

**Universidade dos Açores**

**Departamento de Ciências Agrárias**



***Estudo da actividade antimicrobiana de isolados provenientes  
de ambientes vulcânicos da Ilha Terceira - Açores - contra  
microrganismos indicadores relacionados com ambientes  
alimentares***

Dissertação de Mestrado em Tecnologia e Segurança Alimentar

Orientador: Professora Doutora Maria de Lurdes Nunes Enes Dapkevicius

Co-Orientador: Doutora Cristina Riquelme Gabriel

Doutor Airidas Dapkevicius

Márcia Catarina Mendes Coelho

Angra do Heroísmo

2011

## **Agradecimentos**

À orientadora da tese, Doutora Professora Maria de Lurdes Dapkevicius, pela disponibilidade, conhecimentos transmitidos e ajuda prestada na elaboração do trabalho escrito;

Aos Co-orientadores Doutor Airidas Dapkevicius e de forma especial à Doutora Cristina Gabriel pelo apoio prestado durante o trabalho prático e teórico;

Ao colega de laboratório, Mestre António Louvado, pelo incentivo e grande colaboração durante todo este trabalho;

Às colegas Dra Sandra Câmara e Mestre Susana Ribeiro pela optimização de metodologias e às restantes que de uma ou outra forma também colaboraram;

À Dona Berta Borges e Dona Guida Pires pelo auxílio no laboratório;

À Doutora Diana Northup pelo trabalho de sequenciação dos isolados;

Ao Doutor Pedro Cardoso por ter permitido usar algumas das suas belíssimas fotos de grutas;

Ao Técnico Fernando Pereira (Pardal) pela colaboração na identificação das grutas;

À grande amiga, Célia Silva, pelo companheirismo, paciência, ânimo, apoio, confiança e boa disposição que sempre me transmitiu;

Por fim, mas não menos importante agradeço à minha família, e de forma muito especial ao meu namorado Elias pela paciência que teve e por ter permanecido ao meu lado nos momentos mais difíceis.

## Resumo

No decurso das últimas décadas, muitas bactérias entre as quais, importantes patógenos de transmissão alimentar, adquiriram resistência aos antibióticos actualmente disponíveis, relançando a necessidade de pesquisar novas moléculas dotadas de actividade antimicrobiana. Os ambientes extremos albergam comunidades microbianas únicas, que podem ser exploradas como fontes de compostos com actividade antimicrobiana. Devido à sua natureza vulcânica, ocorrem nos Açores numerosos habitats terrestres extremos, como os tubos lávicos e as fumarolas, cujo potencial biotecnológico não foi ainda explorado.

Este trabalho teve como objectivos caracterizar morfofisiologicamente isolados provenientes de biofilmes de tubos de lava - Terra Mole e Branca Opala - e de amostras de solo das fumarolas - Furnas do Enxofre; rastrear os microorganismos com actividade antimicrobiana contra microorganismos indicadores relacionados com ambientes alimentares; isolar e caracterizar preliminarmente as fracções dotadas de actividade antimicrobiana para os microorganismos com maior actividade.

Estudaram-se 27 isolados provenientes de dois tubos lávicos e 3 isolados oriundos de fumarolas, situados na ilha Terceira. Todos os isolados foram caracterizados do ponto de vista morfofisiológico (morfologia das colónias, reacção ao Gram, catalase, oxidase, redução nitratos e mobilidade). A actividade antimicrobiana dos 30 isolados contra 8 microorganismos indicadores (*Proteus* sp., *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028, *E.coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 9144, *Staphylococcus aureus* ATCC 29523, *Listeria innocua* ATCC 33090, *Listeria monocytogenes* ATCC 7466) foi avaliada inicialmente por inoculação cruzada. Quatro isolados representativos com actividade antimicrobiana (GBO31C, GTM1B2, GBO69B e P2-1) foram seleccionados para o estudo do efeito das condições de cultivo sobre os parâmetros de crescimento (OD<sub>max</sub>,  $\mu_{max}$ ,  $\lambda$  e T.est.) e a actividade antimicrobiana, avaliada pelo ensaio de difusão em agar por inoculação em poços. Os isolados GBO31C, GTM1B2 e GBO69B foram identificados por sequenciação do gene que codificam o ARNr da subunidade 16S. O efeito do tipo de preparação da amostra (cultura inteira vs. sobrenadante) sobre a actividade antimicrobiana do isolado P2-1, foi avaliado pelo método de difusão em agar, por poços e discos. Por último procedeu-se à caracterização preliminar da actividade antimicrobiana do isolado P2-1, nomeadamente por ensaios de termoestabilidade, degradação enzimática e precipitação de proteínas com sulfato de amónio.

Os 30 isolados em estudo apresentaram uma elevada diversidade fenotípica, estando representados entre eles 7 dos 16 grupos morfofisiológicos possíveis. A redução de nitratos (cerca de 40% dos isolados) e a mobilidade (23% de isolados móveis) foram frequentes. Dos isolados estudados, 77% inibiram pelo menos um dos 8 indicadores testados. No que toca aos locais de amostragem, todos os isolados obtidos a partir das fumarolas foram inibidores contra os microorganismos indicadores testados. Nos tubos lávicos, a frequência de isolados com antibiose foi superior nos tapetes amarelo e rosa. Os ensaios realizados com isolados do filo das Proteobactérias (GBO31C e GTM1B2) e isolado do género *Enterococcus* (GBO69B) permitiram compreender que as condições de incubação (temperatura e

meio de cultura) influenciam a actividade antimicrobiana. Verificou-se também que as condições óptimas para a antibiose diferem das condições óptimas para o crescimento de cada microrganismo. A comparação dos resultados da avaliação da actividade antimicrobiana do GBO31C, GTM1B2 e P2-1 pelos métodos da inoculação cruzada e dos poços, indicou que o modo de vida em biofilme favoreceu a antibiose nestes isolados. O mesmo não se verificou em relação ao isolado GBO69B. O isolado P2-1 (G+Ox+Cat-n) apresentou actividade antimicrobiana de largo espectro. Observou-se que a remoção das células, o tratamento térmico a 100°C, a extracção por *n*-butanol e a adição das enzimas proteinase K,  $\alpha$ -quimotripsina, tripsina e  $\alpha$ -amilase não afectaram a actividade antimicrobiana deste isolado. Pelo contrário, o tratamento térmico a 121°C, com sulfato de amónio, com neutrase e a extracção com *n*-hexano e acetato de etilo, eliminaram a actividade antimicrobiana de culturas do P2-1. Isto indica que para a actividade antimicrobiana deste isolado deverão contribuir composto(s) proteico(s) de polaridade média.

Os nossos dados indicam que as bactérias dos ambientes extremos dos Açores (ilha Terceira) poderão ser uma fonte promissora de antibióticos e de outros compostos antimicrobianos com interesse industrial.

## Summary

In the recent decades, many bacteria among which important food borne pathogens, have acquired resistance to the antibiotics that are presently available, raising the need to search for novel compounds with antimicrobial activity. Extreme environments are home to unique microbial communities that can be exploited as sources of antimicrobial compounds. Due to their volcanic origin, the Azores possess countless terrestrial extreme environments, such as lava tubes and sulfur vents, whose biotechnological potential is yet to be exploited.

The present work aimed at the morphophysiological characterization of isolates from biofilms in lava tubes – Terra Mole and Branca Opala - and from sulfur vents – Furnas do Enxofre, screening these isolates for their antimicrobial activity against food-related indicator microorganisms; isolating and preliminarily characterizing the anti-microbially active fractions of the most active bacteria.

Twenty-seven isolates from two lava tubes and three isolates from sulfur vents located in Terceira Island (Azores, Portugal) were studied. All isolates were characterized from the morphophysiological point of view (colony morphology, Gram reaction, catalase, oxidase, nitrate reduction and motility). Antimicrobial activity of the 30 isolates was initially studied against 8 indicator microorganisms (*Proteus* sp., *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028, *E.coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 9144, *Staphylococcus aureus* ATCC 29523, *Listeria innocua* ATCC 33090, *Listeria monocytogenes* ATCC 7466) by the cross-streak assay. Four representative isolates with antimicrobial activity (GBO31C, GTM1B2, GBO69B and P2-1) were selected for studying the effect of cultivation conditions on their growth parameters (OD<sub>max</sub>,  $\mu_{max}$ ,  $\lambda$  e T.est.) and on their antimicrobial activity, evaluated by the well-assay. Identification of the isolates GBO31C, GTM1B3 and GBO69B was attempted by sequencing the genes that code for rRNA from the 16S subunit. The effect of sample preparation (whole culture vs. cell-free supernatant) on the antimicrobial activity of isolate P2-1 was evaluated by the well-assay and disk assay methods. Finally, preliminary characterization of the antimicrobial activity of cell-free supernatants from P2-1 was carried out by testing the effect of heat, enzymes, and ammonium sulfate precipitation.

The 30 isolates under study displayed considerable phenotypic diversity, with 7 of the 16 possible morphological groups represented. Nitrate reduction and motility were frequent. Seventy-seven percent of the studied isolates inhibited at least one of the 8 indicators tested. Concerning the sampling locations, all isolates from sulfur vents were inhibitory against the tested pathogens. In lava tubes, the frequency of antibacterial isolates was higher in the yellow and pink mats when compared with white and tan biofilms. Tests carried out in two isolates belonging to the Proteobacteria (GBO31C and GTM1B2) and one *Enterococcus* isolate (GBO69B) showed that cultivation conditions (temperature and culture media) influenced their antimicrobial activity. It was also observed that optimal conditions for antibiosis differ from the optimal conditions for growth in the tested organisms. Comparison of the results of the evaluation of antimicrobial activity of GBO31C, GTM1B2 and P2-1 by the cross-streak and well-assay methods indicated that the biofilm lifestyle enhanced antibiosis in these isolates. The same

did not occur for isolate GBO69B. Isolate P2-1 (G+Ox+Cat-n) displayed broad-spectrum antimicrobial activity. In this isolate, removing the cells from the spent culture, heat treatment at 100°C, extraction with *n*-butanol and addition of proteinase K,  $\alpha$ -chymotrypsin, trypsin and  $\alpha$ -amylase did not affect antimicrobial activity, whereas thermal treatment at 121°C, precipitation with ammonium sulfate, treatment with neurase, extraction with *n*-hexane and ethyl acetate eliminated the antibiosis effect. This indicates that mid-polarity proteic compound(s) contribute to the antimicrobial activity of P2-1.

Our data show that bacterial isolates from Azorean (Terceira Island) extreme environments hold potential as a source of novel antibiotics and other antimicrobial compounds of industrial interest.

## Índice

Agradecimentos.....	ii
Resumo.....	iii
Summary .....	v
1. Enquadramento .....	1
1.1. Objectivos: .....	4
2. Revisão Bibliográfica .....	5
2.1. O problema da resistência bacteriana aos antibióticos .....	5
2.2. Antibióticos e outras substâncias antimicrobianas.....	6
2.3. Ambientes vulcânicos .....	8
2.4. Biofilmes bacterianos .....	10
2.4.1. Formação de biofilmes .....	10
2.4.2. Factores que influenciam a formação de biofilme .....	11
2.4.3. Composição dos biofilmes .....	12
2.4.4. Benefícios de viver em biofilme .....	13
2.4.5. Biofilmes como potenciais fontes de compostos antimicrobianos.....	14
3. Metodologia .....	16
3.1. Local de amostragem .....	16
3.2. Culturas bacterianas.....	18
3.3. Caracterização morfofisiológica.....	20
3.3.1. Morfologia das colónias.....	20
3.3.2. Teste de Gram por KOH .....	20
3.3.3. Teste da Catalase.....	21
3.3.4. Teste da oxidase .....	21
3.3.5. Teste de redução dos nitratos.....	21

3.3.6. Coloração de Gram .....	22
3.3.7. Mobilidade .....	22
3.4. Rastreio de microorganismos com actividade antimicrobiana contra microorganismos indicadores relacionados com ambientes alimentares.....	22
3.4.1. Microrganismos indicadores .....	22
3.4.2. Ensaio de inoculação cruzada .....	23
3.5. Estudo da cinética de crescimento.....	24
3.5.1. Condições de incubação .....	24
3.5.2. Condições de leitura .....	25
3.5.3. Recolha de dados.....	25
3.5.4. Cálculo dos parâmetros da curva de crescimento .....	26
3.6. Identificação dos isolados por métodos de Biologia Molecular .....	26
3.7. Ensaio de difusão em agar por inoculação em poços .....	27
3.8. Partição e caracterização dos compostos bioactivos de amostras do isolado P2-1 .....	29
3.8.1. Bioactividade da cultura inteira vs. sobrenadante .....	29
3.8.2. Partição em solventes guiada por ensaios de bioactividade .....	30
3.8.3. Estudo da termostabilidade, sensibilidade enzimática e à precipitação com sulfato de amónio.....	31
4. Resultados e Discussão.....	32
4.1. Caracterização morfofisiológica.....	32
4.2. Estudo da actividade antimicrobiana .....	34
4.2.1. Ensaio de inoculação cruzada .....	34
4.3. Estudo da cinética de crescimento.....	37
4.3.1. Cálculo dos parâmetros da curva de crescimento .....	37
4.4. Identificação dos isolados.....	40
4.5. Ensaio de difusão em agar por inoculação em poços .....	41

4.6. Partição e caracterização dos compostos bioactivos de amostras do isolado P2-1 .....	47
4.6.1. Bioactividade da cultura inteira vs. sobrenadante .....	47
4.6.2. Partição em solventes guiada por ensaios de bioactividade .....	48
4.6.3. Estudo da termostabilidade, sensibilidade enzimática e à precipitação com sulfato de amónio.....	48
5. Conclusões.....	50
6. Bibliografia.....	51
7. Anexos.....	59

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Representação da junção de três placas tectónicas e da microplaca dos Açores.....	1
<b>Figura 2.</b> Representação da formação de um tubo de lava .....	2
<b>Figura 3.</b> Esquema representativo da formação de biofilmes .....	11
<b>Figura 4.</b> Representação da acumulação de um biofilme ao longo do tempo. ....	12
<b>Figura 5.</b> Biofilmes formando tapetes microbianos na gruta Terra Mole .....	13
<b>Figura 6.</b> Mapa da ilha Terceira com os pontos de amostragem .....	16
<b>Figura 7.</b> Tapetes microbianos. ....	17
<b>Figura 8.</b> Locais de amostragem.....	18
<b>Figura 9.</b> Placa inoculada no teste da inoculação cruzada. ....	24
<b>Figura 10.</b> Actividade antimicrobiana dos isolados segundo cada grupo morfofisiológico. ....	35
<b>Figura 11.</b> Número de microrganismos indicadores inibidos por cada isolado.....	36
<b>Figura 12.</b> Proporção de isolados inibidores de cada microrganismo indicador .....	36
<b>Figura 13.</b> Número de isolados inibidos segundo o local de amostragem.....	36
<b>Figura 14.</b> Actividade antimicrobiana dos isolados segundo os tapetes de origem. ....	36
<b>Figura 15.</b> Valores médios dos parâmetros da curva de crescimento .....	39
<b>Figura 16.</b> Efeito dos meios de cultura sobre a actividade antimicrobiana dos isolados GBO31C, GTM1B2 e GBO69B. ....	43
<b>Figura 17.</b> Efeito da temperatura de incubação sobre a actividade antimicrobiana dos isolados GBO31C, GTM1B2 e GBO69B.....	44
<b>Figura 18.</b> Efeito da fase da curva de crescimento sobre a actividade antimicrobiana dos isolados GBO31C, GTM1B2 e GBO69B.. ....	45
<b>Figura 19.</b> Efeito de culturas inteiras (Ci) e de culturas isentas de células (S) sobre a actividade antimicrobiana do P2-1, avaliada pelo método da difusão em agar com inoculação em poços.....	46
<b>Figura 20.</b> Avaliação da actividade antimicrobiana na cultura inteira (Ci) e no sobrenadante (S) do isolado P2-1, avaliada pelo método da difusão em agar com inoculação em discos .....	47

<b>Figura 21.</b> Actividade antimicrobiana da fase aquosa e não aquosa obtida após partição da cultura P2-1 com solventes .....	48
--	----

## Índice de quadros

<b>Quadro 1.</b> Descrição dos locais de amostragem dos isolados estudados. ....	16
<b>Quadro 2.</b> Características dos ambientes originários dos isolados bacterianos estudados. ....	19
<b>Quadro 3.</b> Microrganismos indicadores. ....	23
<b>Quadro 4.</b> Caracterização física das colónias e fisiológica dos isolados. ....	33
<b>Quadro 5.</b> Agrupamento dos isolados segundo os seus caracteres fenotípicos. ....	34
<b>Quadro 6.</b> Resultados da identificação dos isolados por sequenciação do gene codificante do ARNr da subunidade 16S. ....	40
<b>Quadro 7.</b> Comparação do espectro de inibição obtido pelo método de inoculação cruzada e pelo método de difusão em agar por inoculação em poços de todos os isolados. ....	47
<b>Quadro 8.</b> Efeito do tratamento com diferentes temperaturas, enzimas e sulfato de amónio sobre a actividade antimicrobiana do isolado P2-1, avaliada pelo método de difusão em agar por poços. ....	49

## 1. Enquadramento

O Arquipélago dos Açores, situado no nordeste do Oceano Atlântico entre as latitudes 37°-40° Norte e as longitudes 25°-31° Oeste, é constituído por nove ilhas distribuídas por três grupos. O grupo Oriental, o grupo Central e o grupo Ocidental representam a parte emersa da designada plataforma dos Açores e, por outro lado, o contacto de três placas litosféricas: a Norte Americana, a Euroasiática e a Africana (Aguiar *et al.*, 2009) (Figura 1.). A junção destas três placas é responsável pela intensa actividade sísmo-vulcânica que caracteriza o arquipélago e que levou à sua formação (Figueiredo, 2011).



Figura 1. Representação da junção de três placas tectónicas e da microplaca dos Açores (GESPEA, 2005).

A natureza vulcânica dos Açores está bem patente na sua paisagem dominada por vulcões, crateras, escoadas de lava bem como as estruturas que se desenvolvem abaixo da superfície, as cavidades vulcânicas (Figueiredo, 2011). Existem cerca de 250 cavidades subterrâneas naturais inventariadas no Arquipélago dos Açores (Aguiar *et al.*, 2009), das quais 69 encontram-se na ilha Terceira (Nunes *et al.*, 2008), e outros fenómenos vulcânicos, como as fumarolas.

As cavidades vulcânicas podem ser consideradas de dois tipos, algares vulcânicos ou tubos lávicos. Os tubos lávicos são condutas que se desenvolvem maioritariamente, na horizontal e por vezes atingem grandes dimensões. A sua formação dá-se do seguinte modo: à medida que as escoadas lávicas mais fluidas descem os declives, dá-se o arrefecimento das suas zonas superficiais e laterais e forma-se uma crosta mais ou menos sólida, debaixo da qual continua a escorrer lava

ainda quente; a lava incandescente pode sofrer abaixamento, devido a uma diminuição nas emissões do vulcão, surgindo, assim um vazio sob a crosta superficial já solidificada; quando termina a erupção vulcânica, fica formado o túnel ou gruta lávica, a qual se pode desenvolver por alguns metros ou quilómetros de extensão (Gespea, 2005) (Figura 2).

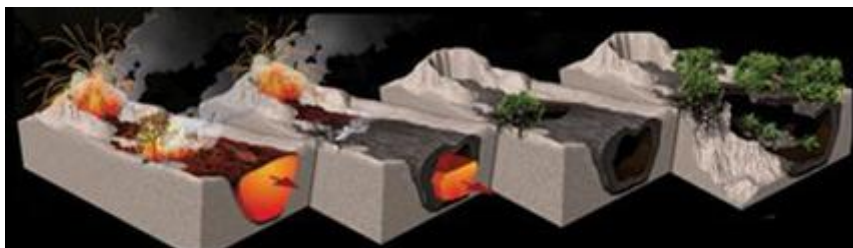


Figura 2. Representação da formação de um tubo de lava (Figueiredo, 2011).

As fumarolas, nomeadamente as Furnas do Enxofre, na ilha Terceira, correspondem a “um fenómeno de vulcanismo secundário, que consiste na libertação de gases para a superfície através de um sistema de fissuras, em torno das quais se formam alguns depósitos de enxofre” (Decreto Legislativo Regional n.º 10/2004/A, 23 de Março de 2004). Este tipo de ambiente alberga microrganismos extremófilos adaptados a sobreviver em nichos ecológicos extremos (Riquelme *et al.*, 2010).

Uma vez que as bactérias possuem uma enorme facilidade de colonizar qualquer superfície, revelam uma elevada capacidade de resistência e adaptação a condições ambientais extremas, como os tubos de lava e os campos fumarólicos (Pereira, 2001; Riquelme *et al.*, 2010).

Para melhor se adaptarem e sobreviverem em ambientes extremos, as bactérias aderem a superfícies, formando comunidades sésseis, em detrimento de formas de vida planctónicas (suspensas e dispersas num ambiente aquático) (Pereira, 2001). As comunidades sésseis desenvolvem estruturas morfológica e fisiologicamente diferentes das formas planctónicas (Davies *et al.*, 1998). O termo biofilme surgiu para descrever o modo de desenvolvimento sésseis que se caracteriza, essencialmente, pela adesão de bactérias a suportes sólidos, com consequente produção de substâncias poliméricas extracelulares, constituindo-se, então uma rede gelatinosa que imobiliza e protege as células microbianas (Pereira, 2001). As unidades básicas estruturais de um biofilme são as microcolónias (Donlan e Costerton, 2002).

Segundo Costerton *et al.* (1987), mais de 90% dos microrganismos do planeta vivem sob a forma de biofilmes. O biofilme é uma forma organizada de vida microbiana capaz de se adaptar a condições ambientais extremas, como temperaturas elevadas ou baixas, elevadas pressões, valores de pH baixos ou elevados, radioactividade, ou elevadas concentrações de metais pesados (Wilson e Brimble, 2008).

Os tubos de lava têm microclimas específicos, com alta humidade, podendo chegar a 100% de humidade relativa, temperaturas que variam de 10° a 15°C, e baixa fonte de nutrientes, possuindo assim características abióticas e bióticas especiais (Engel, 2007; Groth e Saiz-Jimenez, 1999). Nestes ambientes extremos, a actividade antimicrobiana, nomeadamente a produção de antibióticos, poderá ser estudada nas comunidades sésseis em biofilmes uma vez que parece existir uma relação entre a produção de antibióticos e a formação de biofilmes (Stein, 2005).

As pesquisas acerca de comunidades microbianas dos tubos lávicos ainda são poucas, e principalmente nos Açores as informações sobre estes ambientes hostis é muito escassa. Contudo, estudos desenvolvidos na Universidade dos Açores têm demonstrado que os ambientes vulcânicos açorianos, entre os quais os tubos de lava, são muito ricos em biofilmes e evidenciam provas de albergarem uma biodiversidade considerável de microrganismos, incluindo grupos taxonómicos de bactérias que não tinham ainda sido descritas. Algumas das bactérias presentes nesses biofilmes apresentaram actividade contra microrganismos indicadores humanos, podendo ser fontes promissoras de antibióticos para o tratamento de doenças infecciosas em humanos (Câmara *et al.*, 2008).

Tratando-se de ecossistemas pouco explorados, este tipo de ambientes vulcânicos pode ser promissor relativamente à descoberta de novas espécies de bactérias e, conseqüentemente, de novos antibióticos que sejam eficazes e que contribuam de algum modo para combater o problema da resistência bacteriana.

### **1.1. Objectivos:**

Os objectivos deste trabalho foram:

- Caracterizar morfofisiologicamente isolados provenientes de biofilmes de tubos de lava - Terra Mole e Branca Opala - e de amostras de solo das fumarolas - Furnas do Enxofre;
- Rastrear os microorganismos com actividade antimicrobiana contra microorganismos indicadores relacionados com ambientes alimentares;
- Isolar e caracterizar preliminarmente as fracções dotadas de actividade antimicrobiana para os microorganismos com maior actividade.

## 2. Revisão Bibliográfica

### 2.1. O problema da resistência bacteriana aos antibióticos

Apesar de terem passado mais de 50 anos desde a implementação da produção em larga escala da penicilina, de se terem descoberto muitos outros antibióticos de origem microbiana e de se terem modificado outros tantos por síntese química, a guerra contra os microrganismos patogênicos ainda está longe de terminar. O uso indiscriminado e inapropriado de antibióticos, em humanos e nos animais implicados na produção de alimentos, conduziu ao aparecimento de resistências múltiplas aos antibióticos em muitas das principais bactérias patogênicas (Alanis, 2005).

A resistência antimicrobiana, apesar de não ser um problema recente, ocorre actualmente sem precedentes podendo afectar severamente a saúde pública (Norrby *et al.*, 2005). As bactérias clinicamente relevantes têm evidenciado múltiplas resistências a antibióticos comerciais (Livermore, 2007), sendo que algumas bactérias patogênicas já desenvolveram resistência a todas as diferentes classes de antibióticos descobertas até à data (Levy, 2002). Os primeiros casos de resistência a compostos antimicrobianos ocorreram no final da década de 30, início da década de 40, logo após a introdução das primeiras classes de antibióticos, as sulfonamidas e a penicilina. As primeiras estirpes resistentes apareceram inicialmente em ambientes hospitalares, onde havia uso intensivo de antibióticos (Levy, 1998). A resistência a múltiplas drogas foi primeiramente detectada entre bactérias entéricas, nomeadamente, *Escherichia coli*, *Shigella* e *Salmonella*, no final da década de 50 inícios da década de 60 (Levy, 2001). Actualmente, muitas das bactérias patogênicas e oportunistas associadas a infecções humanas desenvolveram formas multi-resistentes: *Mycobacterium tuberculosis*, *Acinetobacter baumannii*, *Burkholderia cepacia*, *Campylobacter jejuni*, *Citrobacter freundii*, *Clostridium difficile*, *Enterobacter* spp., *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* spp., *Serratia* spp., *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Stenotrophomonas maltophilia* e *Streptococcus pneumoniae* (Davies e Davies, 2010).

Nos últimos tempos, não se tem descoberto novas classes de antibióticos uma vez que grande parte dos antibióticos presentes na natureza já são conhecidos e/ou

são ineficientes (não específicos para bactérias, tóxicos, demasiado fracos, falta de propriedades farmacocinéticas desejadas, entre outras razões). Nas últimas três décadas foi desenvolvida apenas uma nova classe de antibióticos - as oxazolidinonas (Baquero e Blázquez, 1997; Teo e Tan, 2003; Norrby *et al.*, 2005). As grandes empresas farmacêuticas têm, nos últimos anos, vindo a desinvestir na pesquisa de novos antibióticos e a centrar o interesse noutros focos de investigação mais rentáveis. Os antibióticos, contrariamente a outros medicamentos para doenças crónicas, são utilizados em tratamentos de curta duração. Associando isto aos elevados custos de investigação clínica, a comercialização de novos antibióticos torna-se muito difícil de ser lucrativa (Norrby *et al.*, 2005). Deste modo, a pesquisa de novos antibióticos tem declinado significativamente, sendo que a maior parte da investigação tem sido focada na alteração sintética de antibióticos já conhecidos. Como consequência, actualmente existe a necessidade premente de pesquisar novas classes de antibióticos (Peláez, 2006). Os habitats naturais constituem uma fonte promissora para a pesquisa de novos compostos activos.

## **2.2. Antibióticos e outras substâncias antimicrobianas**

Os antibióticos são metabolitos secundários característicos de determinados organismos, como as plantas e os microrganismos. Os metabolitos secundários, principalmente os de origem microbiana, são selectivos nas suas acções sobre bactérias patogénicas e fungos, tornando-se assim importantes para a sobrevivência dos seus produtores e com valor para o tratamento de infecções nos seres humanos e em animais (Teo e Tan, 2003).

Os antibióticos são um grupo heterogéneo de compostos, cujas funções ecológicas na natureza não são exclusivamente as de armas bacterianas contra competidores devido à sua citotoxicidade, mas também tem sido descrito o seu papel como moléculas sinalizadoras que favorecem a colonização de superfícies e a formação de biofilmes, intervindo na regulação da homeostase das comunidades microbianas (Linares *et al.*, 2006).

A descoberta de novos antibióticos a partir de microrganismos exige que determinado microrganismo seja cultivado em condições adequadas para produzir o

metabolito desejado, que será posteriormente extraído e testado *in vitro*. Os isolados que revelem capacidade bioactiva serão sujeitos a estudos para determinar se os antibióticos produzidos são novos. Quando um organismo produtor de novos antibióticos é descoberto, o antibiótico pode então ser produzido em maior escala, purificado e testado *in vivo* para estabelecer a sua citotoxicidade e a actividade terapêutica. A maioria dos novos antibióticos falham nos testes *in vivo*. Apenas uma proporção muito baixa dos compostos pesquisados prova ser útil como medicamento e será, por conseguinte, comercializada (Peláez, 2006; Teo e Tan, 2003).

A maior parte dos antibióticos actualmente empregues na terapia de infecções provêm de dois grupos de microrganismos: actinomicetas e fungos (Peláez, 2006). Nos últimos anos, contudo, outros grupos microbianos, como *Bacillus* (Shaherdur e Takashi, 2009), *Paenibacillus* (Selim *et al.*, 2005), *Janthinobacterium* (O'Sullivan *et al.*, 1989), *Pseudomonas* (Uzair *et al.*, 2007), têm sido explorados como fontes potenciais de antibióticos. Os microrganismos continuam a ser a fonte mais promissora para a descoberta de novos antibióticos (Peláez, 2006) e por conseguinte, a solução mais eficaz para encontrar medicamentos activos contra estirpes de bactérias patogénicas que já sejam multi-resistentes.

Os microrganismos produzem um extraordinário arsenal molecular de defesa, no qual se incluem os antibióticos clássicos de largo espectro, produtos do metabolismo primário como o ácido láctico que os lactobacilos produzem, agentes líticos como as lisozimas, vários tipos de exotoxinas proteicas e bacteriocinas, que são definidas de uma forma muito geral como fracções proteicas antibacterianas produzidas por eubactérias (Gram-negativas e Gram-positivas) e arqueobactérias. Estima-se que 99% das bactérias produzem pelo menos uma bacteriocina (Riley *et al.*, 2007). Contrariamente aos antibióticos clássicos, as bacteriocinas são consideradas metabolitos primários porque a sua produção começa logo no início da fase exponencial, terminando no final desta fase ou no início da fase estacionária (Drosinos *et al.*, 2008).

Variações nas condições de cultivo, como temperatura, pH, arejamento e tempo de incubação têm demonstrado ter um profundo efeito na actividade antimicrobiana de bactérias. O tipo e concentração dos nutrientes constituintes dos

meios de cultura, nomeadamente a fonte de carbono, também têm impacto sobre a antibiose bacteriana. Geralmente a produção de compostos antibacterianos, como as bacteriocinas, é superior à temperatura óptima de crescimento para o microrganismo produtor. Em determinados microrganismos, o crescimento a elevadas temperaturas pode mesmo suprimir por completo a produção destes compostos e conduzir a uma perda irreversível das suas propriedades antibacterianas. A produção máxima de bacteriocinas em culturas laboratoriais poderá ocorrer em diferentes fases de crescimento, podendo verificar-se quer na fase exponencial quer na fase estacionária (Sánchez *et al.*, 2010).

### **2.3. Ambientes vulcânicos**

Ambientes extremos que abrigam vida microbiana estão distribuídos um pouco por todo o planeta. As grutas e os tubos de lava têm, frequentemente, temperaturas moderadas e humidade relativamente estável ao longo do ano, no entanto são considerados ambientes extremos devido à baixa disponibilidade de nutrientes, à sua baixa produtividade enquanto ecossistemas (Barton, 2006; Northup *et al.*, 1997), e baixa concentração de carbono orgânico (<0,5 mg/L) (Rodrigues *et al.*, 2009). Nas fumarolas, as condições extremas são relativas à temperatura, pH e concentrações de enxofre (Riquelme *et al.*, 2010).

Nas últimas décadas, tem vindo a crescer o interesse, tanto a nível regional como internacional, no conhecimento do mundo subterrâneo dos Açores (Oromí *et al.*, 1990, Borges e Oromí, 2006). A descoberta de diversas grutas nos Açores teve grande importância para o desenvolvimento de projectos espeleológicos. Contudo, estudos científicos do mundo microbiano nas grutas ainda são escassos, pelo que actualmente ainda pouco se sabe sobre as comunidades microbianas associadas aos tubos de lava, e qual o seu papel ecológico sobre o ecossistema. É possível que, à semelhança do que acontece em outras regiões cavernícolas, nas zonas mais interiores das grutas, muitos destes microrganismos possuam metabolismos quimiossintéticos e sirvam de base às teias alimentares destes ecossistemas. A presença de bactérias quimiolitotróficas em grutas é usualmente correlacionada com o aumento da diversidade de organismos nestes ambientes (Engel, 2007). Este conhecimento frequentemente baseia-se em estudos dependentes do cultivo microbiano, no entanto, estes subestimam a

diversidade por incapacidade de cultivar muitos dos microrganismos (Hugenholtz *et al.*, 1998; Mulec *et al.*, 2002).

Por todo o mundo, os tubos de lava apresentam tapetes microbianos de diversas cores e padrões, que cobrem as paredes e os tectos das cavidades. Apesar da sua notoriedade, pouco se sabe sobre o papel biogeoquímico que as comunidades microbianas presentes nestes tapetes desempenham no ambiente da gruta. Os tapetes microbianos encontrados em tubos de lava do Hawai'i apresentaram comunidades de fungos e bactérias aeróbias e evidenciaram ser locais importantes para a reciclagem de nutrientes, como o azoto. Os tubos de lava dos Açores, húmidos e com uma temperatura relativamente constante variando entre 15°–16°C, são dominados por tapetes microbianos de cor branca e amarela (Hathaway, 2010).

Numa perspectiva biogeográfica, não está claro se há uma estrutura de comunidade microbiana comum a todos os tubos de lava existentes ou se cada tubo de lava possui comunidades bacterianas únicas (Hathaway, 2010). Numa gruta, podem encontrar-se microrganismos residentes e microrganismos transitórios. Os microrganismos transitórios são aqueles que entram na gruta através das correntes de ar, fluxo de água, fluxo de sedimentos, insectos, morcegos ou pelo homem, uma vez que qualquer organismo ou objecto que entre numa gruta carrega microrganismos (Barton e Northup., 2007; Engel, 2007).

Num estudo realizado na Gruta Altamira, em Espanha, as pseudomonas e as enterobactérias mostraram ser os grupos mais representativos em espessos biofilmes (tapetes microbianos) amarelo e cinza, respectivamente (Portillo *et al.*, 2007). As Actinomicetas têm sido encontradas em diversos tipos de grutas, incluindo os tubos de lava dos Açores e do Hawai'i, recobrando as paredes e tectos destas cavidades (Hathaway, 2010; Northup *et al.*, 2011). Os dois géneros de Actinomicetas mais comumente descritos nestes ambientes são *Streptomyces* e *Nocardia* (Northup *et al.*, 2004).

Pesquisas realizadas por Zitouni *et al.* (2005) demonstraram que metabolitos secundários produzidos por Actinomicetas, de diferentes fontes e regiões, são muito promissores enquanto antibióticos (Busti *et al.*, 2006). Para além disso, os metabolitos secundários dos Actinomicetas têm evidenciado outras propriedades bioactivas, como

anti-tumorais, anti-diabéticas, antivirais (Imada, 2005) e anti-fúngicas (Ouhdouch *et al.*, 2001).

O interesse biotecnológico em bactérias com capacidades antimicrobianas tem aumentado (Lazzarini *et al.*, 2000), nomeadamente para aplicações medicinais (Imada, 2005), indústria alimentar, agricultura, veterinária (Ouhdouch *et al.*, 2001), entre outras, devido à necessidade de pesquisar novos antibióticos que permitam tratar infecções resistentes.

## **2.4. Biofilmes bacterianos**

Um biofilme consiste numa população de células ligadas irreversivelmente a uma superfície sólida, biótica ou abiótica, e envolvida por uma matriz extrapoli-sacarídica. Produzida pelos próprios microrganismos, a matriz contém proteínas, ácidos nucleicos e outras substâncias. Os biofilmes são muitas vezes definidos como comunidades biológicas com elevado grau de organização que se podem formar, teoricamente, em qualquer superfície e ambiente que combinem condições nutricionais e de humidade adequadas (Fonseca, 2010). Nos biofilmes, as bactérias formam comunidades estruturadas, coordenadas e funcionais que proliferam de forma mais eficiente do que as células planctónicas (Caldwell *et al.*, 1997; Davey e O'Toole, 2000; O'Toole *et al.*, 2000).

### **2.4.1. Formação de biofilmes**

Os biofilmes típicos são estruturas complexas, cuja formação envolve diversas etapas: ligação e imobilização das células de vida livre (planctónicas) a uma superfície (colonizadores primários); crescimento, multiplicação e interacção célula a célula; formação de microcolónias e segregação extracelular de componentes polissacarídicos; desenvolvimento e maturação das microcolónias, agregação dos colonizadores secundários, formação de coagregados e maturação do biofilme; e ruptura do biofilme e dispersão das células para o meio circundante (Fonseca, 2010). O desprendimento pode ocorrer segundo quatro processos distintos: erosão superficial, descolamento – *sloughing off*, abrasão e ataque por predadores (Chaves, 2004) (Figura 3.).



Figura 3. Esquema representativo da formação de biofilmes (Adaptado de Fonseca, 2010).

A formação de um biofilme é regulada por mecanismos de *quorum-sensing*, formas de comunicação entre célula-célula de bactérias da mesma espécie ou entre espécies diferentes (Casalini, 2008). Este sistema de comunicação permite aos microrganismos modular o seu comportamento, alterando a sua expressão génica (Casalini, 2008; Mohamed e Huang, 2007). A capacidade de enviar, receber, e processar informação permite aos organismos unicelulares agirem como entidades multicelulares, aumentando as suas probabilidades de sobrevivência em ambientes complexos (Hooshangi e Bentley, 2008).

#### 2.4.2. Factores que influenciam a formação de biofilme

A estrutura final e a composição do biofilme são determinadas pelas características do ambiente onde foi desenvolvido. Propriedades como o tipo de microrganismos, o ambiente hidrodinâmico, o pH, a temperatura, a força iónica do meio, tipo e rugosidade da superfície, a disponibilidade de nutrientes, de iões – como cálcio, magnésio ou zinco - de CO<sub>2</sub>, e de agentes antimicrobianos são consideradas importantes na formação do biofilme (Chaves, 2004; Davey e O’Toole, 2000; Fonseca, 2010).

Os biofilmes são entidades dinâmicas, embora fisicamente imobilizadas. Ao longo do tempo a composição microbiana dos biofilmes geralmente sofre alterações significativas (Silva, 2008). A evolução de um biofilme é um processo natural, que ocorre segundo um padrão sigmoideal (Figura 4) (Bott, 1993 *in* Chaves, 2004).

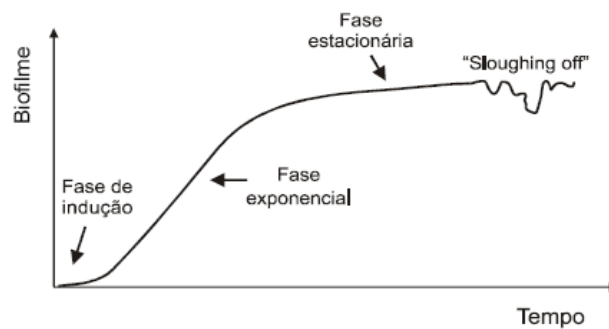


Figura 4. Representação da acumulação de um biofilme ao longo do tempo (Chaves, 2004).

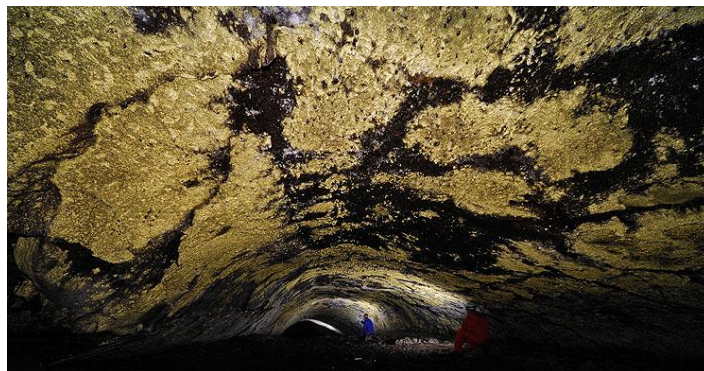
### 2.4.3. Composição dos biofilmes

Os biofilmes são tipicamente constituídos por água, microrganismos e substâncias poliméricas extracelulares, vulgarmente designadas por EPS (*Extracellular Polymeric Substances*) (Pereira, 2001). Os biofilmes não são necessariamente uniformes, podendo englobar partículas sólidas (argilas, areias, produtos de corrosão e partículas orgânicas) provenientes do meio onde estão imersos (Characklis *et al.*, 1990 *in* Chaves, 2004).

A composição química das EPS que constituem a matriz é muito complexa e heterogênea, sendo maioritariamente composta por polissacáridos. No entanto, a matriz polimérica pode também ser constituída por proteínas, ácidos nucleicos, lípidos, substâncias húmicas e heteropolímeros, tais como glicoproteínas (Chaves, 2004; Frolund *et al.*, 1996). A matriz polimérica é responsável pela morfologia, estrutura, coesão, e integridade funcional dos biofilmes. A sua composição determina a maioria das propriedades físico-químicas e biológicas, bem como a homeostasia, dos biofilmes (Davey e O'Toole, 2000).

Os biofilmes podem ser constituídos por um aglomerado de uma única espécie ou por uma comunidade derivada de múltiplas espécies microbianas. Os biofilmes que se encontram em ambientes naturais são de um modo geral heterogêneos, contendo mais do que uma espécie. No mesmo biofilme podem ser encontrados estratos aeróbios e estratos anaeróbios (Chaves, 2004; van der Wende *et al.*, 1990). Os primeiros situam-se nas zonas mais superficiais do biofilme e os segundos nas mais profundas, junto ao suporte sobre o qual o biofilme se desenvolve. Esta estratificação

deve-se à dificuldade de difusão do oxigénio presente na água através do biofilme, conjugado com o facto do oxigénio disponível ser logo consumido pelos microrganismos que compõem as camadas mais superficiais (Chaves, 2004). Os biofilmes podem atingir espessuras e extensões consideráveis, como sucede nas grutas dos Açores (Figura 5). Neste caso, recebem o nome de tapetes microbianos.



**Figura 5.** Grandes extensões de biofilmes formando tapetes microbianos na gruta Terra Mole (Fotografia cedida por Pedro Cardoso)

Os microrganismos frequentemente encontrados numa comunidade em biofilme são microalgas, fungos, protozoários, bactérias e vírus (Characklis *et al.*, 1990 *in* Chaves, 2004), sendo, no entanto, as bactérias os microrganismos predominantes. A sua maior versatilidade e resistência, os seus tamanhos reduzidos, as elevadas taxas de reprodução, a grande capacidade de adaptação e de produção de substâncias e estruturas extracelulares que as protegem do meio circundante, são as principais características que fazem das bactérias excelentes organismos produtores de biofilme (Caçador, 2009; Pereira, 2001). Seja simples ou de múltiplas espécies, o desenvolvimento de biofilmes é sempre um processo complexo, que requer comportamentos bacterianos colectivos (Davey e O'Toole, 2000).

#### **2.4.4. Benefícios de viver em biofilme**

O modo de desenvolvimento em biofilme proporciona importantes benefícios aos microrganismos que o constituem, tais como: aumento da concentração de nutrientes nas interfaces líquido-biofilme, uma vez que a matriz polimérica favorece a adsorção de nutrientes; a matriz de EPS restringe a difusão de compostos tóxicos do

meio circundante para o biofilme (Gilbert *et al.*, 1997) e protege contra factores ambientais agressivos como radiação UV, variações de pH, choques osmóticos, desidratação; maior facilidade de ocorrerem trocas de material genético entre os microrganismos; facilidade de desenvolvimento de microconsórcios que permitem o estabelecimento de relações de simbiose bem como a utilização de substratos de difícil degradação; capacidade de estabelecer e colonizar nichos ecológicos difíceis (Davey e O'Toole, 2000; Mittelman, 1998; Mohamed e Huang, 2007).

A natureza da estrutura de um biofilme e os atributos fisiológicos dos organismos que o constituem conferem uma inerente resistência a agentes antimicrobianos, como os antibióticos (Donlan e Costerton, 2002; Pasternak, 2009). Os mecanismos responsáveis pela resistência podem ser relativos à dificuldade de penetração do agente antimicrobiano através da matriz do biofilme; à taxa de crescimento do biofilme alterada - as microcolónias proliferam mais devagar, prejudicando, portanto, a sua resposta a muitos antibióticos que agem essencialmente quando as células se dividem; e outras alterações fisiológicas devido ao modo de crescimento do biofilme (Donlan e Costerton, 2002; Pasternak, 2009).

#### **2.4.5. Biofilmes como potenciais fontes de compostos antimicrobianos**

Os biofilmes são considerados como o modo de vida predominante entre as bactérias, quer em ambientes naturais quer em condições artificiais (por exemplo, linhas de produção industrial e dispositivos médicos) (Moons *et al.*, 2009). Uma parte importante da interacção entre bactérias no interior dos biofilmes é a produção de moléculas que inibem a ligação e o crescimento das espécies competidoras, impedindo assim a sua sobrevivência (Egan *et al.*, 2008). Desta forma, a vida em biofilme traz vantagens competitivas aos microrganismos que optam por este modo de vida (Burgess *et al.*, 1999).

A produção de moléculas antimicrobianas pode ser uma característica fenotípica que é induzida apenas quando o microrganismo se desenvolve em biofilme (Yan *et al.*, 2003; Rao *et al.*, 2005). A indução da actividade antimicrobiana em comunidades sésseis parece ser influenciada por moléculas reguladoras segregadas no interior do biofilme (Mearns-Spragg *et al.*, 1998; Yan *et al.*, 2003).

Diversos estudos, indicam que a incidência de isolados produtores de antibióticos é mais elevada em biofilmes do que em locais onde as comunidades microbianas se encontram em vida planctónica, pelo que, já em 1998, Mearns-Spragg *et al.* concluíram que os biofilmes naturais podem ser uma fonte promissora de microrganismos produtores de substâncias antimicrobianas.

### 3. Metodologia

#### 3.1. Local de amostragem

Os isolados estudados são provenientes de três zonas de amostragem de ambientes vulcânicos da ilha Terceira, a Gruta Branca Opala (GBO), a Gruta Terra Mole (GTM) e as Furnas do Enxofre (FE) (Figura 6). A amostragem das grutas foi efectuada em locais isentos de luz, por outro lado nas FE os locais de amostragem eram iluminados (Quadro 1).

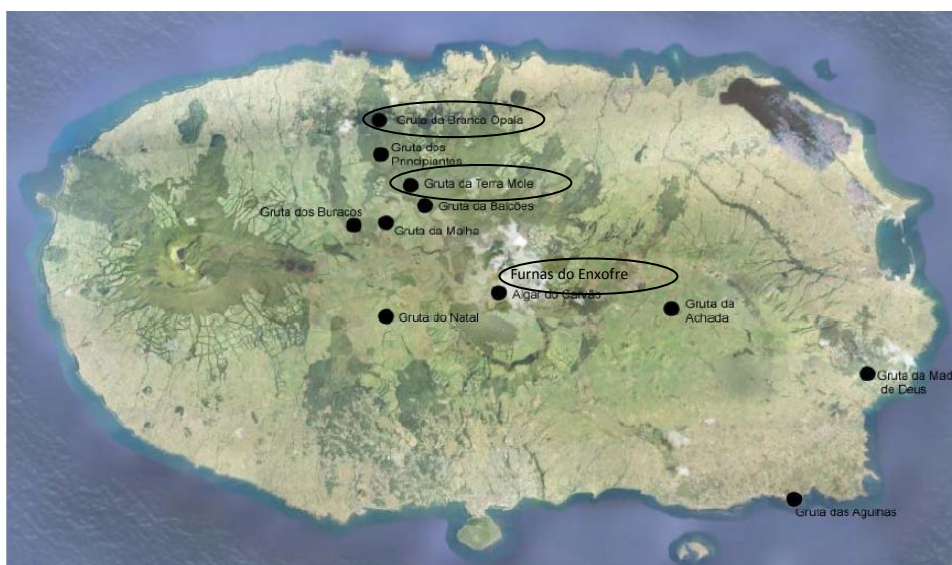


Figura 6. Mapa da ilha Terceira com os pontos de amostragem (adaptado de Hathaway, 2010).

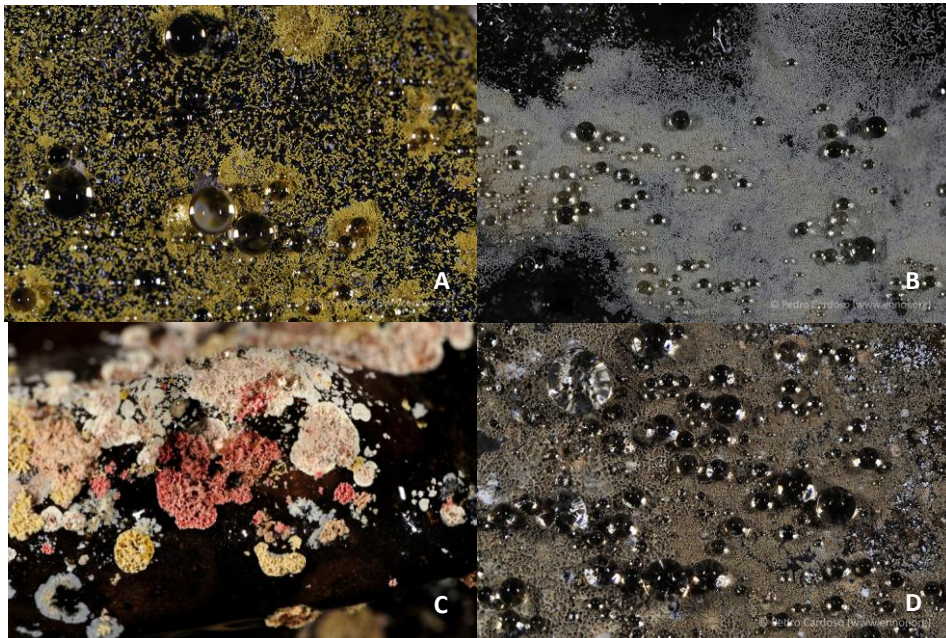
Quadro 1. Descrição dos locais de amostragem dos isolados estudados.

Ilha	Local amostragem	Ambiente vulcânico	Temperatura média	Média pH amostras água	Número entradas	Iluminação ponto amostragem	Paisagem envolvente
Terceira	Branca Opala	Tubo de lava	15°C	7	3	ausente	Plantação exótica
Terceira	Terra Mole	Tubo de lava	15°C	7	2	ausente	Pastagem intensiva
Terceira	Furnas do Enxofre	Fumarolas	45°C 69°C	n/a	n/a	presente	Vegetação diversificada de musgos, hepáticas, algas e líquenes

A GTM localiza-se no concelho da Praia da Vitória, freguesia dos Biscoitos, a uma altitude de 370 m. Geologicamente designada como tubo de lava, a GTM apresenta comprimento de 120 m, largura máxima de 11 m, e altura máxima de 3 m (Figura 8A) (Gespea, 2005). À superfície o terreno é ocupado por pastagem intensiva (Hathaway, 2010).

A GBO situa-se também na freguesia dos Biscoitos, concelho da Praia da Vitória, a uma altitude de 255 m. A Branca Opala é também considerada tubo de lava, e apresenta comprimento de 99 m, largura máxima de 10 m e altura máxima de 5 m (Gespea, 2005; Hathaway, 2010). Esta gruta possui uma grande quantidade de rochas de opala cobertas por tapetes microbianos esbranquiçados (Figura 8B). A gruta é de difícil acesso, pois a sua abertura principal encontra-se no interior de uma zona com vegetação arbórea, o que a torna mais húmida e lamacenta (Silva, 2008).

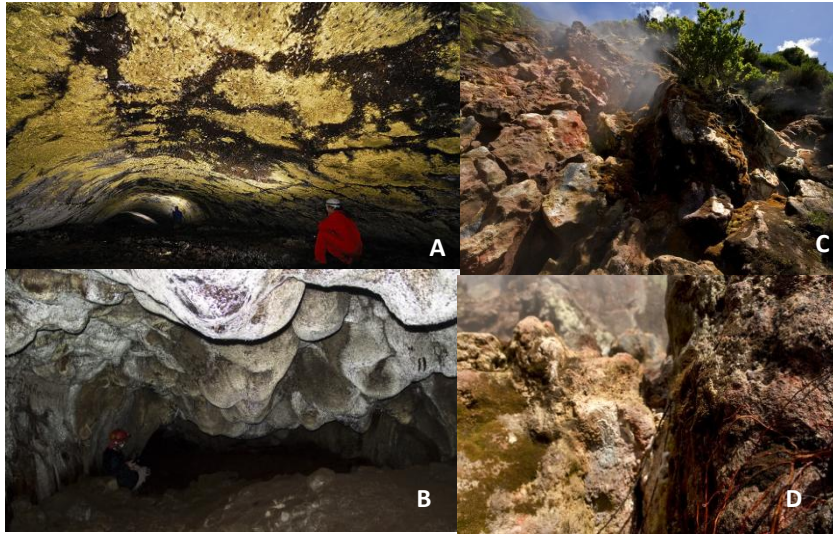
Os tapetes microbianos amostrados nas grutas apresentaram uma diversidade de cores, nomeadamente amarelo, branco, bege e rosa (Figura 7).



**Figura 7.** Tapetes microbianos: A) amarelo B) branco C) rosa D) bege (Fotografias cedidas por Pedro Cardoso).

As FE localizam-se no interior da ilha Terceira, cobrindo uma área de 64,746 m<sup>2</sup> e situam-se entre os 583 e 620 metros de altitude. As condições climáticas desta zona caracterizam-se pela elevada humidade e valores anuais de precipitação superiores a 2000 mm. Dadas essas características, e a presença de solos pouco permeáveis, a zona tem tendência ao encharcamento. A temperatura e a concentração de gases vulcânicos condicionam a distribuição da vegetação, sendo que junto às fumarolas o solo é demasiadamente quente para permitir a cobertura vegetal, mas na sua

vizinhança surgem comunidades de musgos, hepáticas, algas e líquenes (Figura 8C e 8D) (Riquelme *et al.*, 2010).



**Figura 8.** Locais de amostragem: A) Gruta Terra Mole; B) Gruta Branca Opala; C) Furnas do Enxofre (Fotografias de Pedro Cardoso (A), Airidas Dapkevicius (B) e Câmara Municipal de Angra do Heroísmo (C e D)).

### 3.2. Culturas bacterianas

O conjunto de isolados estudados foi obtido num estudo anterior, realizado no âmbito do projecto “Understanding Underground Biodiversity: Studies in Azorean Lava Tubes” (Varela *et al.*, 2009). No presente trabalho, foram estudados 20 isolados provenientes da GBO, 7 da GTM e 3 das FE (Quadro 2).

**Quadro 2.** Características dos ambientes originários dos isolados bacterianos estudados.

<b>Código Amostra</b>	<b>Ambiente vulcânico</b>	<b>Coloração tapete microbiano</b>
<b>GB067B1</b>	Branca Opala	Amarelo
<b>GB034G</b>	Branca Opala	Branco
<b>GB035A</b>	Branca Opala	Beige
<b>GB067D</b>	Branca Opala	Amarelo
<b>GB070A</b>	Branca Opala	Amarelo
<b>GB022C</b>	Branca Opala	Amarelo
<b>GB069B</b>	Branca Opala	Beige
<b>GB08C</b>	Branca Opala	Beige
<b>GB015B</b>	Branca Opala	Branco
<b>GB031A</b>	Branca Opala	Branco
<b>GB031H</b>	Branca Opala	Branco
<b>GB036B</b>	Branca Opala	Beige
<b>GB068A</b>	Branca Opala	Branco
<b>GB068C</b>	Branca Opala	Branco
<b>GB071A</b>	Branca Opala	AT
<b>GB015F</b>	Branca Opala	Branco
<b>GB020A2</b>	Branca Opala	Branco
<b>GB027A</b>	Branca Opala	Branco
<b>GB027E</b>	Branca Opala	Branco
<b>GB031C</b>	Branca Opala	Branco
<b>GTM1B1</b>	Terra Mole	Rosa
<b>GTM1B2</b>	Terra Mole	Rosa
<b>GTM1D</b>	Terra Mole	Rosa
<b>GTM2A</b>	Terra Mole	Rosa
<b>GTM5E</b>	Terra Mole	Beige
<b>GTM1E1</b>	Terra Mole	Rosa
<b>GTM2B1</b>	Terra Mole	Rosa
<b>P4-2</b>	Furnas do Enxofre	AT
<b>P1-6B</b>	Furnas do Enxofre	AT
<b>P2-1</b>	Furnas do Enxofre	AT

AT: ausência de tapete microbiano

### **3.3. Caracterização morfofisiológica**

As culturas, que se encontravam armazenadas a - 80°C, foram revivificadas em meio líquido de Nitrate Broth (NtB, Fluka Analytical, 72548, Suíça) e incubadas a uma temperatura próxima à do habitat natural, 11±1°C (Varela *et al.*, 2009). Posteriormente os isolados foram cultivados em meio sólido ½R2A (R2A, AES Laboratoire, AEB153482, França, diluído para meia concentração) e Nutrient Agar (NA, Biokar Diagnostics, BK185HA, França), e incubados a 11±1°C. O meio ½R2A foi utilizado por ser um meio baixo em nutrientes, assemelhando-se desta forma ao ambiente oligotrófico característico das grutas.

Após crescimento das culturas isoladas por exaustão, as colónias foram caracterizadas relativamente às suas características morfológicas. De modo a separar os microrganismos em grupos morfofisiológicos de acordo com Jay *et al.* (2006), foi determinado o tipo de parede celular por ensaio de KOH e coloração de Gram, presença das actividades enzimáticas catalase e oxidase, bem como a produção de pigmentação (p) ou a não produção de pigmentação (n). Nos anexos (quadro 1) resume-se o sistema de classificação utilizado. Para além das características contempladas na classificação de Jay *et al.* (2006), analisou-se ainda a mobilidade e a redução de nitratos.

#### **3.3.1. Morfologia das colónias**

As colónias isoladas foram analisadas relativamente ao diâmetro (mm), à coloração, à morfologia, ao brilho, à opacidade e à elevação. O diâmetro foi medido com uma régua graduada em mm.

#### **3.3.2. Teste de Gram por KOH**

O teste de Gram por tratamento com KOH, descrito inicialmente por Ryu (1938), é um método simples, que não recorre à coloração, e para o qual é necessário apenas hidróxido de potássio a 3%. A parede das bactérias Gram positivas é resistente à solução alcalina e por isso não ocorre lise celular, pelo contrário a parede das bactérias Gram negativas como não é resistente à solução alcalina ocorre lise celular, e

o ADN ao ser libertado forma um fio viscoso que adere à ansa (Powers, 1995). A metodologia empregue foi a de Powers (1995).

### **3.3.3. Teste da catalase**

A prova da catalase tem como objectivo determinar a capacidade dos microrganismos produzirem a enzima catalase para degradar o peróxido de hidrogénio. Durante a respiração aeróbia, em que o oxigénio é usado como receptor final de electrões, os microrganismos produzem peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ) e, em alguns casos, o ião superóxido ( $O_2^-$ ). A acumulação destas substâncias leva à morte das células, a não ser que elas possam ser enzimaticamente degradadas. Este teste é realizado apenas pela adição de  $H_2O_2$  a 3% a uma porção da cultura a testar. Os microrganismos com capacidade para produzir catalase ou peroxidase degradam o peróxido de hidrogénio em água e oxigénio (Benson, 2001).

A produção de catalase foi determinada segundo Aslanzadeh (2006).

### **3.3.4. Teste da oxidase**

O teste de oxidase é utilizado para verificar a presença da enzima citocromo oxidase na cultura bacteriana. Esta enzima, pertencente ao grupo das porfirinas férricas, oxida o citocromo c reduzido tornando-se ela própria na forma reduzida e inactiva. Contudo, através da transferência de electrões do oxigénio molecular a citocromo oxidase reduzida é transformada novamente na forma activa. Na presença de oxigénio molecular, o sistema citocromo oxidase/citocromo c pode reduzir diversas substâncias orgânicas, como o NaDi (1-naftol-dimetil parafenilenodiamina) com formação de azul de indofenol (Win *et al.*, 2006).

Para a realização do teste, utilizaram-se Bactident Oxidase test strips (1.13300.0001, Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante.

### **3.3.5. Teste de redução dos nitratos**

A redução dos nitratos por alguns microrganismos aeróbios ou anaeróbios facultativos ocorre na ausência de oxigénio. Estes microrganismos obtêm energia

através dum processo oxidativo (respiração anaeróbia) em que o aceitador final de electrões é o nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ). Nesse processo, os nitratos são reduzidos a nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ). Alguns desses microrganismos possuem ainda a capacidade para actuarem sobre os nitritos reduzindo-os a amónia ( $\text{NH}_3$ ) ou a azoto molecular ( $\text{N}_2$ ) (Prescott, 2002).

O método utilizado para pesquisar a redução de nitratos foi o descrito por Benson (2001).

### **3.3.6. Coloração de Gram**

O procedimento foi executado segundo Win *et al.* (2006). A observação das preparações obtidas foi feita ao microscópio óptico de fundo luminoso (Leica CME, 1349522X, India), com uma ampliação de 1000x.

### **3.3.7. Mobilidade**

A detecção de mobilidade das bactérias foi determinada pela visualização das culturas ao microscópio óptico de fundo luminoso. Centrifugou-se cerca de 1mL de cada cultura crescida em NB (Nutrient Broth, AES Laboratoire, AEB140802, França) durante 2 minutos a 1540 x g (Eppendorf, 5415D, Alemanha). Desprezou-se o sobrenadante e utilizou-se uma gota do precipitado, pendente numa lamela, para a visualização óptica, numa ampliação de 1000x.

## **3.4. Rastreio de microrganismos com actividade antimicrobiana contra microrganismos indicadores relacionados com ambientes alimentares**

A pesquisa de actividade antimicrobiana em culturas bacterianas foi efectuada frente a oito microrganismos indicadores relacionados com ambientes alimentares, por meio de dois métodos semi-quantitativos, o ensaio de inoculação cruzada e o ensaio de difusão em agar.

### **3.4.1. Microrganismos indicadores**

Para este estudo laboratorial, os microrganismos indicadores foram obtidos de colecções ATCC (American Type Culture Collection, Rockille, MD) fornecidos pelo Serviço Desenvolvimento Agrário da Ilha Terceira e Laboratórios de Química

(*Staphylococcus aureus* ATCC 9144) e Microbiologia (*Proteus* sp.) da Universidade dos Açores.

Os microrganismos indicadores listados no quadro 3 foram conservados em tubos com PCA (Plate Count Agar, Biokar Diagnostics, BK144HA, França), sob a forma de rampas, e mantidos à temperatura de 4°C. Periodicamente, as culturas foram repicadas para novas rampas de PCA. Aquando da utilização destas culturas, os microrganismos foram ressuspensos em NB e incubados a 37°C.

**Quadro 3.** Microrganismos indicadores, e respectivos códigos ATCC, para a pesquisa de compostos bioactivos.

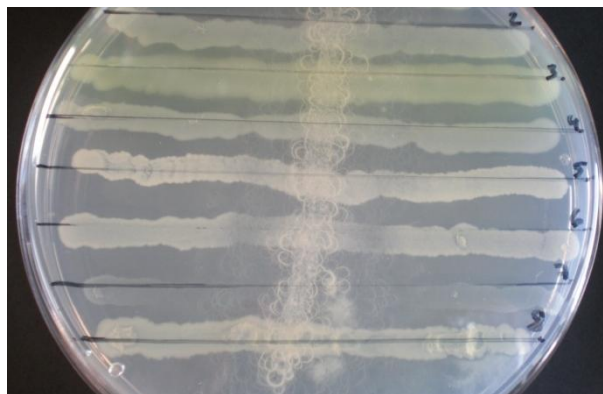
Microorganismos	Código ATCC
<i>Proteus</i> sp.	-----
<i>Salmonella</i> Typhimurium	14028
<i>Escherichia coli</i>	25922
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27853
<i>Staphylococcus aureus</i>	9144
<i>Staphylococcus aureus</i>	29523
<i>Listeria innocua</i>	33090
<i>Listeria monocytogenes</i>	7466

### 3.4.2. Ensaio de inoculação cruzada

O teste de inoculação cruzada foi utilizado por permitir fazer um rastreio rápido do espectro antimicrobiano de cada bactéria isolada contra determinados microrganismos indicadores, detectando assim a sensibilidade destes microrganismos a culturas laboratoriais crescidas em biofilme. A metodologia foi adaptada de Uzair *et al.* (2009).

Este ensaio iniciou-se com a inoculação das amostras isoladas em NtB e incubação a 11±1°C, por 3–7 dias (dependendo do isolado). Após crescimento em caldo, os isolados foram riscados, ao longo do diâmetro da placa, numa primeira camada de agar e incubados por alguns dias, até haver crescimento considerável (2–10 dias). Posteriormente adicionou-se uma segunda camada de meio sólido na placa para crescimento dos microrganismos indicadores. Foram testadas as seguintes

combinações de meios na primeira e segunda camada: ½R2A-PCA, ½R2A-NA, PCA-PCA e NA-PCA, respectivamente. Os microrganismos indicadores, crescidos previamente em NB (18–24h a 37°C) foram inoculados sobre a segunda camada de cada placa num riscado perpendicular ao isolado em teste, como mostra a figura 9. As placas foram incubadas a 37°C e os resultados observados após 18–24 horas. A zona de inibição foi medida com uma régua graduada em mm.



**Figura 9.** Disposição dos riscados de microrganismos indicadores (riscos horizontais) e do isolado em estudo (risco vertical) no teste da inoculação cruzada.

### **3.5. Estudo da cinética de crescimento**

Seleccionaram-se os isolados que apresentaram maior espectro de inibição dos microrganismos indicadores, no ensaio da inoculação cruzada, de modo a haver um “representante” de cada grupo taxonómico ou morfofisiológico, para estudar as condições mais favoráveis para o seu crescimento laboratorial. De acordo com estes critérios, foram seleccionados os isolados GBO69B, GBO31C, GTM1B2 (provenientes de tubos lávicos), e P2-1 (obtido de amostras colhidas nas FE). Procedeu-se ao estudo da cinética de crescimento destes microrganismos em diferentes caldos e a diferentes temperaturas.

#### **3.5.1. Condições de incubação**

Para o estudo da cinética de crescimento dos isolados utilizou-se diversos caldos, NB, TSB (Tryptone Soy Broth, Biokar Diagnostics BK046HA, França), BHI (Brain Heart Infusion, AES Laboratoire, AEB140102, França), ½R2B (anexos, quadro 2), NtB e MRS (AES Laboratoire, AEB140652). O MRS foi somente utilizado no crescimento do

isolado GBO69B, por ser considerado o mais adequado para o crescimento de *Enterococcus* (Kumar e Srivastava, 2010). Este ensaio foi realizado a quatro temperaturas distintas, 11, 20, 30 e 46°C. Os isolados das grutas foram ensaiados a 11, 20 e 30°C e o isolado das FE foi ensaiado a 30 e 46°C.

Primeiramente, procedeu-se ao crescimento de um pré-inóculo em 5 mL dos diferentes caldos, às diferentes temperaturas. Após crescimento considerável, acertou-se a turbidez dos pré-inóculos para 1 MacFarland, utilizando um turbidímetro (Densimat Biomérieux, IDN010238, Italy), por adição de caldo esterilizado, idêntico ao utilizado em cada caso. Posteriormente, os isolados foram inoculados à concentração de 0.01% (v/v) em 1 mL de cada um dos diferentes caldos. Para cada isolado preparou-se quatro culturas independentes. O ensaio em branco consistiu em quatro amostras de caldo esterilizado, não inoculado, idêntico ao usado em cada caso. Seguidamente, 100 µL de cada cultura e respectivos brancos foram transferidos para uma microplaca estéril de 96 poços (96 Well ELISA Microplates, 655001, Greiner Bio One, Alemanha). Os poços mais exteriores foram preenchidos com água destilada esterilizada, de modo a evitar a desidratação das amostras. Cada placa foi coberta por um filme estéril de poliéster com adesivo acrílico (Platemax - Axyseal Sealing film, Axygen Scientific, USA), com o intuito de prevenir a evaporação dos caldos e a contaminação do material contido nos poços. As placas foram incubadas em estufas, às temperaturas pretendidas.

### **3.5.2. Condições de leitura**

Para leitura da absorvância das culturas nas placas utilizou-se um leitor de microplacas (Absorvance Microplate Reader, Elx808LBS, Biotek Instruments, 2009, USA) com o software Gen5 (Gen 5, Getting started, Microplate Data Collection and Analysis Software, Biotek Instruments, 2010), com as seguintes condições: comprimento de onda de leitura – 630 nm, pré-agitação – 15s.

### **3.5.3. Recolha de dados**

Os dados foram exportados do leitor de microplacas para uma folha de cálculo (Excel, Microsoft Office 2007). Aos resultados finais foram descontados os valores de

absorvância (densidade óptica – OD) correspondente ao respectivo branco, tendo sido seguidamente calculadas as médias dos quadruplicados preparados para cada isolado ou ensaio em branco e para cada conjunto de condições de cultivo.

#### **3.5.4. Cálculo dos parâmetros da curva de crescimento**

A partir das médias anteriormente calculadas, os parâmetros de crescimento, nomeadamente, taxa máxima de crescimento ( $\mu_{\max}$  ( $h^{-1}$ )), tempo de latência ( $\lambda$ (h)), e densidade óptica máxima (OD<sub>max</sub>), foram estimados segundo o modelo primário de Baranyi (Baranyi e Roberts, 1994) usando o software MicroFit (versão 1.0, 1999, Institute of Food Research – IFR, U.K.). Aos valores dos diversos parâmetros estão associadas estimativas de erro calculadas segundo a matriz jacobiana (Microfit, 1999). Para além disso, calculou-se visualmente, a partir do gráfico representativo da variação da absorvância em função do tempo, para cada isolado, o tempo médio de entrada em fase estacionária (T. est.(h)).

Os dados obtidos para cada parâmetro foram submetidos a ANOVA com factor único, com quatro réplicas, e  $\alpha = 0.05$ , com recurso a uma folha de cálculo (Excel, Microsoft Office 2007).

#### **3.6. Identificação dos isolados por métodos de Biologia Molecular**

Procedeu-se à sequenciação dos genes que codificam o ARN ribossómico (ARNr) da subunidade 16S dos isolados GBO69B, GBO31C, GTM1B2 (provenientes de tubos lávicos), e P2-1 (obtido de amostras colhidas nas FE), com o objectivo de obter indicações sobre a sua identidade.

De forma a preservar o ADN até à sua extracção, culturas puras crescidas em meio sólido, foram incorporadas em *sucrose lysis buffer*. A extracção de ADN genómico foi realizada através do kit de isolamento UltraClean Microbial ADN (MoBio Laboratories, Inc.) segundo o protocolo do fabricante.

O gene ARNr 16S foi amplificado pela técnica de Reacção em Cadeia da Polimerase (PCR – “*Polymerase Chain Reaction*”) com os primers universais, 8F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 1492R (5'-GCYTACCTTGTTACGACTT-3'), e a ADN polimerase Amplitaq. Com um volume total de 50  $\mu$ l, o *mix* foi constituído por: PCR

*buffer* (1x),  $Mg^{2+}$  a 1.5mM, cada primer específico (*Foward* e *Reverse* a 0.4 $\mu$ M), dNTP's (trifosfato desoxirribonucleótidos) a 0.2mM; 5 $\mu$ g albumina de soro bovino (BSA), que tem como função diminuir o efeito de potenciais inibidores do PCR permitindo aumentar o rendimento desta técnica (Miguel, 2007); e 1U AmpliTaq LD (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) (Hathaway, 2010).

A amplificação foi efectuada no termociclador Eppendorf Mastercycler 5333 (Eppendorf, Hauppauge, NY ) sob as seguintes condições: 94°C durante 5 min, seguido por 30 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 50°C, 1.5 min a 72°C, e por último a extensão de 7 min a 72°C. Os amplicões foram limpos e purificados usando o kit Qiagen PCR cleanup (Qiagen, Germantown, Maryland) (Hathaway, 2010).

Cada fragmento amplificado foi sequenciado em duas reacções independentes, usando o kit Big Dye Terminator (Applied Biosystems) com os primers 46F (5'-GCYTAAYACATGCAAGTCG-3') e 1409R (5'-GTGACGGGCRGTGTGTRCAA-3') e posteriormente analisados pelo sequenciador ABI 377 (Applied Biosystems).

Relativamente à análise taxonómica, as sequências foram editadas com o Sequencher 4.8. (Gene Codes, Ann Arbor, MI). Posteriormente foram analisadas pelo BLAST (National Center for Biotechnology Information; Altschul *et al.*, 1997) a fim de encontrar as sequências com maior similaridade na base de dados do GenBank (Altschul *et al.*, 1997). Todas as sequências foram alinhadas com o Greengenes (greengenes. lbl.gov; DeSantis *et al.*, 2006), e foram corrigidas manualmente com o editor BioEdit ([www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html](http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html)). As sequências foram posteriormente classificadas pela Ribosomal Database Project Classifier ([rdp.cme.msu.edu](http://rdp.cme.msu.edu); Cole *et al.*, 2009). De forma a determinar o grau de similaridade entre as sequências alvo e as três mais próximas da base de dados do GenBank. Os valores de matrizes de identidade das sequências foram calculados com o editor BioEdit ([www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html](http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html)).

### **3.7. Ensaio de difusão em agar por inoculação em poços**

A sensibilidade dos microrganismos indicadores às culturas planctónicas foi avaliada *in vitro*, utilizando-se o método de difusão em agar por inoculação em poços, adaptado de Tagg e McGiven (1971).

Analisou-se o efeito de diversos caldos (NB, TSB, BHI, ½R2B, NtB e MRS), diferentes temperaturas (11, 20 e 30°C), duas fases da curva de crescimento (exponencial e estacionária) e dois métodos de tratamento da amostra (cultura inteira vs. sobrenadante isento de células) para os isolados dos tubos lácicos. Para o isolado P2-1, testou-se apenas o efeito do método de tratamento da amostra, em caldo NB à temperatura de incubação de 46°C.

Os microrganismos indicadores, inoculados previamente em 5 mL de NB e incubados por 12–18h a 37°C, foram ajustados para uma absorvância de 0.001, a 620–630 nm, medida no espectrofotómetro (Thermo Spectronic, Genesys 20, 4001/4, USA). Os microrganismos indicadores foram posteriormente incorporados em PCA fundido estéril (50 µL cultura/100 mL PCA) e o meio foi vertido para as placas de petri (50 mL por placa), que foram posteriormente guardadas no frio (4°C). Após o meio estar bem solidificado fizeram-se orifícios com um diâmetro de 7 mm no agar, distribuídos uniformemente, com uma pipeta de pasteur estéril invertida. O fundo do poço foi selado com uma pequena quantidade de agar (Pastagar B, AES Laboratoire, AEB175356, França).

Após crescimento dos isolados em estudo, nos respectivos caldos, às respectivas temperaturas, prepararam-se sobrenadantes isentos de células a partir de cada cultura em estudo. Para tal, as culturas foram centrifugadas sob refrigeração numa centrífuga Eppendorf (5804R, Alemanha), a 4500 x g por 10 minutos a 4 °C, e esterilizou-se o sobrenadante por filtração através de filtros de membrana de polietersulfona (PES) com poros de 0.20 µm (Minisart® high flow, 16532, Sartorius Stedim Biotech, Alemanha). Foram utilizados como controlos negativos os caldos esterilizados e os controlos positivos foram amostras previamente utilizadas que evidenciaram antibiose. A cada poço foi adicionado 70 µL de cada amostra (cultura inteira, sobrenadante isento de células e controlos). As placas mantiveram-se no frio (4°C) por 4h, de modo a permitir a difusão dos compostos da amostra (Corsetti *et al.*, 2004) e posteriormente foram incubadas a 37°C, sob condições aeróbias, por 8h-16h, dependente do crescimento dos microrganismos indicadores. A *E. coli*, *Proteus* e *Salmonella* foram incubados por um intervalo de tempo mais curto, pois crescem

muito rapidamente e produzem muito gás, que interfere com a visualização dos resultados do teste. O teste foi realizado em duplicado.

A actividade antimicrobiana manifestou-se através da presença de halos de inibição ao redor dos orifícios inoculados. O diâmetro dos halos foi medido com uma régua graduada em mm.

### **3.8. Partição e caracterização dos compostos bioactivos de amostras do isolado P2-1**

#### **3.8.1. Bioactividade da cultura inteira vs. sobrenadante**

O ensaio de difusão em agar por inoculação em discos foi realizado somente com o isolado P2-1, por ter sido o único que demonstrou actividade antimicrobiana no sobrenadante livre de células. O teste foi realizado com os indicadores *E. coli* ATCC 25922 e *Listeria monocytogenes* 7466, por terem sido os mais frequentemente inibidos no ensaio de difusão em agar por inoculação em poços. A metodologia empregue para este ensaio foi adaptada de Zheng *et al.* (2005).

Após crescimento do pré-inóculo em NB, a turbidez do caldo foi ajustada para 1 MacFarland com adição de NB estéril. Posteriormente, o isolado foi inoculado a uma concentração de 0.01% (v/v) em tubos de ensaio com 30 mL de caldo. As culturas foram a incubar a 46°C durante 7 dias. Após crescimento, parte das culturas foram centrifugadas sob refrigeração (4°C) a 4500 x g por 10 minutos. A fase sobrenadante obtida e as restantes culturas inteiras foram distribuídas em placas de petri e transferidas para o congelador (-80°C) até estarem congeladas, para evitar a formação excessiva de espuma e perdas de amostra durante a liofilização. Para a liofilização, as amostras foram colocadas de um dia para o outro num liofilizador (E-C Modulyo, EDWARDS, RV8, Inglaterra).

Dissolveu-se o liofilizado em água estéril, obtendo-se uma concentração final de 0.1 g de liofilizado/mL. Com esta solução, procedeu-se à carga de discos brancos (Blank Discs, CT0998B, Oxoid, UK) com 3x20 µL de cada amostra, de forma a saturá-los, com intervalos de cerca de 30 minutos, para secagem, entre cada aplicação.

Cultivou-se os indicadores (*E. coli* e *L. monocytogenes*) em NB e, após 18–24h, ajustou-se a turbidez para 1 MacFarland. Estas suspensões de indicadores foram utilizadas para inocular a superfície de placas contendo PCA ou MHA (Mueller-Hinton Agar, AES laboratoire, AEB151802) por meio de uma zaragatoa. O MHA foi utilizado por ser o meio padrão desta metodologia (EUCAST, 2009). O PCA foi escolhido por ter sido usado em ensaios anteriores (Varela *et al.*, 2009; Riquelme *et al.*, 2010). Os discos foram colocados sobre o agar e as placas foram a incubar de um dia para outro a 37°C. Cada teste foi realizado em duplicado.

A actividade antimicrobiana manifestou-se através da presença de halos de inibição ao redor dos discos. O diâmetro dos halos foi medido com uma régua graduada em mm.

### **3.8.2. Partição em solventes guiada por ensaios de bioactividade**

Este ensaio teve como objectivo proceder à separação da fracção ou fracções da cultura inteira do isolado P2-1 dotada(s) de maior actividade. Inoculou-se o P2-1 em 10mL de NB. Após 3 dias de crescimento a 46°C, ajustou-se a turbidez da cultura para 1 McFarland. Posteriormente, inocularam-se 20 tubos contendo 30 mL NB, através da adição de 0.3 mL de pré-cultura a cada tubo, e incubaram-se todos os tubos a 46°C.

Após 7 dias de incubação, dividiu-se a cultura obtida em quatro fracções de igual volume. A três destas fracções, adicionou-se igual volume de solvente: *n*-butanol (34867, Sigma-Aldrich), acetato de etilo (EtoAc) (1.00868.2500, Merck) ou *n*-hexano (32293, Sigma-Aldrich), correspondendo a três tipos distintos de solventes: polar prótico, polar aprótico e apolar, respectivamente. À quarta fracção não foi adicionado qualquer solvente, funcionando como controlo positivo.

As amostras com solvente foram colocadas num agitador orbital (Edmund Buhler GmbH, TH 30, Alemanha) e agitadas a 120 rpm durante 30 minutos. Posteriormente foram colocadas a 4°C durante 1h para facilitar a separação das fases. Procedeu-se à separação das fases num funil de decantação. A fase de solvente foi evaporada (banho-maria: 65°C; refrigeração: 5°C; pressão: 30 mbar) num evaporador rotativo (BUCHI, R215, Suíça) e a fase aquosa e o controlo positivo foram liofilizados como anteriormente descrito.

Após liofilização ou evaporação dos solventes das amostras, estas foram ressuspendidas, à concentração de 0.1 g/mL, nos respectivos solventes (água destilada estéril no caso do controlo e das fases aquosas). Voltou-se então a realizar o ensaio de difusão em agar por inoculação em discos para determinar a actividade antimicrobiana das diferentes fracções obtidas.

### **3.8.3. Estudo da termostabilidade, sensibilidade enzimática e à precipitação com sulfato de amónio**

O efeito da temperatura, de enzimas e do sulfato de amónio, sobre a actividade antimicrobiana do sobrenadante do isolado P2-1 foi determinado. A preparação do sobrenadante foi efectuada como anteriormente referido (3.8.1).

Submeteu-se o sobrenadante às seguintes condições: banho-maria a 100°C durante 30 minutos; banho-maria a 100°C durante 60 minutos; e autoclavagem (121°C durante 15 minutos) (Corsetti *et al.*, 2004). A actividade antimicrobiana foi determinada nas amostras resultantes do tratamento térmico através do ensaio de difusão em agar por inoculação em poços, como descrito anteriormente.

Para testar a sensibilidade a diferentes tipos de enzimas, utilizou-se a metodologia de Todorov e Dicks (2006). Adicionou-se neutrase (Sigma-Aldrich), proteinase K (Sigma-Aldrich),  $\alpha$ -quimotripsina (Sigma-Aldrich), tripsina (Sigma-Aldrich) e  $\alpha$ -amilase (Sigma-Aldrich) a cada um sobrenadante do isolado P2-1. As amostras foram incubadas a 30°C durante 2h. O controlo negativo consistiu na enzima à concentração de 1 mg/mL em NB. A actividade antimicrobiana foi testada nas diferentes amostras que resultaram do tratamento enzimático através do ensaio de difusão em agar por inoculação em poços como descrito anteriormente.

Para testar se o(s) composto(s) antimicrobiano(s) presente(s) no sobrenadante poderia ser de natureza proteica, procedeu-se ao teste da precipitação com sulfato de amónio a 80%. A adição de sulfato de amónio em elevadas concentrações precipita as proteínas solúveis em água, através do fenómeno de *salting out* (Jakoby *et al.*, 1971). Adicionou-se sulfato de amónio ao sobrenadante e colocou-se a amostra num agitador orbital de um dia para o outro, à temperatura ambiente. Posteriormente, a amostra foi centrifugada a 4500 x g por 20 minutos, a 4°C. A actividade antimicrobiana do

sobrenadante foi então testada através do ensaio de difusão em agar por inoculação em poços como descrito anteriormente.

## **4. Resultados e Discussão**

### **4.1. Caracterização morfofisiológica**

No quadro 4 apresenta-se um resumo da caracterização morfofisiológica dos isolados e das respectivas colónias. Na maioria, as colónias apresentaram uma coloração branca e foram de pequenas dimensões. A mobilidade esteve presente somente em 7 isolados, enquanto que a capacidade de reduzir os nitratos foi observada em 13 isolados. A capacidade dos microrganismos reduzirem os nitratos a nitritos e posteriormente a azoto é importante neste tipo de ambiente oligotrófico, como fonte de energia e nutrientes para os microrganismos (Hathaway, 2010). Nos tubos de lava da ilha Terceira, Hathaway (2010) observou a presença de grupos de bactérias capazes de fixar o azoto, nomeadamente, Actinobacteria, Firmicutes e diversas classes de Proteobacteria. Detectou ainda a presença de genes que participam no ciclo biogeoquímico do azoto (*amoA* e *nifH*) em amostras de tapetes bacterianos brancos e amarelos provenientes de tubos lávicos dos Açores.

**Quadro 4.** Caracterização física das colônias e fisiológica dos isolados.

Código Amostra	Morfologia das colônias						Caracteres fisiológicos dos isolados	
	Ø (mm)	Coloração	Morfologia	Brilho	Opacidade	Elevação	Mobilidade	Redução nitratos
GBO70A	< 1	branca	circular	+	-	convexa	-	-
GBO67B1	< 1	branca	circular	+	-	convexa	-	-
GBO67D	< 1	branca	circular	+	-	convexa	-	-
GBO69B	< 1	branca	circular	+	-	convexa	-	-
GBO35A	Nd	branca	filamentosa	-	+	Plana	-	-
GBO22C	Nd	branca	filamentosa	-	+	Plana	-	-
GBO 27E	Nd	branca	filamentosa	-	+	Plana	-	+
GBO34G	1-4	beige	circular	+	-	convexa	+	-
GBO31A	Nd	branca	filamentosa	-	+	Plana	-	+
GBO15B	1	amarela	circular	+	+	convexa	+	-
GBO31H	Nd	branca	filamentosa	-	+	Plana	-	+
GBO36B	Nd	branca	filamentosa	-	+	Plana	-	+
GBO71A	1-4	branca	circular	+	+	convexa	-	+
GBO 8C	Nd	branca	filamentosa	-	+	Plana	-	-
GBO 68C	>5	branca	irregular	-	+	Plana	+	-
GBO 20A2	Nd	branca	filamentosa	-	+	Plana	-	+
GBO 31C	1-4	beige	circular	+	-	convexa	+	-
GBO27A	Nd	branca	filamentosa	-	+	Plana	-	+
GBO 15F	Nd	branca	filamentosa	-	+	Plana	-	+
GBO 68A	1-4	beige	circular	+	-	convexa	-	-
GTM 1B1	1-3	beige	circular	+	-	convexa	+	-
GTM 1B2	1-4	beige	circular	+	-	convexa	+	-
GTM 1D	1-2	beige	oval	+	-	convexa	+	-
GTM 2A	Nd	branca	filamentosa	-	+	Plana	-	+
GTM 5E	1-3	branca	irregular	-	+	Plana	-	+
GTM 2B1	Nd	branca	filamentosa	-	+	Plana	-	-
GTM 1E1	Nd	branca	filamentosa	-	+	Plana	-	-
P4-2	1-4	beige	circular	+	+	convexa	-	+
P1-6B	1-4	beige	circular	+	+	convexa	-	+
P2-1	1-4	beige	circular	+	+	convexa	-	+

(-): ausente; (+): presente; nd: não foi possível determinar dada a natureza contínua e difusa do crescimento

O agrupamento dos isolados segundo os seus caracteres fenotípicos, de acordo com Jay *et al.* (2006), está patente no quadro 5. Os isolados estudados pertencem a sete grupos morfofisiológicos diferentes, três dos quais de bactérias Gram-positivas e quatro de bactérias Gram-negativas. Em ambientes cavernícolas, têm sido observados *Bacillus*, *Enterobacteriaceae* (Hathaway, 2010) *Paenibacillus*, *Pseudomonas*

(Schabereiter-Gurtner *et al.*, 2002) e bactérias do ácido láctico (Northup *et al.*, 2003), que têm características morfofisiológicas semelhantes às dos nossos isolados.

**Quadro 5.** Agrupamento dos isolados segundo os seus caracteres fenotípicos.

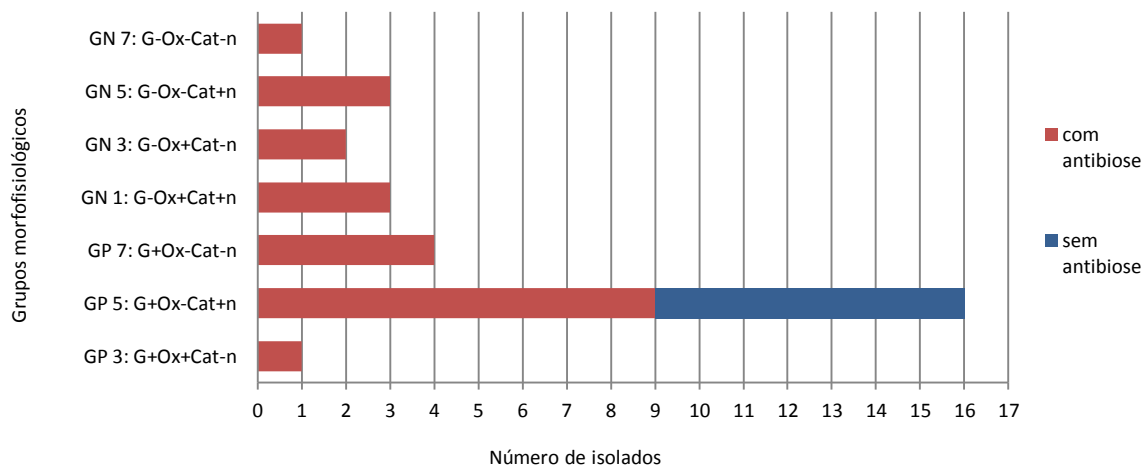
GP 3:	GP 5:	GP 7:	GN 1:	GN 3:	GN 5:	GN 7:
G+Ox+Cat-n	G+Ox-Cat+n	G+Ox-Cat-n	G-Ox+Cat+n	G-Ox+Cat-n	G-Ox-Cat+n	G-Ox-Cat-n
P2-1	GBO31A	GBO67B1	GBO34G	P1-6B	GBO68A	GBO71A
	GBO36B	GBO70A	GTM1D	P4-2	GTM1B2	
	GTM5E	GBO69B	GBO31C		GTM1B1	
	GBO20A2	GBO67D				
	GBO27E					
	GBO27A					
	GTM2A					
	GBO15F					
	GBO31H					
	GBO35A					
	GBO22C					
	GBO15B					
	GBO8C					
	GBO68C					
	GTM2B1					
	GTM1E1					

G+:Gram-positivo; G-:Gram-negativo; Ox+:oxidase positivo, Ox-:oxidase negativo; C+: catalase positivo; C-: catalase negativo; n: não produtor de pigmentação

## 4.2. Estudo da actividade antimicrobiana

### 4.2.1. Ensaio de inoculação cruzada

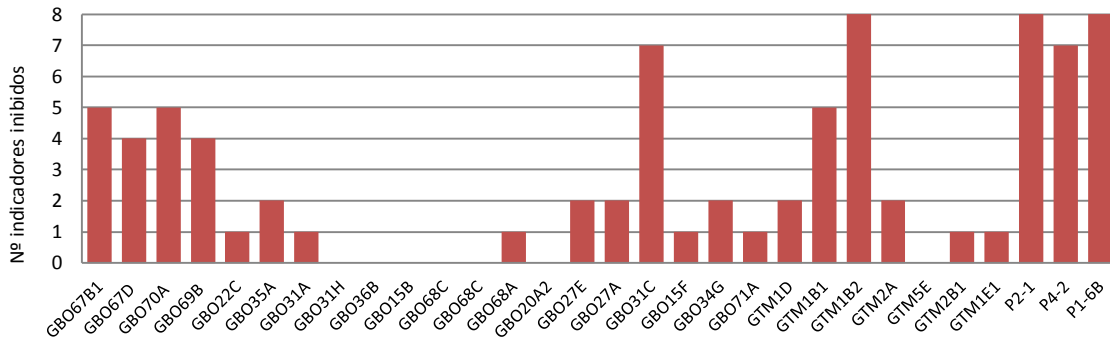
Em seis dos sete grupos morfofisiológicos estudados, todos os isolados em análise apresentaram actividade antimicrobiana contra pelo menos um dos indicadores considerados. Destes, quatro grupos são pertencentes a bactérias Gram-negativas. O grupo GP 5 foi o único em que parte dos isolados não evidenciaram capacidade antimicrobiana (Figura 10).



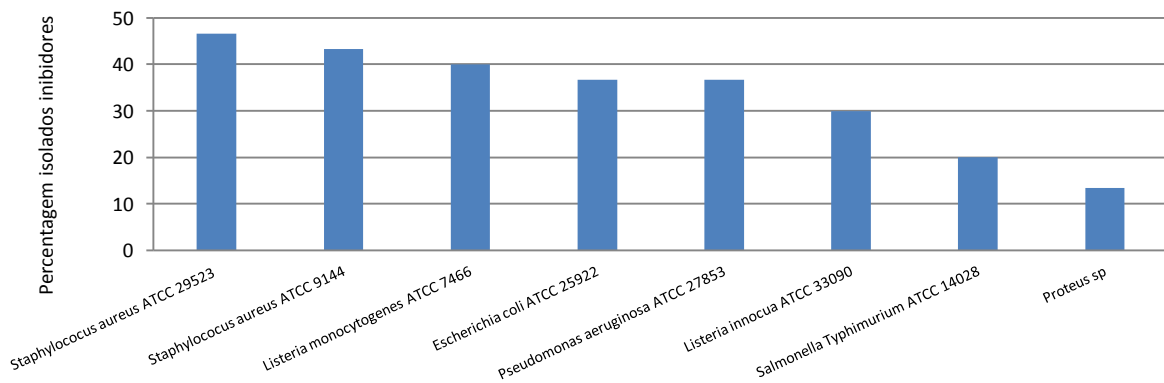
**Figura 10.** Actividade antimicrobiana de isolados obtidos a partir de tubos lávicos (Branca Opala e Terra Mole) e fumarolas da Ilha Terceira, Açores, segundo cada grupo morfofisiológico.

Na figura 11, observou-se que, dos trinta isolados em estudo, apenas oito inibiram cinco ou mais indicadores. Os isolados GTM1B2, P2-1 e P1-6B foram os únicos que apresentaram antibiose frente a todos os microrganismos indicadores testados. O indicador mais frequentemente inibido no ensaio de inoculação cruzada foi o *Staphylococcus aureus* ATCC 29523, com 47% de isolados inibidores (Figura 12). Os microrganismos indicadores com menores frequências de inibição foram o *Proteus* (inibido por 13% dos isolados) e a *Salmonella* Typhimurium (inibida por 20% dos isolados em estudo) (Figura 12).

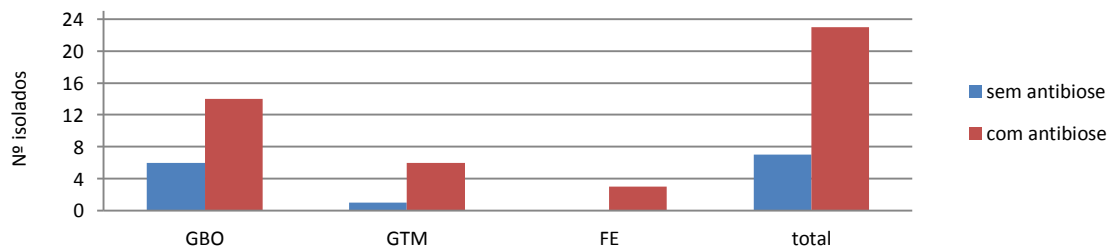
Na figura 13, apresentam-se os resultados da antibiose por local de amostragem. Observou-se que todos os três isolados provenientes das FE apresentaram antibiose. Quanto aos isolados das grutas GTM e GBO, embora nem todos fossem inibidores, houve mais isolados com antibiose do que isolados sem capacidade inibidora. Relativamente aos tapetes de origem (Figura 14), observou-se que, nos tapetes rosa e amarelo, todos os isolados apresentaram antibiose contra pelo menos um dos indicadores em estudo. Nos restantes tapetes (beige e branco), obteve-se isolados com actividade antimicrobiana e isolados sem antibiose. No tapete branco foram amostrados maior número de isolados com capacidade antimicrobiana, contra os microrganismos indicadores, do que isolados sem capacidade antimicrobiana.



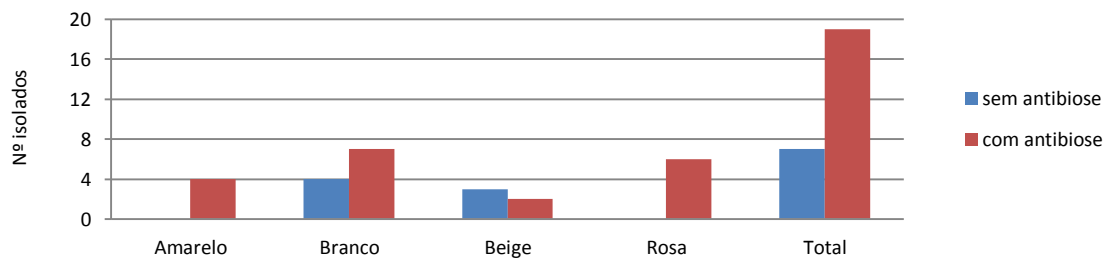
**Figura 11.** Actividade antimicrobiana de isolados obtidos a partir de tubos lávicos (GBO e GTM) e fumarolas (FE) da Ilha Terceira, Açores. Número de microrganismos indicadores inibidos por cada isolado.



**Figura 12.** Proporção de isolados obtidos a partir de tubos lávicos (GBO e GTM) e fumarolas (FE) da Ilha Terceira, Açores, que inibem os microrganismos indicadores em estudo.



**Figura 13.** Actividade antimicrobiana de isolados obtidos a partir de tubos lávicos (GBO e GTM) e fumarolas (FE) da Ilha Terceira, Açores, segundo o local de amostragem.



**Figura 14.** Actividade antimicrobiana de isolados obtidos a partir de tapetes amarelos, brancos, bege e rosa das grutas Branca Opala e Terra Mole (Terceira, Açores).

A metodologia usada (ensaio da inoculação cruzada) adequou-se bem aos objectivos do trabalho. Este método permite simular em laboratório o crescimento em biofilme de cada isolado, sendo por isso adequado para detectar a actividade antimicrobiana em números elevados de culturas obtidas a partir de biofilmes de tubos lúvicos, por reproduzir o modo de crescimento dos microrganismos no seu habitat natural. Por este motivo e por ser um método relativamente rápido e de fácil execução, tem sido frequentemente utilizado para a pesquisa inicial da actividade antimicrobiana de microrganismos em ambientes muito diversificados (Deepa *et al.*, 2011; Mangano *et al.*, 2009; Ravikumar *et al.*, 2010).

### **4.3. Estudo da cinética de crescimento**

#### **4.3.1. Cálculo dos parâmetros da curva de crescimento**

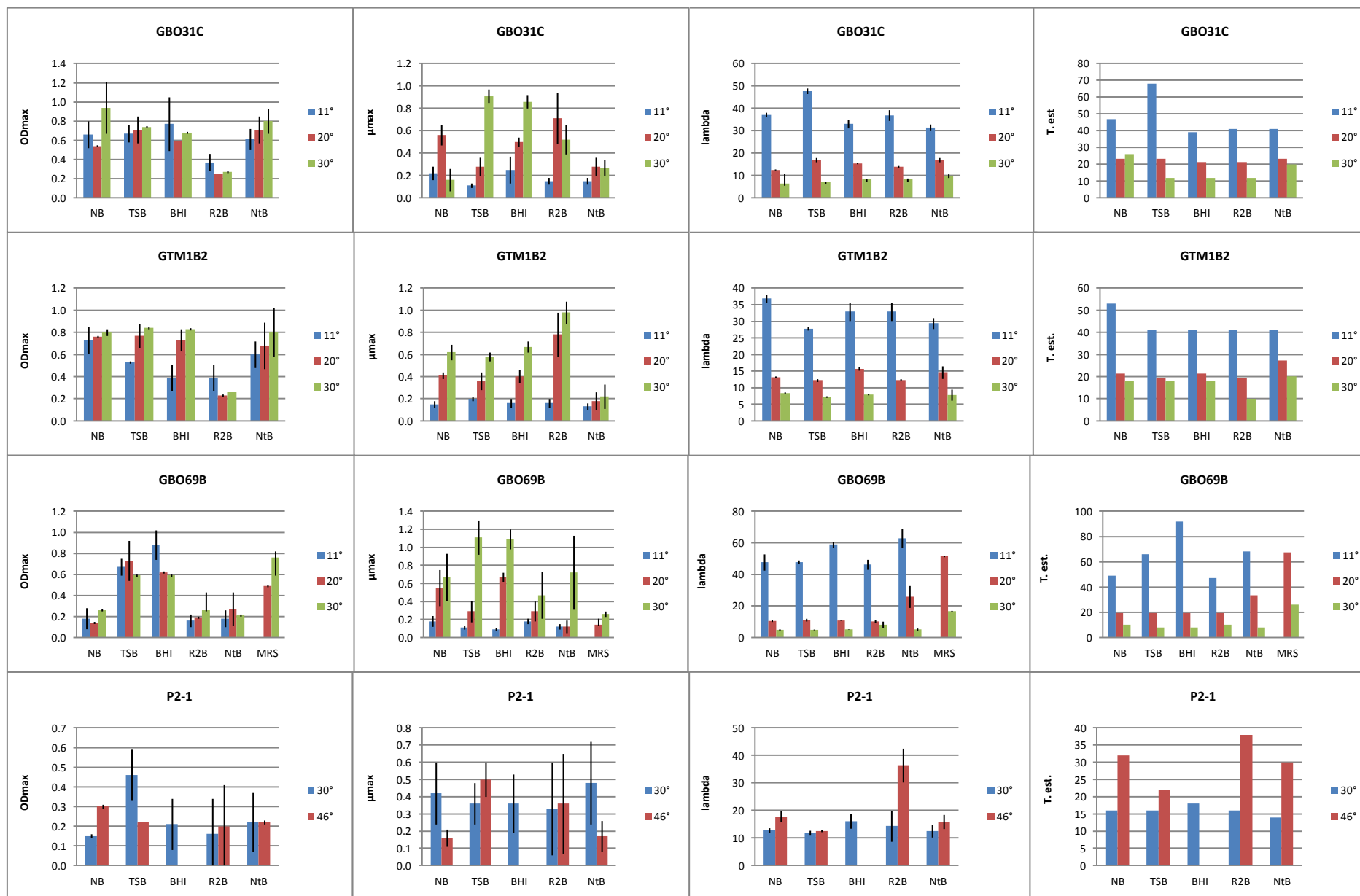
Na figura 15 observam-se os parâmetros da curva de crescimento, nomeadamente densidade óptica máxima (ODmax), taxa específica máxima de crescimento ( $\mu_{\max}$  ( $h^{-1}$ )), duração da fase de latência ( $\lambda$  (h)), e tempo de entrada na fase estacionária (T. est. (h)) para os isolados em estudo.

Os dois isolados pertencentes ao filo das Proteobactérias (GBO31C e GTM1B2) apresentaram desempenho significativamente ( $p < 0.05$ ) pior quanto ao crescimento a todas as temperaturas testadas no caldo  $\frac{1}{2}$ R2B. Em relação às temperaturas testadas, a de 30°C permitiu valores significativamente ( $p < 0.05$ ) mais elevados de ODmax,  $\mu_{\max}$  e valores significativamente mais baixos ( $p < 0.05$ ) de  $\lambda$ . Dum modo geral, a temperatura teve um efeito muito acentuado sobre a duração da fase de latência dos isolados, o que está de acordo com o relatado por Fisher e Phillips (2009).

Relativamente ao *Enterococcus* (GBO69B) na temperatura de 30°C, o caldo MRS, conduziu a valores de ODmax significativamente ( $p < 0.05$ ) mais elevados, o e a valores de  $\mu_{\max}$  significativamente ( $p < 0.05$ ) mais baixos, do que os restantes caldos. Quanto aos valores de  $\lambda$  e de T. est., a 30°C, estes são significativamente ( $p < 0.05$ ) mais baixos, comparativamente às restantes temperaturas. O MRS é considerado um dos meios de eleição para bactérias do ácido láctico, no entanto, tal facto depende da temperatura de incubação.

Em relação ao isolado P2-1 verificou-se também um efeito considerável das condições de cultivo sobre os parâmetros de crescimento. Em BHI, o isolado não cresceu a 46°C embora o tenha feito a 30°C. Os valores mais elevados de OD<sub>max</sub> e de  $\mu_{max}$  foram obtidos para o caldo TSB. Tal como nos isolados dos tubos lávicos, os valores de  $\lambda$  e T. est. foram significativamente ( $p < 0.05$ ) mais baixos a 30°C (Figura 15).

As condioes (caldos e temperaturas de incubao) que melhor favoreceram o crescimento, maximizando os valores de OD<sub>max</sub> e  $\mu_{max}$ , mostram-se dependentes do isolado. No entanto, de um modo geral, pode considerar-se que a temperatura de 30°C foi a mais adequada para o crescimento das Proteobactérias em estudo, por ter conduzido  obtenao de valores mais elevados de OD<sub>max</sub> e de  $\mu_{max}$  bem como valores mais baixos de  $\lambda$ . O caldo de 1/2R2B foi o que apresentou pior desempenho em termos de crescimento para todos os isolados dos tubos lávicos, o que não  surpreendente, uma vez que este  um meio oligotrófico, com baixas concentraoes de nutrientes. Por outro lado, os dois caldos que conduziram a melhores desempenhos em termos de crescimento (TSB e BHI) são meios com concentraoes elevadas de nutrientes e contem ambos glucose. Tendo em conta a generalidade dos parâmetros, o caldo TSB poderá ser usado para o crescimento do isolado P2-1 em ensaios futuros.



**Figura 15.** Valores médios (n=4) ± estimativa de erro dos parâmetros da curva de crescimento ( $OD_{max}$ ,  $\mu_{max}$  ( $h^{-1}$ ),  $\lambda$  (h)) calculados pelo programa Microfit (IFR, 1999) e do tempo médio de entrada em fase estacionária (T.est. (h)) dos isolados GBO31C, GTM1B2, GBO69B e P2-1. Não houve crescimento do isolado GBO69B em MRS a 11°C.

#### 4.4. Identificação dos isolados

No quadro 6 apresentam-se os resultados da identificação molecular de alguns isolados pela sequenciação do gene codificante do ARNr da subunidade 16S. Os isolados GBO31C e GTM1B2 pertencem ambos ao filo das Proteobactérias, e mais concretamente ao género *Pseudomonas* ou a géneros muito próximos como a *Burkholderia*. O isolado GBO69B pertence ao Filo Firmicutes, apresentando elevada similaridade (99%) com estirpes de *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis*.

Um estudo de Northup *et al.* (2011), realizado em diversas grutas incluindo as dos Açores, demonstrou a existência de uma elevada diversidade de microrganismos em tubos lávicos. Foi observada a presença de diversos filos bacterianos nos tapetes de tubos lávicos (5-11 filos por gruta), entre eles os filos a que pertencem os isolados que foram objecto do nosso estudo (Proteobactérias e Firmicutes). Apesar dos dados apresentados por Northup *et al.* (2011) apontarem para a presença de Actinobacteria, um filo bacteriano bem conhecido pela sua produção de substâncias antimicrobianas (Peláez, 2006) em todos os tubos lávicos estudados, nenhum dos isolados identificados no presente trabalho pertencia a este filo. Os métodos dependentes do cultivo, como o que usámos, permitem identificar apenas uma pequena fracção dos microrganismos efectivamente presentes nas amostras (Hugenholtz *et al.*, 1998). Por outro lado, a identificação dum maior número de isolados, que se encontra em curso, poderá conduzir à identificação de outros filos.

**Quadro 6.** Resultados da identificação dos isolados por sequenciação do gene codificante do ARNr da subunidade 16S.

Código isolado	Sequência GenBank	Accession number	% similaridade
GBO31C	<i>Pseudomonas fluorescens</i> strain Bi60	HQ336318.1	96
	<i>Pseudomonas koreensis</i> strain EA2-7	JF496406.1	96
	<i>Pseudomonas fluorescens</i> strain Bi25	HQ336317.1	96
GTM1B2	<i>Burkholderia cepacia</i> strain ATCC 53795	AY741354.1	99
	<i>Pseudomonas fluorescens</i> strain JF04	HQ123477.1	99
	<i>Pseudomonas teessidea</i> strain PR65T	AM419154.2	99
GBO69B	<i>Enterococcus faecium</i> strain CE3.A	JN653465.1	99
	<i>Enterococcus faecalis</i> strain Na15	HQ831381.1	99
	<i>Enterococcus faecium</i> strain 017	JN560896.1	99

#### 4.5. Ensaio de difusão em agar por inoculação em poços

Na figura 16 observa-se que o uso de diferentes caldos para o crescimento dos isolados conduziu a diferentes respostas frente aos diversos microrganismos indicadores testados. O caldo NB foi o que permitiu ao isolado GBO31C originar maiores halos de inibição (2.2 cm) frente ao *Staphylococcus aureus* ATCC 9144 (Figura 16A). No isolado GTM1B2, o meio de cultura usado também influenciou muito o espectro de inibição e o tipo de indicador inibido. Nos meios TSB e BHI apenas se verificou inibição de indicadores Gram-negativos, enquanto que os meios NtB e ½R2B permitiram maiores espectros de inibição (Figura 16B). Relativamente ao isolado GBO69B, os caldos mais favoráveis à produção de compostos bioactivos demonstraram ser o MRS e o TSB (Figura 16C). A síntese e expressão de compostos antimicrobianos pode ser influenciada por diversos factores, entre os quais o tipo e concentração dos nutrientes constituintes do meio de cultura, nomeadamente a fonte de carbono utilizada (Sánchez *et al.*, 2010). Relativamente à fonte de carbono, os meios TSB, BHI, ½R2B e MRS possuem glucose na sua constituição ao contrário dos restantes meios (NB e NtB). Desta forma observou-se que o isolado GBO69B apresentou melhor desempenho em termos de antibiose num meio com glucose. Pelo contrário, as Proteobactérias (isolados GBO31C e GTM1B2) apresentaram melhores resultados em caldos sem glucose ou com baixas concentrações deste nutriente (½R2B). Duma forma geral, pode concluir-se que o efeito do meio de cultura sobre a actividade antimicrobiana variou consoante o isolado. Por este motivo, a utilização dum único meio para o cultivo de isolados provenientes de ambientes extremos para testar a sua actividade antimicrobiana pelos métodos clássicos de difusão em agar poderá conduzir a resultados pouco fiáveis. A inclusão dum amplo leque de meios de cultura, contudo, torna este tipo de testes moroso e dispendioso. A miniaturização dos testes de actividade antimicrobiana é possível (Yaakoubi *et al.*, 2009) e poderá ajudar a contornar estes problemas.

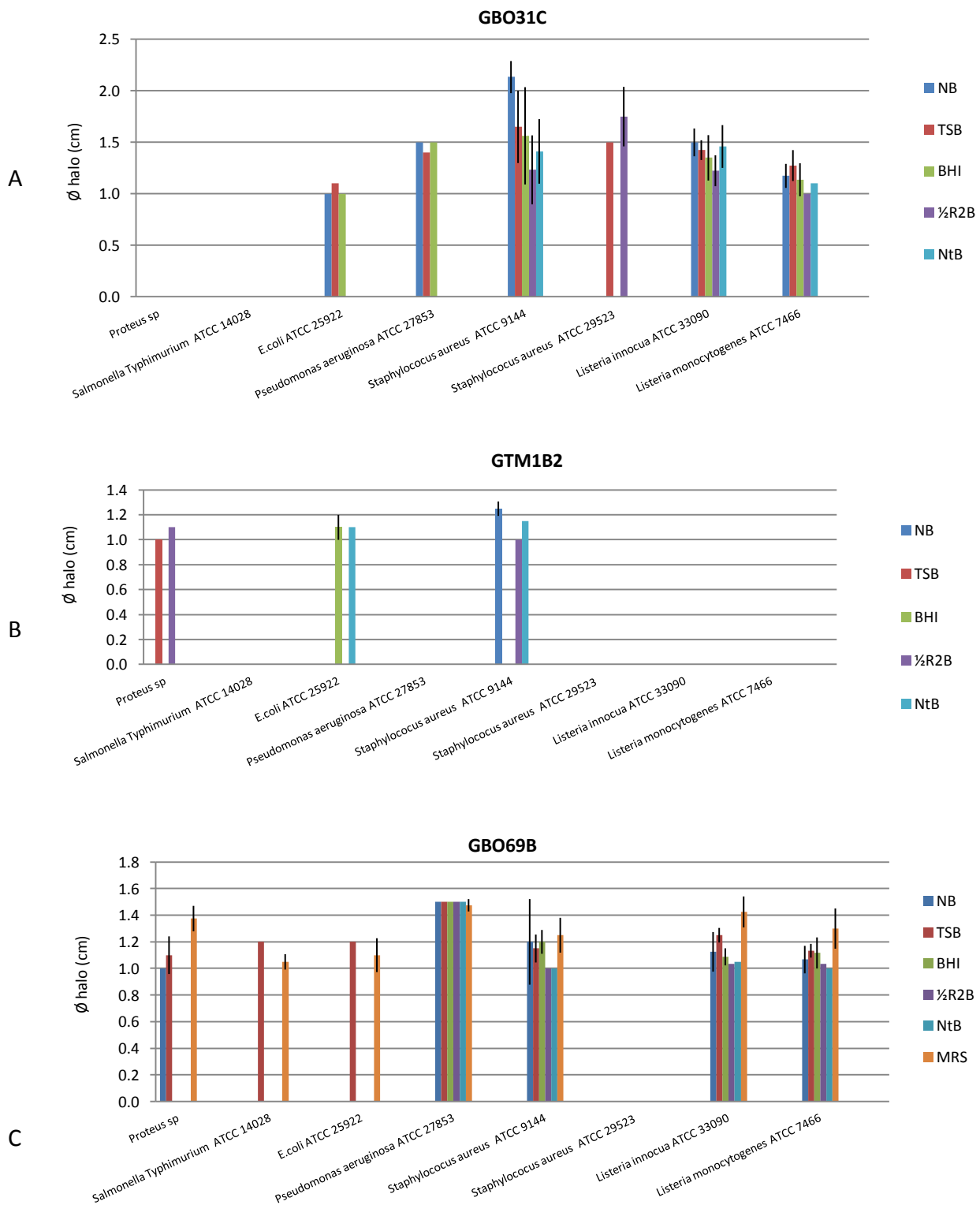
Na figura 17A observa-se que, para o isolado GBO31C (Proteobacteria), as temperaturas de 11°C e 20°C foram as que favoreceram mais a actividade antimicrobiana, uma vez que conduziram à obtenção de halos de inibição maiores (1,8–1,9 cm) e à inibição dum maior número de microrganismos indicadores testados.

A 30°C só se observaram inibições frente a indicadores Gram-positivos (Figura 17A). Quanto à outra Proteobactéria (GTM1B2), à temperatura de 30°C observou-se unicamente inibição da *E. coli* ATCC 25922. Num estudo realizado em 1995, Slininger e Shea-Wilbur demonstraram que a actividade antimicrobiana de *Pseudomonas* ( $\gamma$ -Proteobacteria) depende da temperatura e de factores relacionados com a composição do substrato, o que está de acordo com o observado para os isolados GBO31C e GTM1B2. Quanto ao isolado GBO69B (*Enterococcus*), observou-se que a temperatura de 30°C foi a que mais favoreceu a actividade antimicrobiana (Figura 17C). Outros autores também verificaram dependência da actividade antimicrobiana de bactérias do ácido láctico em relação à temperatura e observaram que a temperatura ideal para a manifestação da actividade antimicrobiana destas bactérias se situava entre 30 e 37°C (Settanni *et al.*, 2008).

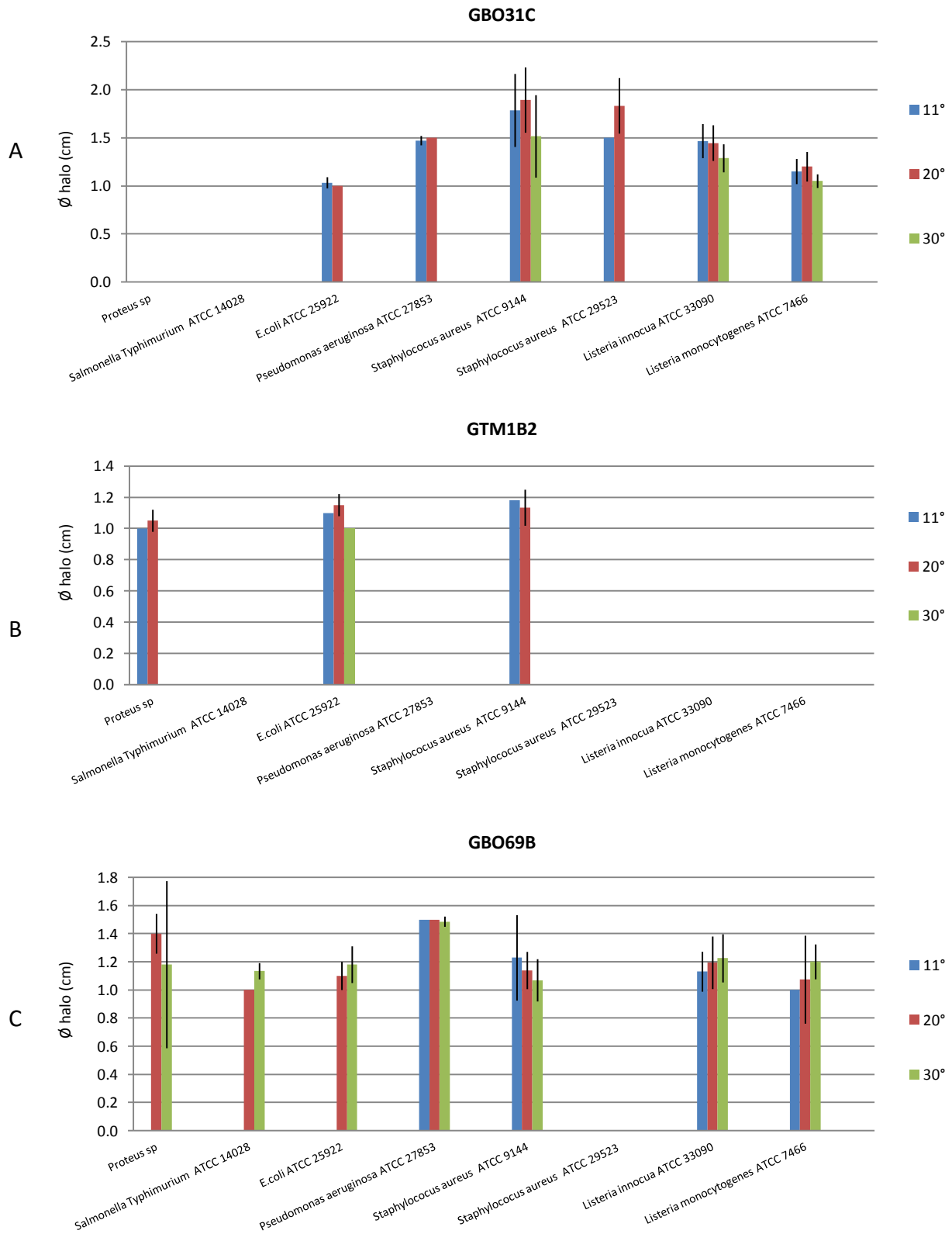
As condições que maximizaram o crescimento dos isolados em estudo não coincidiram com as condições em que a actividade antimicrobiana foi favorecida, o que está de acordo com as observações de Hobbs *et al.* (1990). No entanto, a actividade antimicrobiana, tal como é medida pelo método dos poços, também depende de outros factores como a concentração dos compostos antimicrobianos na amostra e a capacidade de difusão dos mesmos no agar (Bonev *et al.*, 2008).

A figura 18 mostra os resultados da actividade antimicrobiana em duas fases da curva de crescimento. Na figura 18A observa-se que, para o isolado GBO31C, tanto houve antibiose na fase exponencial como na fase estacionária da curva de crescimento, enquanto que o isolado GTM1B2 apresentou actividade antimicrobiana apenas contra três dos microrganismos indicadores estudados e somente na fase estacionária (Figura 18B), o que poderá indicar que a actividade deste isolado resulta do seu metabolismo secundário. O isolado GBO69B (Figura 18C) não apresentou actividade contra o *S. aureus* ATCC 29523 e só foi activo na fase exponencial contra os indicadores *Proteus* e *Salmonella* Typhimurium. Os restantes microrganismos-alvo foram inibidos em ambas as fases de crescimento estudadas. Embora a síntese de antibióticos ocorra geralmente na fase estacionária, por se tratar de metabolitos secundários (Sánchez *et al.*, 2010), a produção doutras substâncias antimicrobianas, como as bacteriocinas dos

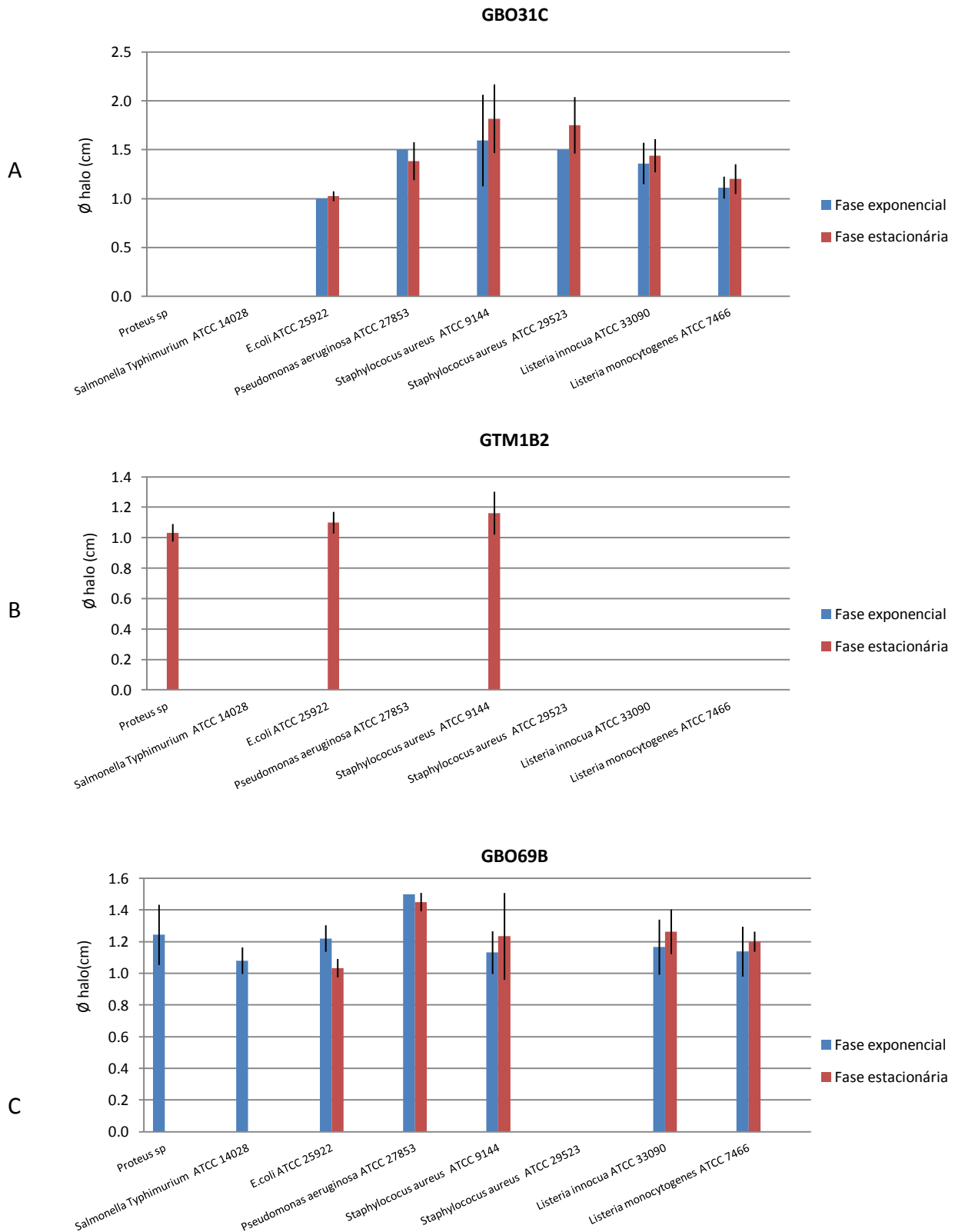
*Enterococcus*, que não são consideradas metabolitos secundários, já poderão apresentar um padrão distinto (Fisher e Phillips, 2009).



**Figura 16.** Efeito dos meios de cultura (NB, TSB, BHI, 1/2R2B, NtB ou MRS) sobre a actividade antimicrobiana de isolados obtidos a partir de tapetes microbianos de tubos lávicos da Ilha Terceira, Açores, avaliada pelo método da difusão em agar com inoculaao em poços. Isolados: GBO31C (A), GTM1B2 (B) e GBO69B (C). Valores médios  $\pm$  Desvio Padrão do diâmetro (cm) dos halos de inibiao do(s) respectivo(s) isolado(s).

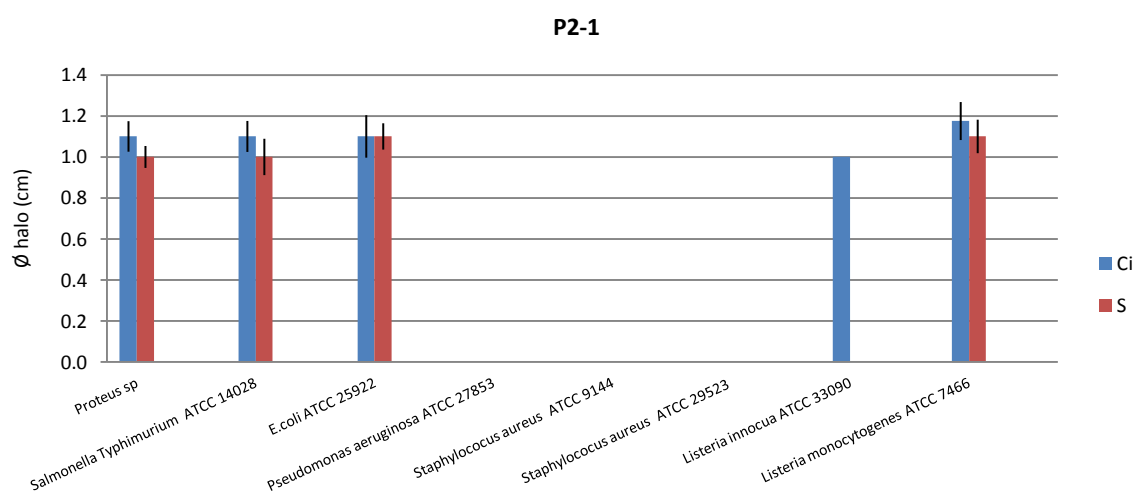


**Figura 17.** Efeito da temperatura de incubação (11, 20 ou 30°C) sobre a actividade antimicrobiana de isolados obtidos a partir de tapetes microbianos de tubos lávicos da Ilha Terceira, Açores, avaliada pelo método da difusão em agar com inoculação em poços. Isolados: GBO31C (A), GTM1B2 (B) e GBO69B (C). Valores médios  $\pm$  Desvio Padrão do diâmetro (cm) dos halos de inibição do(s) respectivo(s) isolado(s).



**Figura 18.** Efeito da fase da curva de crescimento (exponencial ou estacionária) sobre a actividade antimicrobiana de isolados obtidos a partir de tapetes microbianos de tubos lávicos da Ilha Terceira, Açores, avaliada pelo método da difusão em agar com inoculação em poços. Isolados: GBO31C (A), GTM1B2 (B) e GBO69B (C). Valores médios  $\pm$  Desvio Padrão do diâmetro (cm) dos halos de inibição do(s) respectivo(s) isolado(s).

Os sobrenadantes isentos de células obtidos a partir dos isolados provenientes dos tubos lúvicos não produziram quaisquer halos de inibição (dados não apresentados). Na figura 19, apresentam-se apenas os resultados da actividade antimicrobiana de culturas inteiras e sobrenadantes isentos de células do isolado P2-1. Observou-se que, para a maioria dos microrganismos indicadores, não houve diferenças consideráveis entre as duas formas de tratamento da amostra. No entanto, a *Listeria innocua* ATCC 33090 só foi afectada pela cultura inteira.



**Figura 19.** Efeito de culturas inteiras (Ci) e de culturas isentas de células (S) sobre a actividade antimicrobiana, avaliada pelo método da difusão em agar com inoculação em poços, do isolado P2-1. Valores médios  $\pm$  Desvio Padrão do diâmetro (cm) dos halos de inibição do respectivo isolado.

No quadro 7 comparam-se os resultados das duas metodologias empregues no rastreio da actividade antimicrobiana. Observou-se que, no ensaio da inoculação cruzada, todos isolados com excepção do GBO69B (*Enterococcus*) inibiram maior número de microrganismos indicadores do que no teste dos poços. Isto indica que a actividade antimicrobiana de determinados microrganismos poderá ser favorecida em biofilme do que em modo de vida planctónico. Isto também se verificou num estudo de Yan *et al.* (2003), em que uma estirpe de *Bacillus* desenvolvida em biofilme foi capaz de produzir compostos antimicrobianos, ao contrário do que acontecia quando cultivada em modo planctónico. É conhecido que os diferentes modos de vida das bactérias induzem diferenças comportamentais, pelo que não é de estranhar que a actividade metabólica em biofilme seja diferente da encontrada em vida planctónica

(Lopes e Machado, 2010). Assim, ao testar microrganismos provenientes de biofilmes naturais, como os estudados neste trabalho, o método da inoculação cruzada poderá ter a vantagem de reproduzir melhor a forma de vida destes microrganismos no seu habitat natural. Contudo, a utilização da metodologia dos poços também tem vantagens: simplifica a investigação da natureza e propriedades da actividade antimicrobiana, porque permite mais facilmente o tratamento térmico e enzimático das amostras.

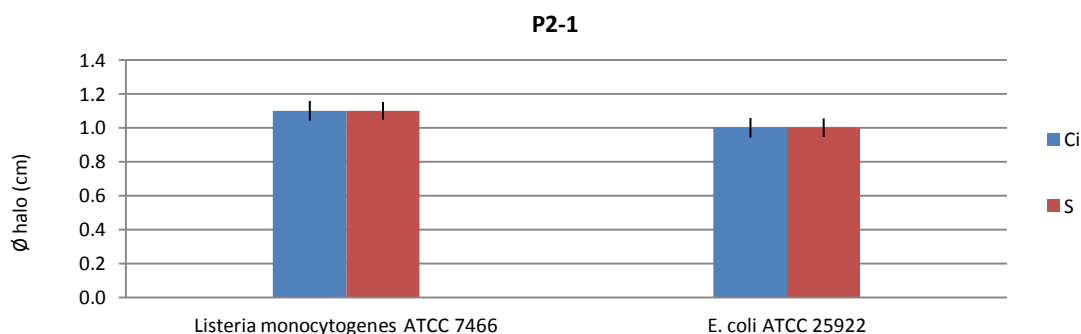
**Quadro 7.** Comparação do espectro de inibição obtido pelo método de inoculação cruzada e pelo método de difusão em agar por inoculação em poços, em quatro isolados recolhidos a partir de amostras de ambientes extremos (tubos lávicos e fumarolas) da Ilha Terceira, Açores.

Isolado	Ensaio	
	Inoculação cruzada	Difusão em agar por poços
GBO31C	7	6
GTM1B2	8	3
GBO69B	4	7
P2-1	8	5

## 4.6. Partição e caracterização dos compostos bioactivos de amostras do isolado P2-1

### 4.6.1. Bioactividade da cultura inteira vs. sobrenadante

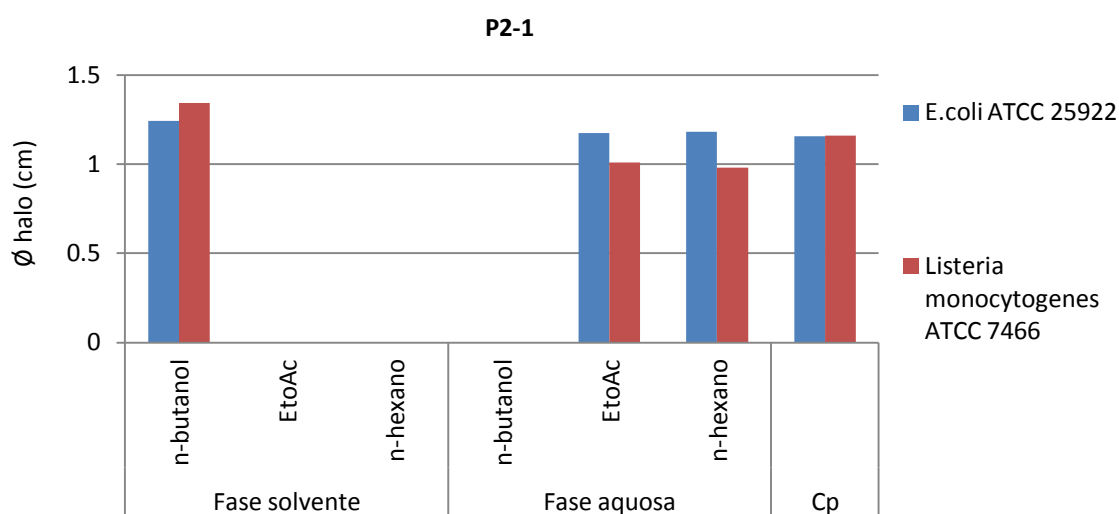
A bioactividade da cultura inteira de P2-1 e do respectivo sobrenadante é comparada na figura 20. Não houve diferenças entre a actividade antimicrobiana dos dois tipos de amostra para cada indicador estudado. Observou-se, contudo, que tanto a cultura inteira como o sobrenadante produziram halos de maior diâmetro frente à *Listeria monocytogenes* 7466.



**Figura 20.** Avaliação da actividade antimicrobiana na cultura inteira (Ci) e no sobrenadante (S) do isolado P2-1, pelo método de difusão em agar com inoculação em discos. Valores médios  $\pm$  Desvio Padrão do diâmetro (cm) dos halos de inibição do respectivo isolado.

#### 4.6.2. Partição em solventes guiada por ensaios de bioactividade

Na figura 21 comparou-se o efeito da partição do líquido de cultura do isolado P2-1, cultivado em NB, a 46°C, com diferentes solventes. Observou-se que a fracção *n*-butanólica foi a única a apresentar actividade antimicrobiana, na fase solvente, contrariamente às restantes fracções. Assim, observou-se que a fracção bioactiva da amostra de P2-1 apresentou maior afinidade por um solvente polar prótico de polaridade média. Os solventes polares próticos solvatam fortemente solutos aniónicos, por estabelecimento de pontes de hidrogénio (Senthilkumar *et al.*, 2004), o que dá uma indicação sobre a polaridade da(s) substância(s) presente(s).



**Figura 21.** Actividade antimicrobiana, avaliada pelo método de difusão em agar com inoculação em discos, da fase aquosa e não aquosa obtida após partição da cultura P2-1 com solventes: apolar (*n*-hexano), polar aprótico (acetato de etilo, EtOAc) e polar prótico (*n*-butanol). Cp: controlo positivo (cultura não fraccionada).

#### 4.6.3. Estudo da termostabilidade, sensibilidade enzimática e à precipitação com sulfato de amónio

Os resultados do ensaio de termostabilidade revelaram que a actividade antimicrobiana do isolado P2-1 contra a *E. coli* e a *L. monocytogenes* se manteve após incubação a 100°C durante 30 minutos. Por outro lado, o isolado deixou de evidenciar bioactividade após ter sido autoclavado a 121°C durante 15 minutos (Quadro 8).

No ensaio de degradação enzimática, não houve alteração da actividade antimicrobiana após adição das enzimas proteinase K,  $\alpha$ -quimotripsina, tripsina e  $\alpha$ -amilase (Quadro 8). Contrariamente, com a adição da enzima proteolítica neutrase à

amostra, o sobrenadante do isolado P2-1 perdeu a sua bioactividade, o que poderá indicar tratar-se de uma (ou mais) proteínas. A enzima neutrase é uma endoprotease, sintetizada pela bactéria *Bacillus amyloliquefaciens* (Perona e Craik, 1995), que ataca as proteínas, preferencialmente, em zonas onde existem aminoácidos hidrofóbicos, o que pode indicar a presença deste tipo de aminoácidos no(s) composto(s) responsáveis pela actividade antimicrobiana do isolado P2-1. Seria, contudo, de esperar que a proteinase K, uma protease sérica de origem eucariótica, activa contra um largo espectro de substratos (Betzel *et al.*, 1993), também inibisse a actividade antimicrobiana do isolado P2-1, o que não se verificou.

O tratamento com sulfato de amónio eliminou a actividade antimicrobiana contra *E. coli* e contra *L. monocytogenes* (Quadro 8), o que também indica a presença de composto(s) de natureza proteica na fracção bioactiva da cultura de P2-1.

**Quadro 8.** Efeito do tratamento com diferentes temperaturas, enzimas e sulfato de amónio sobre a actividade antimicrobiana do isolado P2-1, avaliada pelo método de difusão em agar por poços.

Microrganismos indicadores	Banho	Banho	Autoclave	Enzimas					Precipitação c/ sulfato amónio
	100°C	100°C	121°C	Neutrased	α-Amilase	Tripsina	Proteinase K	α-Quimotripsina	
	30'	60'	15'						
<i>E. coli</i> ATCC 25922	+	+	-	-	+	+	+	+	-
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 7466	+	-	-	-	+	+	+	+	-

(+) actividade antimicrobiana presente; (-) actividade antimicrobiana ausente

## 5. Conclusões

Os isolados de ambientes extremos dos Açores poderão ser uma fonte promissora de antibióticos e de outros compostos antimicrobianos com interesse industrial. Setenta e sete por cento dos isolados estudados inibiram pelo menos um dos oito indicadores testados. Ensaio realizados com dois isolados pertencentes ao filo das Proteobactérias (GBO31C e GTM1B2) e um isolado do género *Enterococcus* (GBO69B) permitiram verificar que as condições de incubação (temperatura e meio de cultura) influenciam a actividade antimicrobiana. Verificou-se também que as condições óptimas para a antibiose diferem das condições óptimas para o crescimento de cada microrganismo. A comparação dos resultados da avaliação da actividade antimicrobiana do GBO31C, GTM1B2 e P2-1 pelos métodos da inoculação cruzada e dos poços, indicou que o modo de vida em biofilme favoreceu a antibiose nestes isolados. O mesmo não se verificou em relação ao isolado GBO69B. O isolado P2-1 (G+Ox+Cat-n) apresentou actividade antimicrobiana de largo espectro. Neste isolado, observou-se que a remoção das células, o tratamento térmico a 100°C e a adição das enzimas proteinase K,  $\alpha$ -quimotripsina, tripsina e  $\alpha$ -amilase não afectaram a actividade antimicrobiana. Pelo contrário, o tratamento térmico a 121°C, com sulfato de amónio, com neutrase e a extracção com *n*-hexano e acetato de etilo, eliminaram a actividade antimicrobiana de culturas do P2-1. Isto indica que para a actividade antimicrobiana deste isolado deverão contribuir composto(s) proteico(s) de polaridade média.

## 6. Bibliografia

- Aguiar, P., Gonçalves, V., Lima, E., Cunha, A., Ramos, J., e Nunes, J. C. (2009). *Estudo das comunidades microbianas associadas a grutas litorais de erosão de Santa Maria, Açores*. XIV expedição Científica do Departamento de Biologia – Santa Maria – Rel. Com. Dep. Bio. **36**: 30-37
- Alanis, A. J. (2005). *Resistance to Antibiotics: Are We in the Post-Antibiotic Era?* Arch. Medical Res. **36**: 697–705
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., e Lipman, D. J. (1997). *Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs*. Nucleic Acids Res. **25**(17): 3389-402
- Aslanzadeh, J. (2006). Capítulo 6. *Biochemical Profile-Based Microbial, Identification Systems*. In: Y. W. Tang e C. W. Stratton. Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology. Springer, New York. 91.
- Baquero, F. e Blázquez, J. (1997). *Evolution of antibiotic resistance*. TREE. **12**: 482-487
- Baranyi, J., e Roberts, T. (1994). *A dynamic approach to predicting bacterial growth in food*. Int. J. Food Microbiol. **23**: 277-294
- Barton, H. (2006). *Introduction to Cave Microbiology: A Review for the Non-Specialist*. J. Cave and Karst Studies. **68**: 43-54
- Barton, A., e Northup, D. (2007). *Geomicrobiology in cave environments: past, current and future perspectives*. J. Cave and Karst Studies. **69**: 163–178
- Benson, H. (2001). Capítulo 48. *Physiological Characteristics: Oxidation and Fermentation Tests*. In: H. Benson. Microbiology Applications – Laboratory Manual in General Microbiology. 8<sup>th</sup> Ed. McGraw-Hill Companies. 168.
- Betzl, C., Singh, T. P., Visanji, M., Peters, K., Fittkau, S., Saenger, W. e Wilson, K. S. (1993). *Structure of the complex of proteinase K with a substrate analogue hexapeptide inhibitor at 2.2-Å resolution*. J. Biological Chemistry. **268**: 15854-15858
- Bonev, B., Hooper, J. e Parisot, J. (2008). *Principles of assessing bacterial susceptibility to antibiotics using the agar diffusion method*. J. Antimicrob. Chemotherapy. **61**: 1295–1301
- Borges, P.A.V. e Oromí, P. (1994). The Azores. In: C. Juberthie e V. Decu (Eds.), *Encyclopaedia Biospeleologica. Tome I*. 605-610. Société de Biospéologie, Moulis.
- Burgess, J., Jordan, E., Bregu, M., Mearns-Spragg, A. e Boyd, K. G. (1998). *Microbial antagonism: a neglected avenue of natural products research*. J. Biotechnol. **70**: 27-32
- Busti, E., Monciardini, P., Cavaletti, L., Bamonte, R., Lazzarini, A., Sosio, M. e Donadio, S. (2006). *Antibiotic-producing ability by representatives of a newly discovered lineage of actinomycetes*. Microbiol. SGM. **152**: 675-683

- Caçador, M. P. (2009). Controlo de Biofilmes Indesejáveis – Utilização de Biocidas em meios Hospitalares. MS Thesis. Universidade do Minho, Portugal
- Caldwell, D., Atuku, E., Wilkie, D., Wivcharuk, K., Karthiken, S., Korber, D., Schmid, D., e Wolfaardt, G. (1997). *Germ theory vs. community theory in understanding and controlling the proliferation of biofilms*. *Adv. Dent. Res.* **11**: 4–13
- Câmara Municipal de Angra do Heroísmo. (2009). *Ícones Ambientais do Concelho de Angra do Heroísmo*. Acedido a 5 Outubro de 2011. <http://www.cm-ah.pt/angrosfera/icones-angra/furnas-enxofre/fotos4.html>
- Câmara, S., Baptista, I., Varela, A. R., Dapkevicius, M. L. N. E., Amorim, I., Pereira, F. e Northup, D. (2008). *Understanding Underground biodiversity in the Azores – a perspective*. 1<sup>as</sup> Jornadas Científicas do Instituto de Biotecnologia e Biomedicina dos Açores. Angra do Heroísmo, Açores
- Cardoso, Pedro. [www.ennor.org](http://www.ennor.org)
- Casalini, J. (2008). *Biofilmes microbianos na indústria de alimentos*. MS Thesis. Universidade Federal de Pelotas, Brasil
- Chaves, L. C. D. (2004). *Estudo da Cinética de Formação de Biofilmes em Superfícies em Contacto com Água Potável*. MS Thesis. Universidade do Minho, Portugal
- Cole, J. R., Wang, Q., Cardenas, E., Fish, J., Chai, B., Farris, R. J., Kulam-Syed-Mohideen, A. S., McGarrell, D. M., Marsh, T., Garrity, G. M., e Tiedje, J. M. (2009). *The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis*. *Nucleic Acids Res.* **37**: D141-D145
- Corsetti, A., Settanni, L. e Sinderen, D. (2004). *Characterization of bacteriocin-like inhibitory substances (BLIS) from sourdough lactic acid bacteria and evaluation of their in vitro and in situ activity*. *J. Appl. Microbiol.* **96**: 521-534
- Costerton J. W., Cheng, K. J., Geesey, G. G., Ladd, T. I., Nickel, J. C., Dasgupta, M., e Marrie, T. J. (1987). *Bacterial biofilms in nature and disease*. *Annu. Rev. Microbiol.* **41**: 435-64
- Davey, M. E., e O’Toole, G. A. (2000). *Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics*. *Mol. Biol. Rev.* **64**: 847-867
- Davies, D., Parsek, M., Pearson, J., Iglewski, B., Costerton, J. W., e Greenberg, E. (1998). *The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm*. *Science* **280**: 295–298
- Davies, J. e Davies, D. (2010). *Origins and evolution of antibiotic resistance*. *Microbiol. Molecul. Biol. Rev.* **74**: 417-433
- Decreto Legislativo Regional n.º 10/2004/A, de 23 de Março de 2004, que classifica como monumento natural regional dos Açores as furnas do Enxofre, na ilha Terceira
- Deepa, L. S., Gowthami, K. e SenthilKumar, K. (2011). *In vivo Screening of Antimicrobial Activity of Soil Actinomycetes Against Human Pathogens*. *World Journal of Agricultural Sciences* **7**: 624-628

- DeSantis, T., Hugenholtz, P., Larsen, N., Rojas, M., Brodie, E., Keller, K., Huber, T., Dalevi, D., Hu, P. e Andersen, G. (2006). *Greengenes, a Chimera-Checked 16S rRNA Gene Database and Workbench Compatible with ARB*. *Appl Environ Microbiol.* **72**: 5069-72
- Donlan, R. M., e Costerton, J. W. (2002). *Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms*. *Clin. Microb. Rev.* **15**: 167-193
- Drosinos, E., Mataragas, M. E Paramithiotis, S. (2008). Capítulo 17. *Antimicrobial activity of bacteriocins and their applications*. In: F. Toldrá (Ed). *Meat Biotechnology*. Springer, E.U.A. 375-398
- Egan, S., Thomas, T. e Kjelleberg, S. (2008). *Unlocking the diversity and biotechnological potential of marine surface associated microbial communities*. *Curr. Opin Microbiol.* **11**: 219-225
- Engel, A. (2007). *Observations on the Biodiversity of Sulfidic Karst Habitats*. *J. Cave and Karst Studies.* **69**: 187-206
- EUCAST - European Committee on antimicrobial susceptibility testing. (2009). *Antimicrobial susceptibility testing EUCAST diffusion method*. v 1.0.
- Figueiredo, P. *Centro de Ciência de Angra do Heroísmo*. Acedido a 23 de Outubro de 2011. <http://centrocienciaah.com/cavernicolas/cavernicolas.htm#intro>.
- Fisher, K., e Phillips, C. (2009). *The ecology, epidemiology and virulence of Enterococcus*. *Microb.* **155**: 1749-1757
- Fonseca, J. (2010). *Avaliação da capacidade de adesão e produção de biofilme em enterococos clínicos e alimentares*. Tese Mestrado. Universidade de Lisboa, Portugal
- Frolund, B., Palmgren, R., Keiding, K., e Nielsen, P. H. (1996). *Extraction of Extracellular Polymers from Activated Sludge Using a Cation Exchange*. *Water Res.* **30**: 1749-1758
- Gespea. (2005). Grupo de trabalho para o estudo do patrimonio espeleologico dos Açores. Acedido a 23 de Outubro de 2011. [www.speleoazores.com](http://www.speleoazores.com)
- Gilbert, P., Das, J., e Foley, I. (1997). *Biofilms susceptibility to antimicrobials*. *Adv. Dent. Res.* **11**: 160-167
- Groth, I. e Saiz-Jimenez, C. (1999). *Actinomycetes in Hypogean Environments*. *Geomicrobiology Journal.* **16**: 1-8
- Hathaway, J. J. M. (2010). *Molecular Phylogenetic Investigation of Microbial Diversity and Nitrogen Cycling in Lava Tubes*. MS Thesis. University of New Mexico, New Mexico
- Hobbs, G., Frazer, C. M., Gardner, D. C. J., Flett, F. e Oliver, S. G. (1990). *Pigmented antibiotic production by Streptomyces coelicolor A3(2): kinetics and the influence of nutrients*. *J. General Microbiol.* **136**: 2291-2296

- Hooshangi, S., e Bentley, W. (2008). *From unicellular properties to multicellular behaviour: bacterium quorum sensing circuitry and applications*. *Current Opin. Biotechnol.* **19**: 550-555
- Hugenholtz, P., Goebel, B., e Pace, N. (1998). *Impact of Culture-Independent Studies on the Emerging Phylogenetic View of Bacterial Diversity*. *J. Bact.* **180**: 4765-4774
- Imada, C. (2005). *Enzyme inhibitors and other bioactive compounds from marine actinomycetes*. *Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* **87**: 59-63
- Jay, J., Loessner, M. J., e Golden, D. A. (2006). Apêndice. Grouping of Gram-Positive and Gram-Negative Bacterial Genera. In: J. Jay, M. J. Loessner e D. A. Golden. *Modern Food Microbiology*. 7<sup>th</sup> Ed. Springer, New York, EUA. 747
- Jakoby, W.B. (1971). Crystallization as a purification technique. In: *Methods in Enzymology*. B. J. William. Editor. Academic Press. 248-252
- Kumar, M., e Srivastava, S. (2010). *Enhanced Production of Enterocin from Enterococcus faecium LR/6 by Statistical Optimization of the Growth Medium*. *Trakia J. Sci.* **8**: 12-21
- Lazzarini, A., Cavaletti, L., Toppo, G., e Marinelli, F. (2000). *Rare genera of actinomycetes as potential producers of new antibiotics*. *Antonie van Leeuwenhoek*. **78**: 399-405
- Levy, S. B. (1998). *The challenge of antibiotic resistance*. *Sci. Am.* **278**: 46-53
- Levy, S. B. (2001). *Antibiotic resistance: consequences of inaction*. *Clin. Infect. Dis. Suppl.* **33**: 124-129
- Levy, S. B. (2002). *The 2000 Garrod lecture. Factors impacting on the problem of antibiotic resistance*. *J. Antimicrob. Chemother.* **49**: 25-30
- Linares, J. F., Gustafsson, I., Baquero, F., e Martinez, J. L. (2006). *Antibiotics as intermicrobial signaling agents instead of weapons*. *Proc. Nat. Academy Sci.* **103**: 19484-19489
- Livermore, D. M. (2007). *Introduction: the challenge of multiresistance*. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **29 Suppl. 3**: S1-S7
- Lopes, S. e Machado, I. (2010). *Role of planktonic and sessile extracellular metabolic byproducts on Pseudomonas aeruginosa and Escherichia coli intra and interspecies relationships*. *J. Ind. Microbial Biotechnol.* **38**: 133-140
- Mangano, S., Michaud, L., Caruso, C., Brillì, M., Bruni, V, Fani, R. e Giudice, A. (2009). *Antagonistic interactions between psychrotrophic cultivable bacteria isolated from Antarctic sponges: a preliminary analysis*. *Res. Microbiol.* **160**: 27-37
- Mearns-Spragg, A., Bregu, M., Boyd, K. G. e Burgess, J. G. (1998). *Cross-species induction and enhancement of antimicrobial activity produced by epibiotic bacteria from marine algae and invertebrates, after exposure to terrestrial bacteria*. *Lett. Appl. Microbiol.* **27**: 142-146
- MicroFit, 1999. Institute of Food Research, UK. <http://www.ifr.bbsrc.ac.uk/MicroFit>

- Miguel, A. L. (2007). *Aplicação da técnica de PCR na pesquisa de bactérias patogénicas em biofilmes de condutas e reservatórios de água do sistema de distribuição da EPAL*. Tese de Mestrado. Instituto Superior Técnico, Universidade Técnica de Lisboa, Portugal
- Mittelman, M. W. (1998). *Structure and Functional Characteristics of Bacterial Biofilms in Fluid Processing Operations*. J. Dairy Sci. **81**: 2760-2764
- Mohamed, J. A., e Huang, D. B. (2007). *Biofilm formation by enterococci*. J. Med. Microb. **56**: 1581-1588
- Moons, P. Michiels, C. W. e Aertsen, A. (2009). *Bacterial interactions in biofilms*. Crit. Rev. Microbiol. **35**: 157-168
- Mulec, J., Zalar, P., Hajna, N. Z., e Rupnik, M. (2002). *Screening for culturable microorganisms from cave environments (Slovenia)*. Acta Carsologica. **31**: 177-187
- Norrby, S. R., Nord, C. E., e Finch, R. (2005). *Lack of development of new antimicrobial drugs: a potential serious threat to public health*. Lancet Infect. Dis. **5**: 115-119
- Northup, D. E., Reysenbach, A-L, Pace, N. R. (1997). Microorganisms and speleothems. In: *Cave minerals of the world*. Hill CA, Forti P. 2<sup>nd</sup> Ed. Huntsville, AL: National Speleological Society. 261–266
- Northup, D. E., Barns, S. M., Yu, L. E., Spilde, M. N., Schelble, R. T., Dano, K. E., Crossey, L. J., Connolly, C. A., Boston, P. J., Natvig, D. O., e Dahm, C. N. (2003). *Diverse microbial communities inhabiting ferromanganese deposits in Lechuguilla and Spider Caves*. Environ. Microbiol. **5**: 1071–1086
- Northup, D. E., Connolly, C. A., Trent, A., Peck, V. M., Spilde, M. N., Welbourn, W. C. e Natvig, D. O. (2004). *The nature of bacterial communities in Four Windows Cave, El Malpais National Monument, New Mexico, USA*. AMCS Bulletin. **19**: 119-125
- Northup, D. E., Melin, L. A., Spilde, M.N., Hathaway, J.J.M., Garcia, M.G., Moya, M., Stone, F.D., Boston, P.J., Dapkevicius, M.L.N.E. e Riquelme, C. (2011). *Lava Cave Microbial Communities Within Mats and Secondary Mineral Deposits: Implications for Life Detection on Other Planets*. Astrobiology. **11**: 1-18
- Nunes, J., Garcia, P., Lima, E., Costa, M., e Pereira, F. (2008). *New geological insights for the Azores Islands (Portugal) lava caves*. In 13th International Symposium on Vulcanospeleology, International Union of Speleology
- Oromí, P., Martin, J. L., Ashmole, N. P., e Ashmole, M. J. (1990). *A preliminary report on the cavernicolous fauna of the Azores*. Mémoires de Biospéologie, **17**: 97-105
- O'Sullivan, J., McCullough, J., Johnson, J. H. Bonner, D. P., Clark, J. C., Dean, L. e Trejo, W. H. (1989). *Janthinocins A, B e C, novel peptide lactone antibiotics produced by Janthino bacterium lividum*. I. Taxonomy, fermentation, isolation, physicochemical and biological characterization. J. Antibiotics. **8**: 913-919
- O'Toole, G., Kaplan, H. B., e Kolter, R. (2000). *Biofilm formation as microbial development*. Annu. Rev. Microbiol. **54**: 49–79

- Ouhdouch, Y., Barakate, M., e Finance, C. (2001). *Actinomycetes of Moroccan habitats: Isolation and screening for antifungal activities*. European J. Soil Biol. **37**: 69-74
- Pasternak, J. (2009). *Biofilmes: um inimigo (in)visível*. SBCC 36-38
- Peláez, F. (2006). *The historical delivery of antibiotics from microbial natural products - Can history repeat?* Biochem. Pharmacol. **71**: 981 – 990
- Pereira, M. (2001). *Comparação da Eficiência de Dois Biocidas (Carbamato Glutaraldeído) em Sistemas de Biofilme*. PhD Diss. Escola de Engenharia da Universidade do Minho, Portugal
- Perona, J., e Craik, C. (1995). *Structural basis of substrate specificity in the serine proteases*. Protein Sci. **4**: 337-360
- Portillo, M. C., Gonzalez, J. M., e Saiz-Jimenez, C. (2007). *Metabolically active microbial communities of yellow and grey colonizations on the walls of Altamira Cave, Spain*. J. Appl. Microbiol. **104**: 681-691
- Powers, E. M. (1995). *Efficacy of the Ryu Nonstaining KOH Technique for Rapidly Determining Gram Reactions of Food-Borne and Waterborne Bacteria and Yeasts*. Appl. Environ. Microbiol. **61**: 3756-3758
- Prescott, L. M., Klein, D. A., e Harley J. P. (2002). *Microbiology*. 5<sup>th</sup> ed. McGraw-Hill Companies. New York. 1147
- Rao, D., Webb J. S. e Kjelleberg, S. (2005). *Competitive interactions in mixed-species biofilms containing the marine bacterium Pseudoalteromonas tunicate*. Appl. Environ. Microbiol. **71**: 1729-1736
- Ravikumar, S., Krishnakumar, S., Inbaneson, S. J. e Gnanadesign, M. (2010). *Antagonistic activity of marine actinomycetes from Arabian Sea coast*. Appl. Sci. Res. **2**: 273-280
- Riley, M. A. e Chavan, M. A. (2007). Capítulo 1. *Introduction*. In: M. A. Riley e M. A. Chavan. Bacteriocins: Ecology and Evolution. Springer, Alemanha. 1-3
- Riquelme, C., Varela, A. R., Ghadimi, A. M., Moselhy, M. A., Hathaway, J. M. M., Dapkevicius, M. L. N. E., e Northup, D. E. (2010). *Preliminary screening of sulfur vents for antibiotic-producing microorganisms*. 8th International Congress on Extremophiles. Book of Abstracts, p170. São Miguel, Azores, Portugal
- Rodrigues, A. A., Carrim, A. J. I., Sadoyma, G., Vieira, J. D. G. (2009). *Potencialidades Biotecnológicas de Bacillus cereus isolado em uma caverna*. Anais do XXX Congresso Brasileiro de Espeleologia. 215-220
- Sánchez, S., Chávez, A., Forero, A., García-Huante, Y., Romero, A., Sánchez, M., Rocha, D., Sánchez, B., Ávalos, M., Guzmán-Trampe, S., Rodríguez-Sanoja, R., Langley, E., e Ruiz, B. (2010). *Carbon source regulation of antibiotic production*. J. Antibiotics. **63**: 442-459
- Schabereiter-Gurtner, C., Saiz-Jimenez, C., Piñar, G., Lubitz, W., e Rölleke, S. (2002). *Altamira cave Paleolithic paintings harbor partly unknown bacterial communities*. FEMS Microbiol. Lett. **211**: 7-11

- Selim, S., Negrel, J., Govaerts, C., Gianinazzi, S., e van Tuinen, D. (2005). *Isolation and Partial Characterization of Antagonistic Peptides Produced by Paenibacillus sp. Strain B2 Isolated from the Sorghum Mycorrhizosphere*. Appl. Environ. Microbiol. **71**: 6501-6507
- Senthilkumar, S., Nath, S. e Pal, H. (2004). *Photophysical properties of coumarin-30 dye in aprotic and protic solvents of varying polarities*. Photodem. Photobiol. **80**: 104-11
- Settanni, L., Valmorri, S., Suzzi, G., Corsetti, A. (2008). *The role of environmental factors and medium composition on bacteriocinlike inhibitory substances (BLIS) production by Enterococcus mundtii strains*. Food Microbiol. **25**: 722-728
- Shaherdur, R. M., e Takashi, A. (2009). *Production characteristics of lipopeptide antibiotics in biofilm fermentation of Bacillus subtilis*. J. Environ. Sci. Suppl. S36-S39
- Slininger, P. J., Shea-Wilbur, M. A. (1995). *Liquid-culture pH, temperature, and carbon (not nitrogen) source regulate phenazine productivity of the take-all biocontrol agent Pseudomonas fluorescens 2-79*. Appl. Microbiol. Biotechnol. **43**: 794-800
- Schabereiter-Gurtner, C., Saiz-Jimenez, C., Piñar, G., Lubitz, W., e Rölleke, S. (2002). *Altamira cave Paleolithic paintings harbor partly unknown bacterial communities*. FEMS Microbiol. Lett. **211**: 7-11
- Shaherdur, R. M., e Takashi, A. (2009). *Production characteristics of lipopeptide antibiotics in biofilm fermentation of Bacillus subtilis*. J. Environ. Sci. Suppl. S36-S39
- Silva, I. (2008). *Acção antimicrobiana de bactérias de tubos lávicos (Branca Opala e Agulhas) Ilha Terceira – Açores*. Projecto do Curso de Engenharia do Ambiente, para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas
- Stein, T. (2005). *Bacillus subtilis antibiotics: structures, syntheses and specific functions*. Mol. Microbiol. **56**: 845-857
- Tagg, J. R. e McGiven, A. R. (1971). *Assay System for Bacteriocins*. Appl. Microbiol. **21**: 943
- Teo, A. Y. L., e Tan, H. M. (2003). *Screening for Microbial Products*. In: *Microbial Biotechnology: Principles and Applications*. Kun, L. Y., e Lee, Y. K. 1<sup>st</sup> Ed. World Scientific Publishing Company. London
- Todorov, S.D., e Dicks, L. (2006). *Screening for bacteriocin-producing lactic acid bacteria from boza, a traditional cereal beverage from Bulgaria: Comparison of the bacteriocins*. Process Biochemistry. **41**: 11-19
- Uzair, B., Ahmed, N., Ahmad, V. U., Mohammad, F. V., e Edwards, D. H. (2007). *The isolation, purification and biological activity of a novel antibacterial compound produced by Pseudomonas stutzeri*. FEMS Microbiol. Lett. **279**: 243–250
- Uzair, B., Ahmed, N., Mohammad, F. V., Ahmad, V. U., e Edwards, D. (2009). *Screening of marine bacteria of Pakistan coast for drug discovery potential*. Proc. Pakistan Acad. Sci. **46**: 137-144

- van der Wende, E., e Characklis, W. G. (1990). Biofilms in Potable Water Distribution Systems. In: *Drinking Water Microbiology*. Gordon A. McFeters Editor, Springer-Verlag, N.Y. Inc. 250-268
- Varela, A. R., Dapkevicius, M. L. N. E., e Northup, D. E. (2009). *Microorganisms isolated from Azorean lava tubes have antimicrobial activity towards food-borne pathogens*. Livro de Actas do 9º Encontro Química dos Alimentos – Qualidade e Sustentabilidade: uma abordagem integrada, 29 Abril a 2 Maio. Angra do Heroísmo. Sociedade Portuguesa Química. Edição em CD-ROM
- Wilson, Z. E., Brimble, M. A. (2008). *Molecules derived from the extremes of life*. Nat. Prod. Rep. **26**: 44-71
- Win, W. Jr., Allen, S., Janda, W., Koneman, E., Procop, G., Schreckenberger, P., e Woods, G. (2006). *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. 6<sup>th</sup> edition. Lippincott Williams e Wilkins. EUA
- Yan, B., Boyd, K. B., Adams, D. R., e Burgess, J. G. (2003). *Biofilm-Specific Cross-Species Induction of Antimicrobial Compounds in Bacilli*. Appl. Environ. Microbiol. **69**: 3719-3727
- Yaakoubi, K., Benkerroum, N., Wiorowski, F., Sanson, F., Haydersah, J. e Chevallier, I. 2009. *Development of a multiwell antagonistic activity assay for the detection of bacteriocin production by lactic acid bacteria*. J. Rapid Methods Automat. Microbiol. **17**: 32-45
- Zheng, L., Chen, H., Han, X., Lin, W., e Yan, X. (2005). *Antimicrobial screening and active compound isolation from marine bacterium NJ6-3-1 associated with the sponge Hymeniacidon perleve*. World J. Microbiol. & Biotechnol. **21**: 201–206
- Zitouni, A., Boudjella, H., Lamari., L, Badji., B, Mathieu, F., Lebrihi, A. E Sabaou, N. (2005). *Nocardiosis and Saccharothrix genera in Saharan soils in Algeria: Isolation, biological activities and partial characterization of antibiotics*. Res. Microbiol. **156**: 984-993

## 7. Anexos

Quadro 1. Grupos propostos por Jay *et al.* (2006) segundo caracteres fenotípicos das bactérias.

Grupo	Gram	Oxidase	Catalase	Produtor ou não de pigmentação (p/n)
1	+	+	+	n
2	+	+	+	p
3	+	+	-	n
4	+	+	-	p
5	+	-	+	n
6	+	-	+	p
7	+	-	-	n
1	-	+	+	n
2	-	+	+	p
3	-	+	-	n
4	-	+	-	p
5	-	-	+	n
6	-	-	+	p
7	-	-	-	n

Quadro 2. Composição do meio R2B já com a concentração, de cada constituinte, reduzida a metade.

Composição	g/L
proteose peptona	0.25
extracto de levedura	0.25
glucose	0.25
ácido de caseína hidrolisado	0.25
amido solúvel	0.25
piruvato de sódio	0.15
fosfato dipotássio	0.15
sulfato de magnésio 7H <sub>2</sub> O	0.025