009), estando ambas as estratégias influenciadas pela disponibilidade de nutrientes no solo ((Schalatter *et al.*,2009) (Nagarajkumar *et al.*,2004)).

A produção de compostos com atividade antimicrobiana no solo sugere que o processo ocorre em locais onde, tal como na rizosfera, a concentração de nutrientes e a competição é intensa. A produção desses compostos tem sido associada à diferenciação morfológica celular (produção de esporos) ou à limitação de nutrientes (Dantas *et al.*,2009).

O controlo biológico de doenças em plantas utilizando bactérias antagonistas é uma alternativa aos controlos químicos, que são dispendiosos e podem resultar na acumulação de compostos tóxicos nas comunidades do solo (Ghai *et al.*,2007).

1.4 Características Gerais de *Streptomyces* spp. e *Pseudomonas* spp.

Segundo (Alam *et al.*,2012) os solos ricos em *Streptomyces* spp. potenciam o desenvolvimento das plantas e inibem o crescimento de patógenos ao mesmo tempo que estirpes de *Pseudomonas* apresentam a capacidade de controlar o desenvolvimento de agentes patogénicos no solo (Weller,D.,2007).

Elevadas densidades de *Streptomyces* spp. e *Pseudomonas* spp. estão frequentemente associadas aos solos supressivos (Mendes *et al.*,2011). Os fenótipos antagonistas que podem contribuir para a supressividade incluem a produção de antibióticos, a presença de sideróforos e a produção de enzimas extracelulares (Kinkel *et al.*,2011).

1.4.1 *Streptomyces* spp.

As bactérias do género *Streptomyces* são caracterizadas como sendo bactérias Gram positivas, aeróbias e filamentosas, as colónias apresentam micélio aéreo, possuem pigmentos de diversas colorações resultantes do metabolismo secundário e produzem um odor característico a terra molhada devido à produção de geosminas (compostos voláteis) ((Lima,S.,2013) (Azuma,M.,2011)).

Em relação à micromorfologia, podem-se observar longas hifas ramificadas com filamentos que podem ser retos ou ondulados e a taxa de crescimento é considerada rápida a moderada, variando entre 4 a 10 dias (Azuma,M.,2011). São também responsáveis pela decomposição aeróbia de substratos orgânicos no solo, processo designado de biodegradação (Lima,S.,2013). Algumas espécies de *Streptomyces* podem produzir enzimas hidrolíticas extracelulares que lhes permite degradar polissacarídeos, proteínas e gorduras (Madigan *et al.*,2012).

Mais de 50% das espécies de *Streptomyces* são produtoras de antibióticos, sendo a produção caracterizada pela formação de um halo de inibição em ensaios de interação com uma estirpe sensível. O autor (Azuma,M.,2011) refere que a produção de antibióticos está relacionada com o processo de esporulação, podendo ser um mecanismo para inibir o crescimento de outros organismos competidores pelos nutrientes limitantes. Segundo os mesmos autores este processo permite que *Streptomyces* sp. complete o processo de esporulação e a formação de estruturas resistentes que aumentam a hipótese de sobrevivência. De todos os metabolitos microbianos bioativos descobertos, 45% são produzidos por estirpes de *Streptomyces* (Subathra *et al.*,2013).

A maioria dos metabolitos secundários extracelulares produzidos por *Streptomyces* sp. são utilizados como antibióticos, antifúngicos, agentes anticancerígenos, antivirais, antioxidantes, anti-inflamatórios, antiparasitários e inseticidas ((Lima,S.,2013) (George *et al.*,2012)).

Segundo (Kinkel *et al.*,2012), elevadas densidades de *Streptomyces* spp. com atividade antagonista estão associadas à supressão de doenças de plantas em muitos solos. Estudos sugerem que estirpes de *Streptomyces* têm uma vasta distribuição, estando associadas às raízes das plantas, devido à libertação de matéria orgânica nos exsudatos das plantas (Khamna *et al.*,2009). De acordo com (Khamna *et al.*,2009), os exsudatos das plantas promovem o crescimento de estirpes de *Streptomyces*, sendo que os compostos antimicrobianos produzidos por essas estirpes diminuem o número de microrganismos patogénicos presentes nos solos, promovendo assim a supressão de doenças de plantas.

1.4.2 *Pseudomonas* spp.

As bactérias do género *Pseudomonas* têm a forma de bastonetes pequenos, retos ou ligeiramente curvados, são Gram negativas e quimioorganotróficas, com flagelo polar e sem capacidade de produzir endósporos. A temperatura ótima de crescimento é entre 20-25°C e a temperatura máxima abaixo dos 55°C, tendo um tempo de incubação de 48 a 72h. O seu metabolismo é aeróbio obrigatório e são oxidase e catalase positivas. Algumas espécies produzem um pigmento fluorescente designado piocianina (Madigan *et al.*,2012).

Pseudomonas spp. apresentam grande versatilidade metabólica, podendo utilizar diversos compostos orgânicos embora segundo (Madigan *et al.*,2012) sejam pobres em enzimas extracelulares.

São ecologicamente importantes no solo e na água por serem capazes de degradar compostos de baixo peso molecular de origem vegetal ou animal. Também catabolizam xenobióticos, como pesticidas e químicos tóxicos, sendo por isso considerados agentes de biorremediação do ambiente (Madigan *et al.*,2012).

Pseudomonas fluorescens e *Pseudomonas putida* produzem um pigmento fluorescente em meio B-King (King *et al.*,1954) sob luz ultravioleta, e podem ser encontradas tanto na água como no solo.

Foi descrito em estudos anteriores, que algumas estirpes de *Pseudomonas* produziam quitinases, sideróforos, ácido cianídrico entre outros compostos, capazes de atuar contra bactérias e fungos patogénicos ((Nagarajkumar *et al.*,2004) (Jousset *et al.*,2006)). Também foi descrito que *Pseudomonas fluorescens* produz compostos com atividade antimicrobiana resistentes à degradação enzimática, que atuam contra alguns fungos (Scherlach *et al.*,2013), estando relacionada a sua presença em solos com a supressividade registada a determinados organismos patogénicos nesses mesmos solos (Ramette *et al.*,2003).

Na Natureza é normal as bactérias encontrarem imensos competidores ao mesmo tempo e por isso a produção de um composto com atividade antimicrobiana de largo espectro pode ser uma estratégia benéfica para abranger diversos alvos (Garbeva *et al.*,2011). A observação de que a produção desses compostos apenas é ativada durante as interações interespecíficas sugere uma estratégia de custo, em que o composto antimicrobiano apenas é produzido quando necessário, ou uma estratégia para evitar a adaptação dos competidores ao composto (Garbeva *et al.*,2011).

1.5 Objetivos da tese

Como foi referido, elevadas densidades de *Streptomyces* sp. e de *Pseudomonas* sp. estão associadas a solos agrícolas supressivos. Para (Bertrand *et al.*,2014) a produção de

metabolitos secundários pelos microrganismos está fortemente relacionada com fatores ambientais, quer nas condições de crescimento requeridas pelas estirpes como no stress abiótico e biótico. Apesar de estarem descritas várias estratégias para alterar as populações microbianas de modo a promover a supressão de doenças, pouco se tem avançado na compreensão dos mecanismos que levam ao aumento das relações antagonistas relacionadas com fatores abióticos do solo.

Os autores (Jousset *et al.*,2006) referem que a produção dos compostos envolvidos na supressão de doenças é influenciada pela disponibilidade de nutrientes, assim como moléculas sinalizadoras provenientes de bactérias, fungos e plantas. Os metabolitos antagonistas podem ter um largo espectro de ação na natureza (Sharma &Kaur, 2010).

Para (Schalatter *et al.*,2009) é necessário utilizar uma fonte de carbono, purificada e em quantidades conhecidas de modo a se conhecer a especificidade por nutrientes ou as quantidades necessárias para alterar os fenótipos microbianos de modo a favorecer a supressão de microrganismos patogénicos de plantas, assim como para entender os potenciais efeitos na evolução das comunidades presentes nos diferentes solos.

Sendo assim, os principais objetivos deste trabalho foram:

1. Estudar o efeito de fatores abióticos no aparecimento de novos fenótipos em *Streptomyces* sp. e *Pseudomonas* spp. com conseqüente alteração do perfil de atividade antagonista. Os fatores estudados foram diferentes fontes de carbono (Glucose, Sacarose, Maltose, Manitol ou Xilose) em três concentrações distintas (1%; 0,4% ou 0,04%).
2. Estudar a dinâmica co-evolutiva na alteração de fenótipos dos microrganismos em mono e em co-cultura de modo a verificar a influência da co-cultura na interação entre espécies.

2. Materiais e Métodos

2.1 Culturas bacterianas

Foram utilizadas sete estirpes referenciadas como produtoras de compostos com atividade antagonista (Cerqueira,F.,2013), estando as identificações e correspondentes designações utilizadas ao longo do trabalho referidas na Tabela 1.

Tabela 1: Estirpes produtoras utilizadas, respetiva designação e origem de onde foram isoladas.

Estirpe (Coleção FCUL/cE3c)	Designação	Origem
<i>Pseudomonas fluorescens</i> 20130311XA1	<i>P. fluorescens</i> CG2013	Solo de jardim
<i>Pseudomonas jessenii</i> SR3	<i>P. jessenii</i> 13 A	Solo de cultura de milho
<i>Pseudomonas kilonensis</i> KUDC1801	<i>P. kilonensis</i> 3 A	Solo de cultura de milho

<i>Pseudomonas kilonensis</i> KU1801	<i>P. kilonensis</i> CAP1	Solo de cultura de ananás
<i>Pseudomonas migulae</i> GGRJ17	<i>P. migulae</i> 13 B	Solo de cultura de milho
<i>Pseudomonas putida</i> X236	<i>P. putida</i> CAP4	Solo de cultura de ananás
<i>Streptomyces</i> sp.	<i>Streptomyces</i> sp.	Solo de cultura de ananás

Foram considerados microrganismos indicadores aqueles que foram sujeitos aos ensaios de interação com as estirpes produtoras. Ao longo deste trabalho foram utilizadas para testar o efeito da atividade antagonista, seis estirpes de bactérias indicadoras e sete estirpes de fungos, referidos na Tabela 2.

Tabela 2: Estirpes indicadoras utilizadas e respetiva designação.

Estirpe (Coleção FCUL/cE3c)	Designação	Estirpe (Coleção FCUL/cE3c)	Designação
Bactérias		Fungos	
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> EU88	<i>A. calcoaceticus</i>	<i>Alternaria</i> sp.	<i>Alternaria</i> sp.
<i>Bacillus megaterium</i> AMC	<i>B. megaterium</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	<i>B. cinerea</i>
<i>Bacillus subtilis</i> 168	<i>B. subtilis</i>	<i>Cladosporium</i> sp.	<i>Cladosporium</i> sp.
<i>Burkholderia cepacia</i> BSF-SO10	<i>B. cepacia</i>	<i>Fusarium culmorum</i>	<i>F. culmorum</i>
<i>Escherichia coli</i> K12	<i>E. coli</i>	<i>Geotrichum candidum</i>	<i>G. candidum</i>
<i>Micrococcus luteus</i>	<i>M. luteus</i>	<i>Pestalotia</i> sp.	<i>Pestalotia</i> sp.
		<i>Phoma</i> sp.	<i>Phoma</i> sp.

2.2 Meios de cultura

A composição dos meios de cultura utilizados no decorrer do trabalho encontra-se no anexo A.

2.3 Conservação de culturas

As culturas bacterianas foram crescidas em 10 mL de meio Nutrient Broth (NB), durante 5 dias, a 28°C e com agitação de 160rpm sendo posteriormente conservadas em glicerol a uma concentração final de 20% e guardadas a -20°C e -80°C (Shepherd *et al.*,2010). As culturas fúngicas foram mantidas a 4°C, em meio Potato Dextrose Agar (PDA).

2.4 Revitalização das culturas

Streptomyces sp. foi revitalizada em meio Maltose Yeast extract Malt extract (MYM), com incubação a 28°C durante 14 dias. As restantes estirpes bacterianas foram revitalizadas em meio Nutrient Agar (NB com adição de agar (NA)), com incubação a 28°C durante 2 dias. Os fungos foram inoculados em meio PDA, incubados a 28°C durante 10 dias.

2.5 Ensaios de interação entre microrganismos

Foram realizados ensaios preliminares de modo a comprovar a atividade antagonista das bactérias produtoras.

2.5.1 Interação Bactéria / Bactéria

Cada estirpe de bactéria produtora teve uma incubação prévia de 2 dias a 28°C em meio NA ou em meio International *Streptomyces* Project (ISP-2) de modo a permitir o seu crescimento e desenvolvimento da capacidade antagonista. Após essa incubação, inoculou-se na mesma caixa de Petri as bactérias indicadoras de forma perpendicular, como exemplificado na Figura 1. Foram realizadas todas as combinações possíveis entre as diferentes estirpes microbianas produtoras e indicadoras e efetuadas 3 réplicas de cada situação. A incubação conjunta decorreu a 28°C durante 48 horas.

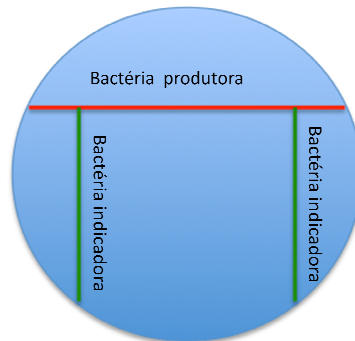


Figura 1: Ilustração do padrão de inoculação das interações bactéria/ bactéria em meio sólido (a vermelho a bactéria produtora e a verde as bactérias indicadoras).

2.5.2 Interação Bactéria / Fungo

Como o crescimento dos fungos foi mais lento do que o das bactérias, a inoculação em caixa de Petri não foi simultânea, por isso, foi inoculado um disco de micélio do fungo (de 6mm) no centro da caixa de Petri, em meio Yeast Extract Peptone Glucose Agar (YEPGA) e após dois dias a 28°C, procedeu-se à inoculação das bactérias. Em cada setor foi inoculada uma estirpe produtora diferente, como indicado na Figura 2, sendo que como controlo um dos setores não foi inoculado. Foram realizadas todas as combinações possíveis entre as diferentes estirpes microbianas e efetuadas 3 réplicas de cada situação. A incubação conjunta ocorreu durante 3-5 dias a 28°C.

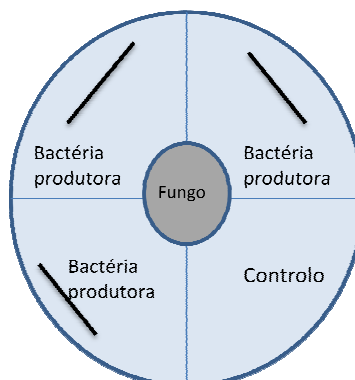


Figura 2: Ilustração do padrão de inoculação das interações bactéria/ fungo em meio sólido (no centro, o fungo e em cada setor uma bactéria produtora diferente).

Foi realizado um controlo do crescimento em YEPGA de modo a avaliar as características macroscópicas dos microrganismos nesse meio, pelo que todos os

microrganismos estudados foram inoculados e incubados a 28°C durante 2 dias (bactérias) ou 10 dias (fungos).

2.6 Efeito de fatores abióticos na atividade antagonista

2.6.1 Influência da fonte de carbono e da limitação de nutrientes na interação entre microrganismos

Neste ensaio foi utilizado o meio Basal (BSM) suplementado com 1%; 0,4% ou 0,04% de cada uma das seguintes fontes de carbono: Glucose, Sacarose, Manitol, Maltose ou Xilose.

O procedimento de inoculação das bactérias produtoras e dos microrganismos indicadores (bactérias e fungos) foi semelhante aos ensaios descritos em 2.5.1 e 2.5.2. Foram realizadas todas as combinações entre as diferentes estirpes e efetuadas 3 réplicas de cada situação.

Foi realizado um controlo em que as culturas bacterianas e fúngicas foram inoculadas em meio BSM sem a fonte de carbono, para poder garantir que o crescimento foi devido à utilização da fonte de carbono e não ao extrato de levedura que fez parte da composição do meio de cultura.

2.6.2 Expressão de resultados e análise estatística

Os resultados de **interação entre microrganismos** foram expressos **qualitativamente**, seguindo os seguintes critérios adaptados de (Bertrand *et al.*,2014):

Nos ensaios de interação Bactéria / Bactéria os resultados foram organizados em três classes: interação **sem efeito no crescimento**, quando não houve alterações no crescimento da bactéria indicadora, crescendo esta ao longo da linha de inoculação e junto à bactéria produtora; interação com **redução do crescimento** quando a bactéria indicadora apresentou uma diminuição do crescimento (menor densidade celular) junto ao crescimento da bactéria produtora e interação com **inibição do crescimento** quando houve ausência total do crescimento da bactéria indicadora na zona de contacto desta com a bactéria produtora.

Nos ensaios de interação Bactéria / Fungo os resultados foram organizados em quatro classes: interação **sem efeito no crescimento** quando não houve alteração no crescimento do fungo, desenvolvendo-se este por cima do crescimento da bactéria produtora; interação com **ligeira redução do crescimento** “Zone line” quando o fungo não se desenvolveu por cima do crescimento da bactéria produtora e apresentou menos micélio aéreo; interação com **redução do crescimento** “Contact inhibition” quando o fungo não cresceu na zona de contacto do crescimento da bactéria produtora e não desenvolveu esporos nem micélio aéreo e interação com **inibição do crescimento** “Distance inhibition” quando se obteve ausência total de crescimento do fungo.

Os resultados qualitativos obtidos nos ensaios de interação entre microrganismos para estudar a influência da fonte de carbono e respectiva concentração, foram convertidos em dados quantitativos de acordo com a Tabela 3.

Tabela 3: Ponderação das classes qualitativas em classes quantitativas nos ensaios de interação entre microrganismos.

Classe qualitativa	Classe quantitativa atribuída
Interação Bactéria /Bactéria	
Inibição do crescimento	2
Redução do crescimento	1
Sem efeito no crescimento	0
Interação Bactéria /Fungo	
Inibição do crescimento	3
Redução do crescimento	2
Ligeira redução do crescimento	1
Sem efeito no crescimento	0

Aplicou-se a seguinte equação a todas as réplicas, obtendo-se um valor de frequência de inibição:

$$\sum_{k=1} \frac{F_k * X_k}{N * k} \quad \text{Equação 1}$$

Legenda da equação 1: F_k : Número de estirpes indicadoras; X_k : Classe quantitativa atribuída; N : Número total de estirpes indicadoras estudadas; k : Número total de classes quantitativas atribuídas.

Com os valores de frequência de inibição, utilizando o programa SPSS versão 20, efetuaram-se análises de ANOVA com um, dois ou três fatores e teste posterior (teste de Tukey com $p < 0,05$), de modo a averiguar quais os fatores (fonte de carbono, concentração e estirpe produtora) que influenciaram mais a atividade antagonista.

2.7 Perfis de crescimento dos microrganismos

A fonte de carbono pode influenciar o crescimento dos microrganismos e a atividade antagonista, assim como a sua limitação pode influenciar a taxa de crescimento, indicando que o crescimento pode ser limitado pela fonte de carbono no meio (Garbeva & Boer, 2009).

2.7.1 Efeito da limitação da fonte de carbono nas taxas de crescimento das bactérias produtoras do género *Pseudomonas* e bactérias indicadoras

O efeito da limitação da fonte de carbono no crescimento das bactérias foi realizado em microplacas de 96 poços para as bactérias produtoras pertencentes ao género *Pseudomonas* e para as bactérias indicadoras.

Cada cultura bacteriana teve um pré-inóculo em 5 mL de meio NB, com incubação a 28°C e agitação de 160rpm durante 12 horas. Posteriormente procedeu-se à diluição do inóculo em soro até se obter uma absorvência de 0,1 (correspondente a 0,5 na escala de McFarland).

Em cada poço da microplaca foram adicionados 190 µL de meio BSM suplementado com a fonte de carbono e concentração respectiva em estudo e inoculados 10 µL de cada

estirpe, tendo cada uma seis réplicas. Nos poços considerados controlo foram adicionados 200 µL do meio em estudo. A incubação decorreu a 28°C com agitação de 160rpm durante 24 horas. As leituras de absorvência foram realizadas a 600nm (Tecan Spectra Rainbow) de 2 em 2 horas até às 24 horas.

No tratamento de resultados, traçou-se um gráfico de absorvência em função do tempo, a partir do qual se determinaram e compararam as taxas específicas de crescimento (μ ; Unidades de Absorvência h^{-1}) das estirpes bacterianas obtidas nos diferentes meios de cultura, de acordo com a equação 2:

$$\ln (\text{Abs}) = \mu.t + \ln (\text{Abs} (0)) \quad \text{Equação 2}$$

2.7.2 Efeito da limitação da fonte de carbono no crescimento de *Streptomyces* sp.

Dadas as características morfológicas de *Streptomyces* sp., o efeito da fonte de carbono e da concentração no seu crescimento foi realizado estimando o número de colónias após crescimento nas diferentes modalidades em estudo.

O ensaio foi realizado em balão de *Erlenmeyer* com 10 mL do meio BSM suplementado com cada fonte de carbono e respetiva concentração e inoculação com ansa calibrada (10 µL) a partir de uma cultura pré-crescida de *Streptomyces* sp. A incubação decorreu a 28°C, com agitação de 160rpm durante 7 dias.

Ao fim de 7 dias realizaram-se diluições seriadas até 10^{-6} , sendo inoculado 100 µL de cada diluição em meio ISP-2. Foram inoculadas 3 réplicas de cada diluição e a incubação decorreu a 28°C durante 5 dias.

No tratamento de resultados calculou-se e comparou-se o número de colónias por mililitro (CFU/mL), obtido nos diferentes meios de cultura, de acordo com a equação 3:

$$\text{CFU/mL} = \text{Número de colónias} * \frac{1}{\text{Inóculo}} * \frac{1}{\text{Diluição}} \quad \text{Equação 3}$$

2.7.3 Efeito da limitação da fonte de carbono nas taxas de crescimento dos fungos

O efeito da limitação da fonte de carbono no crescimento dos fungos foi realizado em caixa de Petri contendo meio BSM suplementado com cada fonte de carbono e concentração respetiva, onde foram inoculados todos os fungos em estudo com um disco de micélio (de 6mm) no centro da caixa de Petri. Foram realizadas 3 réplicas de cada situação com incubação a 28°C durante 4-10 dias, de modo a registar-se a expansão linear do micélio ao longo do tempo.

No tratamento de resultados, traçou-se um gráfico de expansão linear do micélio em função do tempo, a partir do qual se determinaram e compararam as taxas específicas de

crescimento (μ) das estirpes fúngicas obtidas nas diferentes modalidades de meios de cultura, de acordo com a equação 4:

$$\text{Expansão linear do micélio} = \mu \cdot t \quad \text{Equação 4}$$

2.8 Ensaio de co-evolução à escala laboratorial

Foi efetuado um ensaio por adaptação do método descrito em (Lawrence *et al.*,2012) de forma a estudar a influência da fonte de carbono e do número de gerações na co-evolução estabelecida entre duas populações com atividades antagonistas provenientes do mesmo solo (solo de cultura de ananás).

2.8.1 Estirpes

As duas estirpes selecionadas foram *P. kilonensis* CAP1 e *P. putida* CAP4.

2.8.2 Desenho experimental

Foi montado um ensaio simulando um microcosmo (estirpes em mono-cultura e em co-cultura em meio de cultura (BSM) suplementado com distintas fontes de carbono (Manitol ou Xilose)) cuja composição está resumida na Tabela 4.

Tabela 4: Composição do ensaio de co-evolução, simulando um microcosmo

Estirpe Meio BSM	Mono-cultura	Mono-cultura	Co-cultura
Manitol 0,04%	<i>P. kilonensis</i> CAP1	<i>P. putida</i> CAP4	<i>P. kilonensis</i> CAP1 <i>P. putida</i> CAP4
Xilose 0,04%	<i>P. kilonensis</i> CAP1	<i>P. putida</i> CAP4	<i>P. kilonensis</i> CAP1 <i>P. putida</i> CAP4
Manitol 0,02% com Xilose 0,02%	<i>P. kilonensis</i> CAP1	<i>P. putida</i> CAP4	<i>P. kilonensis</i> CAP1 <i>P. putida</i> CAP4

Foram efetuadas 5 réplicas de cada microcosmo, a incubação decorreu a 28°C com agitação de 160rpm. A cada 48 horas realizaram-se transferências de inóculos, em que 1 mL do microcosmo foi transferido para 9 mL de meio fresco. Foram efetuadas 15 passagens consecutivas o que correspondeu a aproximadamente 70 gerações (de acordo com o descrito em (Lawrence *et al.*,2012).

2.8.3 Influência da dinâmica co-evolutiva na alteração dos fenótipos de *P. kilonensis* CAP1 e *P. putida* CAP4

Este ensaio teve como objetivo verificar se após sucessivas gerações, as duas populações de *P. kilonensis* CAP1 e *P. putida* CAP4 alteravam o fenótipo, ou seja, se alteravam a atividade antagonista.

Para tal as estirpes bacterianas *P. kilonensis* CAP1 e *P. putida* CAP4 foram inoculadas de forma semelhante ao descrito em 2.5.1. Retirou-se uma ansa calibrada (10 μ L) da estirpe produtora de cada microcosmo e inoculou-se em caixas de Petri contendo o respetivo meio de cultura agarizado. A incubação decorreu a 28°C durante 48 horas. De uma forma

perpendicular, inocularam-se duas estirpes indicadoras (*E. coli* e *B. subtilis*), seguida de incubação a 28°C, durante 48 horas.

Os resultados foram expressos qualitativamente (de acordo com o ponto 2.6.2), sendo posteriormente convertidos para permitir uma análise estatística quantitativa.

Com os valores de frequência de inibição (obtidos utilizando a equação 1 do ponto 2.6.2), utilizando o programa SPSS versão 20, efetuaram-se análises de ANOVA de medidas repetidas, para avaliar o efeito do número de gerações, da fonte de carbono, inóculo de estirpes produtoras e da interação entre esses fatores na evolução da atividade antagonista.

De seguida, foram efetuadas análises de ANOVA com um fator (e teste posterior – teste de Tukey com $p < 0,05$) para cada fonte de carbono e separadamente para cada tratamento de estirpes produtoras de modo a averiguar se o número de gerações influenciava a atividade antagonista.

Para comparar a alteração do fenótipo das estirpes bacterianas entre o início e o final do ensaio de co-evolução, comparou-se a atividade antagonista contra as estirpes indicadoras, utilizando o Teste T de Student.

2.8.4 Quantificação da atividade antimicrobiana

A quantificação de atividade antimicrobiana de *P. kilonensis* CAP1 e *P. putida* CAP4 foi avaliada a partir do respetivo crescimento em meio líquido e pela aplicação dos correspondentes extratos extracelulares sobre *B. subtilis* utilizando o teste de difusão em agar (Bauer *et al.*, 1966).

2.8.4.1 Obtenção dos extratos extracelulares

A obtenção dos extratos extracelulares de *P. kilonensis* CAP1 e *P. putida* CAP4 foi realizada por centrifugação de 5 mL de cada microcosmo (Tabela 4) e das respetivas réplicas (3000rpm durante 15 minutos), seguida de uma filtração (filtros 0,45µm - Minisart).

2.8.4.2 Teste de difusão em agar

A atividade antimicrobiana dos extratos extracelulares de *P. kilonensis* CAP1 e *P. putida* CAP4 foi avaliada pelo teste de difusão em agar de acordo com (Bauer *et al.*, 1966) utilizando como referência positiva o antibiótico cloranfenicol.

Inoculou-se a estirpe indicadora *B. subtilis* por espalhamento uniforme em caixas de Petri contendo meio Mullër Hinton Agar (MHA) e colocou-se discos de papel de filtro 3MM com 10 µL de cada extrato extracelular. Foi usado como referência positiva 10 µL de cloranfenicol a uma concentração de 75 µg/mL. Incubaram-se as caixas de Petri a 28°C, durante 24 horas e registou-se os resultados.

2.8.4.3 Curva de calibração de cloranfenicol

Para determinar a sensibilidade do método e extrapolar a concentração de metabolitos produzidos por *P. kilonensis* CAP1 e *P. putida* CAP4 foi estabelecida uma regressão linear

entre diferentes concentrações de antibiótico e respectivos diâmetros dos halos de inibição da estirpe indicadora *B. subtilis*.

B. subtilis foi inoculado por espalhamento uniforme em caixas de Petri com meio MHA, posteriormente foram colocados discos de papel de filtro 3MM com 10 µL de cada concentração de cloranfenicol (10, 15, 30, 40, 50, 60, 75 e 100 µg/mL). Realizaram-se 3 réplicas de cada concentração e a incubação decorreu a 28°C durante 24 horas.

2.8.5 Influência da dinâmica co-evolutiva na viabilidade e permanência de *P. kilonensis* CAP1 e *P. putida* CAP4 em co-cultura ao longo do ensaio

Semanalmente e com o objetivo de testar a viabilidade e a permanência de *P. kilonensis* CAP1 e *P. putida* CAP4 retirou-se de cada microcosmo e das respectivas réplicas 10 µL e inoculou-se por espalhamento em caixas de Petri contendo meio B-King. A incubação decorreu a 28°C durante 48 horas.

Após esse tempo de incubação, observou-se a emissão de fluorescência sob luz UV uma vez que *P. kilonensis* CAP1 não emite fluorescência e *P. putida* CAP4 emite fluorescência (Madigan *et al.*,2012), sendo assim possível distinguir e confirmar a viabilidade e a permanência das duas populações ao longo do ensaio.

3. Resultados e Discussão

3.1 Ensaios de interação entre microrganismos

3.1.1 Interação Bactéria / Bactéria

De uma forma geral, em meio ISP-2, todas as bactérias indicadoras foram suscetíveis à atividade antagonista de uma ou mais das sete estirpes bacterianas em estudo. Registaram-se 13 inibições num total de 42 casos possíveis (31%) e 5 reduções do crescimento (12%) das estirpes bacterianas indicadoras, no entanto *P. kilonensis* CAP1 não alterou o crescimento de nenhuma bactéria indicadora, enquanto as restantes estirpes produtoras testadas alteraram o crescimento de uma ou mais bactérias indicadoras.

Em meio NA, a atividade antagonista das estirpes denominadas produtoras não promoveu qualquer alteração do crescimento das estirpes indicadoras.

A ausência de atividade antagonista pelas estirpes produtoras em meio NA pode dever-se a este ser um meio rico em fontes de carbono, provenientes do extrato de carne e como tal não favoreceu a competição por nutrientes em interações entre estirpes bacterianas produtoras e indicadoras, já o meio ISP-2 tem sido descrito como um meio ideal para a produção de metabolitos extracelulares antimicrobianos por parte de *Streptomyces* sp. (Cunha *et al.*,2009) e como é constituído por glucose, também pode favorecer a atividade antagonista por parte de *Pseudomonas* spp. (James & Gutterson,1986).

Com este ensaio preliminar foi comprovada a atividade antagonista de seis estirpes produtoras, com exceção da estirpe *P. kilonensis* CAP1 que não revelou atividade antagonista com os meios em estudo.

3.1.2 Interação Bactéria / Fungo

As características macroscópicas dos microrganismos (bactérias e fungos) em YEPGA corresponderam às características observadas em meio NA e PDA respectivamente, validando a utilização deste meio para o ensaio de interação entre bactérias e fungos.

Na Tabela 5 apresentam-se os valores das taxas específicas de crescimento dos fungos em meio PDA e YEPGA.

Tabela 5: Taxas específicas de crescimento das estirpes fúngicas em meio PDA e em meio YEPGA. Os valores obtidos foram expressos em milímetros (mm) / dia.

	PDA	YEPGA		PDA	YEPGA
<i>Alternaria</i> sp.	12,5	8,0	<i>G. candidum</i>	7,8	7,0
<i>B. cinerea</i>	19,0	26,3	<i>Pestalotia</i> sp.	7,2	7,0
<i>Cladosporium</i> sp.	2,4	1,0	<i>Phoma</i> sp.	14,0	13,5
<i>F. culmorum</i>	12,0	17,0			

Verificou-se que o crescimento fúngico foi semelhante nos dois meios de cultura, embora *Alternaria* sp. tendesse para apresentar uma maior taxa específica de crescimento em meio PDA, ao contrário de *B. cinerea* e *F. culmorum*, cujos valores das taxas específicas de crescimento tenderam para serem maiores em YEPGA, sugerindo que estes fungos se desenvolveram mais rapidamente neste meio.

No ensaio de interação bactéria / fungo em meio YEPGA os resultados para um total de 49 combinações possíveis foram os seguintes: 3 inibições (6%), 8 reduções (16%), 5 ligeiras reduções (10%), 26 casos (53%) onde não houve efeito no crescimento do fungo e 7 casos inconclusivos (situação onde não foi possível distinguir o resultado entre ligeira redução do crescimento e o resultado de sem efeito no crescimento do fungo).

Todas as estirpes bacterianas produtoras alteraram o crescimento de pelo menos um fungo, sendo assim comprovada a sua atividade antifúngica.

Estudos sugerem que interações entre fungos e bactérias são complexas e mediadas pela produção de metabolitos secundários com funções específicas para o organismo que o produz (Scherlach *et al.*,2013). As alterações no crescimento dos fungos neste ensaio pode dever-se a interações complexas que levaram as estirpes bacterianas a produzirem compostos com atividade antimicrobiana.

3.2 Efeito de fatores abióticos na atividade antagonista

3.2.1 Influência da fonte de carbono e da limitação de nutrientes no desenvolvimento dos microrganismos

As bactérias produtoras e indicadoras testadas cresceram separadamente em meio BSM nas três concentrações (1; 0,4 e 0,04%) em cada uma das fontes de carbono, tendo-se observado que em baixas concentrações de cada fonte de carbono (0,04%) as colônias apresentavam menor crescimento, enquanto a concentração de 1% promoveu um maior crescimento das colônias. Na Figura 3 ilustra-se um exemplo dessa observação.



Figura 3: Crescimento bacteriano (*Streptomyces* sp.) em baixa concentração da fonte de carbono (maltose a 0,04% apresentando menor quantidade de esporos) e em elevada concentração da fonte de carbono (maltose a 1%).

Os fungos testados cresceram em meio BSM nas três concentrações (1; 0,4 e 0,04%) em cada uma das fontes de carbono, no entanto observou-se que baixas concentrações de cada fonte de carbono (0,04%) induziram uma maior expansão linear do micélio embora com menor densidade de biomassa, enquanto a concentração de 1% promoveu menor expansão linear do micélio, mas um aumento da densidade de biomassa. A Figura 4 ilustra essa observação.

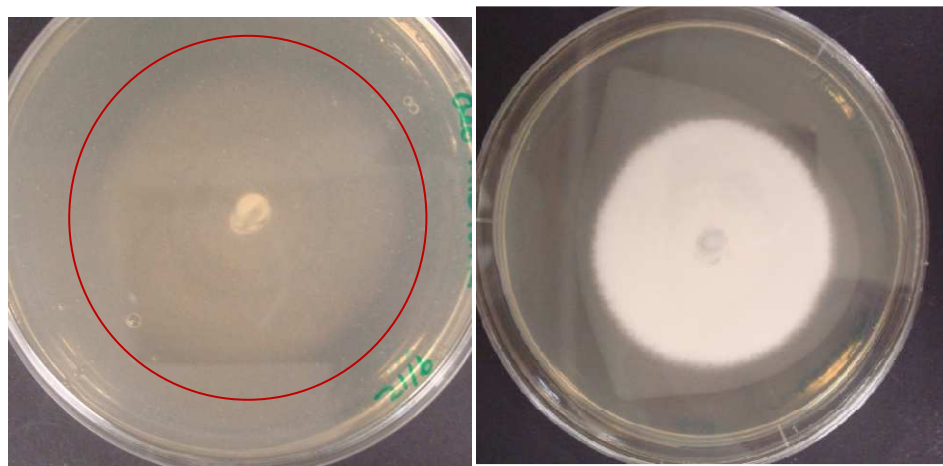


Figura 4: Crescimento fúngico (*Geotrichum candidum*) em baixa concentração da fonte de carbono (manitol a 0,04%) e em elevada concentração da fonte de carbono (manitol a 1%).

Com estes ensaios verificou-se que na ausência de interações entre si, os microrganismos estudados (bactérias e fungos) cresceram nas três concentrações (1; 0,4 e 0,04%) de cada uma das fontes de carbono testadas. Maior concentração da fonte de carbono permite um maior aumento da biomassa, enquanto menor concentração da fonte de carbono leva a uma maior expansão do micélio das estirpes fúngicas, sugerindo uma estratégia de procura de nutrientes.

De modo a avaliar os resultados do efeito de fatores abióticos na atividade antagonista, agruparam-se as bactérias indicadoras pelo carácter Gram, procurando associar a resposta obtida às diferenças da parede celular das bactérias, uma vez que esta tem sido referenciada como um dos alvos de ação de metabolitos antagonistas (Guimarães *et al.*, 2010).

Os resultados dos fungos foram analisados em conjunto considerando como característica comum serem potencialmente fitopatogénicos.

3.2.2 Influência da fonte de carbono e da limitação de nutrientes na interação Bactéria / Bactérias Gram Positivas

Através da análise de uma ANOVA com três fatores aos dados obtidos nos ensaios de interação entre bactérias produtoras (*Pseudomonas* spp. e *Streptomyces* sp.) e bactérias Gram positivas (*B. megaterium*; *B. subtilis*; *M. luteus*), verificou-se que tanto a fonte de carbono, como a concentração e a estirpe de bactéria produtora tiveram influência significativa na inibição das estirpes bacterianas Gram positivas, assim como as diferentes interações desses três fatores (Tabela 6).

Tabela 6: Valores de F e valores de p obtidos na análise de ANOVA com três fatores nos ensaios de interação entre bactérias produtoras e bactérias Gram positivas.

	Valor de F	Valor de p
Fonte de carbono	54,625	<0,001
Concentração	7,103	<0,001
Estirpe produtora	74,896	<0,001
Fonte de carbono x Concentração	10,896	<0,001
Fonte de carbono x Estirpe produtora	4,837	<0,001
Concentração x Estirpe produtora	4,255	<0,001
Fonte de carbono x Concentração x Estirpe produtora	3,649	<0,001

Deste modo, realizaram-se análises estatísticas detalhadas de modo a determinar quais os fatores com maior influência na inibição das estirpes indicadoras.

Na Figura 5 apresenta-se o efeito geral da fonte de carbono (englobando as diferentes concentrações) na frequência de inibição provocada pelas estirpes produtoras sobre bactérias Gram positivas.

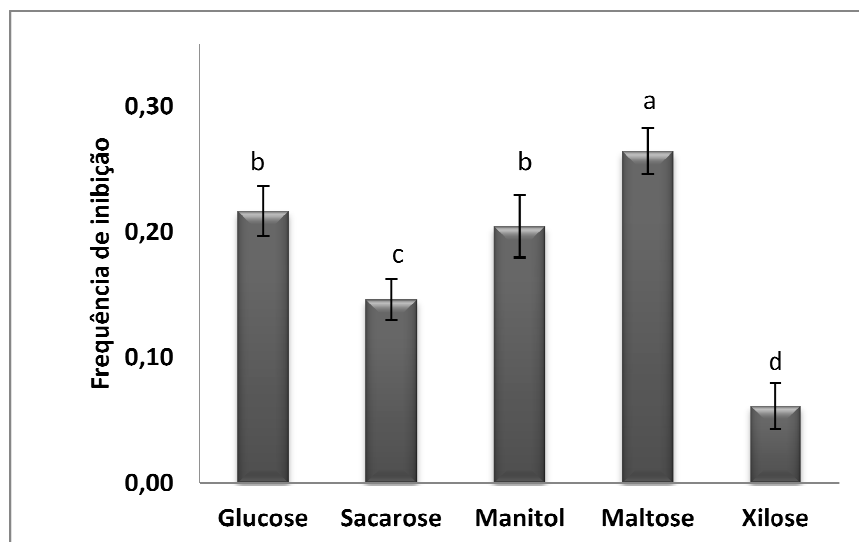
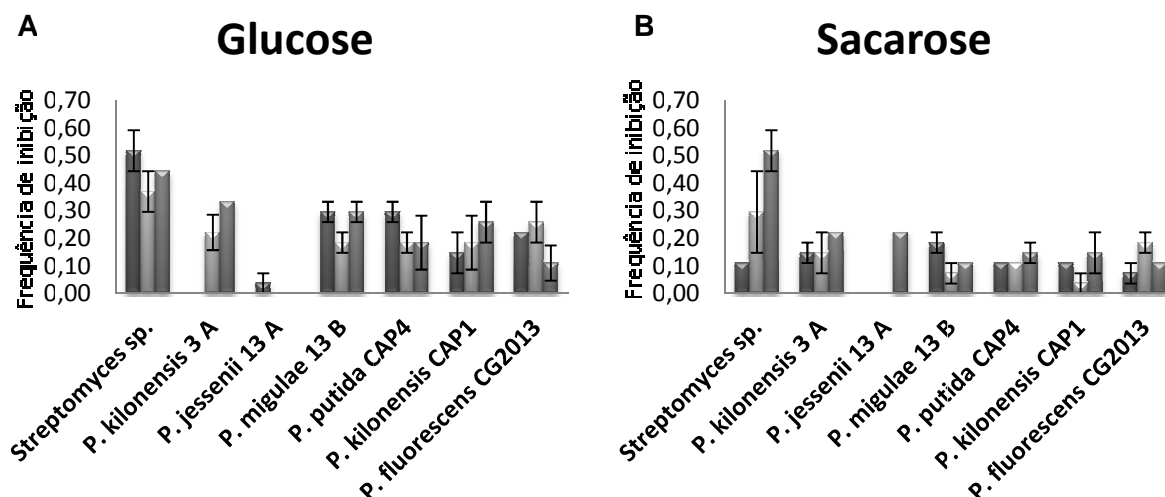


Figura 5: Efeito geral da fonte de carbono na frequência de inibição provocada pelas bactérias produtoras sobre bactérias Gram positivas. Valores para cada tratamento representam médias englobando estirpes produtoras e concentrações das fontes; o erro padrão está indicado pelas barras de erro. Diferentes letras acima das barras indicam diferenças significativas entre tratamentos (teste Tukey, $p < 0,05$).

A análise dos resultados demonstrou que a fonte de carbono influenciou a inibição das bactérias indicadoras Gram positivas, sendo a inibição significativamente maior com maltose e menor com xilose.

Nos gráficos da Figura 6 apresenta-se o efeito das três concentrações de cada fonte de carbono na atividade antibacteriana de cada estirpe produtora sobre as culturas bacterianas Gram positivas.



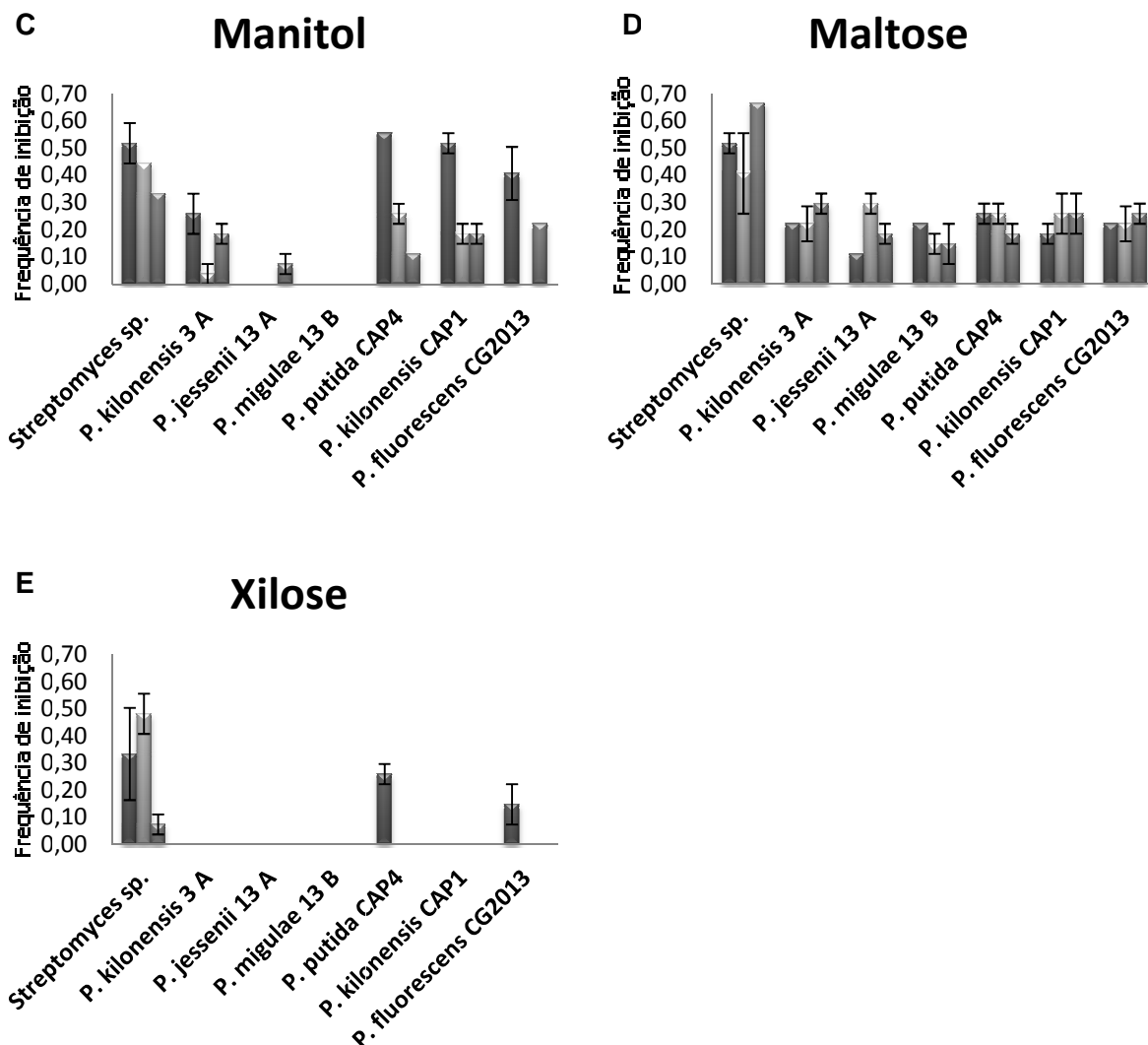


Figura 6: Efeito da concentração das diferentes fontes de carbono (A-E) na atividade antibacteriana pelas 7 estirpes produtoras sobre 3 bactérias Gram positivas (ANOVA com dois fatores). Em cada gráfico, da esquerda para a direita, a primeira barra corresponde à concentração de 1%, a segunda barra à concentração de 0,4% e a terceira barra à concentração de 0,04%. Valores representam médias e o erro padrão está indicado pelas barras de erro.

Na Tabela 7 apresenta-se o efeito da concentração de cada fonte de carbono e estirpes produtoras na atividade antibacteriana sobre bactérias Gram positivas.

Tabela 7: Efeito da concentração das diferentes fontes de carbono e estirpes produtoras na atividade antibacteriana sobre 3 bactérias Gram positivas. Valores de F e valores de p, resultantes da ANOVA com dois fatores.

Glucose	Valor de F	Valor de p
Concentração	0,586	0,561
Estirpe produtora	16,170	<0,001
Concentração x Estirpe produtora	2,793	0,007
Sacarose		
Concentração	9,971	<0,001
Estirpe produtora	7,895	<0,001
Concentração x Estirpe produtora	3,438	<0,001

Manitol		
Concentração	51,843	<0,001
Estirpe produtora	51,059	<0,001
Concentração x Estirpe produtora	9,109	<0,001
Maltose		
Concentração	0,887	0,419
Estirpe produtora	15,147	<0,001
Concentração x Estirpe produtora	1,786	0,082
Xilose		
Concentração	7,954	<0,001
Estirpe produtora	17,525	<0,001
Concentração x Estirpe produtora	4,614	<0,001

O efeito da concentração de glucose (Figura 6.A) não foi estatisticamente significativo, no entanto, a estirpe produtora teve influência na atividade antagonista, assim como a interação entre a concentração e a estirpe produtora (Tabela 7). De um modo geral, nesta fonte, *Streptomyces* sp. registou a maior frequência de inibição em qualquer das concentrações testadas e *P. jessenii* 13 A registou a menor frequência de inibição.

Utilizando sacarose como fonte de carbono (Figura 6.B), ambos os fatores concentração e estirpe produtora, assim como a sua interação tiveram influência significativa na atividade antagonista (Tabela 7). *Streptomyces* sp. foi a estirpe produtora que registou valores mais elevados de inibição no crescimento de bactérias Gram positivas testadas, particularmente na concentração de 0,04%. Este resultado evidencia o efeito da limitação desta fonte de carbono na atividade antagonista de *Streptomyces* sp.

Com meio BSM suplementado com manitol (Figura 6.C), todos os fatores envolvidos e as suas interações influenciaram significativamente a atividade antagonista (Tabela 7). A concentração de 1% foi geralmente a que influenciou mais essa atividade e as estirpes *Streptomyces* sp., *P. putida* CAP4, *P. kilonensis* CAP1 e *P. fluorescens* CG2013 foram as que registaram os valores de frequência de inibição mais elevados. A estirpe *P. migulae* 13 B não registou qualquer valor de inibição em nenhuma concentração.

Utilizando maltose como fonte de carbono (Figura 6.D), apenas a estirpe produtora teve influência significativa na atividade antibacteriana (Tabela 7). *Streptomyces* sp. foi a estirpe que teve maior influência, registando valores de frequência de inibição entre 40 a 70 %.

O efeito da concentração de xilose (Figura 6.E) foi significativo, assim como a estirpe produtora e a interação entre os dois fatores (Tabela 7). *Streptomyces* sp. foi novamente a estirpe que influenciou mais a inibição das bactérias Gram positivas e nas estirpes de *Pseudomonas* em que houve inibição esta ocorreu unicamente na concentração de 1%.

Neste ensaio, *Streptomyces* sp. foi a estirpe produtora que revelou valores de frequência de inibição das estirpes indicadoras mais elevados. De acordo com (Jemimah et

al.,2012) algumas estirpes de *Streptomyces* possuem a capacidade de degradar glicose, sacarose, maltose e manitol como fonte de carbono, levando a produção de metabólitos secundários biologicamente ativos. No entanto (Pridham & Gottlieb,1948) refere que entre as Actinobactérias, existem estirpes capazes de degradar glicose, sacarose, manitol, maltose e xilose e outras estirpes que não conseguem degradar essas fontes de carbono. De acordo com (Kinkel *et al.*,2011), estirpes de *Streptomyces* produzem mais compostos com atividade antagonista quando em condição de maior concentração de nutrientes.

Com estes ensaios verificou-se que a limitação da fonte de carbono influenciou a atividade antagonista sobre bactérias Gram positivas, no entanto dependeu da estirpe produtora e da interação entre concentração e estirpe produtora, uma maior ou menor atividade inibitória nas diferentes fontes de carbono.

3.2.3 Influência da fonte de carbono e da limitação de nutrientes na interação Bactéria / Bactérias Gram Negativas

Na análise dos ensaios de interação entre bactérias produtoras (*Pseudomonas* spp. e *Streptomyces* sp.) e bactérias Gram negativas (*A. calcoaceticus*; *B. cepacia*; *E. coli*), através de uma ANOVA com três fatores verificou-se que tanto a fonte de carbono, como a concentração e a estirpe de bactéria produtora tiveram influência significativa na inibição das estirpes bacterianas Gram negativas, assim como as diferentes interações desses três fatores, exceto a interação entre fonte e concentração (Tabela 8).

Tabela 8: Valores de F e valores de p obtidos na análise de ANOVA com três fatores dos ensaios de interação entre bactérias produtoras e bactérias Gram negativas.

	Valor de F	Valor de p
Fonte de carbono	58,887	<0,001
Concentração	8,171	<0,001
Estirpe produtora	6,126	<0,001
Fonte de carbono x Concentração	1,752	0,088
Fonte de carbono x Estirpe produtora	1,978	0,006
Concentração x Estirpe produtora	3,158	<0,001
Fonte de carbono x Concentração x Estirpe produtora	2,270	<0,001

Deste modo, efetuaram-se de seguida análises estatísticas mais exaustivas de modo a determinar quais os fatores com maior influência na inibição de estirpes indicadoras.

Na Figura 7 apresenta-se o efeito geral da fonte de carbono (englobando as diferentes concentrações) na frequência de inibição provocada pelas estirpes produtoras sobre bactérias Gram negativas.

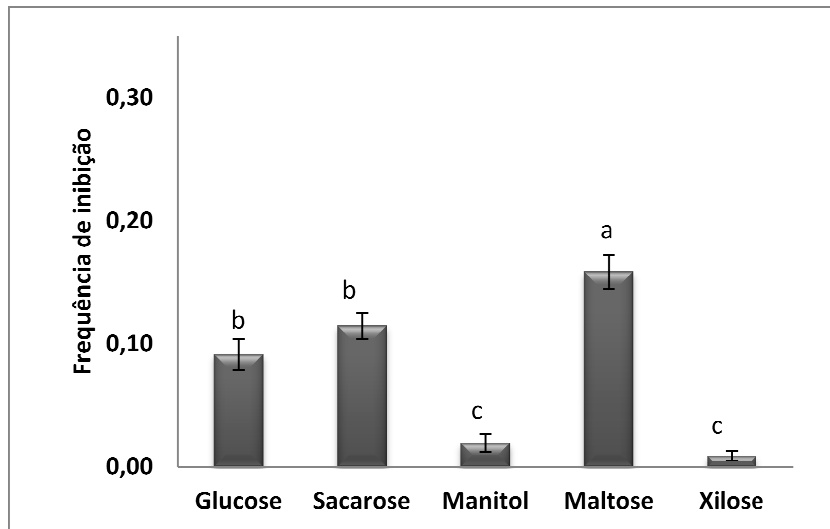


Figura 7: Efeito geral da fonte de carbono na frequência de inibição provocada pelas bactérias produtoras sobre bactérias Gram negativas. Valores para cada tratamento representam médias englobando estirpes produtoras e concentrações das fontes; o erro padrão está indicado pelas barras de erro. Diferentes letras acima das barras indicam diferenças significativas entre tratamentos (teste Tukey, $p < 0,05$).

Verificou-se que a fonte de carbono influenciou a inibição das bactérias Gram negativas sendo maltose a fonte de carbono onde se registou de modo geral maior frequência de inibição das estirpes indicadoras e manitol e xilose as que apresentaram valores menores de frequência de inibição.

Com estes ensaios verificou-se que, na generalidade, as bactérias Gram negativas sofreram um menor número de inibições quando comparadas com as bactérias Gram positivas, estando de acordo com o resultado obtido por (Rakesh *et al.*, 2013) que demonstrou que bactérias Gram positivas são mais suscetíveis à ação de compostos antimicrobianos do que bactérias Gram negativas.

Nos gráficos da Figura 8 apresenta-se o efeito das três concentrações de cada fonte de carbono na atividade antibacteriana de cada estirpe produtora sobre as culturas bacterianas Gram negativas.

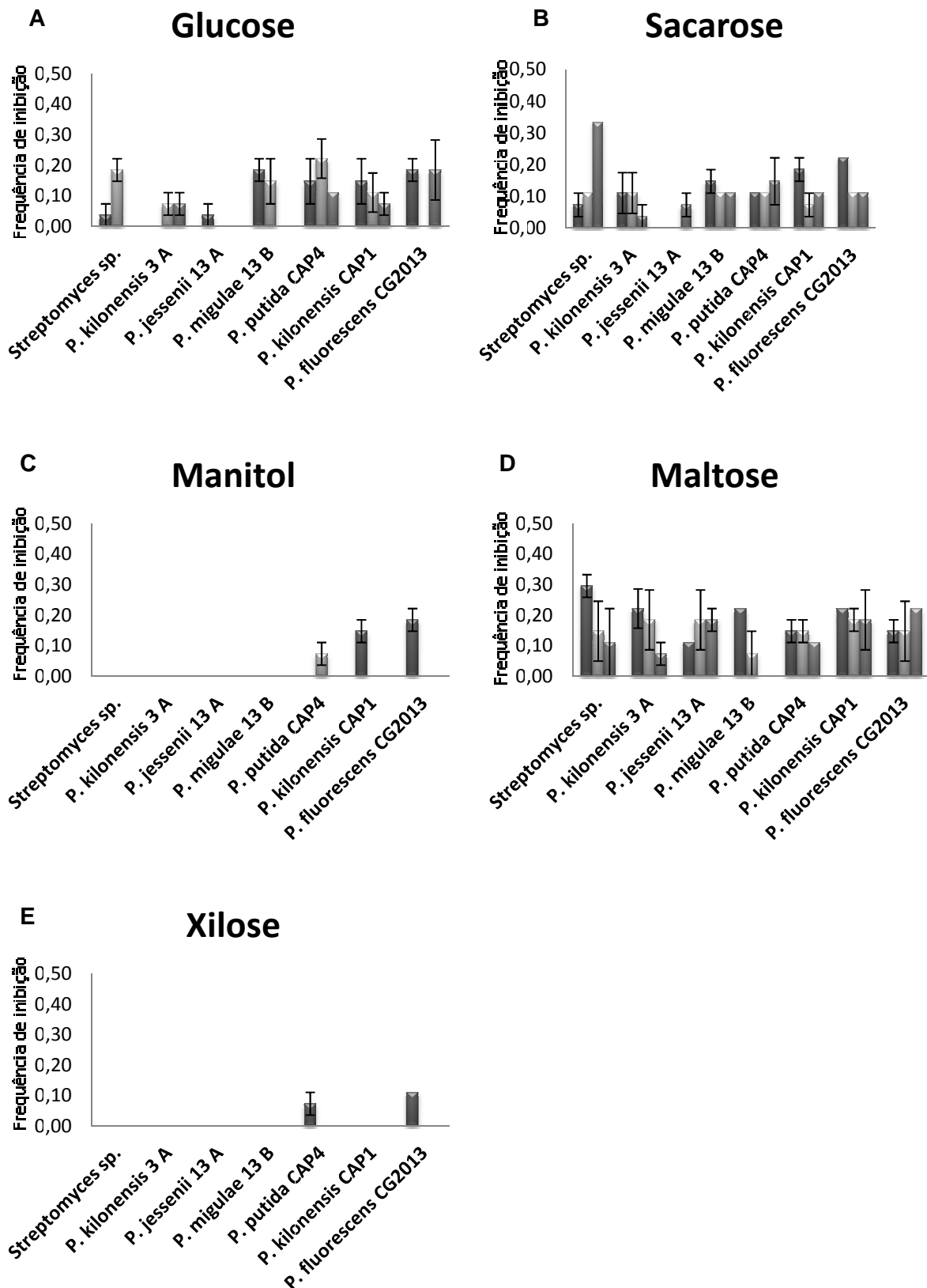


Figura 8: Efeito da concentração das diferentes fontes de carbono (A-E) na atividade antibacteriana pelas 7 estirpes produtoras sobre 3 bactérias Gram negativas (ANOVA com dois fatores). Em cada gráfico, da esquerda para a direita, a primeira barra corresponde à concentração de 1%, a segunda barra à concentração de 0,4% e a terceira barra à concentração de 0,04%. Valores representam médias e o erro padrão está indicado pelas barras de erro.

Na Tabela 9 apresenta-se o efeito da concentração de cada fonte de carbono e estirpes produtoras na atividade antibacteriana sobre bactérias Gram negativas.

Tabela 9: Efeito da concentração das diferentes fontes de carbono e estirpes produtoras na atividade antibacteriana sobre 3 bactérias Gram negativas. Valores de F e valores de p, resultantes da ANOVA com dois fatores.

Glucose	Valor de F	Valor de p
Concentração	1,939	0,156
Estirpe produtora	3,455	0,007
Concentração x Estirpe produtora	2,576	0,012
Sacarose		
Concentração	3,250	0,049
Estirpe produtora	6,521	<0,001
Concentração x Estirpe produtora	4,490	<0,001
Manitol		
Concentração	22,333	<0,001
Estirpe produtora	10,778	<0,001
Concentração x Estirpe produtora	13,778	<0,001
Maltose		
Concentração	2,224	0,121
Estirpe produtora	0,862	0,530
Concentração x Estirpe produtora	1,078	0,402
Xilose		
Concentração	25,000	<0,001
Estirpe produtora	11,000	<0,001
Concentração x Estirpe produtora	11,000	<0,001

O efeito da concentração de glucose (Figura 8.A) não foi estatisticamente significativo, no entanto, a estirpe produtora teve influência na atividade antagonista, assim como a interação entre a concentração e a estirpe produtora (Tabela 9). É de salientar que nesta fonte as estirpes produtoras que promoveram valores de frequência de inibição em todas as concentrações foram apenas *P. putida* CAP4 e *P. kilonensis* CAP1 e a estirpe produtora *P. jessenii* 13 A foi a que registou menor frequência de inibição.

Utilizando sacarose como fonte de carbono (Figura 8.B), todos os fatores foram estatisticamente significativos, isto é, tanto a concentração e a estirpe produtora, como a interação entre os dois fatores tiveram influência na atividade antibacteriana (Tabela 9). Verificou-se estatisticamente que *Streptomyces* sp. na concentração de 0,04% promoveu maior frequência de inibição, enquanto *P. jessenii* 13 A foi a que registou os valores mais baixos.

Com meio BSM suplementado com manitol (Figura 8.C), os dois fatores envolvidos e a interação entre eles influenciaram estatisticamente a atividade antagonista das estirpes produtoras (Tabela 9). Estes efeitos resultaram de apenas se terem registado inibições pelas estirpes *P. putida* CAP4 com 0,4%, *P. kilonensis* CAP1 com 1% e *P. fluorescens* CG2013 com 1% de concentração de substrato.

Utilizando maltose como fonte de carbono (Figura 8.D), o efeito da concentração, estirpe produtora e a interação entre ambos não foi estatisticamente significativo (Tabela 9), reforçando os dados anteriores, de que nesta fonte de carbono a concentração e a estirpe produtora não têm influência, embora a fonte de carbono tenha.

O efeito da concentração de xilose (Figura 8.E) foi significativo, assim como a estirpe produtora e a interação entre os dois fatores (Tabela 9). Estes efeitos são resultantes de apenas *P. fluorescens* CG2013 e *P. putida* CAP4 crescendo na concentração de 1% terem induzindo inibições nas bactérias Gram negativas.

De acordo com (Kinkel *et al.*,2011) uma maior disponibilidade de nutrientes pode aumentar a produção de compostos com atividade antagonista, porém também há estudos que sugerem que em condições limitantes da fonte de carbono (meio pobre) há uma maior competição pelos nutrientes e consequente aumento da produção de compostos com atividade antagonista (Bertrand *et al.*,2014). Neste ensaio, foram estirpes de *Pseudomonas* as que registaram valores mais elevados de frequência de inibição das estirpes indicadoras. Segundo (Garbeva *et al.*,2011), estirpes Gram negativas desencadeiam uma maior produção de um antibiótico de largo espectro por *Pseudomonas* spp. em comparação com estirpes Gram positivas, sendo a produção de metabolitos secundários fortemente afetada pela identidade dos competidores, sugerindo que *Pseudomonas* spp. conseguem distinguir entre diferentes competidores e adaptar as suas estratégias.

Com estes ensaios verificou-se que, excetuando os resultados obtidos com maltose, a limitação de carbono nas diferentes fontes influenciou a atividade inibitória sobre bactérias Gram negativas, no entanto dependeu da estirpe produtora e da interação entre concentração e estirpe produtora, uma maior ou menor atividade antagonista nas diferentes fontes de carbono.

3.2.4 Influência da fonte de carbono e da limitação de nutrientes na interação Bactéria / Fungos

A análise de uma ANOVA com três fatores aplicada aos dados obtidos nos ensaios de interação entre bactérias produtoras (*Pseudomonas* spp. e *Streptomyces* sp.) e fungos revelou que tanto a fonte de carbono, como a concentração e a estirpe de bactéria produtora tiveram influência na inibição das estirpes fúngicas, assim como as diferentes interações desses três fatores (Tabela 10).

Tabela 10: Valores de F e valores de p obtidos na análise de ANOVA com três fatores dos ensaios de interação entre bactérias produtoras e fungos.

	Valor de F	Valor de p
Fonte de carbono	143,625	<0,001
Concentração	22,859	<0,001
Estirpe produtora	261,263	<0,001
Fonte de carbono x Concentração	49,039	<0,001

Fonte de carbono x Estirpe produtora	27,644	<0,001
Concentração x Estirpe produtora	18,755	<0,001
Fonte de carbono x Concentração x Estirpe produtora	8,612	<0,001

Deste modo, efetuaram-se análises estatísticas mais detalhadas de modo a determinar quais os fatores com maior influência na inibição das estirpes fúngicas.

Na Figura 9 apresenta-se o efeito geral da fonte de carbono (englobando as diferentes concentrações) na frequência de inibição provocada pelas diferentes estirpes produtoras sobre as culturas fúngicas em estudo.

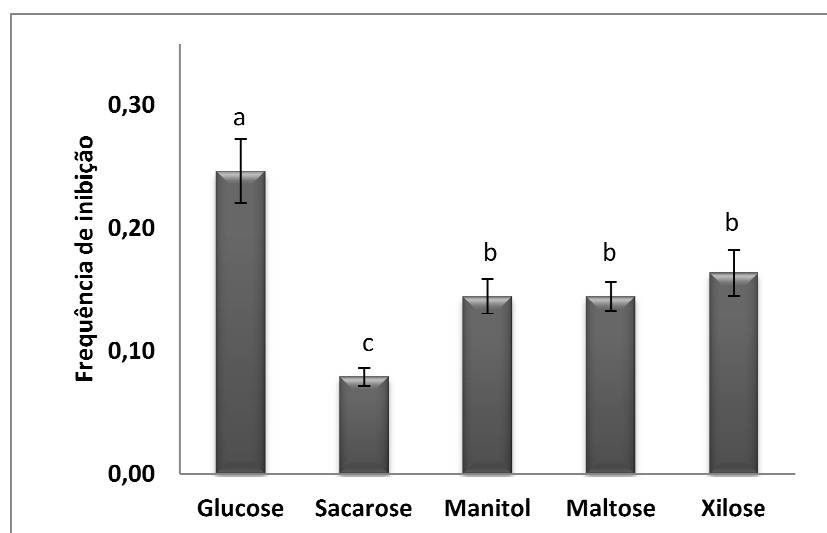


Figura 9: Efeito geral da fonte de carbono na frequência de inibição provocada pelas bactérias produtoras sobre fungos. Valores para cada tratamento representam médias englobando estirpes produtoras e concentrações das fontes; o erro padrão está indicado pelas barras de erro. Diferentes letras acima das barras indicam diferenças significativas entre tratamentos (teste Tukey, $p < 0,05$).

Nestes ensaios verificou-se que a fonte de carbono influenciou a inibição das estirpes fúngicas e que glucose foi de modo geral a fonte de carbono onde se registou maior frequência de inibição das estirpes fúngicas e sacarose a que apresentou menor frequência de inibição.

Nos gráficos da Figura 10 apresenta-se o efeito das três concentrações de cada fonte de carbono na atividade antagonista de cada estirpe produtora sobre as culturas fúngicas.

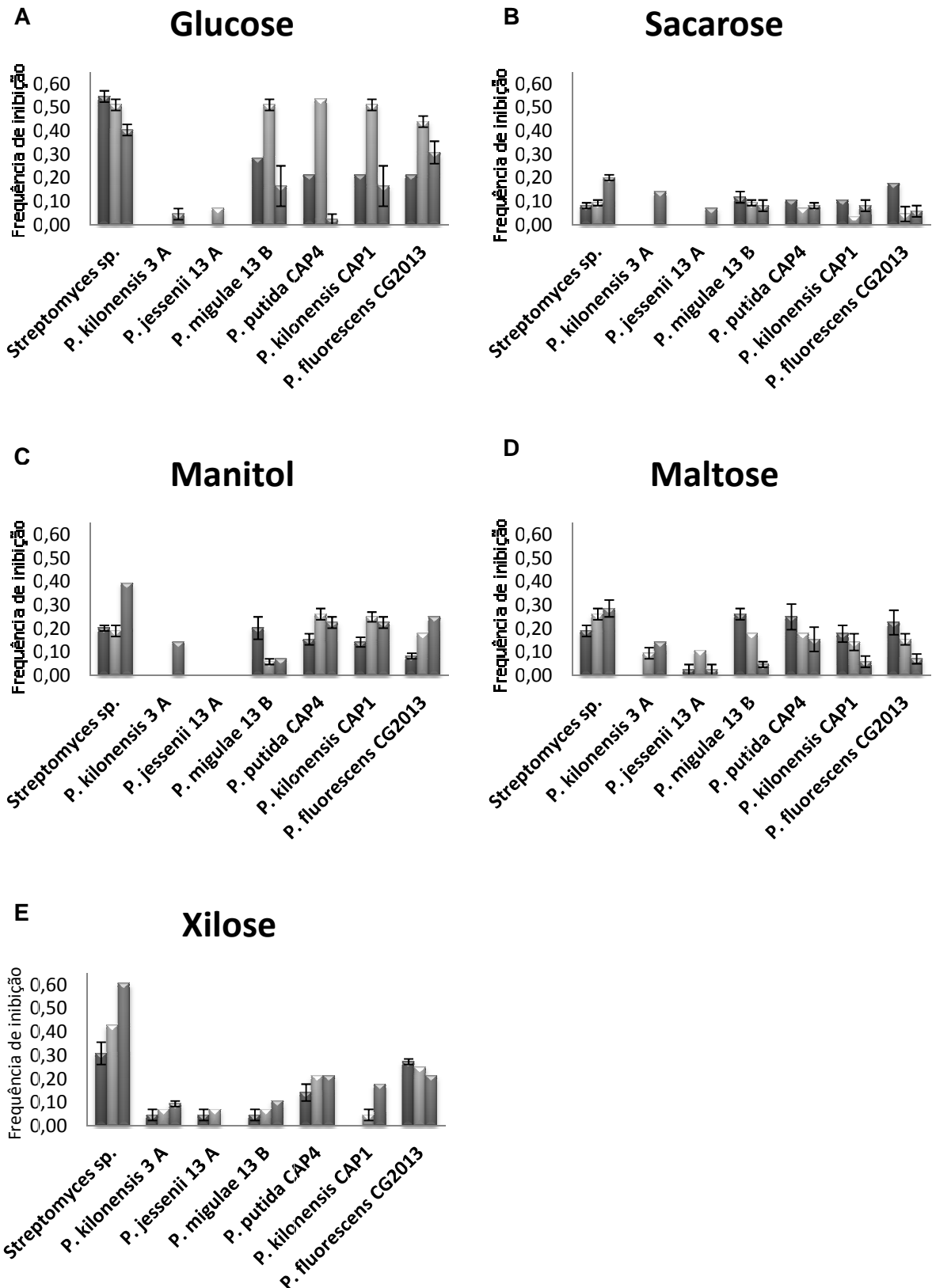


Figura 10: Efeito da concentração das diferentes fontes de carbono (A-E) na atividade antagonista pelas 7 estirpes produtoras sobre 7 estirpes fúngicas (ANOVA com dois fatores). Em cada gráfico, da esquerda para a direita, a primeira barra corresponde à concentração de 1%, a segunda barra à concentração de 0,4% e a terceira barra à concentração de 0,04%. Valores representam médias e o erro padrão está indicado pelas barras de erro.

Na Tabela 11 apresenta-se o efeito da concentração de cada fonte de carbono e estirpes produtoras na atividade antagonista sobre fungos.

Tabela 11: Efeito da concentração das diferentes fontes de carbono e estirpes produtoras na atividade antagonista sobre 7 estirpes fúngicas. Valores de F e valores de p, resultantes da ANOVA com dois fatores.

Glucose	Valor de F	Valor de p
Concentração	81,136	<0,001
Estirpe produtora	85,295	<0,001
Concentração x Estirpe produtora	11,419	<0,001
Sacarose		
Concentração	28,421	<0,001
Estirpe produtora	18,782	<0,001
Concentração x Estirpe produtora	13,008	<0,001
Manitol		
Concentração	34,047	<0,001
Estirpe produtora	89,762	<0,001
Concentração x Estirpe produtora	15,816	<0,001
Maltose		
Concentração	6,693	<0,001
Estirpe produtora	16,019	0,003
Concentração x Estirpe produtora	5,752	<0,001
Xilose		
Concentração	37,110	<0,001
Estirpe produtora	221,675	<0,001
Concentração x Estirpe produtora	14,808	<0,001

Em todas as fontes de carbono estudadas, o efeito da concentração, da estirpe produtora e da interação entre os dois fatores tiveram influência significativa na atividade antagonista contra as estirpes fúngicas testadas, como se pode verificar pelos valores significativos de p na Tabela 11.

Com glucose (Figura 10.A), a concentração que de um modo geral teve maior influência foi a de 0,4%, por contraste com a concentração de 0,04% que foi a que menos influenciou. A estirpe produtora que promoveu geralmente maior frequência de inibição foi *Streptomyces* sp. não tendo revelado diferenças na atividade antifúngica dependendo da concentração, ao contrário das restantes estirpes cujos valores de inibição foram dependentes da concentração de glucose utilizada. As estirpes que menos influenciaram foram *P. kilonensis* 3 A e *P. jessenii* 13 A.

Utilizando sacarose como fonte de carbono (Figura 10.B), observaram-se valores de frequência de inibição relativamente baixos, independentemente da estirpe produtora.

Com meio BSM suplementado com manitol (Figura 10.C), *Streptomyces* sp. foi a estirpe produtora que originou valores mais elevados de inibição particularmente na concentração de 0,04% e *P. jessenii* 13 A não provocou nenhuma inibição. Com as restantes estirpes

produtoras, não houve um padrão de resposta pois os valores oscilaram dependendo da concentração utilizada.

Utilizando maltose como fonte de carbono (Figura 10.D), as concentrações de 1% e 0,4% foram as mais relevantes, sendo *Streptomyces* sp. a estirpe produtora em que se registaram valores mais elevados e *P. jessenii* 13 A os valores mais baixos de inibição.

Com xilose (Figura 10.E) *Streptomyces* sp. foi a estirpe produtora com maior relevância, sendo a frequência de inibição maior na concentração de 0,04% de xilose.

O efeito inibitório de várias estirpes de *Streptomyces* e de *Pseudomonas* tem sido demonstrado em diversos estudos. (Ghai *et al.*,2007) observaram atividade inibitória contra fungos patogénicos em diversas estirpes de *Pseudomonas*, enquanto tem sido demonstrado que a diversidade de metabolitos secundários produzidos por *Streptomyces* sp. também têm atividade sobre fungos patogénicos (Kinkel *et al.*,2012).

Estudos revelaram que a fonte de carbono influenciou a densidade do crescimento de estirpes e conseqüente atividade inibitória, assim como a uma maior concentração de substrato levou a maiores densidades das comunidades microbianas (Schalatter *et al.*,2009). De acordo com os resultados obtidos no presente trabalho, verificou-se que a limitação da fonte de carbono influenciou a atividade antagonista sobre fungos, mas essa atividade inibitória também está dependente da estirpe produtora e da interação entre concentração da fonte de carbono e estirpe produtora.

Nos ensaios de interação entre microrganismos incluiu-se um controlo feito no meio BSM (com extrato de levedura e sem fonte de carbono) em que se pretendia verificar se as bactérias e os fungos podiam crescer à custa do extrato de levedura e não utilizavam a fonte de carbono. Observou-se a ausência de crescimento bacteriano no respetivo meio, validando desta forma que o extrato de levedura na concentração testada não foi utilizado como fonte de carbono. Em relação aos fungos, observou-se crescimento lento e com alterações morfológicas (menor micélio aéreo ou coloração diferente da característica) bem distinto do crescimento nas diferentes fontes de carbono testadas.

3.3 Perfis de crescimento dos microrganismos

3.3.1 Efeito da limitação da fonte de carbono nas taxas de crescimento das bactérias produtoras do género *Pseudomonas*

O efeito de cada fonte de carbono em meio BSM e da respetiva concentração na taxa específica de crescimento das estirpes produtoras encontra-se representado na Tabela 12. O valor das taxas de crescimento em meio NB permitiu compará-lo com os obtidos nos restantes meios.

Tabela 12: Efeito da fonte de carbono e respetiva concentração nas taxas específicas de crescimento das estirpes bacterianas produtoras do género *Pseudomonas*. Os valores obtidos foram expressos em Unidades de Absorvência h⁻¹. ND significa que o valor foi não determinado.

	<i>P. fluorescens</i> CG2013	<i>P. jessenii</i> 13 A	<i>P. kilonensis</i> 3 A	<i>P. kilonensis</i> CAP1	<i>P. migulae</i> 13 B	<i>P. putida</i> CAP4
Controlo NB	1,02	1,46	1,14	0,78	0,72	0,75
Glucose 1%	0,96	1,14	1,38	0,90	0,99	1,29
Glucose 0,4%	0,87	1,06	0,57	1,20	0,76	0,89
Glucose 0,04%	0,91	0,57	0,40	0,49	0,52	0,48
Sacarose 1%	0,22	0,17	0,49	0,26	0,23	0,18
Sacarose 0,4%	0,23	0,15	0,23	0,22	0,21	0,18
Sacarose 0,04%	0,22	0,34	ND	0,30	0,11	0,24
Manitol 1%	0,83	0,42	1,08	0,87	0,20	1,02
Manitol 0,4%	0,68	0,77	0,33	0,71	0,29	0,92
Manitol 0,04%	0,76	0,31	0,48	0,46	0,26	0,59
Maltose 1%	0,55	0,81	0,49	0,55	0,97	0,99
Maltose 0,4%	0,69	0,91	0,55	0,78	0,60	1,00
Maltose 0,04%	0,45	0,69	0,68	0,89	0,70	0,73
Xilose 1%	ND	0,30	0,30	0,41	ND	0,92
Xilose 0,4%	ND	ND	0,62	0,96	0,31	0,41
Xilose 0,04%	0,58	0,15	0,56	0,44	0,49	0,37

Comparando as taxas específicas das seis estirpes produtoras em meio NB observou-se que *P. fluorescens* CG2013, *P. jessenii* 13 A e *P. kilonensis* 3 A apresentaram taxas ligeiramente superiores às restantes estirpes.

No geral, em meio BSM suplementado com glucose, observou-se que na concentração de 1%, os valores das taxas específicas das estirpes produtoras foram superiores aos valores

na concentração de 0,04%, verificando-se que os valores registados a 1% são semelhantes ou em alguns casos até superiores aos valores registados em meio NB.

No meio BSM suplementado com sacarose, verificou-se que as taxas específicas de crescimento foram consideravelmente inferiores relativamente aos valores registados em meio NB, no entanto foram semelhantes nas três concentrações testadas.

No meio BSM suplementado com manitol, não foi visível um padrão de resposta, pois dependendo da estirpe, a concentração a 1% favoreceu o crescimento, no entanto em algumas estirpes não houve variação da taxa de crescimento em função da concentração e noutras já se verificou uma influência da concentração na velocidade de crescimento.

Em relação à utilização de maltose como fonte de carbono, a variação entre as concentrações testadas já não foi tão evidente como em glucose, obtendo-se taxas de crescimento semelhantes dentro de cada estirpe, independentemente da concentração utilizada.

Em relação ao meio BSM contendo xilose, o crescimento das estirpes também não seguiu um padrão de resposta, pois em alguns casos a concentração mais elevada favoreceu o crescimento, enquanto em algumas estirpes foi na menor concentração que a taxa de crescimento foi maior.

Resultados de estudos anteriores (Schalatter *et al.*,2009) sugerem que isolados cultivados com menor quantidade de fonte de carbono são capazes de a utilizar mais eficientemente do que os isolados cultivados com elevadas concentrações de fontes de carbono, no entanto o mesmo autor refere que a produção de compostos com atividade antagonista está descrita como sendo mais propícia em meios com maior concentração da fonte de carbono.

Verificou-se que as taxas específicas de crescimento de cada estirpe variaram de acordo com o meio e com a concentração testada, devido à sua limitação favorecer ou limitar o crescimento e à preferência de cada estirpe por uma fonte de carbono.

Em todas as fontes de carbono e concentrações testadas houve crescimento pois $\mu > 0$ permitindo validar o crescimento das estirpes produtoras (*P. fluorescens* CG2013, *P. jessenii* 13 A, *P. kilonensis* 3 A, *P. kilonensis* CAP1, *P. migulae* 13 B e *P. putida* CAP4) nas diferentes situações testadas.

3.3.2 Efeito da limitação da fonte de carbono no crescimento de *Streptomyces* sp.

Os resultados do efeito das diferentes fontes de carbono e respetivas concentrações no crescimento de *Streptomyces* sp. encontram-se registados na Tabela 13.

Tabela 13: Efeito da fonte de carbono e respetiva concentração no crescimento de *Streptomyces* sp. Os valores obtidos foram expressos em Unidades Formadoras de Colónias (CFU) /mL. ND significa que o valor foi não determinado.

Meio	CFU/mL	Meio	CFU/mL
Controlo NB	$1,9 \times 10^6$	Manitol 0,4%	$1,4 \times 10^6$
Glucose 1%	$1,3 \times 10^6$	Manitol 0,04%	$1,0 \times 10^6$
Glucose 0,4%	$3,0 \times 10^6$	Maltose 1%	$2,4 \times 10^6$
Glucose 0,04%	$2,9 \times 10^7$	Maltose 0,4%	$5,1 \times 10^6$
Sacarose 1%	$2,0 \times 10^5$	Maltose 0,04%	$1,8 \times 10^7$
Sacarose 0,4%	$1,6 \times 10^6$	Xilose 1%	ND
Sacarose 0,04%	ND	Xilose 0,4%	$5,2 \times 10^6$
Manitol 1%	$8,3 \times 10^6$	Xilose 0,04%	$4,5 \times 10^6$

Streptomyces sp. embora tenha crescido em todas as situações, a sua viabilidade variou consoante a fonte de carbono. Com glucose e maltose produziu um maior número de CFU, nas concentrações mais baixas. Com manitol, ocorreu o inverso, ou seja houve um menor número de CFU nas concentrações mais baixas.

Na concentração 1% de sacarose registou-se o menor número de CFU e com xilose o número de CFU foi semelhante e independente da concentração.

Esta observação, à semelhança das anteriores, permitiu validar o crescimento da estirpe produtora *Streptomyces* sp. no meio BSM suplementado com as diferentes fontes de carbono nas três concentrações testadas.

De acordo com (Schalatter *et al.*,2009) as comunidades que receberam menores quantidades da fonte de carbono utilizaram o substrato mais eficientemente, estando de acordo com os resultados obtidos, que sugerem que menores quantidades da fonte de carbono foram utilizadas mais eficazmente para o crescimento de *Streptomyces* sp, no entanto depende da fonte de carbono e da capacidade de *Streptomyces* sp. de degradar diferentes substratos. A capacidade de *Streptomyces* sp. metabolizar diversas fontes de carbono aumentam o seu potencial de ser eficaz na competição por recursos na rizosfera (Kinkel *et al.*,2012).

3.3.3 Efeito da limitação da fonte de carbono nas taxas de crescimento das bactérias indicadoras

Na Tabela 1 do anexo B apresenta-se o efeito de cada fonte de carbono em meio BSM e da respetiva concentração na taxa específica de crescimento das estirpes indicadoras. O valor da taxa de crescimento em meio NB permitiu compará-lo com os obtidos nos restantes meios.

Verificou-se que no meio BSM suplementado com glucose, *A. calcoaceticus*, *B. subtilis*, *E. coli* e *M. luteus* tiveram uma taxa de crescimento menor, em comparação com o meio NB, no entanto, a taxa de crescimento foi semelhante nas três concentrações.

Em relação ao meio BSM contendo sacarose, verificou-se que as taxas específicas de crescimento de *A. calcoaceticus*, *B. megaterium* e *B. subtilis* diminuíram conforme se diminuiu a concentração de sacarose, no entanto nas restantes estirpes a taxa de crescimento foi independente da concentração do substrato.

Em relação à utilização de maltose, observou-se, que embora os valores de taxas de crescimento não variassem muito com a concentração, o padrão de resposta variou consoante a estirpe: *A. calcoaceticus* cresceu mais rapidamente a 1% enquanto *B. megaterium*, *B. subtilis*, *B. cepacia* e *E. coli* tiveram um aumento na taxa de crescimento na concentração 0,4%.

Nos meios contendo manitol ou xilose, o padrão de resposta foi variável, pois algumas estirpes (como *A. calcoaceticus*) tiveram a taxa máxima na concentração de 1% tendo o valor diminuindo conforme se diminuiu a concentração da fonte de carbono, enquanto outras (*B. megaterium* em manitol e *B. cepacia* em xilose) não alteraram o valor da taxa de crescimento com a concentração.

Com estes ensaios validou-se o crescimento das estirpes bacterianas indicadoras no meio BSM suplementado com as diferentes fontes de carbono nas três concentrações, pois embora tenha diminuído o valor da taxa de crescimento, todas as estirpes registaram valores de μ superiores a zero, evitando o registo de falsos negativos nos ensaios de interação bactéria/bactéria. Também se verificou que cada estirpe possuía um comportamento diferente, tendo preferência por fontes de carbono específicas.

3.3.4 Efeito da limitação da fonte de carbono nas taxas de crescimento dos fungos

Os resultados do efeito de cada fonte de carbono e da respetiva concentração no crescimento dos fungos estão expressos na Tabela 2 no anexo B.

Relativamente à utilização de glucose como fonte de carbono não existiu um padrão de resposta, pois *Alternaria* sp. e *Cladosporium* sp. não registaram alterações na taxa específica de crescimento com as diferentes concentrações. Em *Pestalotia* sp. e *Phoma* sp. observou-se um valor máximo na concentração de 1% e *B. cinerea* registou um valor máximo na concentração de 0,4%. *F. culmorum* apresentou uma diminuição da taxa específica de crescimento conforme se diminuiu a concentração da fonte de carbono enquanto *G. candidum* teve um aumento da taxa específica de crescimento quando se diminuiu a concentração da fonte de carbono.

Em meio BSM suplementado com sacarose, verificaram-se diminuições das taxas específicas de crescimento conforme se diminuiu a concentração em *B. cinerea*, *Cladosporium* sp., *Pestalotia* sp. e *Phoma* sp. As estirpes *Alternaria* sp. e *G. candidum* não registaram

alterações nos valores das taxas de crescimento nas diferentes concentrações e *F. culmorum* registou um valor máximo na concentração de 0,04%.

No meio com manitol, em algumas estirpes não se verificaram alterações dos valores das taxas específicas de crescimento nas diferentes concentrações (*Alternaria* sp., *B. cinerea* e *Cladosporium* sp.). *G. candidum* e *Phoma* sp. registaram diminuições dos valores das taxas de crescimento conforme se diminuiu a concentração. Em *F. culmorum* verificou-se um valor máximo na concentração de 0,4% e *Pestalotia* sp. registou um valor máximo na concentração de 0,04% de manitol.

Em relação à utilização de maltose como fonte de carbono registaram-se taxas específicas de crescimento que não variaram com as diferentes concentrações em *Alternaria* sp., *Cladosporium* sp., *G. candidum* e *Pestalotia* sp. e com a estirpe *B. cinerea* observou-se uma diminuição dos valores da taxa de crescimento conforme se diminuiu a concentração de maltose. *F. culmorum* registou um valor máximo na concentração de 0,4% e *Phoma* sp. um valor máximo na concentração de 1% de maltose.

No meio BSM com xilose, na maioria das estirpes verificou-se uma diminuição dos valores das taxas específicas de crescimento conforme se diminuiu a concentração (*B. cinerea*, *F. culmorum*, *Pestalotia* sp. e *Phoma* sp.), enquanto *Alternaria* sp. registou o oposto, isto é, aumentou o valor da taxa de crescimento conforme se diminuiu a concentração. Para *Cladosporium* sp. e *G. candidum* não se registaram variações nos valores das taxas específicas de crescimento.

Com estes ensaios observou-se que apesar das diferenças encontradas, todas as estirpes fúngicas tiveram taxas de crescimento positivas nas três concentrações das várias fontes de carbono testadas, embora a taxa de crescimento seja geralmente maior em concentrações mais baixas, o que sugere uma exploração do ambiente de modo a encontrar nutrientes.

Deste modo nos ensaios de interação, a ausência de crescimento de *Alternaria* sp., *B. cinerea*, *Cladosporium* sp., *F. culmorum*, *G. candidum*, *Pestalotia* sp. e *Phoma* sp. pôde ser atribuída à atividade antagonista das bactérias produtoras testadas.

3.4 Ensaio de co-evolução à escala laboratorial

Foi efetuado um ensaio para estudar a influência da fonte de carbono ao longo do tempo (número de gerações) na co-evolução estabelecida entre duas populações provenientes do mesmo solo e com diferentes atividades antagonistas. As duas estirpes selecionadas foram *P. kilonensis* CAP1 e *P. putida* CAP4.

O meio de crescimento selecionado foi o meio BSM suplementado com manitol, xilose, ou ambos, na concentração de 0,04% (adaptado de Lawrence *et al.*, 2012), pois foram os meios

onde as taxas de crescimento das duas culturas foram similares para ambas as estirpes (Tabela 12), permitindo o respectivo crescimento em co-cultura.

3.4.1 Influência da dinâmica co-evolutiva na alteração dos fenótipos de *P. kilonensis* CAP1 e *P. putida* CAP4

Este ensaio teve como objetivo verificar se após aproximadamente 70 gerações as duas populações de *P. kilonensis* CAP1 e *P. putida* CAP4 alteravam o fenótipo, ou seja, se alteravam a atividade antagonista sobre duas estirpes indicadoras (*E. coli* e *B. subtilis*).

Os resultados seguintes foram obtidos em *B. subtilis* uma vez que *E. coli* não foi inibida ao longo do tempo do ensaio.

Aplicando uma ANOVA com análise de medidas repetidas verificou-se que o número de gerações, o inóculo de estirpes produtoras e a interação entre os fatores tiveram influência significativa na atividade antimicrobiana sobre *B. subtilis* (Tabela 14).

Tabela 14: Efeito do número de gerações, da fonte de carbono, inóculo de estirpes produtoras e das diferentes interações desses fatores na atividade antibacteriana sobre *B. subtilis*. Valores de F e valores de p, resultantes da ANOVA com análise de medidas repetidas.

	Valor de F	Valor de p
Nº de gerações	7,545	<0,001
Fonte de carbono	3,098	0,057
Inóculo de estirpes produtoras	7,311	0,002
Fonte de carbono x Inóculo de estirpes produtoras	1,872	0,137
Nº de gerações x Fonte de carbono	1,684	0,087
Nº de gerações x Inóculo de estirpes produtoras	2,888	0,002
Nº de gerações x Fonte de carbono x Inóculo de estirpes produtoras	1,219	0,243

Nos gráficos da Figura 11 apresenta-se a variação da frequência de inibição de *B. subtilis* ao longo das 15 transferências (aproximadamente 70 gerações) originada pelas estirpes *P. kilonensis* CAP1 e *P. putida* CAP4 em mono e em co-cultura nas diferentes fontes de carbono.

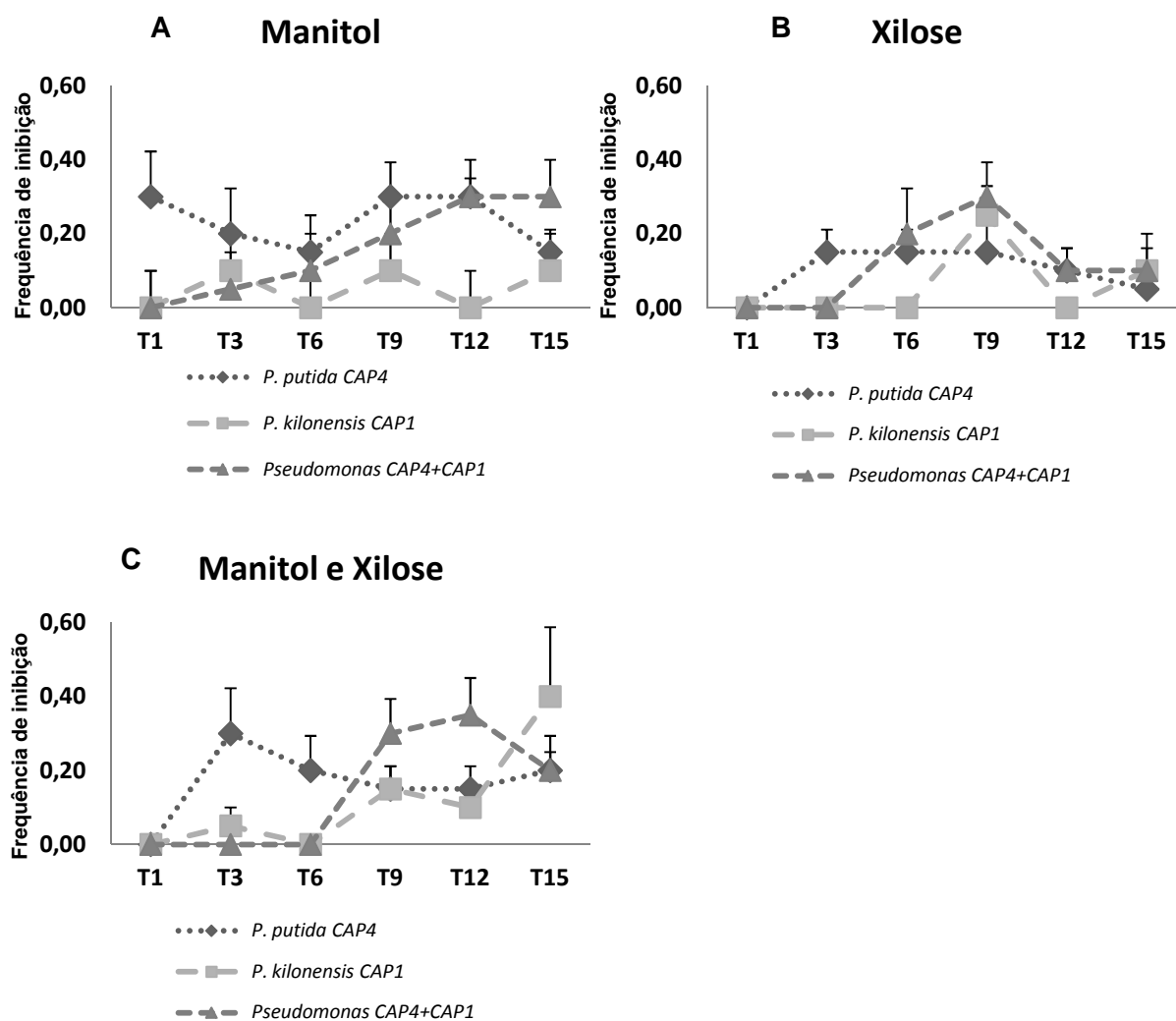


Figura 11: Variação da frequência de inibição de *B. subtilis* (A-C) originada pelas estirpes produtoras, ao longo das 15 transferências (T; o número representa o momento de amostragem) nas diferentes fontes de carbono. Valores representam médias e o erro-padrão está representado pelas barras de erro.

Utilizando uma ANOVA com um fator para estudar o efeito do número de gerações em cada um dos tratamentos de estirpes produtoras e em meio de cultura com manitol (Figura 11.A), verificou-se que em co-cultura o número de gerações foi influenciando significativa e progressivamente a atividade antagonista ($p= 0,024$). Em meio de cultura contendo xilose (Figura 11.B), verificou-se que apenas em *P. kilonensis* CAP1 houve influência significativa do número de gerações na atividade antagonista ($p= 0,002$). No meio contendo manitol e xilose (Figura 11.C), verificou-se que o número de gerações em *P. kilonensis* CAP1 em mono-cultura ($p= 0,027$) e em ambas as estirpes em co-cultura ($p=0,001$) influenciou significativamente a atividade antagonista.

Verificou-se que o crescimento em co-cultura foi mais lento, o que está de acordo com (Lawrence *et al.*,2012) que sugere que o crescimento é mais lento em co-cultura devido a existência de adaptações entre estirpes.

Para confirmar a alteração do fenótipo de *P. kilonensis* CAP1 e *P. putida* CAP4, entre o início e o final do ensaio de co-evolução à escala laboratorial, comparou-se a atividade antagonista contra *B. subtilis* em T1 (1ª transferência) e em T15 (15ª transferência) utilizando o Teste T de Student (Figura 12).

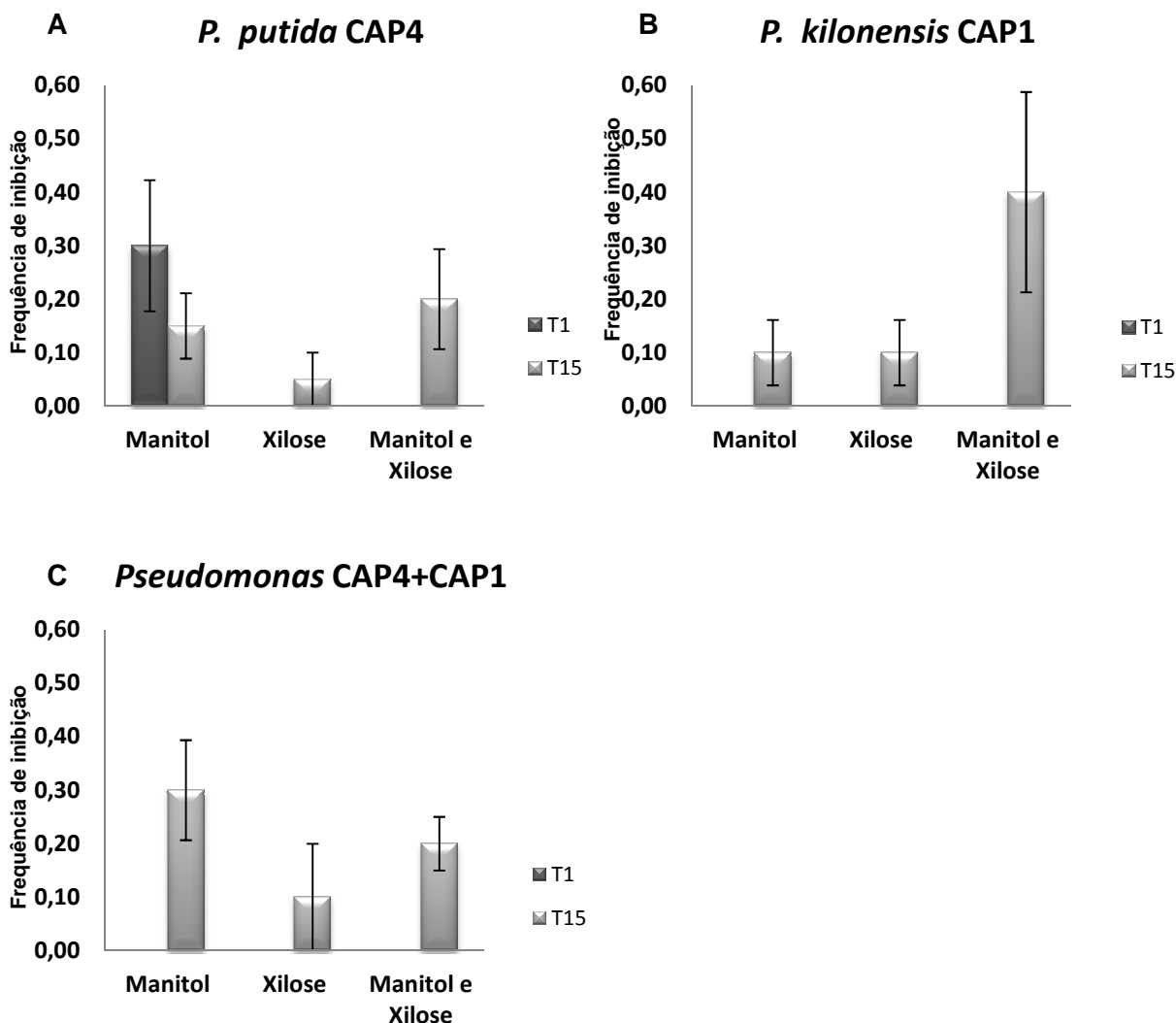


Figura 12: Comparação da frequência de inibição de *B. subtilis* (A-C) originada pelas estirpes produtoras, no início do ensaio de co-evolução (T1) e no final do ensaio (T15) nas diferentes fontes de carbono. Valores representam médias e o erro-padrão está representado pelas barras de erro. A ausência de barra correspondente ao T1 significa que o valor nesse tempo foi nulo.

Verificaram-se diferenças significativas entre o T1 e o T15 na situação de co-cultura com a fonte de carbono manitol ($p=0,012$) e com manitol e xilose ($p=0,004$). Este resultado sugere que será o manitol a influenciar a competição das estirpes em co-cultura de modo a aumentar a atividade antimicrobiana, uma vez que com xilose a atividade antagonista não foi alterada quer em mono quer em co-cultura.

Os resultados obtidos sugerem que houve uma influência da dinâmica co-evolutiva na alteração dos fenótipos de *P. kilonensis* CAP1 e *P. putida* CAP4 uma vez que a co-cultura após

70 gerações apresentou maior efeito antagonista do que as estirpes em mono cultura. De acordo com o estudo de (Garbeva & Boer, 2009) a co-cultura de diferentes estirpes bacterianas pode resultar em alterações das características fenotípicas, quer seja pelo aumento da produção de metabolitos secundários ou enzimas extracelulares (importantes durante a competição), uma vez que as estirpes respondem à presença de outras estirpes, relacionadas taxonomicamente ou não, desde que estejam a competir pelo mesmo recurso.

No entanto apesar das diferenças reveladas, será necessário um maior número de transferências, de modo a aumentar o número de gerações, para se confirmar uma alteração do padrão de resposta na atividade antagonista e confirmar se a fonte de carbono também tem influência na alteração do fenótipo das duas populações em co-cultura.

Quantificação da atividade antimicrobiana no ensaio de co-evolução à escala laboratorial

Os resultados dos ensaios realizados em meio líquido com vista à quantificação da atividade antimicrobiana encontram-se no Anexo C. Verificou-se que os extratos extracelulares das estirpes *P. kilonensis* CAP1 e *P. putida* CAP4 contra *B. subtilis* tinham uma atividade antimicrobiana inferior a 30 µg/mL.

3.4.2 Influência da dinâmica co-evolutiva na viabilidade e permanência de *P. kilonensis* CAP1 e *P. putida* CAP4 em co-cultura ao longo do ensaio

Este ensaio teve como objetivo confirmar se as estirpes *P. kilonensis* CAP1 e *P. putida* CAP4 em co-cultura se mantiveram viáveis ao longo das 70 gerações, utilizando para esse fim o meio B-King, o qual permitiu distinguir as duas estirpes (*P. kilonensis* CAP1 sem capacidade para produzir fluorescência e *P. putida* CAP4 com capacidade de produzir fluorescência).

Como se pode observar na Figura 13 foi possível distinguir ambas as estirpes aquando em condição de co-cultura, pela observação de colónias que emitiam fluorescência (*P. putida* CAP4) e colónias sem essa característica (*P. kilonensis* CAP1). Essa distinção manteve-se ao longo de todo o ensaio (70 gerações), o que permitiu concluir que quando em co-cultura, ambas as estirpes se mantiveram viáveis, embora não se conheça a frequência em que se encontravam as estirpes no final do ensaio.



Figura 13: Emissão de fluorescência por colónias de *P. putida* CAP4 e ausência dessa característica em colónias de *P. kilonensis* CAP1

4. Conclusão

Os resultados deste trabalho revelaram que não é apenas um fator que influencia a produção de compostos com atividade antagonista, mas sim um conjunto de fatores e as interações entre eles. De um modo geral e através de ensaios de interação entre bactérias produtoras de compostos com atividade antagonista (estirpes de *Streptomyces* e de *Pseudomonas*) e bactérias Gram positivas, bactérias Gram negativas e fungos, verificou-se que tanto a fonte de carbono, como a concentração de substrato, a estirpe produtora e as diferentes interações entre esses fatores tiveram influência na inibição das estirpes utilizadas como indicadoras.

Os ensaios de interação entre bactérias produtoras e bactérias Gram positivas revelaram que a maltose foi a fonte de carbono que promoveu maior atividade antagonista e a xilose a que promoveu menor atividade antagonista por parte das estirpes produtoras. Nas diferentes fontes de carbono testadas, *Streptomyces* sp. foi a estirpe produtora que provocou valores de frequência de inibição de estirpes Gram positivas mais elevados.

Os ensaios de interação entre bactérias produtoras e bactérias Gram negativas revelaram que novamente maltose foi a fonte de carbono onde se registou maior frequência de inibição e manitol e xilose as que promoveram menores frequências de inibição. No meio suplementado com glucose, manitol e xilose, *P. putida* CAP4, *P. kilonensis* CAP1 e *P. fluorescens* CG2013 foram as estirpes mais promissoras na inibição de bactérias Gram negativas. *Streptomyces* sp. foi a estirpe que mais inibiu as estirpes indicadoras em meio suplementado com sacarose. Utilizando maltose como fonte de carbono o efeito da concentração, estirpe produtora e a interação entre ambos não foi estatisticamente significativo.

Pela comparação das frequências de inibição das estirpes indicadoras Gram positivas e Gram negativas, verificou-se que as bactérias Gram positivas foram mais suscetíveis à atividade antagonista, apresentando um maior número de inibições quando comparadas com as bactérias Gram negativas.

Nos ensaios de interação entre bactérias produtoras e fungos, a glucose foi de modo geral a fonte de carbono onde se registou maior frequência de inibição das estirpes fúngicas e sacarose a fonte de carbono em que se registou menor frequência de inibição. Nas diferentes fontes de carbono testadas, *Streptomyces* sp. foi a estirpe produtora que revelou valores de frequência de inibição das estirpes fúngicas mais elevados.

No ensaio de co-evolução à escala laboratorial (com *P. putida* CAP4 e *P. kilonensis* CAP1) verificou-se que o número de gerações, o inóculo de estirpes produtoras e a interação entre os dois fatores tiveram influência significativa na atividade antimicrobiana sobre *B. subtilis*, não se registrando influência sobre *E. coli*. O número de gerações influenciou significativamente a

atividade antagonista em co-cultura tanto no meio suplementado com manitol como no meio contendo manitol e xilose. Este resultado sugere que será o manitol a influenciar a competição das estirpes em co-cultura de modo a aumentar a atividade antimicrobiana,

Ao longo de todo o trabalho, observaram-se diferentes respostas das estirpes bacterianas e fúngicas utilizadas como indicadoras nos ensaios de interação, permitindo concluir que não há uma estirpe que deva ser eleita como indicadora em ensaios laboratoriais.

Os resultados obtidos neste trabalho permitiram concluir que os fatores abióticos (fonte de carbono e respetiva concentração) influenciaram a atividade antagonista, assim como fatores bióticos (estirpes produtoras e indicadoras). Todos estes fatores são dependentes entre si, contribuindo para uma alteração do fenótipo de estirpes com capacidade de produzir compostos com atividade biológica.

5. Referências Bibliográficas

- Alam, M.; Dharni, S.; Abdul-Khaliq; Srivastava, SK; Samad, A & Gupta, MK. (2012). A promising strain of *Streptomyces* sp. with agricultural traits for growth promotion and disease management. *Indian Journal of Experimental Biology*, 50(8) 559-68.
- Azuma, M. (2011). Actinobactérias com potencial biotecnológico isoladas da região entre-marés da Ilha do Mel, PR, Brasil. Dissertação de Pós-Graduação em Microbiologia. Universidade Federal do Paraná, Brasil.
- Baker, KF & Cook, RJ. (1974) Biological control of plant pathogens . WH Freeman. San Francisco pag 433.
- Bauer, A. W.; Kirby, W. M. M.; Sherris, J. C. & Turck, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Journal of Clinical Pathology*, 45, 493-496.
- Bertrand, S.; Bohni, N.; Schnee, S.; Schumpp, O.; Gindro, K. & Wolfender, J.-Luc. (2014). Metabolite induction via microorganism co-culture: A potential way to enhance chemical diversity for drug discovery. *Biotechnology Advances*, 32(6), 1180-1204.
- Cerqueira, F. (2013). Relatório de actividades no âmbito da unidade curricular de Iniciação à Investigação em Microbiologia 2. Mestrado em Microbiologia Aplicada. Faculdade de Ciências. Universidade de Lisboa. Lisboa.
- Coelho, L.; Freitas, S.; Melo, A. & Ambrosano, G. (2007). Interação de bactérias fluorescentes do gênero *Pseudomonas* e de *Bacillus* spp . com a rizosfera de diferentes plantas. Tese de Mestrado. Instituto Agrônomo. Brasil.
- Corrêa, G.; Rocha, M.; Júnior, J.; Carneiro, I. & Cardoso, J. (2000). Supressividade de diferentes solos a *Rhizoctonia solani* , nos cerrados do estado de Goiás. Universidade Federal de Goiás.
- Cunha, I.; Sobrinho, T.; Silva, R.; Amorim, E. & Araujo, J. (2009). Influência do meio de cultura na produção de metabólitos bioativos do endófito *Streptomyces* sp. EBR49-A UFPEDA. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 90(2), 120-123.
- Dantas, J. S.; Souza, A. P. de.; Farias, M. F. de; Fátima, V. de & Nogueira, B. (2009). Interações entre grupos de microorganismos com a rizosfera. *Pesquisa Aplicada & Agrotecnologia*, 2(2), 213-218.
- Garbeva, P. & Boer, W. de (2009). Inter-specific interactions between carbon-limited soil bacteria affect behavior and gene expression. *Microbial Ecology*, 58, 36-46.
- Garbeva, P.; Silby, M. W.; Raaijmakers, J. M.; Levy, S. B. & Boer, W. de (2011). Transcriptional and antagonistic responses of *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1 to phylogenetically different bacterial competitors. *The ISME Journal*, 5(6), 973-985.
- George, M.; Anjumol, A.; George, G. & Hatha, A. A. M. (2012). Distribution and bioactive potential of soil actinomycetes from different ecological habitats. *African Journal of Microbiology Research*, 6(10), 2265-2271.
- Ghai, S.; Sood, S. & Jain, R. (2007). Antagonistic and antimicrobial activities of some bacterial isolates collected from soil samples. *Indian Journal of Microbiology*, 47, 77-80.
- Guimarães, D.; Momesso, L. & Pupo, M. (2010). Antibióticos: Importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. *Química Nova*, 33(3), 667-679.

- Hol, W. H. G.; Bezemer, T. M. & Biere, A. (2013). Getting the ecology into interactions between plants and the plant growth-promoting bacterium *Pseudomonas fluorescens*. *Frontiers in Plant science*, 4,1-9.
- Hornby, D. (1983) Suppressive soils. *Annual Review of Phytopathology*. (21) 65-85.
- James, D. W. & Gutterson, N. I. (1986). Multiple antibiotics produced by *Pseudomonas fluorescens* HV37a and their differential regulation by glucose. *Applied and Environmental Microbiology*, 52(5), 1183-1189.
- Jemimah Naine, S.; Nasimunislam, N.; Vaishnavi, B.; Mohanasrinivasan, V. & Subathra Devi, C. (2012). Isolation of soil Actinomycetes inhabiting Amrithi forest for the potential source of bioactive compounds. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 5(4), 189-192.
- Jousset, A.; Lara, E.; Wall, L. G. & Valverde, C. (2006). Secondary metabolites help biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* CHA0 to escape protozoan grazing. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(11), 7083-7090.
- Khamna, S.; Yokota, A. & Lumyong, S. (2009). Actinomycetes isolated from medicinal plant rhizosphere soils : diversity and screening of antifungal compounds , indole-3-acetic acid and siderophore production. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25, 649-655.
- King, E.O.; Ward, M.K. & Raney, D.E. (1954) Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, St. Louis, 44(3) 301- 307.
- Kinkel, L. L.; Bakker, M. G. & Schlatter, D. C. (2011). A coevolutionary framework for managing disease-suppressive soils. *Annual Review of Phytopathology*, 49, 47-67.
- Kinkel, L. L.; Schlatter, D. C.; Bakker, M. G. & Arenz, B. E. (2012). *Streptomyces* competition and co-evolution in relation to plant disease suppression. *Research in Microbiology*, 163(8), 490-499.
- Lawrence, D.; Fiegna, F.; Behrends, V.; Bundy, J. G.; Phillimore, A. B.; Bell, T. & Barraclough, T. G. (2012). Species interactions alter evolutionary responses to a novel environment. *PLoS Biology*, 10(5), 1-11.
- Lazarotto, M.; Bovolini, M. P.; Maciel, C. G. & Muniz, M. F. B. (2009). Seleção *in vitro* de isolados de *Trichoderma* spp. com potencial de antagonismo a isolados patogênicos de *Fusarium* spp. Universidade Federal de Santa Maria, Brasil.
- Lima, S. (2013). Avaliação das atividades antimicrobiana e citotóxica de metabólitos secundários produzidos pela Actinobactéria ACTMS-9H isolada da rizosfera de *Paullinia cupana* Kunth. Tese de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial. Universidade Federal de Pernambuco, Brasil.
- Lugtenberg, B. & Kamilova, F. (2009). Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. *Annual Review of Microbiology*, 63, 541-556.
- Madigan,M; Martinko,J; Stahl,D & Clark,D. (2012). Chapter 17: *Bacteria – The Proteobacteria: Pseudomonas* and the Pseudomonads *IN* Brock Biology of Microorganisms.13th edition. 517-518. Global Edition. United States of America.
- Madigan,M; Martinko,J; Stahl,D & Clark,D. (2012). Chapter 18: Other *Bacteria* : Filamentous *Actinobacteria – Streptomyces* and relatives *IN* Brock Biology of Microorganisms.13th edition. 557-560. Global Edition. United States of America.
- Mendes,R; Kruijt,M; Bruijn,I de; Dekkers, E; Voort, M van der; Schneider,J; Piceno,Y; DeSantis,T; Andersen,G; Bakker,P & Raaijmakers,J. (2011). Deciphering the rhizosphere microbiome for disease-suppressive Bacteria. *Science*. 332(6033): 1097-1100

- Nagarajkumar, M.; Bhaskaran, R. & Velazhahan, R. (2004). Involvement of secondary metabolites and extracellular lytic enzymes produced by *Pseudomonas fluorescens* in inhibition of *Rhizoctonia solani*, the rice sheath blight pathogen. *Microbiological Research*, 159, 73-81.
- Philippot, L; Raaijmakers, JM; Lemanceau, P & van der Putten, WH. (2013). Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. *Nature Review of Microbiology*. 11: 789-799
- Pridham, T. G. & Gottlieb, D. (1948). The utilization of carbon compounds by some Actinomycetales as an aid for species determination. *University of Illinois*, 107-114.
- Rakesh K, N.; Syed, J.; Dileep, N. & Prashith Kekuda T, R. (2013). Antibacterial and antioxidant activities of *Streptomyces* species SRDP-H03 isolated from soil of Hosudi , Karnataka , India. *Journal of Drug Delivery & Therapeutics*, 3(4), 47-53.
- Ramette, A.; Moenne-Loccoz, Y. & Défago, G. (2003). Prevalence of fluorescent pseudomonads producing antifungal phloroglucinols and / or hydrogen cyanide in soils naturally suppressive or conducive to tobacco black root rot. *FEMS Microbiology Ecology*, 44, 35-43.
- Scherlach, K.; Graupner, K. & Hertweck, C. (2013). Molecular Bacteria-Fungi interactions : Effects on environment , food , and medicine. *Annual Review of Microbiology*, 67, 375-397.
- Schlatter, D.; Fubuh, A.; Xiao, K.; Hernandez, D.; Hobbie, S. & Kinkel, L. (2009). Resource amendments influence density and competitive phenotypes of *Streptomyces* in soil. *Environmental Microbiology*, 57, 413-420.
- Sharma, S. & Kaur, M. (2010). Antimicrobial activities of rhizobacterial strains of *Pseudomonas* and *Bacillus* strains isolated from rhizosphere soil of carnation (*Dianthus caryophyllus* cv . Sunrise). *Indian Journal of Microbiology*, 50, 229-232.
- Shepherd, M.; Kharel, M.; Bosserman, M. & Rohr, J. (2010). Laboratory maintenance of *Streptomyces* species. *National Institutes of Health*, 1-10.
- Subathra Devi, C.; Kumari, A.; Jain, N.; Jemimah Naine, S. & Mohanasrinivasan, V. (2013). Screening of Actinomycetes isolated from soil samples for antibacterial and antioxidant activity. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 5(4), 483-489.
- Weller, D. M. (2007). *Pseudomonas* biocontrol agents of soilborne pathogens : Looking back over 30 years. *Phytopathology*, 97, 250-256.

Anexo A - Meios de cultura

Nutrient Broth (NB)

- 20 g de meio desidratado (Biokar)
- 1000 mL de água destilada

Nutrient Agar (NA)

- 20 g de meio desidratado (Biokar)
- 20 g de agar (Scharlau)
- 1000 mL de água destilada

Yeast Extract Peptone Glucose Agar (YEPGA)

- 10 g de extrato de levedura (Scharlau)
- 10 g de peptona (Gibco)
- 20 g de glucose (Merck)
- 20 g de agar (Scharlau)
- 1000 mL de água destilada

Potato Dextrose Agar (PDA)

- 39 g de meio desidratado (Difco)
- 1000 mL de água destilada

Maltose Yeast extract Malt extract (MYM)

- 4 g de maltose (Biokar)
- 4 g de extrato de levedura (Scharlau)
- 10 g de extrato de malte (Biokar)
- 20 g de agar (Scharlau)
- 1000 mL de água destilada

International Streptomyces Project (ISP-2)

- 4 g de extrato de levedura (Scharlau)
- 10 g de extrato de malte (Biokar)
- 4 g de glucose (Merck)
- 20 g de agar (Scharlau)
- 1000 mL de água destilada

Meio Basal (BSM)

- 2,64 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Scharlau)
- 2,38 g de KH_2PO_4 (Merck)
- 5,65 g de K_2HPO_4 (Merck)
- 1 g de MgSO_4 (Scharlau)
- 0,3 g de extrato de levedura (Scharlau)

- 20 g de agar (Scharlau)
- 1 mL de solução I
- 1000 mL de água destilada

Solução I – Pridham and Gottlieb

- 0,64 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (BD)
- 0,11 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Merck)
- 0,79 g de $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Riedel)
- 0,15 g de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Merck)
- 100 mL de água destilada

Suplementação do meio BSM

- Glucose (Merck)
- Maltose (Biokar)
- Sacarose (Scharlau)
- Manitol (Sigma)
- Xilose (Scharlau)

B-King

- 20 g de peptona (Gibco)
- 10 g de glicerol (Duchefa Biochemie)
- 1,5 g de K_2HPO_4 (Merck)
- 1,5 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Scharlau)
- 18 g de agar (Scharlau)
- 1000 mL de água destilada

Mullër-Hinton Agar (MHA)

- 21 g de Mullër-Hinton Broth (Biokar)
- 17 g de agar (Scharlau)
- 1000 mL de água destilada

Todos os meios foram acertados a pH 7,2 +/- 0,2.

O meio Basal de Sais Minerais para o estudo das fontes de carbono foi esterilizado a 105°C durante 40 minutos. Todos os outros meios foram esterilizados a 121°C durante 15 minutos.

Anexo B: Taxas específicas de crescimento das estirpes bacterianas e fúngicas indicadoras

Tabela 1: Efeito da fonte de carbono e respetiva disponibilidade nas taxas específicas de crescimento das estirpes bacterianas indicadoras. Os valores obtidos foram expressos em Unidades de Absorvência h⁻¹. ND significa que o valor foi não determinado.

	<i>A. calcoaceticus</i>	<i>B. megaterium</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>B. cepacia</i>	<i>E. coli</i>	<i>M. luteus</i>
Controlo NB	0,74	0,88	1,38	0,69	1,67	1,24
Glucose 1%	0,45	1,01	0,97	0,68	0,45	0,90
Glucose 0,4%	0,54	1,40	0,84	0,50	0,39	0,98
Glucose 0,04%	0,57	1,24	0,76	0,71	0,49	0,91
Sacarose 1%	0,85	0,70	0,80	0,43	0,21	0,33
Sacarose 0,4%	0,40	0,48	0,70	0,53	0,13	0,13
Sacarose 0,04%	0,34	ND	0,43	0,57	0,18	0,29
Manitol 1%	0,51	0,63	0,65	0,48	0,72	0,61
Manitol 0,4%	0,20	0,45	0,94	0,50	0,74	0,59
Manitol 0,04%	0,28	0,52	0,59	0,48	0,46	0,42
Maltose 1%	0,56	0,70	0,85	0,63	0,85	0,41
Maltose 0,4%	0,44	0,87	0,90	0,82	0,94	0,36
Maltose 0,04%	0,42	0,50	0,64	0,41	0,84	0,59
Xilose 1%	0,92	ND	0,66	0,42	0,52	0,46
Xilose 0,4%	0,74	0,69	0,62	0,32	0,62	0,69
Xilose 0,04%	0,40	0,35	0,38	0,33	0,45	0,47

Tabela 2: Efeito da fonte de carbono e respetiva disponibilidade nas taxas de crescimento dos fungos. Os valores obtidos foram expressos em milímetros (mm) / dia.

	<i>Alternaria</i> sp.	<i>B. cinerea</i>	<i>Cladosporium</i> sp.	<i>F. culmorum</i>	<i>G. candidum.</i>	<i>Pestalotia</i> sp.	<i>Phoma</i> sp.
Controlo PDA	12,5	19,0	2,4	12,0	7,8	7,2	14,0
Glucose 1%	8,5	7,5	2,3	18,0	7,5	10,0	10,1
Glucose 0,4%	10,6	9,5	2,5	16,0	10,0	7,3	8,5
Glucose 0,04%	9,5	6,0	2,1	14,0	13,0	7,8	9,0
Sacarose 1%	8,3	6,0	2,4	14,6	8,0	9,3	9,5
Sacarose 0,4%	7,7	4,5	1,9	13,8	8,2	8,0	9,2
Sacarose 0,04%	7,1	3,3	1,0	15,5	8,3	7,5	6,5
Manitol 1%	7,8	1,5	1,4	10,0	7,7	6,6	8,0
Manitol 0,4%	7,6	1,8	1,5	16,5	6,7	5,8	6,3
Manitol 0,04%	7,5	1,8	1,5	12,5	6,2	7,7	6,3
Maltose 1%	8,5	9,0	1,7	14,8	8,6	8,3	10,6
Maltose 0,4%	8,8	6,9	2,3	17,5	8,3	8,4	7,7
Maltose 0,04%	8,5	5,0	2,1	14,7	8,4	7,9	8,9
Xilose 1%	6,5	8,3	1,5	15,0	10,0	9,7	10,4
Xilose 0,4%	10,5	4,0	2,3	12,5	10,0	9,2	9,8
Xilose 0,04%	10,8	3,7	1,7	10,0	11,0	8,8	8,6

Anexo C - Quantificação da atividade antimicrobiana no ensaio de co-evolução à escala laboratorial

A quantificação de atividade antimicrobiana de *P. kilonensis* CAP1 e *P. putida* CAP4 em mono e em co-cultura foi avaliada pela aplicação dos respetivos extratos extracelulares sobre *B. subtilis* através do teste de difusão em agar (Bauer *et al.*, 1966), utilizando como referência positiva o antibiótico cloranfenicol.

Teste de difusão em agar

Curva de calibração de halos de inibição de crescimento em função da concentração de cloranfenicol

Na Figura 1 está representada a curva de calibração de halos de inibição de crescimento de *B. subtilis* em função da concentração de cloranfenicol ($R^2 = 0,99$).

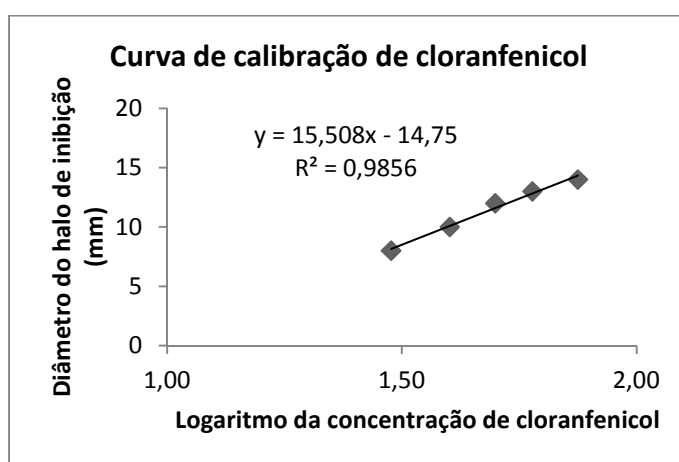


Figura 1: Curva de calibração de halos de inibição de crescimento em função da concentração de cloranfenicol

Como se pode verificar concentrações de antibiótico abaixo de 15 $\mu\text{g/mL}$ não foram reveladas pelo método de difusão em agar. Deste modo considerou-se que a sensibilidade mínima do método utilizado foi 30 $\mu\text{g/mL}$.

Apesar de ao longo dos ensaios de interação (realizados em meio sólido e confrontando diretamente os microrganismos) ter sido detetada atividade antimicrobiana pelas estirpes *P. kilonensis* CAP1 e *P. putida* CAP4, quando se aplicaram os extratos extracelulares das respetivas culturas em meio líquido nenhum revelou atividade antimicrobiana contra *B. subtilis*.

Este resultado pode indicar que o composto antimicrobiano não foi produzido em meio líquido (Bertrand *et al.*, 2014), devido a ser um meio não estruturado, evidenciando a necessidade do contato entre células para que o composto seja produzido, assim como o contato com a estirpe contra a qual o composto atua (Garbeva *et al.*, 2011). Por outro lado, no caso do composto biologicamente ativo ser produzido em baixas concentrações e estar diluído no meio, pode não ser detetável por estar abaixo da sensibilidade do método utilizado (30 $\mu\text{g/mL}$).