

**Objetivo:** observar as diferentes fenofases do ciclo de vida de isolados de *Streptomyces* e identificar fenótipos induzidos por compostos voláteis emitidos por microrganismos. Reconhecer a possibilidade de envolvimento de alguns compostos voláteis (e a sua natureza) na indução de fenótipos específicos de algumas estirpes de *Streptomyces*.

### Estratégia

1. Cultivar estirpes de *Streptomyces* e de leveduras em caixas “normais”, bipartidas e tripartidas (para que não haja possibilidade de contacto físico entre as duas colónias).
2. Identificar padrões de interação ao nível da morfologia das colónias.

### Teoria

O solo é um hotspot de biodiversidade. No entanto a vida no solo não é fácil. A limitação de recursos é uma constante transversal a todos os nichos e por isso a comunicação e a regulação do crescimento das várias populações é algo bem regulado. O comportamento microbiano de uma determinada população de microrganismos do solo é, atualmente, reconhecido como sendo o resultado da interação do meio e de todos os organismos vizinhos, podendo estes estar envolvidos na alteração de perfis de resistência a antibióticos, no crescimento ou na alteração do perfil de metabolitos secundários.

Esta comunicação pode estabelecer-se entre organismos filogeneticamente muito distantes, como é o caso dos *Streptomyces* e das leveduras tendo sido demonstrado que a presença de alguns *Streptomyces* e leveduras podem regular o desenvolvimento uns dos outros pela emissão de compostos voláteis. Muitas leveduras emitem compostos voláteis capazes de induzir a formação de crescimento exploratório em *Streptomyces*. O crescimento exploratório é caracterizado pela extensão lateral e irregular das células em situação de stress. Estas células exploratórias possuem uma conformação de hifas vegetativas, aéreas, não ramificadas, que são capazes de proliferar rápida e extensivamente, ao contrário das células em crescimento vegetativo que possuem um aspeto mais denso e volumoso.

Sabendo que ambos, *Streptomyces* e leveduras, são conhecidos produtores de compostos voláteis (VOCs), este trabalho tem por objetivo mostrar o envolvimento deste tipo de compostos na regulação do desenvolvimento fenotípico dos organismos do solo.

## Procedimento

### Aula de 23 de fevereiro (laboratório)

#### Materiais

- 1 caixa de Petri com *Saccharomyces cerevisiae*
- 1 caixa de duas estirpes de *Streptomyces* da coleção de Ciências
- Caixas de Petri normais, bipartidas e tripartidas
- 2 L de meio YPDA (a composição do meio YPDA por cada litro é a seguinte: 10 g de extrato de levedura, 20 g de peptona, 20 g de glucose e 15 g de agar)
- Ansas
- Palitos esterilizados
- Carvão ativado
- Ácido sulfúrico
- Água estéril
- Lamparinas
- Discos de papel
- Espátulas

**NOTA:** Cada grupo irá estudar o comportamento de uma estirpe de *Streptomyces* (designada como *Streptomyces\_X*) ao longo deste protocolo. Para avaliar o efeito da interação e/ou comunicação entre a estirpe *Streptomyces\_X* e organismos filogeneticamente distantes ou próximos, cada grupo irá trabalhar com uma estirpe de leveduras, e uma outra estirpe de *Streptomyces* (i.e., *Streptomyces\_Y*).

#### **Experiência A. Culturas em caixas “normais” – organismos isolados**

1. Plaquear o meio de cultura na caixa de Petri.
2. Inocular cada caixa de Petri com um organismo *Streptomyces* ou levedura. Preparar em triplicado.
3. Selar as caixas com parafilme e incubar todas as caixas a 28 °C por uma semana. Cada grupo irá utilizar apenas 1 estirpe de *Streptomyces* e a estirpe de levedura. Assim, cada grupo terá 2 situações com 3 réplicas.

#### **Experiência B. Culturas em caixas “normais” – interação e comunicação entre organismos**

1. Plaquear o meio de cultura na caixa de Petri.
2. Inocular cada caixa de Petri com dois organismos (idênticos ou diferentes) separados cerca de 3 mm, de modo a obter todas as seguintes combinações: *Streptomyces\_X* com levedura; e *Streptomyces\_X* com *Streptomyces\_Y* (de estirpes diferentes). Preparar as combinações em triplicado.
3. Selar as caixas com parafilme e incubar todas as caixas a 28 °C por uma semana. Assim, cada grupo terá 2 combinações com 3 réplicas.

**Experiência C. Culturas em caixas bipartidas – comunicação via composto volátil**

1. Plaquear o meio de cultura nos dois compartimentos das caixas de Petri.
2. Inocular cada caixa de Petri com dois organismos (idênticos ou diferentes; cada um num compartimento distinto) ou somente *Streptomyces\_X* de modo a obter as seguintes combinações: 1) *Streptomyces\_X* com levedura; 2) *Streptomyces\_X* com *Streptomyces\_Y* (de estirpes diferentes); e 3) *Streptomyces\_X* e amónia. Preparar as combinações em triplicado.
3. Selar as caixas com parafilme e incubar todas as caixas a 28 °C por uma semana. Assim, cada grupo terá 2 combinações com 3 réplicas.

**Experiência D. Culturas em caixas tripartidas – natureza alcalina do sinal químico**

1. Plaquear o meio de cultura em dois dos três compartimentos das caixas de Petri.
2. Inocular cada caixa de Petri com dois organismos (idênticos ou diferentes; cada um num compartimento distinto com meio) de modo a obter as seguintes combinações: 1) *Streptomyces\_X* com levedura; e 2) *Streptomyces\_X* com *Streptomyces\_Y* (de estirpes diferentes). Preparar as combinações em triplicado.
3. Colocar no 3º compartimento:
  - 3.1. um disco de papel embebido em água esterilizada (controlo);
  - 3.2. carvão ativado;
  - 3.3. três discos de papel embebido em ácido sulfúrico;
4. Selar as caixas com parafilme e incubar todas as caixas a 28 °C por uma semana. Atenção, estas caixas não devem ser invertidas! Assim, cada grupo terá 2 combinações de microrganismos, com 3 situações e com 3 réplicas.

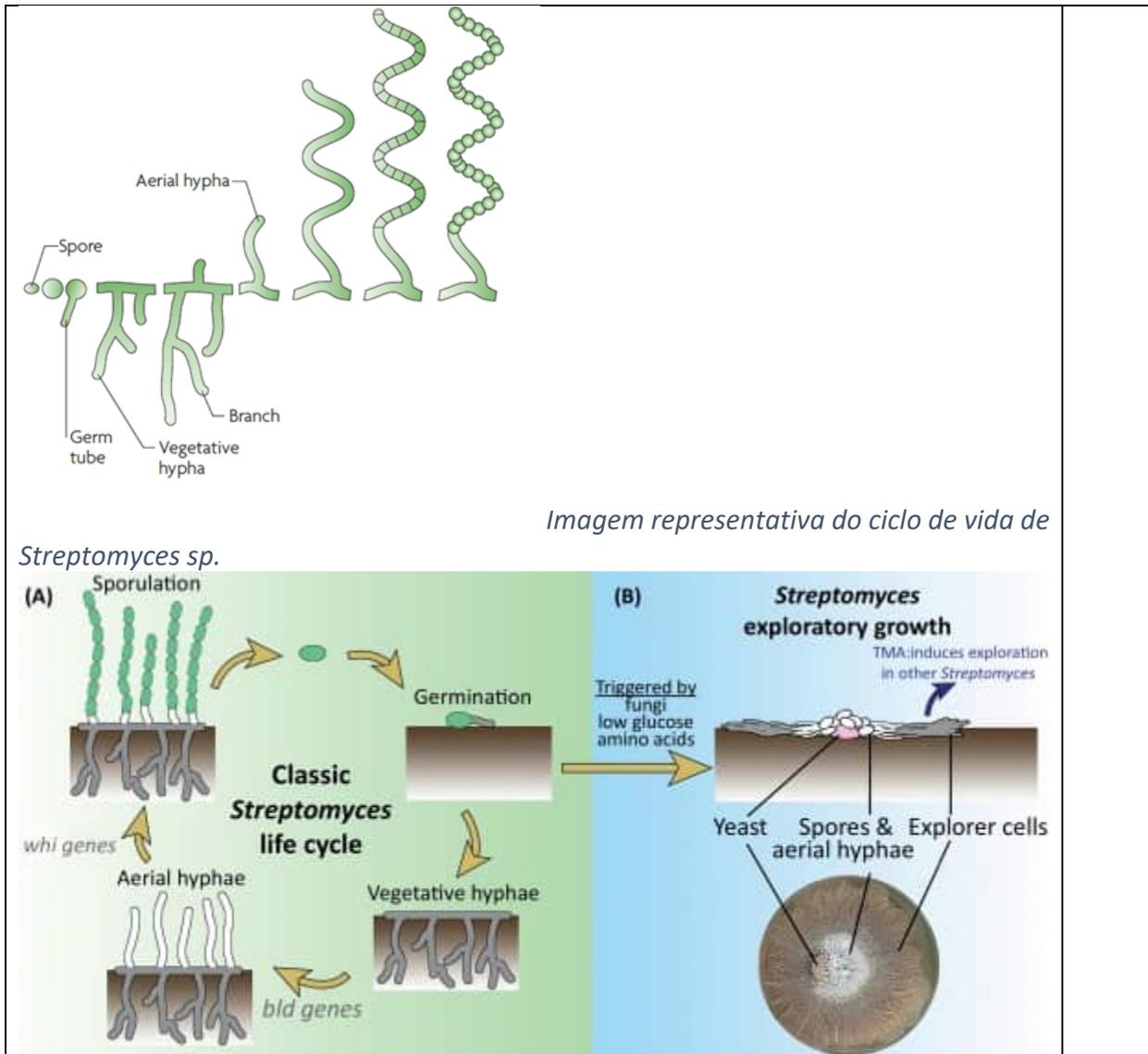
**Aula de 2 de março (laboratório)**

Materiais

- Caixas inoculadas na aula anterior
- Máquina fotográfica
- Régua
- Papel indicador de pH
- Solução de corante

**Observação das caixas (normais, bipartidas e tripartidas)**

- 1 – Registrar o crescimento do material biológico (i.e., medir o diâmetro aproximado de crescimento das colónias) e o fenótipo apresentado (ver figura abaixo). Fotografar.
- 2 – Identificar as diferentes fases do ciclo de vida dos *Streptomyces* de acordo com o esquema



3 – Medir o pH do meio nos compartimentos onde os microrganismos foram inoculados utilizando papel indicador de pH.

4 – Testar a hidrofobicidade das hifas aéreas de *Streptomyces* usando 1 gota de solução de corante.

### Questões a discutir:

1. Explique qual o objetivo de cada uma das situações experimentais propostas (A-D) e de que forma contribuem para o objetivo deste tema.
2. Quais as vantagens da produção de micélio exploratório?
3. Quais os estímulos que podem induzir esse fenótipo?
4. Justifique a escolha dos compostos utilizados no terceiro compartimento das caixas tripartidas.

5. Sugira uma experiência adicional para estudar quais os fatores que desencadeiam as diferentes fenofases do ciclo de vida de isolados de *Streptomyces*.
6. Refira possíveis significados ecológicos da comunicação entre organismos filogeneticamente distantes.

**Referências**

- Jones, S. E. & Elliot, M. A. Streptomyces Exploration: Competition, Volatile Communication and New Bacterial Behaviours. *Trends Microbiol.* 25, 522–531 (2017).
- Jones, S. E. et al. Streptomyces exploration is triggered by fungal interactions and volatile signals. *Elife* 6, 1–21 (2017).