



UNIVERSIDADE DE ÉVORA

**ESCOLA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA**

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**Estudo de comunidades microbianas  
presentes em amostras arqueológicas**

Patrícia Raquel Grilo Nunes

Ana Teresa Caldeira

**Mestrado em Bioquímica**

Dissertação

Évora, 2017





UNIVERSIDADE DE ÉVORA

**ESCOLA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA**

**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

**Estudo de comunidades microbianas  
presentes em amostras arqueológicas**

Patrícia Raquel Grilo Nunes

Ana Teresa Caldeira

**Mestrado em Bioquímica**

Dissertação

Évora, 2017

*i*



# Agradecimentos

Este trabalho só foi possível realizar graças à colaboração de algumas pessoas. Sou muito grata a cada um, de uma forma especial.

À Professora Doutora Ana Teresa Caldeira pela orientação, por ter proposto este desafio e por todo o apoio recebido durante a execução deste trabalho.

À Professora Cristina Dias pela cedência de amostras arqueológicas.

À Ana Carolina Fialho por todo o auxílio e apoio prestados na execução do trabalho experimental, e pela sua amizade, que foram essenciais na execução deste trabalho experimental.

Um muito especial agradecimento à Tânia Rosado, por ter sido incansável, por todo o tempo que despendeu, por todo o apoio e auxílio na realização deste trabalho, por todos os conhecimentos que me transmitiu, e um especial agradecimento pela sua amizade, sem ela teria sido muito mais difícil.

Um especial agradecimento a todos os colegas e amigos do laboratório Mara Silva, Marina Gonzalez, Cátia Salvador, Ricardo Vieira, Ana Branco, Margarida Pires e Margarida Nunes, por todos os conhecimentos que me transmitiram e pela sua amizade, pela disponibilidade que demonstraram para me apoiarem, sem eles seria muito mais difícil toda a execução deste trabalho experimental.

À D. Anabela Cabeça, D. Maria Helena Carvalho e à D. Esperança Alves por todo o apoio e auxílio que me deram durante o decorrer da componente prática deste trabalho, pela sua disponibilidade e pela sua amizade.

Não posso deixar de agradecer a todos os meus amigos, que foram essenciais durante esta etapa tão importante na minha vida, por toda a sua amizade e paciência.

Um agradecimento muito especial aos meus pais e ao meu irmão, pois sem eles não teria sido possível, e por e terem tantas vezes apoiado nesta fase, que foi por vezes difícil.

Este trabalho teve o apoio do projeto "MEDUSA-Microorganisms Monitoring and Mitigation–Developing and Unlocking novel Sustainable Approaches" ref. ALT20-03-0145-FEDER-000015, co-financiados pela União Europeia através do Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional, enquadrado no ALENTEJO 2020.

Cofinanciado por:





# Resumo

Neste trabalho caracterizou-se a presença de comunidades microbianas, envolvidas em processos fermentativos, usando amostras arqueológicas.

Foram selecionados dois tipos de materiais: fragmentos de ânforas, amplamente utilizadas para o transporte, transformação e armazenamento de produtos alimentares no Império Romano e resíduos de garum, um dos condimentos mais utilizado e amplamente produzido no Império Romano.

Através de métodos de cultura, foi possível isolar diversos microrganismos. Os métodos moleculares permitiram detetar a presença de microrganismos. A análise de DNA metagenómico acoplado a SNG permitiu identificar a presença de comunidades microbianas, possibilitando a atribuição de alguns processos fermentativos a estes artefactos arqueológicos.

Os resultados obtidos demonstraram a presença de microrganismos compatíveis com fermentações lácticas e fermentações alcoólicas. As ânforas de onde são provenientes as peças cerâmicas estudadas possivelmente armazenaram, produziram ou transportaram vinho. Relativamente aos resíduos de garum os resultados revelaram que este é produzido com peixe, muito provavelmente fermentado por bactérias lácticas.

Palavras-chave: Amostras arqueológicas, ânforas, garum, comunidades microbianas, métodos dependentes, SNG.



# Abstract

**Title:** Study of microbial communities present in archaeological samples.

In this study it was characterized the presence of microbial communities involved in fermentative processes in archaeological samples.

Two types of materials were selected: fragments of amphorae, which were widely used for transporting, processing and storage of food products in the Roman Empire and garum residues, one of the most used and produced condiments in the Roman Empire.

It was possible to isolate various microorganisms using culture-based methods. The application of molecular approaches allowed to detect the presence of microorganisms. The analysis of the metagenomic DNA coupled to NGS allowed to identify the presence of microbial communities that made possible to associate these archaeological artefacts to fermentative processes.

The results showed the presence of microorganisms compatible with lactic and alcoholic fermentations. The amphorae from which the studied ceramic pieces were collected were probably used for storage, production or transport of wine. The results obtained from the garum analysis revealed that this condiment was produced from fish, probably fermented by lactic bacteria.

Keywords: Archaeological samples, amphoras, garum, microbial communities, dependent methods, NGS.



# Índice Geral

Agradecimentos.....	I
Resumo.....	III
Abstract.....	V
Índice Geral.....	VII
Índice de Figuras.....	XI
Índice de Tabelas.....	XIII
Índice de Abreviaturas e Unidades.....	XV
Problemática.....	1
Objetivos do trabalho.....	3
1.1    Gerais.....	3
1.2    Específicos.....	3
Estratégia.....	3
<b>Capítulo 1</b> – Revisão bibliográfica.....	7
1.1    O património arqueológico.....	9
1.2    Preservação de alimentos: A importância dos microrganismos.....	11
1.2.1    Fermentação.....	13
1.3    Identificação de comunidades microbianas.....	16
<b>Capítulo 2</b> – Detecção de comunidades microbianas em materiais arqueológicos utilizados para o transporte/transformação de alimentos.....	19
2.1    Introdução.....	21
2.2    Material e métodos.....	23
2.2.1    Amostragem.....	23
2.2.2    Isolamento de microrganismos.....	24
2.2.3    Caracterização dos isolados microbiológicos.....	24
2.2.4    Extração de DNA.....	24
2.2.5    Quantificação de DNA.....	25
2.2.6    Amplificação de DNA por Reação de Polimerase em Cadeia.....	26
2.2.7    Análise de DNA por electroforese em gel de agarose.....	26

2.2.8	Sequenciação de Nova Geração.....	27
2.2.8.1	Extração de DNA .....	27
2.2.8.2	Amplificação e sequenciação do DNA .....	27
2.2.8.3	Análise de dados.....	28
2.3	Resultados e discussão.....	29
2.3.1	Avaliação da presença microbiana.....	29
2.3.2	Métodos independentes de cultura.....	32
2.3.2.1	Extração, quantificação e amplificação de DNA .....	32
2.3.2.2	Sequenciação de Nova Geração .....	34
<b>Capítulo 3</b>	<b>– Detecção de comunidades microbianas em resíduos de garum .....</b>	<b>39</b>
3.1	Introdução.....	41
3.2	Material e métodos .....	43
3.2.1	Seleção de amostras .....	43
3.2.2	Isolamento de microrganismos .....	43
3.2.3	Isolamento de bactérias lácticas.....	43
3.2.4	Caraterização dos isolados microbiológicos.....	44
3.2.5	Extração, amplificação e sequenciação do DNA extraído das bactérias láctica. .....	44
3.2.6	Determinação do perfil de crescimento de bactéria lácticas em meio salino....	45
3.2.7	Extração de DNA bacteriano .....	46
3.2.8	Quantificação de DNA por espectrofotometria de UV-Vis.....	47
3.2.9	Amplificação de DNA por Reação de Polimerase em Cadeia.....	47
3.2.10	Sequenciação de Nova Geração.....	48
3.1	Resultados e discussão.....	49
3.1.1	Isolamentos microbianos.....	49
3.1.2	Pesquisa de bactérias lácticas.....	56
3.1.2.1	Isolamento de bactérias lácticas .....	56
3.1.2.2	Caracterização e identificação molecular das bactérias lácticas isoladas..	57

3.1.2.3	Curvas de crescimento em meio salino .....	60
3.1.3	Métodos independentes de cultura .....	65
3.1.3.1	Extração, quantificação e amplificação de DNA.....	65
3.1.3.2	Sequenciação de Nova Geração .....	66
<b>Capítulo 4</b>	– Considerações finais .....	69
<b>Capítulo 5</b>	– Referências bibliográficas .....	73
Anexos.....	.....	82



# Índice de Figuras

Figura 1 - Visão geral do núcleo industrial do sítio arqueológico de Troia.....	10
Figura 2 - Tanques de salga de peixe .....	11
Figura 3 - Ilustração da apanha da uva e transformação em vinho .....	12
Figura 4 - Fermentação láctica, alcoólica e acética.....	16
Figura 5 - Ânfora.....	21
Figura 6 - Exemplos de peças cerâmicas estudadas.....	23
Figura 7 - (a) Imagem de uma peça e as suas camadas; (b) Gráfico da percentagem de microrganismo isolados.....	30
Figura 8 - (a) Imagem da peça 2 e as suas camadas; (b) Gráfico da percentagem de microrganismo isolados na peça 2. ....	31
Figura 9 - (a) Imagem da peça 3 e as suas camadas; (b) Gráfico da percentagem de microrganismo isolados na peça 3. ....	31
Figura 10 - Eletroforese em gel de agarose de DNA metagenómico das duas camadas de cada peça de cerâmica.....	33
Figura 11 - Classes bacterianas obtidas através de sequenciação de nova geração nas diferentes camadas das peças cerâmicas .....	34
Figura 12 – Géneros bacterianos obtidos através de sequenciação de nova geração nas diferentes camadas das peças cerâmicas.. ....	35
Figura 13 - Diversidade das classes eucariotas obtidas através de sequenciação de nova geração nas peças de cerâmica.....	36
Figura 14 - Diversidade eucariota obtida através de sequenciação de nova geração nas peças de cerâmica.....	37
Figura 15- Local de produção de garum. ....	41
Figura 16 - Amostras dos resíduos de garum.....	43
Figura 17- Crescimento das bactérias isoladas em diferentes concentrações de NaCl.....	45
Figura 18 - Eletroforese em gel de agarose de DNA das dez amostras de bactérias isoladas em meio MRS utilizando os primers 27F e 734R. ....	58
Figura 19- Árvore filogenética dos isolados sequenciados com base na sequência de nucleótidos rDNA 16s.....	60
Figura 20- Perfil de crescimento da estirpe A1 a diferentes concentrações.....	62
Figura 21- Perfil de crescimento da estirpe A5 a diferentes concentrações.....	63

Figura 22 - Perfil de crescimento da estirpe A3 a diferentes concentrações.....	64
Figura 23 - Eletroforese em gel de agarose de DNA das quatro amostras de garum.....	66
Figura 24 - Diversidade eucariota obtida através de sequenciação de nova geração de resíduos de garum.....	67
Figura 25 - Classes bacterianas obtidas através da sequenciação de nova geração de resíduos de garum.....	67
Figura 26- Diversidade bacteriana obtida através de sequenciação de nova geração de resíduos de garum.....	68

# Índice de Tabelas

Tabela 1 - Primers utilizados para amplificação do DNA extraído. ....	26
Tabela 2 - Análise da concentração e grau de pureza do DNA extraído das camadas de cada peça.....	32
Tabela 3 - Primers utilizados para amplificação do DNA extraído. ....	45
Tabela 4 - Primers utilizados para amplificação do DNA extraído. ....	48
Tabela 5- Identificação dos microrganismos isolados do garum 1188. ....	51
Tabela 6 - Identificação dos microrganismos isolados do garum 1475. ....	53
Tabela 7 - Identificação dos microrganismos isolados do garum 1060. ....	54
Tabela 8 - Identificação dos microrganismos isolados do garum 1516. ....	55
Tabela 9 - Identificação bacteriana dos isolados em meio MRS. ....	56
Tabela 10 - Identificação dos isolados bacterianos. ....	59
Tabela 11- Taxa específica de crescimento e tempo de geração das estirpes A1, A5 e A3 nas diferentes concentrações de NaCl. ....	61
Tabela 12- Análise da concentração e grau de pureza do DNA bacteriano extraído das amostras de garum.....	65

## Anexos

Tabela A 1- Composição do meio MRS líquido com diferentes concentrações de NaCl. .	85
Tabela B 1 - Identificação dos microrganismos isolados da camada 1 da peça 1.....	87
Tabela B 2 - Identificação dos microrganismos isolados da camada 2 da peça 1.....	88
Tabela B 3 - Identificação dos microrganismos isolados da camada 3 da peça 1.....	90
Tabela B 4 - Identificação dos microrganismos isolados da camada 4 da peça 1.....	92
Tabela B 5 . Identificação dos microrganismos isolados da camada 5 da peça 1 .....	93
Tabela B 6 - Identificação dos microrganismos isolados da camada 1 da peça 2.....	93
Tabela B 7 - Identificação dos microrganismos isolados da camada 2 da peça 2.....	94
Tabela B 8 - Identificação dos microrganismos isolados da camada 1 da peça 3.....	94
Tabela B 9 - Identificação dos microrganismos isolados da camada 2 da peça 3.....	95
Tabela B 10 - Identificação dos microrganismos isolados da camada 3 da peça 3.....	95

Tabela C 1 – Quantificação de DNA dos isolados bacterianos..... 96

# Índice de Abreviaturas e Unidades

- Abs – Absorvância
- DNA - Ácido desoxirribonucleico
- dNTPs - Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
- ITS – *Internal Transcribed Spacer*
- NaCl - Cloreto de sódio
- NA – Nutrente Agar
- MEA - Malt Extract Agar
- MRS - Man, Rogosa e Sharpe agar
- PCR - Reação em cadeia da polimerase
- rDNA - Ácido desoxirribonucleico ribossômico
- RNA - Ácido ribonucleico
- rRNA - Ácido ribonucleico ribossômico
- TE – Tampão de eluição
- YPD - Yeast Peptone Dextrose

## Unidades

- mL - mililitro
- min. - minuto
- g -grama
- h – hora
- M- molar
- mM - milimolar
- $\mu$ L – micromolar
- $\mu$ g- micrograma
- ng - nanograma
- mg - miligrama
- nm - nanometro
- pb - pares de bases
- L -litro

- rpm- rotações por minuto
- % - percentagem

# Problemática

As ânforas, artefactos de cerâmica amplamente utilizados em toda a região do Mediterrâneo para o transporte ou armazenamento de produtos, são particularmente conhecidas devido à sua utilização para produzir/armazenar vinho, azeite, cerveja, especiarias, produtos fermentados, bem como vários outros produtos líquidos ou semilíquidos. Estas peças cerâmicas têm sido reconhecidas como importantes fontes de informação sobre as rotas comerciais e alimentação dos nossos antepassados. Em algumas situações, as ânforas encontradas em escavações arqueológicas possuem resíduos do seu conteúdo, sendo assim possível correlacionar a sua utilização. No entanto, a grande maioria das ânforas são encontradas completamente vazias, e esta falta de evidências mantém a incerteza sobre a sua utilização e função, o que leva a uma pesquisa sobre o uso destas ânforas na produção/transporte de vinho, cerveja, azeite, garum e outros alimentos, sendo pertinente clarificar a utilidade destes objetos pelos nossos antepassados. O garum é um alimento fermentado, um preparado de peixe, que estava entre os condimentos mais utilizados e amplamente produzidos e distribuídos em todo o antigo Império Romano. A conserva por salga de peixe e a produção de garum constituíram uma das indústrias mais ativas do Portugal Romano, particularmente nos estuários do Sado e Tejo, Sines e na costa algarvia (Silva, *et al.*, 2006).

A evidência da presença de microrganismos nas camadas mais internas dos materiais cerâmicos arqueológicos utilizados no armazenamento dos alimentos, ou em resíduos alimentares, pode constituir um indicador importante da utilização de processos fermentativos, nomeadamente associados à produção de vinho, cerveja e garum, contribuindo para um conhecimento na reconstrução da dieta antiga e das técnicas de conservação de alimentos. Este trabalho pretende dar um contributo neste sentido.



# Objetivos do trabalho

## 1.1 Gerais

Este trabalho teve como principal objetivo o desenvolvimento de metodologias para a deteção de microrganismos presentes em amostras arqueológicas, através da caracterização e identificação das comunidades microbiológicas, bem como a pesquisa de microrganismos potencialmente envolvidos em processos fermentativos, com o fim de contribuir para o conhecimento das técnicas de conservação de alimentos.

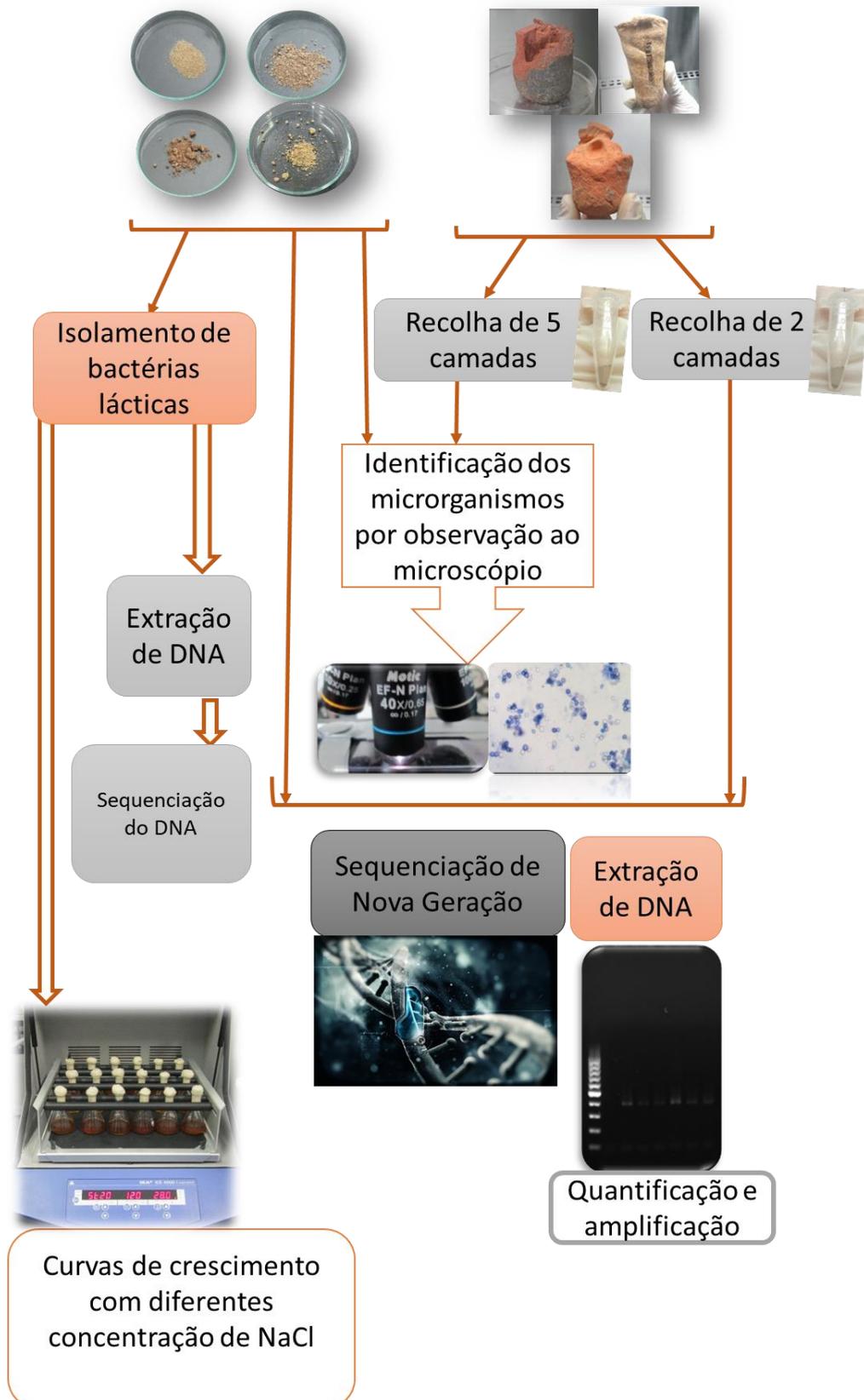
## 1.2 Específicos

- Isolar, caracterizar e identificar comunidades microbianas presentes em amostras arqueológicas, através de técnicas dependentes de cultura;
- Otimizar metodologias para extração de DNA ancestral;
- Utilizar métodos independentes de cultura para a identificação de comunidades microbianas;
- Identificar e caracterizar as comunidades microbianas intervenientes em possíveis processos de conservação/transformação de alimentos.

## Estratégia

A concretização dos objetivos traçados para este trabalho obedeceu ao plano descrito nesta secção.

## Diagrama metodológico



**Amostras estudadas:**

- Peças cerâmicas provenientes de ânforas do período Romano, encontradas no Sul de Portugal
- Amostras de garum (preparado piscícola) provenientes de Troia, Setúbal, Sul de Portugal.

**Metas:**

- Otimização de metodologias de extração de DNA de cerâmicas arqueológicas e de resíduos de garum;
- Pesquisa de microrganismos que possam estar envolvidos em processos de conservação/transformação de alimentos.

**Metodologias utilizadas:**

- Recolha de amostras (a diferentes profundidades) das peças de cerâmicas;
- Isolamento de microrganismos;
- Caracterização dos microrganismos isolados por microscopia;
- Crescimento de bactérias lácticas com diferentes concentrações de NaCl;
- Extração de DNA utilizando várias metodologias;
- Amplificação de DNA por PCR;
- Análise produtos de PCR em gel de agarose;
- SNG das amostras arqueológicas



# Capítulo 1



---

**Revisão bibliográfica**



## 1.1 O património arqueológico

A identificação e deteção rápida de fragmentos DNA tornou-se possível graças aos avanços dos últimos anos no campo da biologia molecular. Estas análises moleculares aplicadas a artefactos arqueológicos podem fornecer informações e gerar novos conhecimentos sem precedentes sobre os nossos antepassados (Hansson, *et al.*, 2008). O que permitirá que novas questões científicas se coloquem em relação à evolução das espécies, práticas agrícolas, reconstrução da dieta, redes de contactos antigos de comércio e das economias de civilizações dos nossos antepassados. Os métodos para o isolamento e amplificação de fragmentos de DNA antigos tornaram-se ferramentas cada vez mais importantes para os cientistas pois permitirão responder a esta vasta série de questões (Foley, *et al.*, 2012, Hansson, *et al.*, 2008).

Neste estudo usamos também análises moleculares para demonstrar a capacidade e a utilidade dos métodos de DNA modernos na pesquisa de microrganismos nas camadas mais internas dos materiais cerâmicos arqueológicos utilizados no armazenamento dos alimentos, ou em resíduos alimentares, pois estes podem constituir um indicador importante da utilização de processos fermentativos, nomeadamente associados à produção do vinho, cerveja ou garum.

Os sítios arqueológicos são locais de investigação arqueológica onde estão preservados testemunhos e evidências de atividade humana do passado histórico. Os vestígios do passado são peças essenciais para o conhecimento da vida do Homem ao longo dos tempos. O património arqueológico reúne um conjunto de locais em que habitaram as populações pré-históricas, bem como toda e qualquer evidência das atividades culturais destes grupos e também os seus próprios restos mortais. O Património Arqueológico é composto não só por bens materiais, mas também pelas informações deles dedutíveis a partir, por exemplo, da sua própria disposição local, das formas adotadas para ocupação do espaço e dos contextos ecológicos selecionados (Velo, *et al.*, 2007).

Os artefactos mais comumente encontrados em sítios arqueológicos do período Romano são fragmentos de cerâmica, provenientes de ânforas ou de outros objetos do quotidiano. O estudo das ânforas apresenta um lugar destaque na pesquisa de cerâmicas romanas pois estas eram recipientes utilizados para o armazenamento e transporte de líquidos (vinho, azeite), bem como outros produtos alimentares (molho de peixes, garum). As ânforas podem proporcionar um maior conhecimento sobre as relações socioeconómicas, uma vez que foram principalmente utilizados para o transporte de produtos alimentares. Dada a sua vasta

utilização como recipientes de transporte, as ânforas são hoje legitimamente consideradas como documentos históricos importantes, representando a evidência mais tangível de comércio antigo que permanece até à atualidade (Dias, *et al.*, 2010).

Na Península de Troia encontra-se um dos mais importantes sítios arqueológicos romanos conhecidos em Portugal, declarado como Monumento Nacional desde 1910 (Silva, *et al.*, 2006). A figura 1 apresenta uma visão geral do núcleo industrial deste sítio arqueológico de Troia. Construído no fim do império A.C., ao longo do Estuário do Sado, em frente da cidade portuária de Setúbal com cerca 2 km de extensão, manteve-se ativo até ao século III D.C. (Monteiro, *et al.*, 2006).



**Figura 1** - Visão geral do núcleo industrial do sítio arqueológico de Troia. (Retirado de (Silva, *et al.*, 2006))

Este sítio arqueológico dispõe de uma grande complexidade de indústrias de salga de peixe, casas, cemitérios e um templo religioso. Este é considerado um dos maiores complexos de conservação de peixe e atividades comerciais do Império Romano Ocidental, sendo o seu principal propósito o processamento industrial de produtos com proveniência marítima. A indústria de conservação e transformação de peixe alcançou grande atividade até meados do sec. III D.C (Silva, *et al.*, 2006, Silveira, *et al.*, 2011).

Estas indústrias eram constituídas por fábricas compostas por conjuntos organizados de reservatórios de salga de peixe (Figura 2).



**Figura 2** - Tanques de salga de peixe (retirado de (Bombico, 2015))

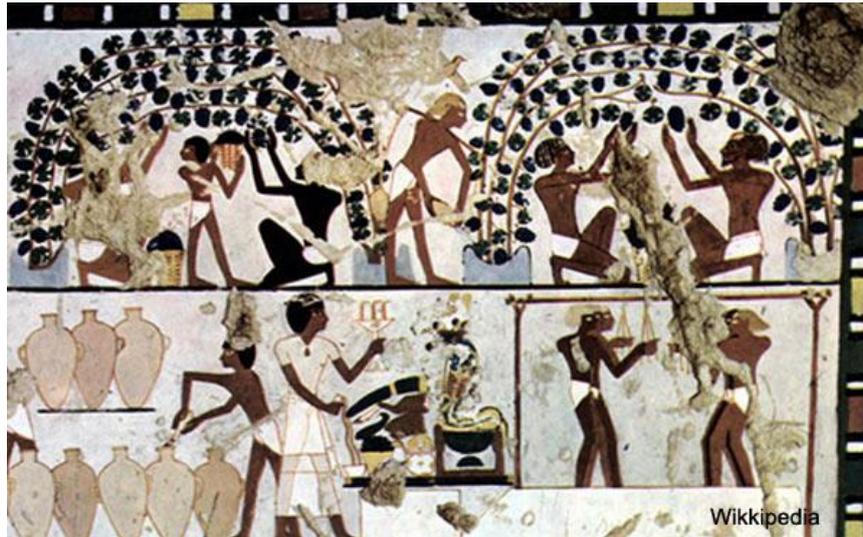
Os peixes eram lavados e preparados para salgar, depois eram-lhe misturadas ervas e especiarias juntamente com as vísceras de peixe e submetidos a processo de maceração e fermentação para obter molhos. O produto mais famoso, produzido nestas indústrias eram os molhos à base de peixe, como o garum. Estes produtos finais eram armazenados em ânforas e eram exportados para várias partes do mundo romano (Nabais, 2008, Silva, *et al.*, 2006).

## **1.2 Preservação de alimentos: A importância dos microrganismos**

Os alimentos contêm diversos nutrientes orgânicos e água, podendo ser alterados por microrganismos ou sofrer reações enzimáticas de deterioração. Existe por isso necessidade de desenvolver de processos de preservação. Os agentes que podem deteriorar ou alterar os alimentos podem ser agentes biológicos, físicos e químicos. Os agentes físicos são processos mecânicos, temperatura e desidratação. Dentro dos agentes químicos existe a reação de Maillard que leva ao ranço lipídico e oxidação de vitaminas, entre outros. Existem ainda os agentes biológicos como a presença de alguns microrganismos ou enzimas (Leistner, 2000, Torres, *et al.*, 2016).

Vários métodos de preservação de alimentos foram utilizados ao longo dos tempos, muitos deles aproveitando circunstâncias naturais. Os métodos mais comuns de preservação de alimentos incluem salga, cura, fumagem, marinação, congelação, refrigeração, secagem e tratamento térmico (Axelsson, *et al.*, 2000, Berk, 2013, Torres, *et al.*, 2016).

A conservação de alimentos remonta a tempos muito antigos (**Figura 3**), sendo o sal, gelo e as temperaturas baixas os métodos mais utilizados para conservar os alimentos (Blandino, *et al.*, 2003, Soomro, *et al.*, 2002). No antigo Egito, por exemplo, utilizavam líquidos como óleo e derivados de vinagre aumentar a vida útil dos produtos alimentares. Para além disso, a salga e a defumação era também utilizadas por ele como técnicas de preservação de alimentos (Torres, *et al.*, 2016).



**Figura 3** - Ilustração da apanha da uva e transformação em vinho (retirado de [www.ancient-origins.net](http://www.ancient-origins.net))

Os microrganismos são essenciais na produção e conservação de alimentos, sendo responsáveis por processos onde são produzidos metabolitos específicos, como ácidos, álcoois, enzimas, antibióticos, hidratos de carbono. Os principais microrganismos envolvidos nos processos de fermentação incluem bactérias lácticas (LAB), alguns fungos filamentosos e leveduras. Tendo estes microrganismos potencialidades para transformar e conservar produtos alimentares. Os nossos antepassados, apesar de não conhecerem o papel dos microrganismos reconheciam as características conservantes e começaram desde muito cedo a consumir produtos alimentares submetidos a fermentação (Bevilacqua, *et al.*, 2016). Mais do que qualquer outra coisa, o homem, por tentativa e erro, desenvolveu métodos de fermentação "controlada" para contrariar a "deterioração" indesejada de alimentos de origem vegetal e animal. Nessas abordagens empíricas, os microrganismos benéficos foram sendo favorecidos por parâmetros de seleção, enquanto outros microrganismos nocivos foram inibidos. Após um primeiro desenvolvimento de bebidas fermentadas, como cerveja e vinho, e também de produtos à base de leite fermentado (queijo, iogurte, etc.), os desenvolvimentos

mais recentes destes processos incluíram também a fermentação da carne, peixe (no século IX aC) e vegetais (século III BC) (Holzapfel, *et al.*, 1995, Soomro, *et al.*, 2002, Terefe, 2016).

### 1.2.1 Fermentação

A fermentação é uma tecnologia que utiliza o crescimento e atividades metabólicas de microrganismos para a preservação e transformação alimentar. A fermentação de alimentos surgiu originalmente como uma forma de preservar e transformar alimentos, durante este processo a deterioração e o crescimento de microrganismos patogênicos é inibido pelos metabolitos gerados pelos organismos de fermentação, ampliando assim a vida útil dos produtos alimentares (Caplice, *et al.*, 1999, Giraffa, 2004, Terefe, 2016). Muitas vezes, este efeito de preservação está relacionado com os próprios produtos finais da fermentação (ácido láctico, ácido acético, etanol, etc.), a diminuição do pH, a produção de antimicrobianos (como bactericidas e antibióticos). A fermentação de alimentos é portanto responsável pela inibição de microrganismos patogênicos (Bevilacqua, *et al.*, 2016).

Existem três grandes grupos de microrganismos que estão envolvidos em processos de fermentação de alimentos: bactérias, leveduras e fungos filamentosos (Tamang, 2014).

As bactérias têm o papel fundamental na produção de muitos alimentos fermentados. Entre as bactérias, as Bactérias Acido-láticas (LAB) são amplamente encontradas em alimentos fermentados. Os bacilos também estão envolvidos na fermentação de alimentos (Ghanbari, *et al.*, 2013, Soomro, *et al.*, 2002, Tamang, 2014).

As LAB são bactérias Gram-positivas, geralmente não móveis, não esporuladas, catalase-negativas, anaeróbias ou aerotolerantes, fastidiosas, tolerante a ácido e produtoras de ácido láctico, como o maior ou único produto fermentativo do metabolismo (Teuber, 1993). Além do efeito de preservação destas bactérias, a sua presença nos alimentos pode levar à produção de uma grande gama de metabolitos antimicrobianos como ácidos orgânicos e bactericidas (Ghanbari, *et al.*, 2013).

Os principais gêneros de LAB isoladas de vários alimentos fermentados são *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Carnobacterium*, *Vagococcus*, *Weissella* e

*Alkalibacterium*. Entre os gêneros de LAB, o gênero *Lactobacillus* é o mais dominante em alimentos fermentados (Poffo, *et al.*, 2011, Stiles, *et al.*, 1997, Tamang, 2014).

Os *Bacillus* são bactérias Gram-positivas, formadora de endosporos, têm forma de bastão e são catalase positivos. As espécies mais comuns de *Bacillus* sp. presentes em alimentos fermentados são *B. subtilis*, *B. natto*, *B. licheniformis*, *B. thuringiensis*, *B. coagulans* e *B. megataerium* (Beaumont, 2002, Juan, *et al.*, 2010, Tamang, 2014).

Relativamente às leveduras, existem muitos gêneros de leveduras detetados em alimentos e bebidas fermentadas, nomeadamente, *Brettanomyces*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Dekkera*, *Galactomyces*, *Geotrichum*, *Hansenula*, *Hanseniaspora*, *Hyphopichia*, *Issatchenkia*, *Kazachstania*, *Kluyveromyces*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Saccharomycodes*, *Saccharomycopsis*, *Schizosaccharomyces*, *Torulaspora*, *Torulopsis*, *Trichosporon*, *Yarrowia* e *Zygosaccharomyces*. As Leveduras que fermentam glúcidos produzem metabolitos secundários, inibem a produção de micotoxinas e possuem várias atividades enzimáticas (James, *et al.*, 2013, Kapsopoulou, *et al.*, 2005, Sicard, *et al.*, 2011, Tamang, 2014).

Alguns gêneros de fungos filamentosos estão também associados a alimentos e bebidas fermentados como: *Actinomucor*, *Amylomyces*, *Aspergillus*, *Monascus*, *Mucor*, *Neurospora*, *Penicillium*, *Rhizopus* e *Ustilago*. As propriedades funcionais dos fungos em alimentos fermentados incluem principalmente a produção de enzimas, tais como maltase, invertase, pectinase,  $\alpha$ -amilase,  $\beta$ -galactosidase, amiloglucosidase, celulase, hemicelulase, proteases e lipases, e também incluem a degradação fatores antinutritivos (Couto, *et al.*, 2006, Lin, *et al.*, 2006, Ng, *et al.*, 2004, Tamang, 2014).

Durante a fermentação alcoólica, láctica ou acética, são produzidos produtos por processos bioquímicos resultantes da ação dos microrganismos (Figura 4).

Na fermentação alcoólica as leveduras convertem glúcidos em etanol, dióxido de carbono e outros subprodutos metabólicos que contribuem para a composição química e as propriedades sensoriais dos alimentos fermentados resultantes (Buratti, *et al.*, 2016). Em condições de anaerobiose, convertem o piruvato em acetaldeído por ação do piruvato descarbolixase. O ácido pirúvico é convertido depois em etanol e CO<sub>2</sub> em duas etapas.

Primeiro o piruvato é descarboxilado, formando-se acetaldeído. O acetaldeído por ação da enzima álcool desidrogenase pode ser metabolizado a etanol.

Alguns alimentos produzidos por fermentação alcoólica são, o vinho e a cerveja.

No vinho fermentação dos glúcidos das uvas é realizada por várias espécies de leveduras que existem na película das uvas, devido à sua maior tolerância ao etanol (Kapsopoulou, *et al.*, 2005). As uvas esmagadas formam o mosto, que inicialmente é sujeito a remontagem para provocar a arejamento e o crescimento das leveduras. Posteriormente, é deixado em repouso, o que cria condições anaeróbias favoráveis à fermentação. O CO<sub>2</sub> liberta-se para a atmosfera no decurso da fermentação, e a concentração de etanol, que é o produto desejado, vai aumentando (van Maris, *et al.*, 2006).

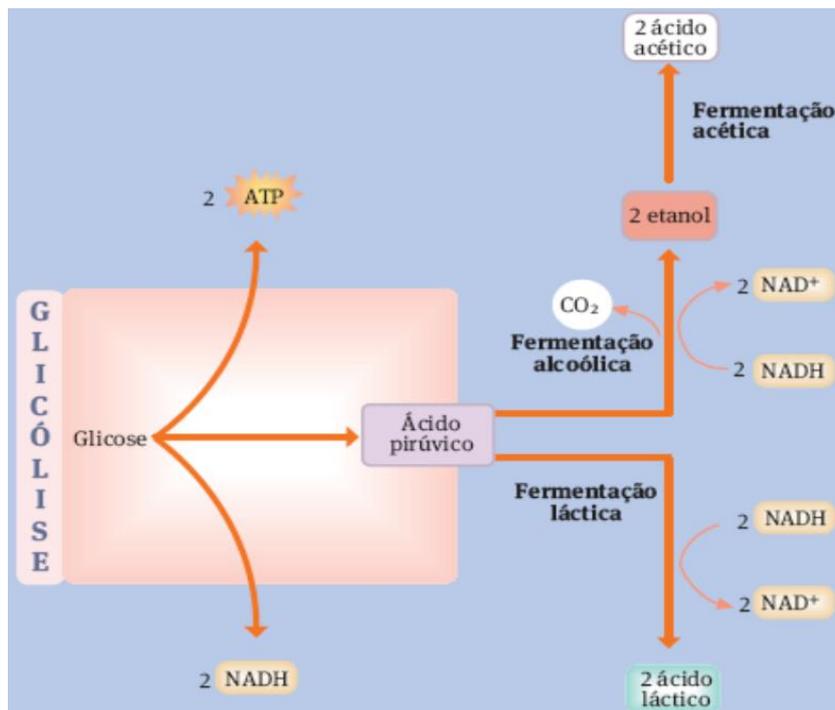
A cerveja é fabricada com malte (grãos de cevada germinados e secos), ou outros materiais ricos em amido (como arroz, milho ou sorgo), lúpulo, água e leveduras. Antes de se iniciar a fermentação provoca-se a sacarificação (produção de glúcidos simples a partir do amido) na mistura de cereais. Durante a fermentação, as leveduras convertem os glúcidos em etanol e CO<sub>2</sub>, e pequenas quantidades de glicerol e ácido acético. O CO<sub>2</sub> é libertado e o álcool atinge uma concentração de cerca de 3,8% do volume (De Keukeleire, *et al.*, 1992). Após a fermentação, a cerveja é geralmente armazenada durante alguns meses, durante os quais ocorre a precipitação de leveduras, proteínas e outras substâncias indesejáveis.

Na fermentação láctica o piruvato é diretamente reduzido a ácido láctico pelo enzima lactato desidrogenase na presença de NADH. A fermentação homoláctica produz grandes quantidades de ácido láctico. A fermentação heteroláctica leva à produção de outras substâncias, para além do ácido láctico, como CO<sub>2</sub>, etanol e ácido acético.

Alguns dos alimentos transformados por fermentação láctica são o queijo e o iogurte.

Vários tipos de queijo são produzidos por fermentação levada a cabo por diferentes espécies de bactérias, em culturas puras ou mistas. As bactérias produzem ácido láctico e outras substâncias que contribuem para o aroma dos produtos fermentados. O aumento da acidez provoca a coagulação das proteínas do leite, sendo este processo conhecido como coagulação ácida. O iogurte pode ser produzido através de leite fermentado por algumas bactérias, nomeadamente *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*. Este método de preservação conserva quase todos os constituintes nutricionais do leite, com exceção da lactose, reduzida durante a fermentação.

A fermentação acética é assim designada devido às características do produto final obtido, o ácido acético. O alimento mais conhecido transformado por fermentação acética é o vinagre. O vinagre é obtido a partir de materiais contendo glúcidos redutores ou amido, como sumos de fruta, vinho ou cereais. A sua produção compreende duas etapas, a primeira consiste na fermentação dos glúcidos que são convertidos em etanol – processo anaeróbio realizado por leveduras. A segunda etapa consiste na oxidação do etanol a ácido acético, transformação aeróbia realizada por bactérias acéticas (Wood, 2012).



**Figura 4** - Fermentação láctica, alcoólica e acética (retirado de mundoeducacao.bol.uol.com).

### 1.3 Identificação de comunidades microbianas

Para detetar a presença de microrganismos em artefactos arqueológicos, existem diferentes possibilidades. As abordagens podem envolver duas estratégias diferentes: métodos dependentes de cultura, que têm como base a cultura e isolamento de microrganismos em meios microbiológicos específicos e métodos independentes de cultura, que se baseiam no estudo e caracterização de ácidos nucleicos (Kraková, *et al.*, 2017, Rosado, *et al.*, 2014).

As técnicas tradicionais de identificação de microrganismos são baseadas na cultura de microrganismos em meios nutritivos específicos. Esta abordagem permite uma enumeração fácil de células microbianas cultiváveis e é um método também usado para a detecção de alguns microrganismos específicos (Lee, *et al.*, 2017). No entanto estas técnicas são trabalhosas e demoradas (Villa, *et al.*, 2009), e para além disso permitem apenas detetar uma pequena percentagem das comunidades microbianas efetivamente presentes nas amostras (Buermans, *et al.*, 2014, González, *et al.*, 2005, Rosado, *et al.*, 2014). Assim, nos últimos anos tem sido frequente a utilização de análises independentes de cultura para caracterização das comunidades microbiológicas. Estas metodologias envolvem técnicas moleculares como a extração e amplificação de DNA. A utilização de DGGE (eletroforese em gel de gradiente desnaturante) ou a SNG (sequenciação de nova geração) tem permitido trabalhar com DNA metagenómico, possibilitando um alargamento enorme no entendimento da dinâmica das populações (Caldeira, *et al.*, 2015). Os métodos independentes de cultura representam uma ferramenta útil para detetar de forma confiável e rápida uma diversidade de comunidades microbianas complexas e tem a vantagem de identificar microrganismos não cultiváveis. Para além disso permite ainda distinguir entre diferentes espécies com características fenotípicas semelhantes e também entre estirpes pertencentes à mesma espécie (Carraro, *et al.*, 2011). Em particular, a SNG é reconhecida como uma ferramenta poderosa para a avaliação da diversidade das comunidades microbianas.

A SNG com pirosequenciação permitiu a sequenciação de alto rendimento e revolucionou o estudo da diversidade microbiana. Esta metodologia foi aplicada recentemente para identificar espécies de mamíferos, para estudar a diversidade microbiana em solos, água, intestino humano, (Nam, *et al.*, 2011, Rosado, *et al.*, 2014, Van Dijk, *et al.*, 2014) ou ainda a presença de comunidades microbianas em contexto patrimonial (Rosado, *et al.*, 2014). É um método não-eletroforético em tempo real, de sequenciação de ssDNA baseado na detecção de pirofosfato libertado durante a incorporação de nucleótidos na cadeia de DNA (McGinnis, *et al.*, 2016, Rosado, *et al.*, 2014). Com a recentemente introdução de diferentes plataformas de sequenciação de nova geração, Roche 454, Illumina, Life Technologies, Helicos Biosciences e Pacific Biosciences SMRT, as comunidades microbianas de uma amostra podem ser analisadas profundamente (Kraková, *et al.*, 2017). Esta metodologia envolve três etapas comuns a todos os equipamentos de SNG disponíveis: preparação da amostra, preparação de biblioteca e sequenciação (Lee, *et al.*, 2017).



# Capítulo 2



---

**Deteção de comunidades microbianas  
presentes em materiais arqueológicos  
utilizados para o  
transporte/transformação de alimentos**



## 2.1 Introdução

Desde tempos muito antigos é necessário o transporte de alimentos e bebidas a partir dos centros de produção para os locais de consumo. Para este efeito, foram frequentemente utilizados vasos de cerâmica, sendo nalgumas situações estes artefactos também utilizados para a transformação de produtos alimentares (Izzo, *et al.*, 2013).



**Figura 5** - Ânfora (retirado de (Hansson, *et al.*, 2008).

As ânforas (Figura 5) representam o recipiente de cerâmica mais frequentemente utilizado em toda a Antiguidade para o armazenamento de mercadorias, transporte de líquidos (vinho, azeite), bem como outros produtos alimentares (produtos de molho de peixes, garum), motivo pelo qual são considerados o material arqueológico mais relevante para o estudo dos nossos antepassados (Dias, *et al.*, 2010, Vila Socías, *et al.*, 2016). Os fragmentos de cerâmica são os artefactos encontrados em maior abundância em qualquer sítio arqueológico do período Romano (Dias, *et al.*, 2010). O interior de algumas ânforas contém vestígios que podem ser analisados por métodos químicos, no entanto a informação obtida é muitas vezes inconclusiva e quase sempre um pouco especulativa. Em raras

situações as ânforas escavadas de locais arqueológicos contêm restos identificáveis. Para além destes casos especiais, a grande maioria das ânforas parecem estar completamente vazias quando são recuperadas. Esta falta de evidência direta de conteúdo das ânforas leva a uma discussão contínua sobre a produção agrícola antiga, a utilização das ânforas e reutilização, e a escala do comércio de vinho, azeite e outras mercadorias (Foley, *et al.*, 2012). Nos últimos anos, para determinar o conteúdo original de ânforas antigas têm-se desenvolvido algumas abordagens com métodos moleculares, sensíveis para extrair e identificar o material genético contido em amostras de peças de cerâmica (Foley, *et al.*, 2012). As últimas décadas, trouxeram grandes avanços em técnicas de biologia molecular e a deteção rápida e identificação de fragmentos de DNA é agora possível através de amplificação de sequências de DNA presentes nas amostras analisadas. Os métodos para o isolamento e amplificação de fragmentos de DNA antigos e presente em baixas concentração tornaram-se ferramentas cada vez mais importantes para os cientistas que tentam responder a uma ampla gama de questões sobre evolução das espécies, a produção agrícola, a alimentação, entre outros (Hansson, *et al.*, 2008). As ânforas têm sido reconhecidas como importantes fontes de informação de produção agrícola antiga, dieta, técnicas de conservação de alimentos e medicamentos, mas os seus conteúdos exatos raramente são conhecidos (Foley, *et al.*, 2012).

## 2.2 Material e métodos

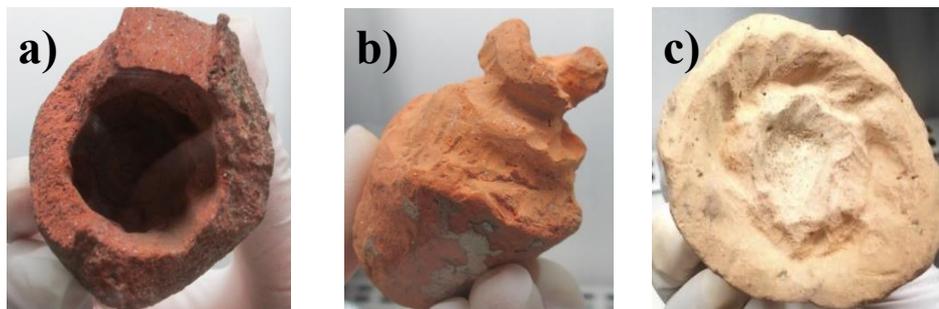
### 2.2.1 Amostragem

Para o isolamento de microrganismos presentes nas amostras de ânforas, material cerâmico poroso que pode permitir a preservação de material biológico e microrganismos associados à sua utilização, efetuou-se o acesso a diferentes profundidades do material de forma a garantir menor número de microrganismos associados a contaminações.

Foram selecionadas as peças cerâmicas (Figura 6) que permitiram a obtenção de camadas a profundidades diferentes para pesquisa de microrganismos.

Para os ensaios de isolamento microbiano recolheu-se de cada peça de cerâmica cinco amostras com um o auxílio de um nanodrill estéril, respeitantes a 5 camadas diferentes (2cm x 1cm) com 1mm de profundidade.

Para a extração de DNA das peças de cerâmica foram utilizadas duas camadas diferentes de cada peça de cerâmica.



**Figura 6** - Exemplos de peças cerâmicas estudadas.

### 2.2.2 Isolamento de microrganismos

Para o isolamento de microrganismos nas amostras arqueológicas adaptou-se um protocolo desenvolvido por Carvajal Barriga *et al.* 2013. Colocaram-se 10 mg das amostras recolhidas (5 camadas de cada peça) em microtubos de 1,5 mL com 1 mL de MRD (Maximum Recovery Diluent, Merck). Incubou-se os microtubos a 30°C durante 72 h. Após este período recolheram-se alíquotas de 50 µL e de 100 µL, de cada amostra, e procedeu-se à sua inoculação por espalhamento em diferentes meios de cultura. Meio Yeast Production  $\alpha$ -Dextrose (YPD) suplementado com maltose e com tetraciclina (0,01 g/L), MEA (Malt Extract Agar) e NA (Nutrient Agar). As placas foram incubadas a 30°C, monitorizando-se o desenvolvimento de microrganismos durante um mês. As diferentes colónias desenvolvidas foram repicadas e isoladas para posterior observação ao microscópio (James, *et al.*, 2013).

### 2.2.3 Caracterização dos isolados microbiológicos

Para a identificação dos isolados efetuou-se a caracterização morfológica, através da observação macroscópica e microscópica das colónias. Para a visualização das estruturas reprodutoras dos fungos procedeu-se à sua observação através de preparações a fresco utilizando o corante azul-de-metileno, sendo em seguida observadas ao microscópico ótico com a objetiva de 40x (Motic BA410E). As imagens foram adquiridas com a câmara MoticamPro 282B. Para observação da estrutura das bactérias procedeu-se à coloração de Gram e de seguida à sua observação microscópica com a objetiva de 100x, utilizando o mesmo microscópico e câmara referidos anteriormente.

### 2.2.4 Extração de DNA

A extração de DNA das comunidades microbiológicas presentes nas duas profundidades de cada peça foi efetuada através do kit NucleoSpin (Macherey-Nagey, 740945). Pesou-se 0,1 g de amostra para um microtubo estéril de 2 mL e adicionou-se 550 µL de tampão CF (pré-aquecido a 65°C) e misturou-se durante 15 s, de forma a promover a lise celular. Em seguida, adicionou-se 10 µL de proteinase K, misturou-se durante 2-3 s e incubou-se a 65°C durante 30 min. Após este período de incubação, adicionou-se 5 µL de

Rnase A (20 mg/ mL), homogeneizou-se e centrifugou-se durante 10 min a 10000 g. Posteriormente transferiu-se o sobrenadante para um microtubo de 2 mL, adicionou-se 1 volume de tampão C4 e um volume de etanol absoluto, e por fim misturou-se no vortex durante 30 s. Aplicou-se 700 µL da mistura anterior numa coluna NucleoSpin com um tubo de recolha, centrifugou-se 1 min a 11000 g e desprezou-se a fração eluída. O procedimento anterior repetiu-se até carregar toda a amostra na coluna. De forma a proceder-se à lavagem da coluna, aplicou-se 400 µL de tampão CQW na coluna NucleoSpin, centrifugou-se 1 min a 11000 g e desprezou-se a fração eluída, em seguida, aplicou-se 700 µL de tampão C5 na coluna NucleoSpin, centrifugou-se 1 min a 11000 g e desprezou-se a fração eluída. Por fim aplicou-se 200 µL de tampão C5 na coluna NucleoSpin, centrifugou-se 2 min a 11000 g, para remover completamente o tampão C5 e desprezou-se a fração eluída (atenção os resíduos de etanol do tampão de lavagem C5 podem inibir reações enzimáticas). Para a eluição do DNA colocou-se a coluna num microtubo estéril de 1,5 mL, aplicou-se, sobre a membrana 100 µL de tampão de eluição CE (pré-aquecido a 70°C) e incubou-se 5 min à temperatura ambiente (22-25°C). Para finalizar o processo de extração centrifugou-se 1 min a 11000 g com o objetivo de eluir o DNA. O conteúdo genético extraído foi conservado a 4°C até posterior utilização.

### 2.2.5 Quantificação de DNA

O DNA extraído foi quantificado por espectrometria de absorção molecular num equipamento *Thermo Scientific µDrop Plate MultiScan Go* acoplado a um software *SkantY RE for MultiScan 3.2*. Para tal aplicou-se 2 µL de cada amostra de DNA no *µDrop Plate MultiScan Go*, efetuando-se um branco com tampão TE. Foram efetuadas as leituras de absorvância aos comprimentos de onda 230, 260 e 280 nm. No cálculo da concentração de DNA usou-se a expressão:

$$[\text{DNA}] (\mu\text{g/mL}) = \text{Abs}_{260\text{nm}} \times 50 \mu\text{g/mL/cm} \times (10/0,51) \text{ cm},$$

Sendo 50 µg/mL/cm o inverso do coeficiente de absorvidade molar para DNA de cadeia dupla e  $\frac{10}{0,51}$  cm o inverso do percurso ótico característico do equipamento.

## 2.2.6 Amplificação de DNA por Reação de Polimerase em Cadeia.

A amplificação do DNA metagenômico, foi efetuada por PCR, com os seguintes *primers*:

**Tabela 1** - *Primers* utilizados para amplificação do DNA extraído.

	<b>Primer</b>	<b>Sequência 5'-3'</b>
<b>Fungos</b>	NS1	5'-GTAGTCATATGCTTGTCTC-3'
	GCfung	5'CGCCCGCCGCGCCCGCGCCCGGCCCGCCGC CCCCGCCCCATTCCCCGTTACCCGTTG-3'
<b>Bactérias</b>	518F	5'- CGCCCGCCGCGCGGGGGGGG 3'
	785R	5'- CTACCAGGGTATCTAATCC 3'

As reações de PCR foram efetuadas num volume final de 25 µL contendo cada amostra 19,8 µL de água RNase Free, 2,5 µL de tampão 10x *Dream Taq Buffer* com MgCl<sub>2</sub> 20 mM, 0,5 µL de dNTPs 10 mM, 1 µL de *primer*, 0,2 µL de Taq DNA polimerase 500 U e 1 µL do DNA extraído das amostras. Juntamente com estas amostras, foi também utilizado um branco, que funcionou como controlo.

A amplificação por PCR, realizada num termociclador MJ Mini Bio-Rad iniciou-se com um passo de desnaturação de 5 min a 94°C, ao qual se seguem 40 ciclos constituídos por: desnaturação de 1 min a 94°C, emparelhamento de 1 min a 50°C, e extensão de 2 min a 72°C. Por último, fez-se uma extensão final de 6 min a 72°C. Os fragmentos resultantes da amplificação foram guardados a 4°C, até posterior análise por eletroforese em gel de agarose.

## 2.2.7 Análise de DNA por eletroforese em gel de agarose

Para a realização da eletroforese, procedeu-se à realização do gel de agarose 1% onde se adicionou o corante Green Safe. Preparou-se as amostras e o marcador de DNA 100 bp Plus (0,5 mg.mL<sup>-1</sup>) com o corante Loading buffer. As amostras foram aplicadas nos poços do gel com uma micropipeta e procedeu-se à separação eletroforética aplicando uma diferença de

potencial de 90 V, até o corante percorrer  $\approx \frac{3}{4}$  do gel ( $\approx 2-3$  h). Por fim as bandas foram reveladas num transiluminador UV (Bio-Rad).

## 2.2.8 Sequenciação de Nova Geração

### 2.2.8.1 Extração de DNA

O DNA das amostras de garum foi extraído com o kit QIAamp® DNA Stool Mini (Qiagen, Hilden, Alemanha). As amostras foram incubadas em tampão do Kit durante 30 min a 37°C e 10 min a 95°C. Em seguida, foram adicionadas microesferas de vidro às suspensões e submetidas a rompimento e homogeneização usando o TissueLyser (Qiagen). Os lisados foram centrifugados e purificados (Rosado, *et al.*, 2014).

### 2.2.8.2 Amplificação e sequenciação do DNA

As comunidades bacterianas e fúngicas foram sequenciadas por SNG usando a região hipervariável V3-V4 do rRNA 16S e a região ITS (Internal Transcribed Spacer II). O DNA de cada amostra foi utilizado como modelo para amplificação da região V3V4 do rDNA 16S para o estudo bacteriano, e da região ITS2 para estudo de população de fungos.

A região V3V4 foi amplificada com os *primers* 5'-ACTCCTACGGGAGGCAG-3' e 5'-TACNVRTHTHTATAATYC-3'. A região ITS2 foi amplificada com os *primers* ITS2\_F 5'-GCATCGATGAAGAACGC-3' e ITS2\_R 5'-CCTCC GCTTATTGATATGC-3'.

Cada *primer* contem um adaptador de sequenciação de titânio 454 Life Science (5'-CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG-3') e um sequenciador TAG com 8 nucleótidos que permite o agrupamento de amostras múltiplas para sequenciação. Os iniciadores inversos também contêm um adaptador de sequenciação de titânio 454 Life Science a montante (5'-CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG-3').

Realizaram-se duas reações de PCR independentes para cada região de cada amostra com 1x Advantage 2 Polymerase Mix (Clontech, Mountain View, CA, EUA), 1x Advantage SA PCR Buffer, 0,2  $\mu$ M de cada iniciador de PCR, 0,2 mM dNTPs (Bioron, Ludwigshafen am Rhein, Alemanha), 5% de DMSO (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanha) e 2 $\mu$ l de DNA num volume total de 40  $\mu$ L. Foram utilizados os seguintes programas de PCR:

uma desnaturação inicial a 94°C durante 4 min, seguido de ciclos de desnaturação de 30x (ITS2) / 40x (V3V4) a 94°C durante 30 s, emparelhamento a 44°C (V3V4) / 50°C (ITS2) por 45 s e extensão a 68°C por 60 s e passo de extensão final a 68°C por 10 min.

Os produtos amplificados foram purificados com microesferas AMPure XP (Agencourt, Beckman Coulter, EUA), seguidos de avaliação de qualidade de ácidos nucleicos através de um gel de agarose 1,2% (p / v) e quantificação por fluorescência usando o kit de quantificação dsDNA PicoGreen (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, Califórnia, EUA). Os amplicões foram amplificados por PCR de emulsão e a biblioteca de DNA resultante foi sequenciada num equipamento Genome Sequencer FLX Instrument (454 Life Sciences, Roche).

### **2.2.8.3 Análise de dados**

Os microrganismos presentes em cada amostra foram identificados de acordo com procedimentos bioinformáticos desenvolvidos na Biocant. As sequências obtidas foram separadas de acordo com os códigos de barras adicionados e processadas através de filtros de qualidade para remover sequências (a) sem o primer forward adicionado, (b) com pelo menos dois nucleótidos não identificados e (c) ser menor que 100 bp. Seguidamente as extremidades 3' foram cortadas atendendo a um índice médio de qualidade  $\leq 15$  (Quality Score  $\leq 15$ ). As sequências com elevada qualidade foram agrupadas no programa uclust v2.1 com um grau de similaridade de 97% (Edgar, 2010). As sequências foram agrupadas no programa Cap3 (assembling process) (Huang, *et al.*, 1999) para produzir unidades taxonómicas operacionais (OTU). As OTU's foram comparadas nas bases de dados NCBI BLAST e RDP (Ribosomal Database Project) com um cut-off de  $1e^{-50}$  para identificação toxonómica. Para incrementar a fiabilidade dos resultados foi incluído o método de bootstrap, onde as OTU's foram replicadas 100 vezes e alteradas em 10% pela aplicação seqboot com o programa PHYLIP (Felsenstein, 1993). Foram apenas identificadas as sequências suportadas por 70% bootstrap.

## 2.3 Resultados e discussão

Neste trabalho foram estudadas peças de cerâmicas romanas usadas no armazenamento/transporte de alimentos. A obtenção de camadas a diferentes profundidades, com camadas mais internas e camadas mais externas, possibilita o acesso a microrganismos em diferentes profundidades o que pode permitir a identificação e isolamento de microrganismos presentes nos processos antigos (Chang, *et al.*, 2012).

Dado que as ânforas foram usadas para o armazenamento, transformação ou para o transporte de alimentos, estas peças cerâmicas, em parte pela sua natureza porosa, podem funcionar como suportes de imobilização de células microbianas podendo conter indícios da sua presença. A evidência de microrganismos nas diferentes camadas do material cerâmico arqueológico pode constituir um indicador importante sobre a utilização de processos fermentativos, nomeadamente associados à produção de vinho, cerveja e garum, contribuindo para a reconstrução das técnicas de conservação/transformação de alimentos. Neste estudo foram selecionados diversos fragmentos de peças cerâmicas, atribuídos a ânforas, de forma a compreender se existe DNA microbiano ancestral nestas amostras que possa estar ligado aos microrganismos responsáveis pelos processos de conservação/transformação de alimentos.

### 2.3.1 Avaliação da presença microbiana

Para o estudo de peças de cerâmica e para a pesquisa de comunidades microbianas que possam ser relevantes em processos de conservação de alimentos ou para o entendimento do seu conteúdo, deparamo-nos com algumas dificuldades. Por um lado, a contaminação associada ao facto destes materiais terem sofrido manuseamentos posteriores às suas utilizações originais, e por outro a degradação do material biológico, como o DNA ancestral, constituem algumas das dificuldades na interpretação dos resultados.

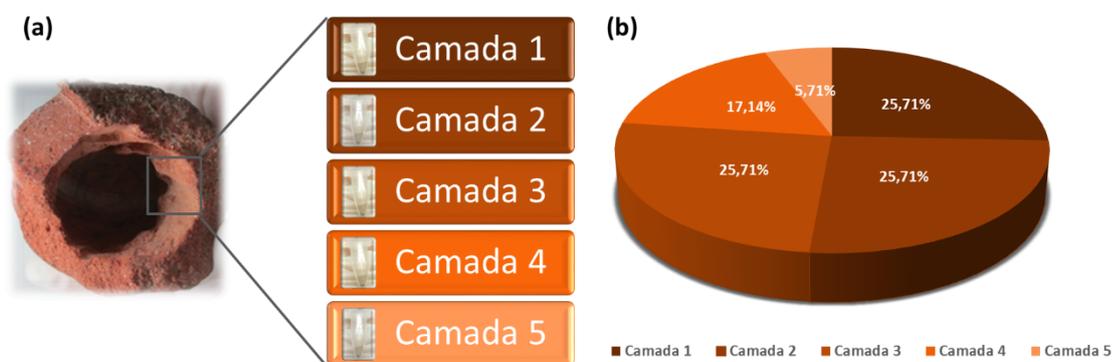
Tendo em consideração que a cerâmica é um material poroso e pode permitir a preservação de microrganismos associados à sua utilização, foi necessário o acesso a diferentes profundidades das peças de cerâmica em estudo, para garantir menor contaminação nas camadas mais internas, descartando assim contaminantes externos (manuseamento, meio circundante onde a peça foi encontrada) e tentando desta forma

identificar a presença de agentes efetivamente associados ao processo de conservação de alimentos.

Para o isolamento de microrganismos foram recolhidas cinco camadas em condições de assepsia através de um nanodrill, como descrito na secção 2.3.

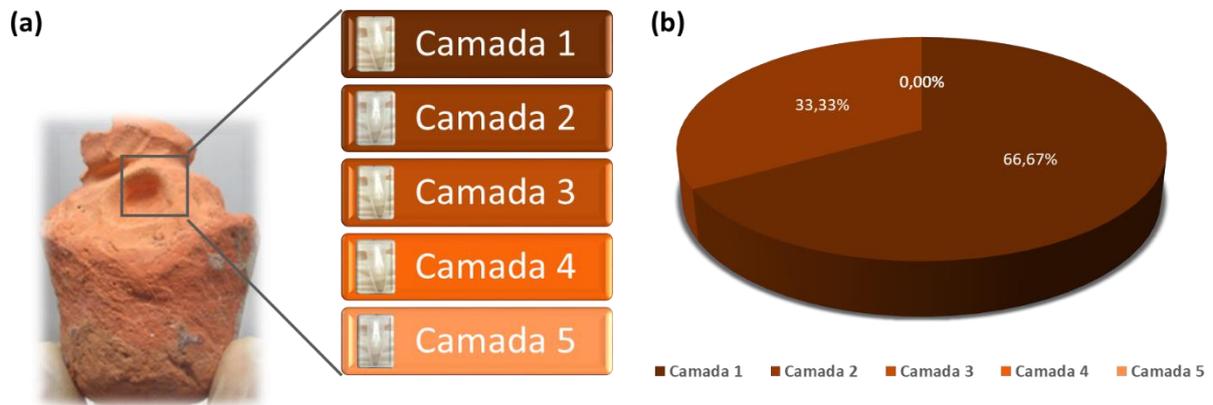
Os métodos dependentes de cultura dão informação sobre a população cultivável existente nas peças em estudo. O estudo microbiológico permitiu o isolamento de 22 estirpes de bactérias e 2 estirpes de fungos filamentosos, sendo que alguns destes microrganismos foram isolados em mais do que uma camada. As Tabela B1- B10, Anexo B apresentam as características macroscópicas das colónias e microscópicas dos diferentes isolados.

A título de exemplo, podemos observar na Figura 7 que a peça apresenta maior percentagem de microrganismos cultiváveis (26%) na camada 1, 2 e 3, e uma menor percentagem de microrganismos cultiváveis nas duas camadas mais internas, 17% e 5% respetivamente. A maioria dos microrganismos cultiváveis presentes nas camadas mais internas não estão presentes nas camadas mais externas, no entanto existem algumas exceções.



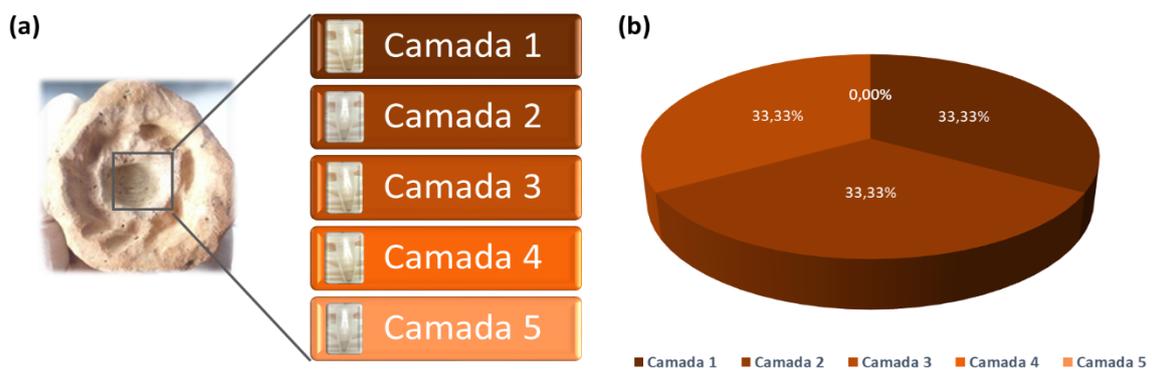
**Figura 7** - (a) Imagem da peça 1 e as suas camadas; (b) Gráfico da percentagem de microrganismo isolados.

A Figura 8 mostra-nos a percentagem de microrganismos isolados nas diferentes camadas para uma outra peça cerâmica. Neste caso apenas existem microrganismos cultiváveis nas camadas 1 e 2, sendo que foram isolados um maior número de microrganismos na camada 1 (67%) comparativamente à camada 2 (33%).



**Figura 8** - (a) Imagem da peça 2 e as suas camadas; (b) Gráfico da percentagem de microrganismos isolados na peça 2.

Observando a Figura 9 podemos verificar que foram isoladas as mesmas percentagens de microrganismos na camada 1, 2 e 3, não sendo isolado qualquer microrganismo nas camadas 4 e 5. Estes resultados revelam por um lado que as camadas mais externas estão sujeitas à presença de microrganismos que podem ter estado em contacto com as peças, sem que haja uma relação com eventuais transportes/transformações de alimentos fermentados. Por outro lado, a ausência de microrganismos cultiváveis em camadas profundas do material pode ser indicativo da ausência ou da não viabilidade dos microrganismos associados aos processos fermentativos.



**Figura 9** - (a) Imagem da peça 3 e as suas camadas; (b) Gráfico da percentagem de microrganismos isolados na peça 3.

Estes métodos de isolamento são muito úteis porque, permitem a obtenção de culturas puras que podem posteriormente ser utilizadas. No entanto, esta abordagem não permite uma caracterização completa da comunidade microbiana, uma vez que alguns microrganismos presentes podem não ser cultiváveis em condições de laboratório ou, noutras situações, a não viabilidade destas células devido ao processo de desidratação e de envelhecimento não permite o seu crescimento, sendo assim necessário o uso de metodologias complementares para um melhor conhecimento das comunidades microbianas presentes nestes artefactos.

### 2.3.2 Métodos independentes de cultura

Uma vez que nem todos os microrganismos presentes em amostras arqueológicas têm capacidade de crescer em meios de cultura, pois podem não estar viáveis, a próxima estratégia adotada foi a análise molecular, com extração e amplificação de DNA e posteriormente a Sequenciação de Nova Geração.

Para o estudo de métodos independentes de cultura foram usadas as duas camadas mais profundas das peças de cerâmica.

#### 2.3.2.1 Extração, quantificação e amplificação de DNA

Foi extraído o DNA metagenómico das amostras e determinada a sua concentração (Tabela 2).

**Tabela 2** - Análise da concentração e grau de pureza do DNA extraído das camadas de cada peça.

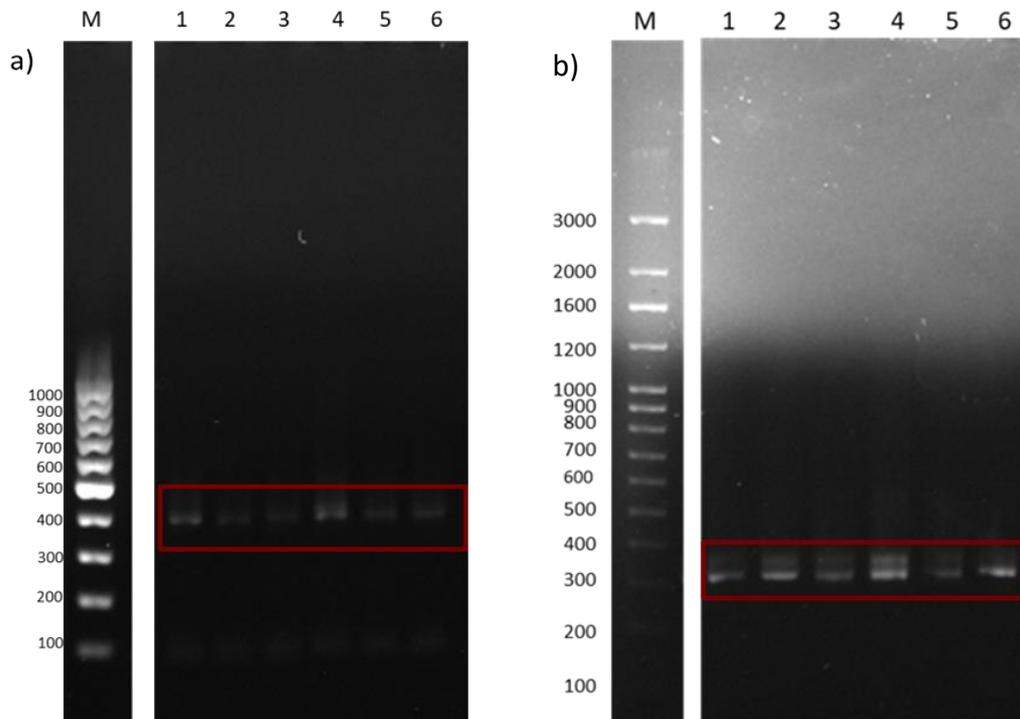
Amostras	[DNA] µg/ mL	Abs260/280	Abs260/230
Peça 1 C1	53,70 ± 4,16	1,65	1,72
Peça 1 C2	49,97 ± 0,64	1,59	1,89
Peça 2 C1	41,67 ± 0,12	1,70	2,13
Peça 2 C2	40,30 ± 0,43	1,71	2,13
Peça 3 C1	39,95 ± 0,17	1,70	1,90
Peça 3 C2	35,65 ± 0,60	1,60	1,55

A razão Abs<sub>260</sub>/Abs<sub>280</sub> é indicativa do grau de pureza das amostras de DNA, tendo como valor ótimo 1,8. Observando a Tabela 2 podemos verificar que a razão é ligeiramente

mais baixa, o pode indicar a presença de proteínas, fenóis ou outros contaminantes que absorvem fortemente a 280 nm ou nessa região. A razão  $Abs_{260}/Abs_{230}$  é usada como uma medida secundária de pureza dos ácidos nucleicos, e os valores ótimos esperados variam entre 1,8-2,2.

Estas amostras foram amplificadas com os *primers* NS1 e GC-Fung, específicos para fungos, e 518F-GC e 785R, específicos para bactérias. A integridade do DNA metagenómico amplificado foi analisada por eletroforese em gel de agarose (Figura 10). Podemos observar amplificação das amostras na zona dos 400 bp e 300 bp, o que nos indica a presença, nas duas camadas das peças analisadas, de fungos e bactérias respetivamente.

Na Figura 10 pode observar-se amplificação das amostras na zona dos 300bp, que nos indica a presença de DNA bacteriano nas duas camadas de cada peça.



**Figura 10** - Eletroforese em gel de agarose de DNA metagenómico das duas camadas de cada peça de cerâmica, utilizando: a) *primers* NS1 e gc-fung, e b) *primers* 518F-GC e 785R. M- Marcador de DNA 100 bp; 1- Produto de PCR da 1ª camada da Peça 1; 2- Produto de PCR da 2ª camada da Peça 1; 3-Produto de PCR da 1ª camada da Peça 2; 4- Produto de PCR da 2ª camada da Peça 2; 5- Produto de PCR da 1ª camada da Peça 3; 6- Produto de PCR da 2ª camada da Peça 3.

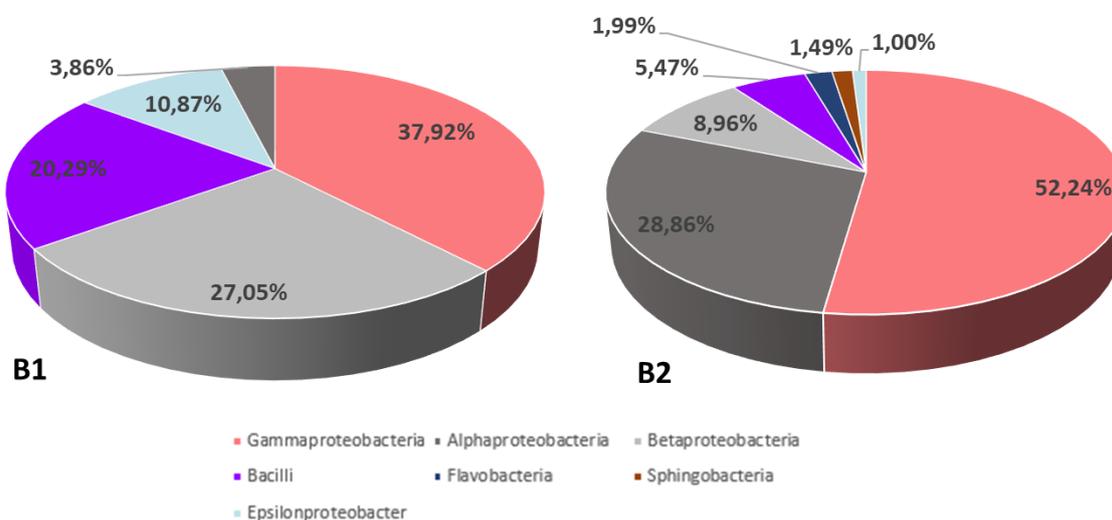
A população microbiana é constituída por procariotas e eucariotas o que corrobora os resultados obtidos através das técnicas de cultura.

### 2.3.2.2 Sequenciação de Nova Geração

Para a análise e identificação mais completa da comunidade microbiana, cultivável e não cultivável, presente nas ânforas, selecionamos duas camadas de uma das peças, uma mais externa (B1) e uma mais interna (B2).

Através da análise dos resultados de SNG podemos observar que, no total foram geradas, na camada mais externa (B1), 2897 leituras para as regiões hipervariáveis V3-V4 do gene 16S, que foram agrupadas em 202 unidades taxonômicas operacionais (OTUs). Relativamente à camada mais interna (B2), foram geradas 2276 leituras para as regiões hipervariáveis V3-V4 do gene 16S, que foram agrupadas em 124 OTUs. Não foi possível identificar a região hipervariável ITS2 na camada mais interna pois o número de leituras foi abaixo do limite detetável, indicando a não presença de microrganismos eucariotas nestas amostras.

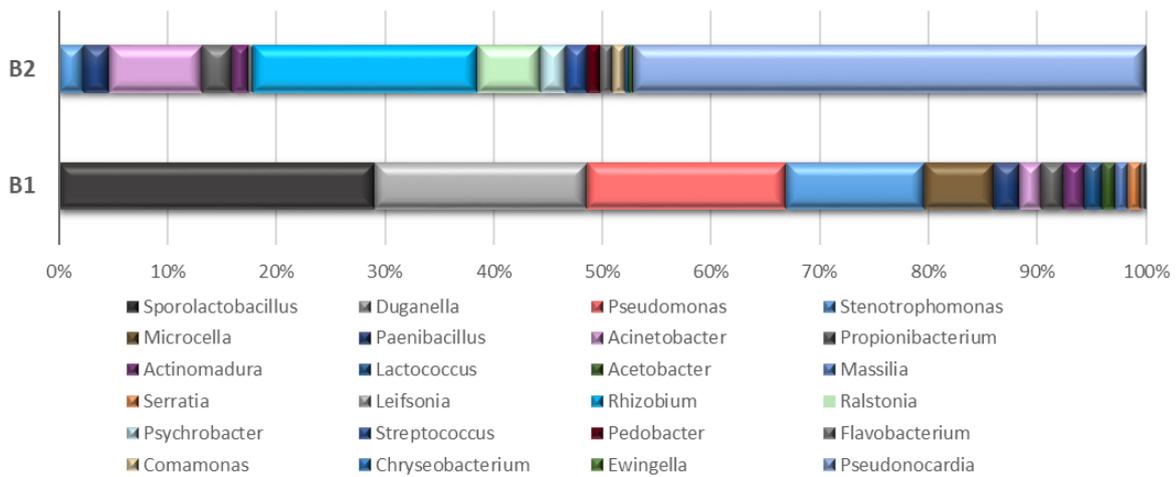
Da população bacteriana identificada destacam-se as classes, Gammaproteobacteria, Betaproteobacteria, Epsilonproteobacteria, Bacilli e Alphaproteobacteria (Figura 11).



**Figura 11** - Classes bacterianas obtidas através de sequenciação de nova geração nas diferentes camadas das peças cerâmicas. Percentagem de composição de classes de bactérias identificados na camada mais externa (B1) e da camada mais interna (B2).

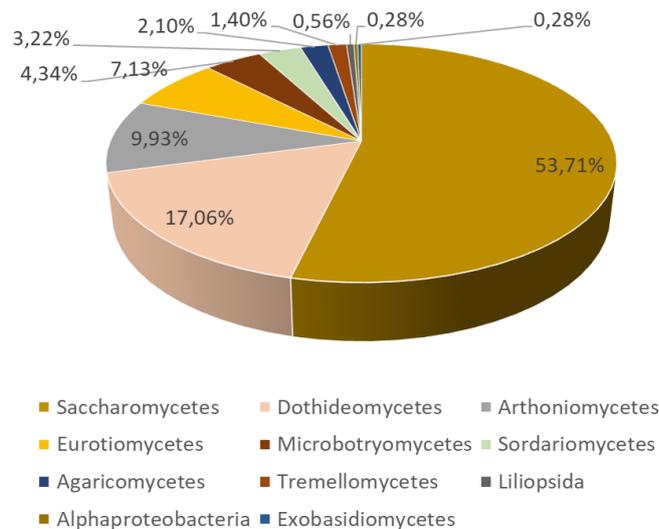
Da população bacteriana identificada até ao género (Figura 12), na camada mais interna (B1) e na camada mais externa (B2), identificaram-se maioritariamente, *Sporolactobacillus*, *Duganella*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Microcella*, *Paenibacillus*, *Acinetobacter*, *Propionibacterium*, *Actinomadura*, *Lactococcus*,

*Acetobacter*, *Massilia*, *Serratia*, *Leifsonia*, *Rhizobium*, *Ralstonia*, *Psychrobacter*, *Streptococcus*, *Pedobacter*, *Flavobacterium*, *Comamonas*, *Chryseobacterium*, *Ewingella* e *Pseudonocardia*. Dentro de população bacteriana os géneros que mais se destacam, estando presentes na camada mais externa (B1), são o género *Sporolactobacillus*, *Lactococcus* e *Acetobacter*. Estes microrganismos poderão estar associados a fermentação láctica e acética respetivamente.



**Figura 12** – Géneros bacterianos obtidos através de sequenciação de nova geração nas diferentes camadas das peças cerâmicas. Duas barras paralelas comparando a percentagem de composição de géneros de bactérias identificados na camada mais externa (B1) e da camada mais interna (B2).

Das classes de população eucariota, sequenciadas por SNG, na camada mais externa (Figura 13) a maioritária é composta por Saccharomycetes, um forte indício da presença de fermentação alcoólica nestes artefactos.



**Figura 13** - Diversidade das classes eucariotas obtidas através de sequenciação de nova geração nas peças de cerâmica.

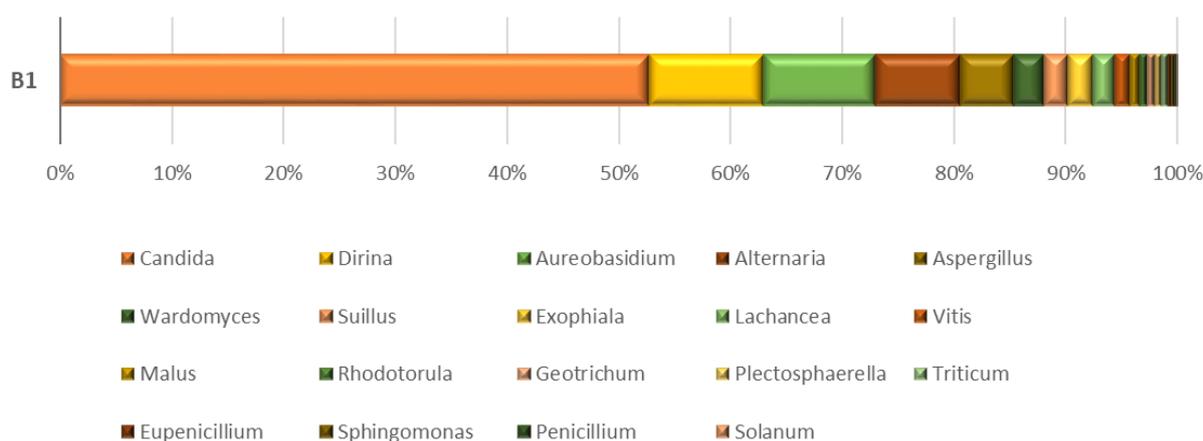
Da população fúngica identificada (Figura 14) na camada mais externa, destacam-se os géneros: *Candida*, *Dirina*, *Aureobasidium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Wardomyces*, *Suillus*, *Exophiala*, *Lachancea*, *Rhodotorula*, *Geotrichum*, *Plectosphaerella*, *Triticum*, *Eupenicillium*, *Sphingomonas*, *Penicillium* e *Solanum*. Alguns destes géneros merecem destaque, como é o caso de *Candida*, *Aureobasidium*, *Lachancea* e *Vitis*.

A identificação do género *Aureobasidium* demonstra bastante importância neste estudo uma vez que é um dos constituintes da microflora presente nos bagos de uva (Fleet, 2003, Prakitchaiwattana, *et al.*, 2004, Wang, *et al.*, 2015), um agente de biocontrolo natural de alguns fungos patogénicos da videira (Dimakopoulou, *et al.*, 2008), e tem um papel importante na degradação e consequente diminuição da ocratoxina A nos bagos de uva (Felice, *et al.*, 2008).

Por outro lado, os géneros *Candida*, e *Lachancea* são (tendo sido esta última identificada à espécie *L. thermotolerans*) também são descritos na bibliografia como leveduras de fermentação do vinho (Bokulich, *et al.*, 2011, Camilo, 2014, Gobbi, *et al.*, 2013, James, *et al.*, 2013, Kapsopoulou, *et al.*, 2005, Prakitchaiwattana, *et al.*, 2004). Embora *Saccharomyces cerevisiae* e a *Saccharomyces bayanus* sejam amplamente consideradas como as principais leveduras de fermentação do vinho, há uma crescente aceitação de que outras espécies, muitas vezes referidas como leveduras indígenas não-*Saccharomyces*, contribuem de forma importante para a fermentação. Estas podem influenciar positivamente o carácter geral do vinho, principalmente através das propriedades aromáticas e da divulgação

de perfis de sabor complexos, pois as leveduras indígenas de vinhos não-*Saccharomyces* geralmente produzem altas concentrações de ésteres, álcoois superiores, aldeídos e glicerol; compostos que desempenham um papel importante na determinação do perfil sensorial do vinho (Rainieri, *et al.*, 2000).

Por fim, a presença do género *Vitis* é também bastante importante para este estudo, tendo sido este identificado à espécie (*V.vinifera*). *V.vinifera* é a espécie de videira mais cultivada para a produção de vinho na Europa. Esta planta da família das *Vitaceae*, cujo fruto é a uva, foi cultivada por várias civilizações europeias desde há milhares de anos, o que originou dezenas de variedades, as denominadas *castas*, por meio de seleção artificial. Originária da Região do Mediterrâneo até o sul da Alemanha, a *Vitis vinifera* é cultivada em todas as regiões de clima temperado, fazendo da produção de vinho uma das atividades mais antigas da civilização (Bouquet, *et al.*, 2007, Terral, *et al.*, 2010)



**Figura 14** - Diversidade eucariota obtida através de sequenciação de nova geração nas peças de cerâmica. Barra com a percentagem de composição de géneros de fungos identificados na camada mais externa (B1).

Atendendo aos resultados obtidos por SNG, podemos constatar que possivelmente nestas ânforas foi produzido, armazenado e/ou transportado vinho, uma vez que a microflora identificada inclui leveduras capazes de iniciarem a fermentação alcoólica, bactérias responsáveis pela fermentação láctica e possuem ainda resíduos de uma espécie de videira usada para a produção de vinho.

Os resultados mostram que esta metodologia é uma ferramenta poderosa e que pode ser bastante útil para um maior conhecimento acerca dos materiais arqueológicos, podendo permitir revolucionar o conhecimento sobre os nossos antepassados



# Capítulo 3



---

**Deteção de comunidades microbianas  
em resíduos de garum**



### 3.1 Introdução

Os molhos de peixe estavam entre os condimentos mais comumente utilizados que melhoravam o sabor dos alimentos, e eram amplamente produzidos e distribuídos em todo o antigo Império Romano (Smriga, *et al.*, 2010).

O garum era um molho de peixe fermentado, líquido ou semilíquido, obtido pela decomposição de peixes e ervas em sal. Este preparado obteve-se em primeiro lugar a partir de um tipo selecionado de peixe que pode ser comparado com anchovas. O garum comum, pelo contrário, foi criado pela decomposição de vísceras oriundas do pescado, em sal (Alarcão, 1988). O seu sabor exótico entrou firmemente no mundo romano e foi considerado um ingrediente chave para muitas receitas. O garum líquido foi tão popular que foi adicionado a doces de frutas. Muitos vestígios arqueológicos podem testemunhar a importância deste produto. A costa atlântica de Espanha e Marrocos, bem como o Mediterrâneo e as costas do Mar Negro eram os principais locais de produção do garum (Van Neer, *et al.*, 2008).



**Figura 15-** Local de produção de garum (retirado de <http://www.gentedecadiz.com>).

Os centros da indústria da transformação do peixe (Figura 15), em que o atum e outros peixes eram limpos e colocados em salgada, eram também os locais onde se fazia extração de sal. A fermentação dos produtos da pesca é uma prática muito antiga e particularmente difundida na Europa e na Ásia. Entre os microrganismos associados à produção de pescado fermentado, as bactérias ácido-láticas desempenham um papel fundamental, pois são capazes de alterar, de forma favorável, a textura e o sabor destes, inibir o desenvolvimento de organismos prejudiciais à saúde, e evitar a deterioração precoce dos produtos (Ghanbari,

*et al.*, 2013, Poffo, *et al.*, 2011). Além do efeito de preservação das bactérias ácido-láticas, acredita-se que a sua presença nos alimentos possa ter efeito probiótico, pela produção de ácidos orgânicos e bactericidas (Ghanbari, *et al.*, 2013).

Em Portugal a conserva por salga de peixe e a produção de garum constituíram, certamente, uma das indústrias mais ativas do império Romano, particularmente nos estuários do Sado, Tejo, Sines, Pessegueiro e na costa algarvia (Alarcão, 1988). Estas indústrias consistiam numa série de cubas cobertas em que o peixe e provavelmente entranhas, era trabalhado, temperado com sal e ervas e posteriormente deixados a fermentar ao sol para transformação em garum.(Comis, *et al.*, 2009).

A confeção de garum baseia-se essencialmente em duas técnicas base de produção. A primeira envolvia essencialmente um método de salga a seco, em que Romanos colocavam o peixe inteiro pequeno ou as entranhas de grandes peixes com sal num tanque numa proporção especificada, talvez juntamente com outros ingredientes, tais como ervas, especiarias e similares. Eles misturavam estes ingredientes, cobriam o recipiente, e deixavam a mistura a fermentar durante três meses. No segundo processo os peixes eram salgados e colocados em recipientes. A mistura era então aquecida através de uma fogueira, até que o líquido adquirisse a textura desejada (Smriga, *et al.*, 2010).

A produção de garum foi executado até ao Século V D.C., em Marrocos, e o consumo de garum é testemunhado nos primeiros tempos medievais e posteriores (século VIII D.C., a Enciclopédia Romana em "garum" afirma que há vestígio de produção de garum tão tarde quanto XIII D.C.). Parece que, portanto, a produção de garum foi estritamente ligada à indústria de transformação de peixe (Comis, *et al.*, 2009).

O objetivo deste capítulo foi a pesquisa de microrganismos que possivelmente fermentariam peixe, para a produção de garum.

## 3.2 Material e métodos

### 3.2.1 Seleção de amostras

Foram seleccionadas para este estudo quatro amostras de resíduos de garum (Figura 16) provenientes das ruínas de Troia.



**Figura 16** - Amostras dos resíduos de garum.

### 3.2.2 Isolamento de microrganismos

Foram recolhidos 100 mg de cada amostra de garum e posteriormente colocadas em microtubos estéreis com 2 mL de MRD (Maximum Recovery Diluent, Merck). As amostras foram colocadas em agitação a 28°C durante 72 h e foram posteriormente inoculadas por espalhamento em meio NA e TSA para isolamento de bactérias e, em MEA, para isolamento de fungos. As culturas foram incubadas a 30°C entre 24 a 48 h para desenvolvimento de bactérias, e, entre 4 a 5 dias, a 28°C, para crescimento de fungos. As placas foram mantidas em incubação até 1 mês para permitir o desenvolvimento de microrganismos com metabolismo mais lento.

### 3.2.3 Isolamento de bactérias lácticas

Foram recolhidos 100 mg de cada amostra de garum que se colocaram em microtubos estéreis com 2 mL de MRD (Maximum Recovery Diluent, Merck). As amostras foram colocadas em agitação a 28°C durante 72 h. Para o isolamento das bactérias foram preparadas diluições decimais, em solução salina estéril a partir das amostras homogeneizadas. De seguida procedeu-se à inoculação por espalhamento de 100  $\mu$ L das amostras diluídas em meio MRS. As placas foram incubadas a 30°C durante 72h. Após a incubação, contaram-se

as colónias desenvolvidas e efetuou-se o isolamento em MRS de cada colónia com morfologia diferente, até obtenção de culturas puras. Estas foram depois repicadas em rampa e mantidas a 4°C até à sua utilização (Poffo, *et al.*, 2011).

### 3.2.4 Caracterização dos isolados microbiológicos

Para a identificação dos isolados efetuou-se a caracterização morfológica, através da observação macroscópica e microscópica das colónias. Para a visualização das estruturas reprodutoras dos fungos procedeu-se à sua observação através de preparações a fresco utilizando o corante azul de metileno, sendo em seguida observadas ao microscópico ótico com a objetiva de 40x (Motic BA410E), cujas imagens foram adquiridas com a câmara MoticamPro 282B. Para observação da estrutura bacterianas procedeu-se à coloração de Gram e de seguida à sua observação microscópica com a objetiva de 100x, utilizando o mesmo microscópico e câmara referidos anteriormente.

### 3.2.5 Extração, amplificação e sequenciação do DNA extraído das bactérias láctica.

A extração do DNA bacteriano foi realizada através de culturas com o crescimento de 1 dia. Removeu-se com uma ansa descartável a cultura e ressuspendeu-se em 100µL de tampão de lise- 1x tampão TE. Adicionou-se 15 µL de Lisosima (2mg/mL), para romper as células, agitou-se no vortex e incubou-se a 37°C durante 20 min. De seguida adicionou-se 15 µL de α-Quimiotripsina (4mg/mL) em SDS 10%, e incubou-se a 50°C durante 30 minutos. Adicionou-se 100 µL de Fenol/Clorofórmio/Alcool isoamílico (25:24:1) (volume igual ao da fase aquosa), agitou-se suavemente e fez-se um spin durante alguns segundos.

Transferiu-se a fase aquosa (sobrenadante) para um novo microtudo e adicionou-se 1 volume de Clorofórmio/álcool isoamílico (24:1), agitou-se suavemente e fez-se um spin durante alguns segundos.

Transferiu-se a fase aquosa para um novo microtubo e adicionou-se 2 volumes de etanol 100% (aproximadamente 200µL) e 0,3 volumes de Acetato de sódio 3M.

Deixou-se o DNA a precipitar *overnight* a -20°C.

Centrifugou-se a 11900g durante 25 minutos. Descartou-se o sobrenadante e deixou-se secar o precipitado. De seguida ressuspendeu-se o precipitado de DNA com 100µL de Tampão TE 1x pH=8 e guardou-se as amostras de DNA a -20°C (Rinta-Kanto, *et al.*, 2005).

A amplificação do DNA extraído, foi efetuada por PCR como descrito na secção 2.2.6 com os *primers* indicados na Tabela 3

**Tabela 3** - *Primers* utilizados para amplificação do DNA extraído.

<i>Primer</i>	Sequência 5'-3'
<b>27F</b>	5'- AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3'
<b>534R</b>	5'- TTA CCG CGG CTG CTG GCA-3'

Efetuuou-se a sequenciação de DNA dos isolados bacterianos e a pesquisa de homologia e identificação das sequências de rDNA 16S foram determinadas usando a ferramenta “Basic Local Alignment Search Tool” - BLAST 2.2.25+ da base de dados NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

A análise das relações filogenéticas entre os diversos isolados bacterianos foi realizada utilizando o software MEGA 7.0.

### 3.2.6 Determinação do crescimento de bactérias lácticas em meio salino.

Para este estudo as bactérias lácticas, previamente isoladas como descrito na secção 3.2.3 deste capítulo, foram repicadas para obtenção de culturas frescas. Os diferentes isolados foram então inoculados em rampa, em meio MRS e incubados durante 24h a 30°C.



**Figura 17-** Crescimento das bactérias isoladas em diferentes concentrações de NaCl.

Após desenvolvimento das culturas, preparou-se o inóculo de cada um dos isolados bacterianos, lavando-se a rampa com 1 mL de MRS. Prepararam-se culturas líquidas com cada um dos inóculos preparados, os quais foram inoculados em 250 mL de meio MRS nas seguintes concentrações de sódio: 0%, 4%, 8%, 12% e 16%. As culturas foram incubadas a uma temperatura de 37°C durante 7 dias (Figura 17), fazendo-se leituras periódicas (no primeiro dia leitura de hora a hora e nos dias seguintes duas leituras por dia). Foram ainda preparadas culturas de cada um dos isolados em caldo de MRS sem a adição de NaCl, com um pH=5,8 a 37°C, as quais funcionaram como controlo (Poffo, *et al.*, 2011). A taxa específica de crescimento ( $\mu$ ) foi determinada a partir de dados experimentais correspondente à fase exponencial do crescimento, utilizando a relação (Zwietering, *et al.*, 1990),

$$\mu (h^{-1}) = \frac{c \times a}{e^{-1}}$$

onde  $e$  é o número de Neper. O tempo de geração foi calculado utilizando a seguinte equação (Zwietering, *et al.*, 1990):

$$g (h) = \frac{\ln(2)}{\mu}$$

Os dados foram tratados e ajustados através do software SigmaPlot (versão 12.0, Germany).

### 3.2.7 Extração de DNA bacteriano

O DNA bacteriano presente nas quatro amostras de garum foi extraído utilizando o KIT “E.Z.N.A. Bacterial DNA” (Omega Bio-Tek, Norcross, EUA). Pesou-se 100 mg de cada amostra de garum e adicionou-se 100  $\mu$ L de Tampão TE. Ressuspendeu-se completamente o precipitado no vortex. Adicionou-se 10  $\mu$ L de lisozima e incubou-se a 37°C durante 10 min. Pesaram-se 25 mg microesferas de vidro num microtubo de 1,5 mL e adicionou-se a respectiva amostra. Misturou-se no vortex na velocidade máxima durante 5 min e deixou-se a amostra repousar para permitir que as microesferas de vidro precipitassem. Transferiu-se o sobrenadante para um novo microtubo de 1,5 mL. Adicionou-se 100  $\mu$ L de *BTL Buffer* e 20  $\mu$ L de Proteinase K. Misturou-se no vortex vigorosamente. Incubou-se num banho com

agitação a 55°C durante 1 h. De seguida adicionou-se 5 µL de RNase A. Incubou-se à temperatura ambiente durante 5 min., de seguida centrifugou-se a 10000 g durante 2 min, para precipitar todo o material não digerido. Transferiu-se o sobrenadante para um novo microtubo de 1,5 mL. Adicionou-se 220 µL BDL *Buffer* e agitou-se no vortex para misturar.

Incubou-se a 65°C durante 10 min e adicionou-se 220 µL de etanol 100%, de seguida agitou-se no vortex durante 20 s na velocidade máxima para misturar bem.

Inseriu-se a coluna “*HiBind DNA Mini Column*” num tubo de recolha de 2 mL e transferiu-se toda a amostra para a coluna, incluindo todo o precipitado que se formou. Centrifugou-se a 10000 g durante 1 min e descartou-se o eluído e o microtubo.

Inseriu-se a coluna num novo microtubo de 2 mL, adicionou-se 500 µL de *HBC Buffer* e centrifugou-se a 10000 g durante 1 min. Descartou-se o eluído e reutilizou-se o microtubo de 2mL.

Adicionou-se 700 µL de *DNA Wash Buffer* e centrifugou-se a 10000 g durante 1 min e descartou-se o eluído e reutilizou-se novamente o microtubo de 2 mL. Repetiram-se estes últimos para uma segunda lavagem com *DNA Wash Buffer*.

Centrifugou-se a coluna vazia a uma velocidade de 10000 g durante 2 min para secar a coluna. Inseriu-se a coluna “*HiBind DNA Mini Column*” num novo microtubo de 1,5 mL e adicionamos 50 µL de *Elution Buffer* (pré-aquecido a 65°C) na coluna e deixou-se em repouso durante 3-5 min à temperatura ambiente. Centrifugou-se a 10000 g durante 1 min para eluir o DNA. Repetimos estes últimos passos com mais 50 µL de *Elution Buffer* para uma segunda eluição. O DNA foi guardado no congelador a -20°C.

### 3.2.8 Quantificação de DNA

O DNA extraído foi quantificado por espetrometria de absorção molecular num *Thermo Scientific* µDrop Plate MultiScan Go acoplado a um software *SkantY RE for MultiScan 3.2*, de acordo com o procedimento descrito no Capítulo 2- secção 2.2.5.

### 3.2.9 Amplificação de DNA por Reação de Polimerase em Cadeia

A amplificação do DNA extraído no ponto anterior, foi efetuada por PCR, com os seguintes *primers* (Tabela 4):

**Tabela 4** - *Primers* utilizados para amplificação do DNA extraído.

<i>Primer</i>	<i>Sequência 5'-3'</i>
<b>518F</b>	5'- CGCCCGCCGCGCGGGGGGGG 3'
<b>785R</b>	5'- CTA CCA GGG TAT CTA ATC C-3'

A amplificação do DNA extraído foi efetuada através da seguinte mistura reacional para um volume final de 25 µL: água RNase Free, tampão 10x *Dream Taq Buffer* com MgCl<sub>2</sub> 20 mM, dNTPs 10 mM, *primer reverse e forward* (0,1 µM), de Taq DNA polimerase 500 U e 1 µL do DNA extraído. Juntamente com estas amostras, foi também utilizado um branco, que funcionou como controlo.

A amplificação por PCR, realizada num termociclador, mencionado no Capítulo 2 secção 2.2.6, iniciou-se com um passo de desnaturação de 5 min a 94°C, ao qual se seguem 40 ciclos constituídos por: desnaturação de 1 min a 94°C, emparelhamento de 1 min a 50°C, e extensão de 2 min a 72°C. Por último, fez-se uma extensão final de 6 min a 72°C. Os produtos resultantes da amplificação foram guardados a 4°C até posterior análise por eletroforese em gel de agarose, seguindo o mesmo procedimento descrito no Capítulo 2, secção 2.2.7.

### 3.2.10 Sequenciação de Nova Geração

A técnica de Sequenciação de Nova Geração das amostras de garum foi realizada de acordo com o procedimento descrito no Capítulo 2- secção 2.2.8.

## 3.1 Resultados e discussão

Neste trabalho foram estudadas amostras de resíduos de garum. A pesquisa de microrganismos ligados ao processo de fermentação do garum contribui para a reconstrução das técnicas antigas de conservação de alimentos. Assim com este trabalho pretende-se dar um contributo para clarificar os processos de conserva de garum e conhecer os microrganismos aí envolvidos.

Neste estudo vão ser realizados métodos de cultura para acesso aos microrganismos cultiváveis, podendo estes serem utilizados para outros estudos posteriores, e métodos independentes de cultura de forma a detetar a existência de DNA microbiano nos resíduos de garum que nos possibilite compreender o seu processo de conservação. Foi ainda realizado um estudo de bactérias isoladas em meio seletivo para bactérias lácticas de modo a perceber se é possível o seu isolamento e se esta poderiam estar ligadas ao método de conservação de garum.

### 3.1.1 Isolamentos microbianos

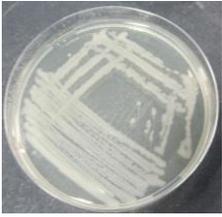
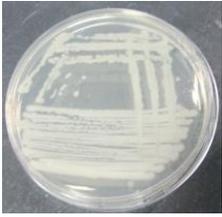
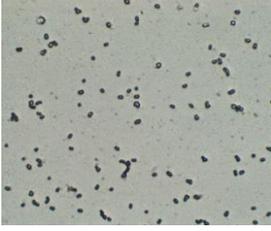
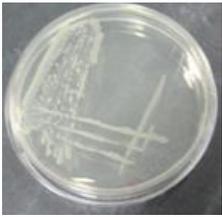
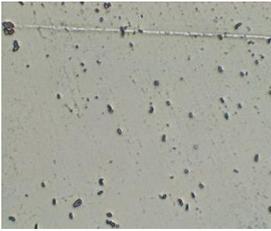
Os microrganismos isolados de resíduos de garum foram caracterizados levando em consideração o seu aspeto macroscópico (cor, tamanho e morfologia) e características microscópicas (tipo de estruturas reprodutivas e cor das colónias no caso das bactérias).

O estudo microbiológico permitiu o isolamento de 13 estirpes de bactérias que incluem cocos (Gram +) e *Bacillus* (Gram +), uma estirpe de levedura e 8 estirpes de fungos filamentosos. Os géneros fungícos predominantes foram *Cladosporium*, *Mucor* e *Penicillium*. Foram ainda isolados outros fungos, não sendo possível a sua identificação, designando-se assim por micélios estéreis, uma vez que não se observaram estruturas resprodutoras. As tabelas Tabela 5, Tabela 6, Tabela 7 e Tabela 8 apresentam as características macroscópicas e microscópicas dos microrganismos isolados.

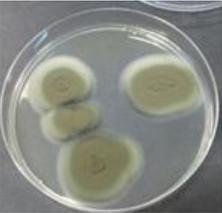
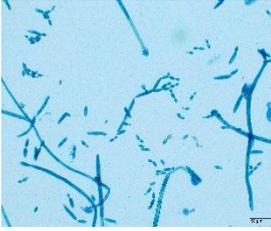
Como já foi referido estes métodos são úteis pois, permitem a obter culturas puras, que podem posteriormente ser utilizados em ensaios subsequentes. No entanto, esta abordagem não permite uma caracterização completa da comunidade microbiana, uma vez que alguns microrganismos não podem ser cultivados em condições de laboratório.

Na amostra de garum 1188 (Tabela 5) foi possível o isolamento de 6 estirpes de bactérias e 3 fungos filamentosos. As bactérias isoladas foram Bacilos. No caso dos fungos foi possível identificar 3 géneros diferentes, *Cladosporium*, *Mucor* e *penicillium*.

**Tabela 5-** Identificação dos microrganismos isolados do garum 1188.

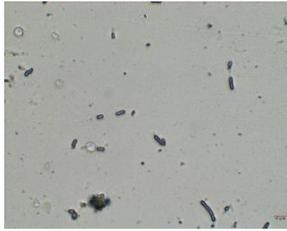
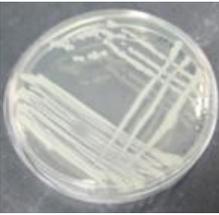
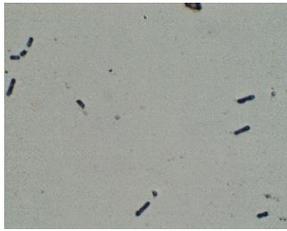
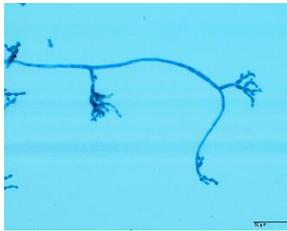
Código	Aspeto das colónias na placa		Aspeto microscópico	
	Frente	Verso		
G1				<i>Bacillus</i> Gram +
G2				<i>Bacillus</i> Gram +
G11				<i>Bacillus</i> Gram +
G13				Cocos Gram +
G14				<i>Bacillus</i> Gram +
G17				<i>Bacillus</i> Gram +

**Tabela 5 (cont.)** – Identificação dos microrganismos isolados do garum 1188

Código	Aspetto das colónias na placa		Aspetto microscópico	
	Frente	Verso		
<b>G10</b>				<i>Cladosporium</i> sp.
<b>G12</b>				<i>Mucor</i> sp.
<b>G15</b>				<i>Cladosporium</i> sp.

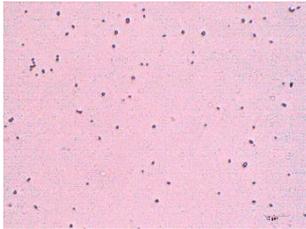
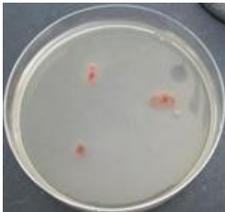
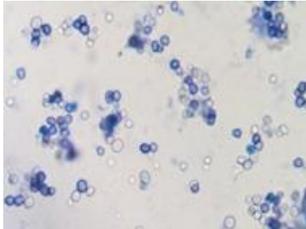
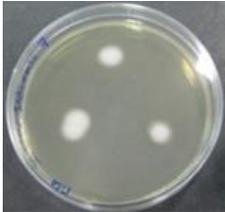
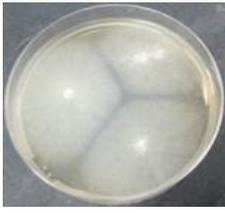
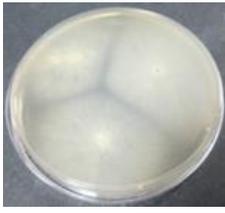
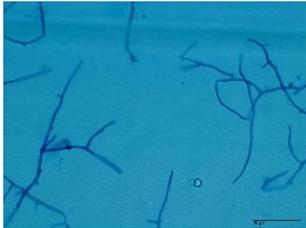
A Tabela 6 mostra que na amostra de garum 1415 foi possível identificar 3 estirpes de bactérias diferentes e uma de fungo filamentosos.

**Tabela 6** - Identificação dos microrganismos isolados do garum 1475.

Código	Aspetto das colónias na placa		Aspetto microscópico	
	Frente	Verso		
G3				<i>Bacillus</i> Gram +
G4				<i>Bacillus</i> Gram +
G16				<i>Bacillus</i> Gram +
G18				<i>Cladosporium</i> sp.

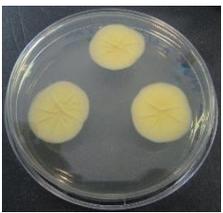
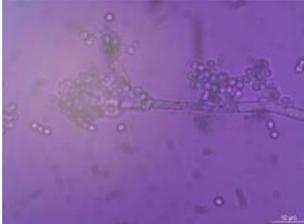
Na Tabela 7 podemos verificar que na amostra de garum 1060 se isolaram duas estirpes bacterianas diferentes, uma estirpe de levedura e 2 estirpes de fungos filamentosos.

**Tabela 7** - Identificação dos microrganismos isolados do garum 1060.

Código	Aspetto das colónias na placa		Aspetto microscópico	
	Frente	Verso		
G5				<i>Bacillus</i> Gram +
G6				Coccus Gram +
G8				Levedura
G7				Micélio sp.
G9				Micélio sp.

Na amostra 1516 (Tabela 8) foram isoladas e identificadas duas estirpes de bactérias e *Penicillium* sp..

**Tabela 8** - Identificação dos microrganismos isolados do garum 1516.

Código	Aspetto das colónias na placa		Aspetto microscópico	
	Frente	Verso		
G19				<i>Bacillus</i> Gram +
G20				<i>Bacillus</i> Gram +
G21				<i>Penicillium</i> <i>sp.</i>
G22				<i>Penicillium</i> <i>sp.</i>

Podemos verificar então que foi possível o isolamento tanto de bactérias como de fungos em todas as amostras.

Alguns destes microrganismos, como os fungos do género *Penicillium* são possivelmente devidos ao meio circundante como o solo e o ar, uma vez que estes são fungos comumente encontrados em vários ambientes como solo, ar e ambientes extremos (temperatura, salinidade, deficiência de água e pH) (Scholtz, *et al.*, 2017, Yadav, *et al.*, 2018).

### 3.1.2 Pesquisa de bactérias lácticas

#### 3.1.2.1 Isolamento de bactérias

Obtiveram-se 10 isolados bacterianos nas amostras de garum. A Tabela 9 mostra algumas das características morfológicas destes isolados.

**Tabela 9** - Identificação bacteriana dos isolados em meio MRS.

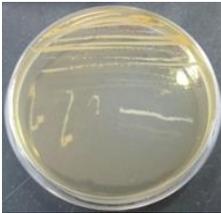
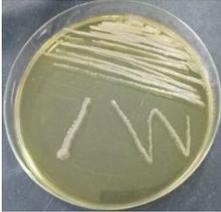
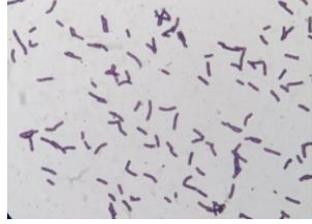
Código	Aspetto das colónias na placa		Aspetto microscópico	
	Frente	Verso		
A1				<i>Bacillus</i> sp. Gram +
A2				<i>Bacillus</i> sp. Gram +
A3				<i>Bacillus</i> sp. Gram +
A4				<i>Bacillus</i> sp. Gram +
A5				<i>Bacillus</i> sp. Gram +

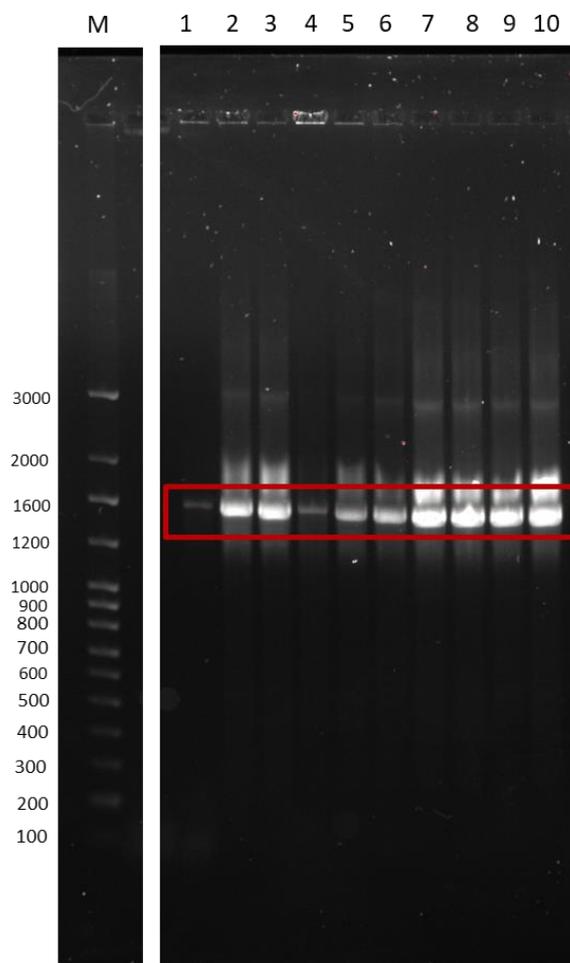
Tabela 9 (cont.)- Identificação bacteriana dos isolados em meio MRS.

Código	Aspetto das colónias na placa		Aspetto microscópico	
	Frente	Verso		
A6				<i>Bacillus</i> sp. Gram +
B1				<i>Bacillus</i> sp. Gram +
B2				<i>Bacillus</i> sp. Gram +
C1				<i>Bacillus</i> sp. Gram +
C2				<i>Bacillus</i> sp. Gram +

### 3.1.2.2 Caracterização e identificação molecular dos isolados

Após extração do DNA dos isolados bacterianos, estes foram amplificados com primers 27F/534R como descrito na secção 3.2.5. Os produtos de amplificação foram purificados e posteriormente sequenciados.

A Figura 18 apresenta-se o perfil electroforético correspondente à amplificação dos isolados bacterianos. A quantificação dos produtos de PCR encontra-se na Tabela C1 do Anexo C.



**Figura 18** - Eletroforese em gel de agarose de DNA das dez amostras de bactérias isoladas em meio MRS utilizando os *primers* 27F e 734R. M- Marcador de DNA 100 bp; 1- Produto de PCR da bactéria A1; 2- Produto de PCR da bactéria A2; 3- Produto de PCR da bactéria A3; 4- Produto de PCR da bactéria A4; 5- Produto de PCR da bactéria A5; 6- Produto de PCR da bactéria A6; 7- Produto de PCR da bactéria B1; 8- Produto de PCR da bactéria B2; 9- Produto de PCR da bactéria C1; 10- Produto de PCR da bactéria C2.

Após extração do DNA dos isolados bacteriano em meio MRS, estes foram amplificados com 27F/534R. Os produtos de amplificação foram purificados e posteriormente sequenciados pelo método de Sanger.

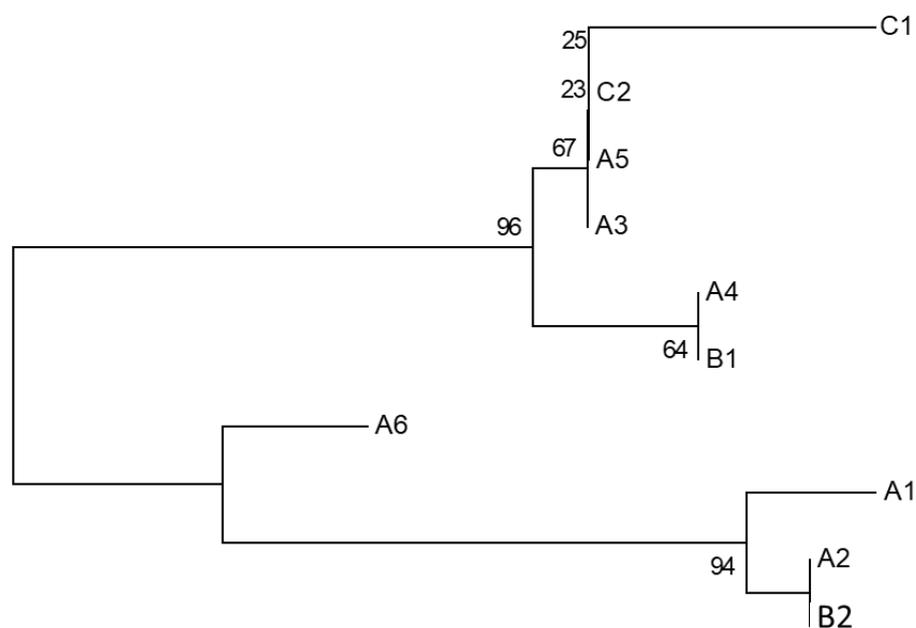
A Tabela 10 relaciona a identificação dos diferentes isolados bacterianos em meio MRS com base nos resultados obtidos através da sequenciação.

**Tabela 10** - Identificação dos isolados bacterianos.

<b>Código microrganismo</b>	<b>Identificação</b>	<b>Total score</b>	<b>Query cover (%)</b>	<b>Similaridade/Identidade (%)</b>	<b>Número de acesso (NCBI)</b>
<b>A1</b>	<i>Bacillus</i> sp.	874	97	99	HQ224654.1
<b>A2</b>	<i>Bacillus cereus</i>	891	98	99	KT291131.1
<b>A3</b>	<i>Bacillus</i> sp.	905	99	99	KF648915.1
<b>A4</b>	<i>Bacillus thuringiensis</i>	893	98	99	KX832697.1
<b>A5</b>	<i>Bacillus</i> sp.	904	99	99	KR007001.1
<b>A6</b>	<i>Bacillus</i> sp.	896	99	99	KF646681.1
<b>B1</b>	<i>Bacillus</i> sp.	898	97	99	EU584532.1
<b>B2</b>	<i>Bacillus thuringiensis</i>	915	99	99	HQ238513.1
	<i>Bacillus cereus</i>	915	99	99	EU834245.1
<b>C1</b>	<i>Bacillus</i> sp.	869	96	99	KF788157.1
	<i>Bacillus cereus</i>	869	97	99	KC222509.1
<b>C2</b>	<i>Bacillus thuringiensis</i>	12362	97	99	CP020754
	<i>Bacillus cereus</i>	12395	97	99	CP017060.1

A árvore filogenética representada na Figura 19 permitiu formar dois clusters principais. No primeiro cluster observa-se que os isolados bacterianos C2, A5 e A3 têm bastante similaridade entre si, e apresentam similaridade com os isolados A4 e B1 que se encontram noutra subdivisão.

O segundo cluster divide-se também em duas subunidades. Na primeira subunidade contém o isolado A6 que não apresenta similaridade com nenhum outro isolado, já os isolados A2 e B2 apresentam proximidade.



**Figura 19-** Árvore filogenética dos isolados sequenciados com base na sequência de nucleótidos rDNA 16s.

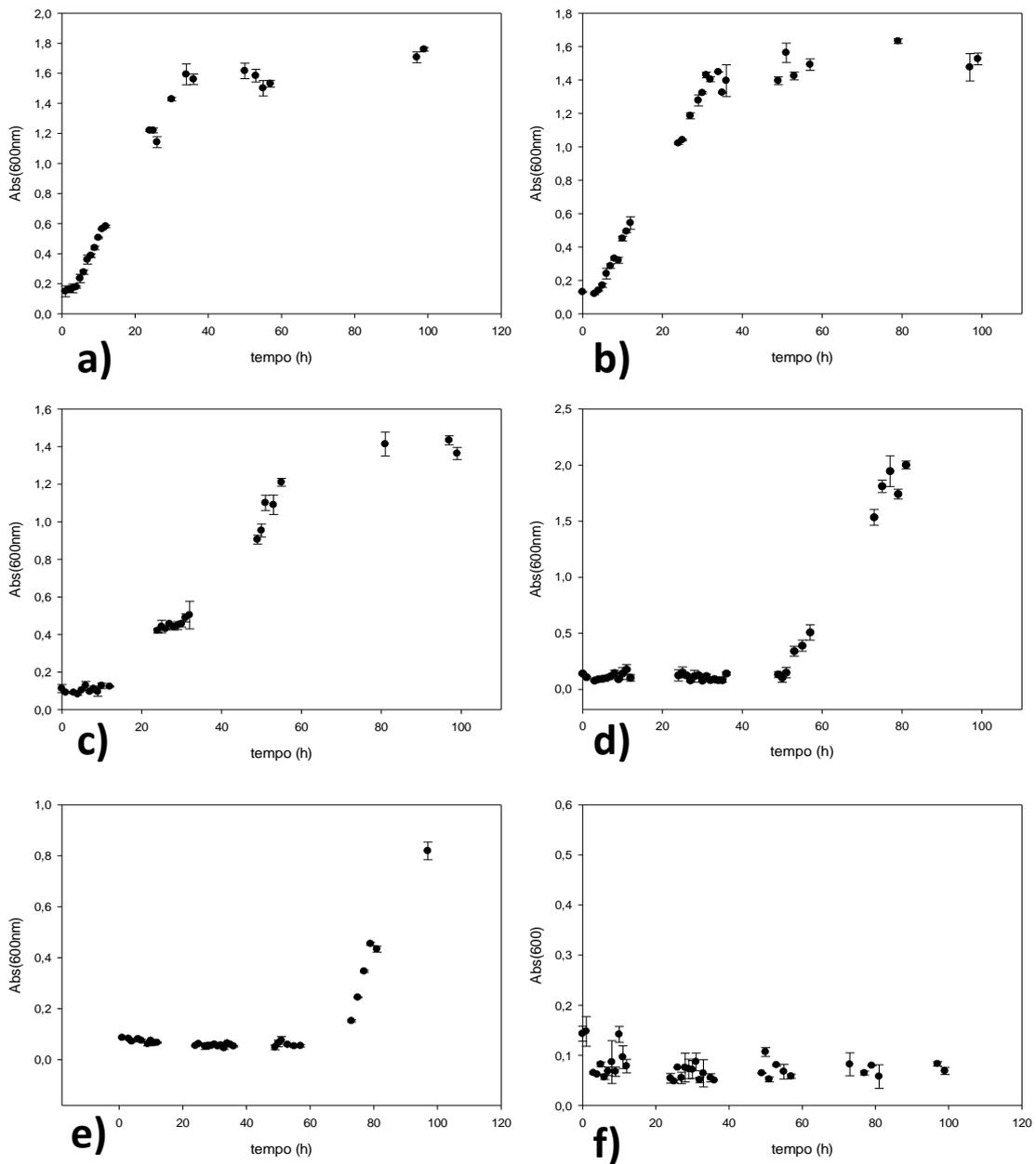
### 3.1.2.3 Curvas de crescimento em meio salino

Uma vez que o garum é um preparado piscícola fermentado obtido pela decomposição de peixes e ervas em sal, torna-se importante perceber se as bactérias isoladas têm capacidade de crescer em meio salino. Foi por esse motivo testada a capacidade de crescimento em diferentes concentrações de NaCl. As culturas foram realizadas conforme descrito na secção 3.2.6. A taxa de crescimento específico e o tempo de geração foram determinados a partir da fase de crescimento exponencial das três estirpes de bactérias testadas Tabela 11.

**Tabela 11-** Taxa específica de crescimento e tempo de geração das estirpes A1, A5 e A3 nas diferentes concentrações de NaCl.

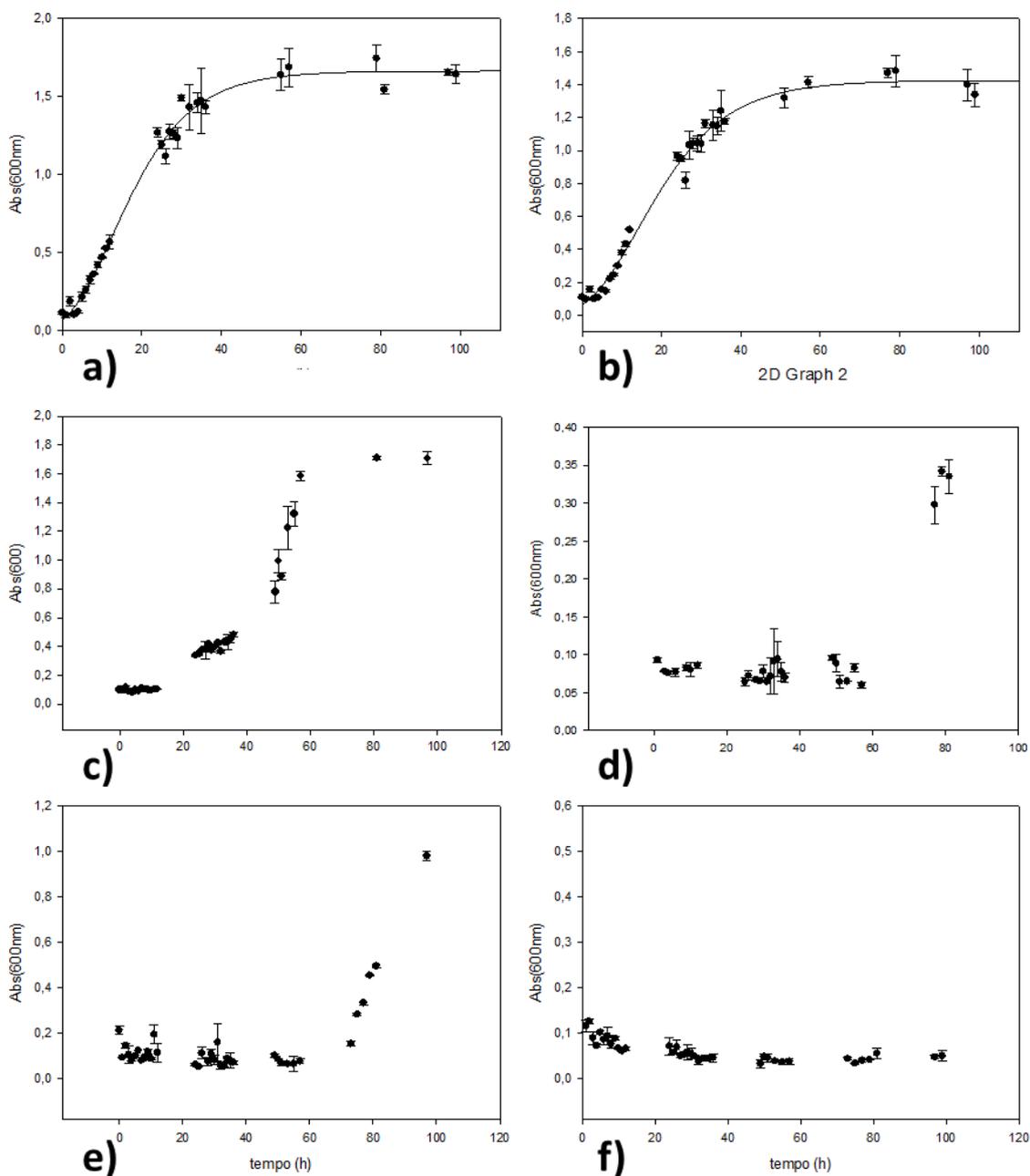
<b>Bactéria</b>	<b>[NaCl]</b>	<b>Taxa específica de crescimento (h<sup>-1</sup>)</b>	<b>Tempo geração (h)</b>
<b>A1</b>	0%	0,06	12,19
	2,50%	0,06	12,46
	5%	0,02	27,93
<b>A5</b>	0%	0,06	12,42
	2,50%	0,04	16,35
<b>A3</b>	0%	0,09	8,08
	2,50%	0,06	10,69

Podemos observar que a estirpe A1 (Figura 20) com uma concentração de NaCl a 0%, 2.5% e 5%, apresenta um perfil de crescimento com uma fase de latência, fase exponencial e fase estacionária bem evidenciado. A partir de concentração salina de 7,5% observa-se que esta estirpe apresenta uma diferença notória nas suas fases de crescimento, chegando mesmo a apresentar um crescimento bacteriano quase nulo na concentração de 15%.



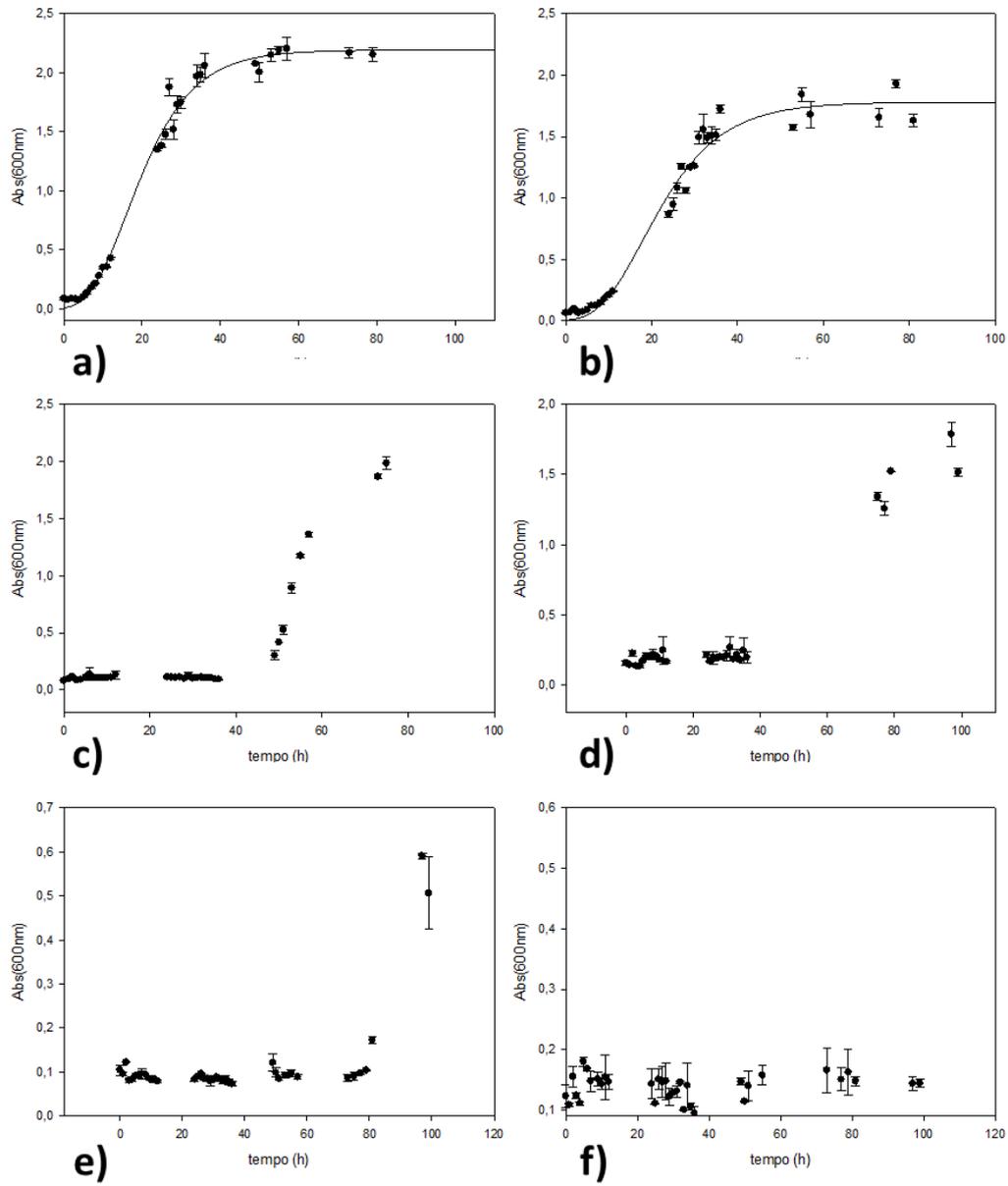
**Figura 20-** Perfil de crescimento da estirpe A1 a diferentes concentrações. a) [NaCl] 0%; b) [NaCl] 2,5%; c) [NaCl] 5%; d) [NaCl] 7,5%; e) [NaCl] 10%; f) [NaCl] 15%.

Relativamente à estirpe A5 (Figura 21) podemos verificar exatamente o mesmo comportamento que na estirpe A1, observando-se que a partir de concentração salina de 7,5% esta bactéria não apresenta uma fase exponencial definida.



**Figura 21-** Perfil de crescimento da estirpe A5 a diferentes concentrações. a) [NaCl] 0%; b) [NaCl] 2,5%; c) [NaCl] 5%; d) [NaCl] 7,5%; e) [NaCl] 10%; f) [NaCl] 15%.

Por último a estirpe A3 (Figura 22) apresenta apenas uma fase de crescimento exponencial até à concentração 2,5%, verificando-se, portanto, que esta estirpe apresenta uma maior sensibilidade à presença de NaCl que as duas anteriores, com influência significativa no seu crescimento. Esta estirpe bacteriana na ausência de NaCl foi a que apresentou maior taxa específica de crescimento e menor tempo de geração Tabela 11.



**Figura 22** - Perfil de crescimento da estirpe A3 a diferentes concentrações. a) [NaCl] 0%; b) [NaCl] 2,5%; c) [NaCl] 5%; d) [NaCl] 7,5%; e) [NaCl] 10%; f) [NaCl] 15%.

### 3.1.3 Métodos independentes de cultura

A estratégia adotada neste estudo incidiu na pesquisa de bactérias possivelmente envolvidas nos processos de fermentação do garum. Assim sendo, e considerando que nem todos os microrganismos têm a capacidade de crescer sob condições *in vitro*, como foi já referido, utilizamos técnicas de cultura independentes para uma pesquisa mais aprofundada da comunidade microbiológica presente nas amostras de resíduos de garum.

#### 3.1.3.1 Extração, quantificação e amplificação de DNA

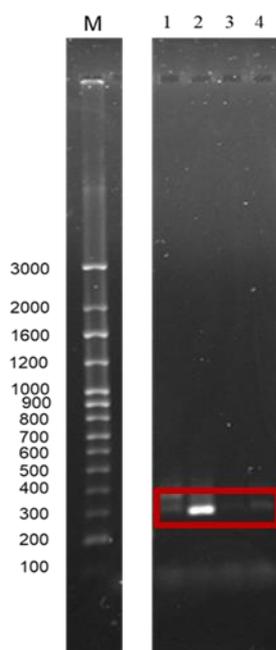
A concentração de DNA extraído e o seu grau de pureza (Tabela 12) foram determinados através de leitura no espectrofotômetro  $\mu$ Drop Plate Multiscan Go. A pureza e integridade do DNA bacteriano amplificado por PCR foi analisada por eletroforese em gel de agarose.

Podemos observar os graus de pureza dados pelas razões  $Abs_{260}/Abs_{280}$  e  $Abs_{260}/Abs_{230}$  obtidos através da análise pelo software *Skanky RE for MultiScan 3.2*. A razão  $Abs_{260}/Abs_{280}$  indica-nos o grau de pureza das amostras de DNA, tendo como valor ótimo 1,8. Observando a Tabela 12 podemos verificar que a razão é ligeiramente mais baixa, o que pode indicar a presença de proteínas, fenóis ou outros contaminantes que absorvem fortemente a 280 nm ou nessa região. A razão  $Abs_{260}/Abs_{230}$  é usada como uma medida secundária de pureza dos ácidos nucleicos, e os valores ótimos esperados variam entre 1,8-2,2. Pode então verificar que as nossas amostras apresentam valores abaixo desse intervalo, indicando assim contaminação.

**Tabela 12-** Análise da concentração e grau de pureza do DNA bacteriano extraído das amostras de garum.

garum	[DNA] $\mu$ g/ mL	Abs 260/280	Abs 260/230
<b>1188</b>	509,85 $\pm$ 2,20	1,67	1,23
<b>1475</b>	539,46 $\pm$ 3,06	1,69	1,24
<b>1060</b>	511,13 $\pm$ 12,56	1,70	1,30
<b>1516</b>	508,58 $\pm$ 3,62	1,70	1,27

O DNA das amostras de garum mostraram amplificações na zona 16s rDNA utilizando *primers* bacterianos. Através da Figura 23 pode observar-se amplificação do DNA das amostras de garum na zona dos 300 bp, sugerindo a presença de DNA bacteriano em todas as amostras.



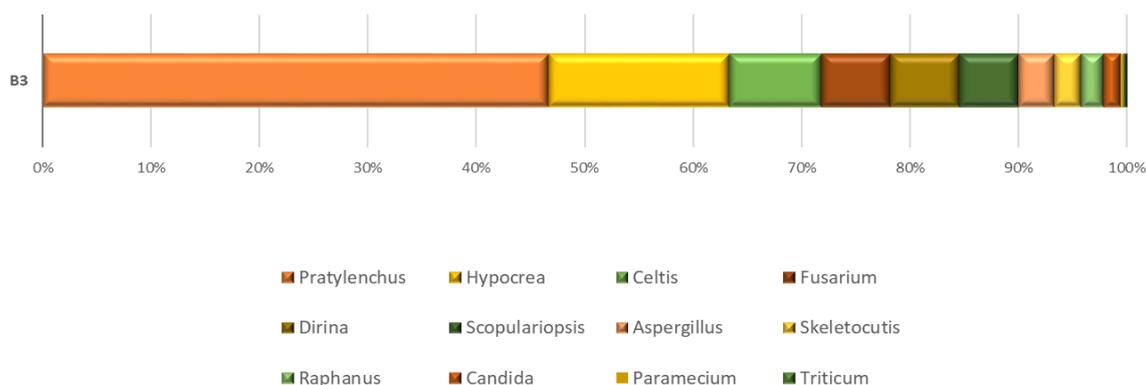
**Figura 23** - Eletroforese em gel de agarose de DNA das quatro amostras de garum utilizando os primers 518F-GC e 785R. M- Marcador de DNA 100 bp; 1- Produto de PCR do garum 1188; 2- Produto de PCR do garum 1475; 3- Produto de PCR do garum 1060; 4- Produto de PCR do garum 1516.

### 3.1.3.2 Sequenciação de Nova Geração

Para uma identificação mais completa da comunidade microbiana presente em resíduos de garum, foi selecionado o garum 1516 (B3) e feita a análise do DNA metagenômico com SNG das regiões V3-V4 e ITS2.

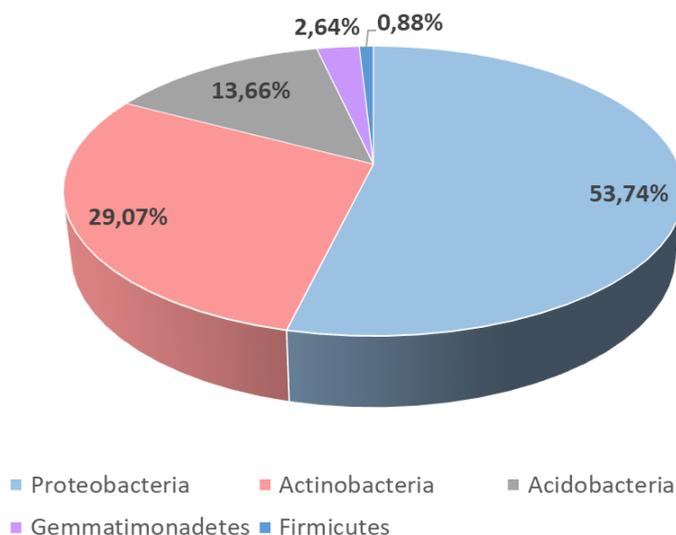
Através da análise dos resultados da sequenciação foram geradas no total, 3920 leituras para as regiões hipervariáveis V3-V4 do gene 16S, que foram agrupadas em 236 OTUs, e foram geradas 4653 leituras para a região hipervariável ITS2 que foram agrupadas em 177 OTUs. As OTUs receberam uma identificação taxonômica através de pesquisas em bases de dados públicas.

Da população fúngica/eucariota (Figura 24) identificaram-se os géneros: *Pratylenchus*, *Hypocrea*, *Celtis*, *Fusarium*, *Dirina*, *Scopulariopsis*, *Aspergillus*, *Skeletocutis*, *Raphanus*, *Candida*, *Paramecium* e *Triticum*.



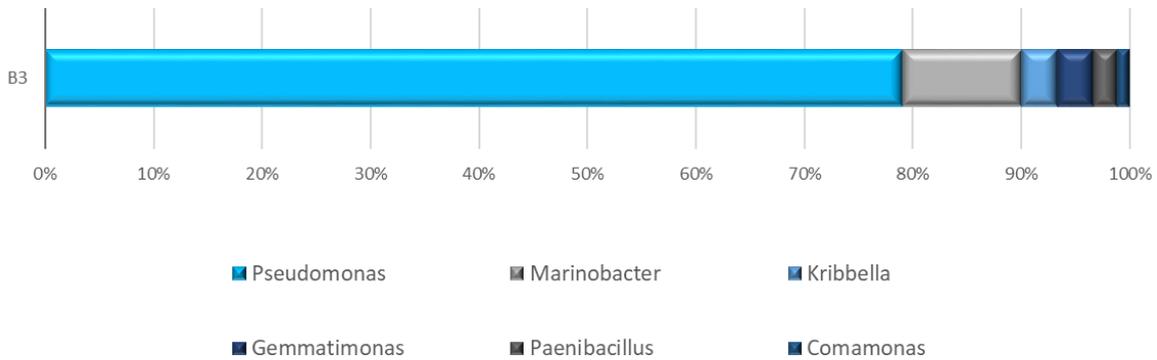
**Figura 24** - Diversidade eucariota obtida através de sequenciação de nova geração de resíduos de garum.

As classes de bactérias identificadas por SNG na amostra (Figura 25) foram: Proteobacteria, Actinobacteria, Acidobacteria, Gemmatimonadetes e Firmicutes.



**Figura 25** - Classes bacterianas obtidas através da sequenciação de nova geração de resíduos de garum..

Esta população bacteriana incluiu os géneros: *Pseudomonas*, *Marinobacter*, *Kribella*, *Gemmatimonas*, *Paenibacillus* e *Comamonas* (Figura 26).



**Figura 26-** Diversidade bacteriana obtida através de sequenciação de nova geração de resíduos de garum.

Dentro de população bacteriana o género *Marinobacter*, possui bactérias que são amplamente distribuídas em todos os oceanos, estando associadas a ambientes marinhos costeiros (Hedlund, *et al.*, 2001, Martin, *et al.*, 2003). A identificação deste género de bactérias é um indício de que estamos perante um alimento que foi produzido à base de peixe. Por outro lado, a grande presença de bactérias lácticas é indicativa do tipo de fermentação.

# Capítulo 4



---

**Considerações finais**



O estudo de artefactos arqueológicos pode representar uma fonte de informações importantes acerca dos processos de conserva de alimentos dos nossos antepassados. As ânforas foram amplamente utilizadas para o transporte, transformação e armazenamento de produtos alimentares no Império Romano e o garum, um preparado piscícola que esteve entre os condimentos mais utilizados e amplamente produzidos no Antigo Império Romano, foram os objetos deste estudo. A identificação das comunidades microbianas presentes nestes artefactos arqueológicos pode constituir uma importante ferramenta na clarificação da utilização destes objetos e dos processos fermentativos usados na preservação/transformação dos alimentos.

Através de métodos dependentes de cultura, foi possível isolar diversos microrganismos. Os métodos de isolamento e amplificação de DNA permitiram detetar a presença de microrganismos e a utilização de DNA metagenómico acoplado a SNG permitiu identificar a presença de diversos microrganismos, possibilitando a atribuição de alguns processos fermentativos a estes artefactos arqueológicos. Foi possível sequenciar, a partir de DNA isolado de fragmentos de ânforas, bactérias do género *Sporolactobacillus*, *Lactococcus* e *Acetobacter*, microrganismos responsáveis pela fermentação láctica e acética respetivamente. Relativamente a eucariotas destaca-se a classe Saccharomycetes, relacionada com a fermentação alcoólica, e o género *Aureobasidium*, constituinte da microflora presente nos bagos de uva e um agente de biocontrolo natural de alguns fungos patogénicos da videira ou ainda os géneros *Candida* e *Lachancea* que podem ser atribuídos a leveduras de fermentação do vinho. A presença de DNA de *Vitis vinifera*, espécie de videira, é outro indício forte da utilização dos artefactos no transporte/produção de vinho.

O estudo dos resíduos de garum permitiu o isolamento de várias estirpes de bactérias lácticas, com capacidade de crescimento em concentrações elevadas de NaCl. Por outro lado, utilizando métodos independentes de cultura, com extração e análise de DNA metagenómico por SNG nos resíduos de garum, foi possível a deteção de bactérias lácticas, evidenciando a presença de fermentação láctica neste processo, e de bactérias do género *Marinobacter*, bactérias amplamente distribuídas em ambientes marinhos costeiros, o que pode ser indicativo da presença de peixes oriundos do mar na produção do garum.

A pesquisa da comunidade microbiana em artefactos arqueológicos dá-nos informações importantes acerca dos processos de conserva de alimentos dos nossos antepassados, sendo um enorme contributo para compreender as técnicas ancestrais de transformação de bens alimentícios. A possibilidade de deteção destes processos em ânforas,

artefactos usados no transporte, pode conduzir-nos a importantes descobertas nas rotas comerciais.

Na continuidade deste estudo seria interessante aplicar estas metodologias estabelecidas a um maior número de amostras e ampliar o estudo a um maior número de artefactos, de forma a estabelecer uma ligação entre os microrganismos detetados e os respetivos processos fermentativos. A metodologia desenvolvida pode ser aplicada na identificação e atribuição de marcadores biológicos aos processos fermentativos de transformação de alimentos e/ou às suas rotas comerciais.

# Capitulo 5



---

**Referências bibliográficas**



1. Alarcão, J., *O domínio romano em Portugal*. Forum da História, 1988.
2. Axelsson, S. and Ahrné, S., *Lactic acid bacteria*, in *Applied microbial systematics* 2000, Springer. p. 367-388.
3. Beaumont, M., *Flavouring composition prepared by fermentation with Bacillus spp.* International journal of food microbiology, 2002. **75**(3): p. 189-196.
4. Berk, Z., *Spoilage and Preservation of Foods*. 2013: p. 395-398.
5. Bevilacqua, A., Sinigaglia, M., and Corbo, M.R., *Fermented Foods: Origins and Applications*. 2016: p. 675-680.
6. Blandino, A., Al-Aseeri, M.E., Pandiella, S.S., Cantero, D., and Webb, C., *Cereal-based fermented foods and beverages*. Food Research International, 2003. **36**(6): p. 527-543.
7. Bokulich, N.A., Hwang, C.F., Liu, S., Boundy-Mills, K.L., and Mills, D.A., *Profiling the Yeast Communities of Wine Fermentations Using Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis*. American Journal of Enology and Viticulture, 2011. **63**(2): p. 185-194.
8. Bombico, S., Pr'Além do Mare Nostrum - Um Guia para a Navegação Romana no Atlântico, in CIDEHUS – Universidade de Évora 2015.
9. Bouquet, A., Torregrosa, L., Iocco, P., and Thomas, M.R., *Grapevine (Vitis vinifera L.)*. Agrobacterium Protocols Volume 2, 2007: p. 273-285.
10. Buermans, H.P. and den Dunnen, J.T., *Next generation sequencing technology: Advances and applications*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1842**(10): p. 1932-1941.
11. Buratti, S. and Benedetti, S., *Alcoholic Fermentation Using Electronic Nose and Electronic Tongue*. Electronic Noses and Tongues in Food Science, 2016: p. 291–299.
12. Caldeira, A.T., Rosado, T., Silva, M., Gonzalez, M., and Candeias, A., *Microrganismos e Património - Novas abordagens*. Magazine da Sociedade Portuguesa de Microbiologia, 2015. **4**: p. 10.03
13. Camilo, S.F., ORIGEM E DISSEMINAÇÃO DOS MICRORGANISMOS DO VINHO, in Engenharia Alimentar – Qualidade e Segurança Alimentar 2014, Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa.
14. Caplice, E. and Fitzgerald, G.F., *Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation*. International journal of food microbiology, 1999. **50**(1): p. 131-149.
15. Carraro, L., Maifreni, M., Bartolomeoli, I., Martino, M.E., Novelli, E., Frigo, F., Marino, M., and Cardazzo, B., *Comparison of culture-dependent and -independent methods for bacterial community monitoring during Montasio cheese manufacturing*. Res Microbiol, 2011. **162**(3): p. 231-9.
16. Chang, C.-F., Lin, Y.-C., Chen, S.-F., Barriga, E.J.C., Barahona, P.P., James, S.A., Bond, C.J., Roberts, I.N., and Lee, C.-F., *Candida theae sp. nov., a new anamorphic beverage-associated member of the Lodderomyces clade*. International journal of food microbiology, 2012. **153**(1): p. 10-14.
17. Comis, L. and Corrado, R., *The archaeology of taste: Gargilius Martialis's Garum*. The archaeology of taste, 2009: p. 33-38.
18. Couto, S.R. and Sanromán, M.A., *Application of solid-state fermentation to food industry—a review*. Journal of Food Engineering, 2006. **76**(3): p. 291-302.
19. De Keukeleire, D., Vindevogel, J., Szücs, R., and Sandra, P., *The history and analytical chemistry of beer bitter acids*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 1992. **11**(8): p. 275-280.

20. Dias, M.I., Prudêncio, M.I., Gouveia, M.A., Trindade, M.J., Marques, R., Franco, D., Raposo, J., Fabião, C.S., and Guerra, A., *Chemical tracers of Lusitanian amphorae kilns from the Tagus estuary (Portugal)*. Journal of Archaeological Science, 2010. **37**(4): p. 784-798.
21. Dimakopoulou, M., Tjamos, S.E., Antoniou, P.P., Pietri, A., Battilani, P., Avramidis, N., Markakis, E.A., and Tjamos, E.C., *Phyllosphere grapevine yeast *Aureobasidium pullulans* reduces *Aspergillus carbonarius* (sour rot) incidence in wine-producing vineyards in Greece*. Biological Control, 2008. **46**(2): p. 158-165.
22. Edgar, R.C., *Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST*. Bioinformatics, 2010. **26**(19): p. 2460-1.
23. Felice, D.V., Solfrizzo, M., Curtis, F., Lima, G., Visconti, A., and Castoria, R., *Strains of *Aureobasidium pullulans* can lower ochratoxin A contamination in wine grapes*. Phytopathology, 2008. **98**(12): p. 1261-70.
24. Felsenstein, J., *{PHYMLIP}: phylogenetic inference package, version 3.5 c*. 1993.
25. Fleet, G.H., *Yeast interactions and wine flavour*. International journal of food microbiology, 2003. **86**(1): p. 11-22.
26. Foley, B.P., Hansson, M.C., Kourkoumelis, D.P., and Theodoulou, T.A., *Aspects of ancient Greek trade re-evaluated with amphora DNA evidence*. Journal of Archaeological Science, 2012. **39**(2): p. 389-398.
27. Ghanbari, M., Jami, M., Domig, K.J., and Kneifel, W., *Seafood biopreservation by lactic acid bacteria – A review*. LWT - Food Science and Technology, 2013. **54**(2): p. 315-324.
28. Giraffa, G., *Studying the dynamics of microbial populations during food fermentation*. FEMS Microbiol Rev, 2004. **28**(2): p. 251-60.
29. Gobbi, M., Comitini, F., Domizio, P., Romani, C., Lencioni, L., Mannazzu, I., and Ciani, M., *Lachancea thermotolerans and Saccharomyces cerevisiae in simultaneous and sequential co-fermentation: a strategy to enhance acidity and improve the overall quality of wine*. Food microbiology, 2013. **33**(2): p. 271-281.
30. González, J.M. and Saiz-Jiménez, C., *Application of molecular nucleic acid-based techniques for the study of microbial communities in monuments and artworks*. International Microbiology, 2005. **8**(3): p. 189.
31. Hansson, M.C. and Foley, B.P., *Ancient DNA fragments inside Classical Greek amphoras reveal cargo of 2400-year-old shipwreck*. Journal of Archaeological Science, 2008. **35**(5): p. 1169-1176.
32. Hedlund, B.P., Geiselbrecht, A.D., and Staley, J.T., *Marinobacter strain NCE312 has a Pseudomonas-like naphthalene dioxygenase*. FEMS Microbiology Letters, 2001. **201**(1): p. 47-51.
33. Holzapfel, W., Geisen, R., and Schillinger, U., *Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes*. International journal of food microbiology, 1995. **24**(3): p. 343-362.
34. Huang, X. and Madan, A., *CAP3: A DNA sequence assembly program*. Genome research, 1999. **9**(9): p. 868-877.
35. Izzo, F.C., Zendri, E., Bernardi, A., Balliana, E., and Sgobbi, M., *The study of pitch via gas chromatography–mass spectrometry and Fourier-transformed infrared spectroscopy: the case of the Roman amphoras from Monte Poro, Calabria (Italy)*. Journal of Archaeological Science, 2013. **40**(1): p. 595-600.
36. James, S.A., Carvajal Barriga, E.J., Barahona, P.P., Cross, K., Bond, C.J., and Roberts, I.N., *Candida ecuadorensis sp. nov., an ascomycetous yeast species found in two separate regions of Ecuador*. Int J Syst Evol Microbiol, 2013. **63**(Pt 1): p. 393-7.

37. Juan, M.Y. and Chou, C.C., *Enhancement of antioxidant activity, total phenolic and flavonoid content of black soybeans by solid state fermentation with Bacillus subtilis BCRC 14715*. Food microbiology, 2010. **27**(5): p. 586-91.
38. Kapsopoulou, K., Kapaklis, A., and Spyropoulos, H., *Growth and Fermentation Characteristics of a Strain of the Wine Yeast Kluyveromyces thermotolerans Isolated in Greece*. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2005. **21**(8-9): p. 1599-1602.
39. Kraková, L., Šoltys, K., Otlewska, A., Pietrzak, K., Purkrťová, S., Savická, D., Puškárová, A., Bučková, M., Szemes, T., Budiš, J., et al., *Comparison of methods for identification of microbial communities in book collections: Culture-dependent (sequencing and MALDI-TOF MS) and culture-independent (Illumina MiSeq)*. International Biodeterioration & Biodegradation, 2017.
40. Lee, H.-W., Yoon, S.-R., Kim, S.-J., Lee, H.M., Lee, J.Y., Lee, J.-H., Kim, S.H., and Ha, J.-H., *Identification of microbial communities, with a focus on foodborne pathogens, during kimchi manufacturing process using culture-independent and -dependent analyses*. LWT - Food Science and Technology, 2017. **81**: p. 153-159.
41. Leistner, L., *Basic aspects of food preservation by hurdle technology*. International journal of food microbiology, 2000. **55**(1): p. 181-186.
42. Lin, C.-H., Wei, Y.-T., and Chou, C.-C., *Enhanced antioxidative activity of soybean koji prepared with various filamentous fungi*. Food microbiology, 2006. **23**(7): p. 628-633.
43. Martin, S., Márquez, M., Sánchez-Porro, C., Mellado, E., Arahál, D., and Ventosa, A., *Marinobacter lipolyticus sp. nov., a novel moderate halophile with lipolytic activity*. Int J Syst Evol Microbiol, 2003. **53**(5): p. 1383-1387.
44. McGinnis, J., Laplante, J., Shudt, M., and George, K.S., *Next generation sequencing for whole genome analysis and surveillance of influenza A viruses*. J Clin Virol, 2016. **79**: p. 44-50.
45. Monteiro, A.M. and Faria, P. *Troia Roman baths (Portugal)–Assessment of history of interventions*. in *International Seminar in Conservation. A Tribute to Cesari Brandi*. 2006. J. Delgado Rodrigues, JM Mimoso (eds). LNEC.
46. Nabais, M., *Animal bones from the Roman site of Tróia (Grândola, Portugal): mammal and bird remains from the fish-salting workshop 2 (2007/08)*. 2008.
47. Nam, Y.D., Jung, M.J., Roh, S.W., Kim, M.S., and Bae, J.W., *Comparative analysis of Korean human gut microbiota by barcoded pyrosequencing*. PLoS One, 2011. **6**(7): p. e22109.
48. Ng, T.B. and Arora, D.K., *Fungi and fermented food*. Fungal biotechnology in agricultural, food, and environmental applications, 2004: p. 223-231.
49. Poffo, F. and Castro da Silva, M.A., *Caracterização taxonômica e fisiológica de bactérias ácido-láticas isoladas de pescado marinho*. Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2011. **31**(2): p. 303-307.
50. Prakitchaiwattana, C.J., Fleet, G.H., and Heard, G.M., *Application and evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis to analyse the yeast ecology of wine grapes*. FEMS Yeast Res, 2004. **4**(8): p. 865-77.
51. Rainieri, S. and Pretorius, I., *Selection and improvement of wine yeasts*. Annals of microbiology, 2000. **50**(1): p. 15-32.
52. Rinta-Kanto, J.M., Ouellette, A.J.A., Boyer, G.L., Twiss, M.R., Bridgeman, T.B., and Wilhelm, S.W., *Quantification of Toxic Microcystis spp. during the 2003 and 2004 Blooms in Western Lake Erie using Quantitative Real-Time PCR*. Environmental Science & Technology, 2005. **39**(11): p. 4198-4205.

53. Rosado, T., Mirao, J., Candeias, A., and Caldeira, A.T., *Microbial communities analysis assessed by pyrosequencing--a new approach applied to conservation state studies of mural paintings*. Anal Bioanal Chem, 2014. **406**(3): p. 887-95.
54. Scholtz, I., Siyoum, N., and Korsten, L., *Penicillium air mycoflora in postharvest fruit handling environments associated with the pear export chain*. Postharvest Biology and Technology, 2017. **128**: p. 153-160.
55. Sicard, D. and Legras, J.L., *Bread, beer and wine: yeast domestication in the Saccharomyces sensu stricto complex*. C R Biol, 2011. **334**(3): p. 229-36.
56. Silva, A.S., Paiva, M., Ricardo, J., M. Salta, M., Monteiro, A.M., and Candeias, A.E., *Characterisation of roman mortars from the archaeological site of Tróia (Portugal)*. Materials Science Forum, 2006. **514-516**: p. 1643-1647.
57. Silveira, T.M., Kraus, N.C., Psuty, N.P., and Andrade, F., *Beach Nourishment on Tróia Peninsula, Portugal*. Journal of Coastal Research, 2011: p. 173-180.
58. Smriga, M., Mizukoshi, T., Iwahata, D., Eto, S., Miyano, H., Kimura, T., and Curtis, R.I., *Amino acids and minerals in ancient remnants of fish sauce (garum) sampled in the "Garum Shop" of Pompeii, Italy*. Journal of Food Composition and Analysis, 2010. **23**(5): p. 442-446.
59. Soomro, A.H., Masud, T., and Anwaar, K., *Role of Lactic Acid Bacteria (LAB) in Food Preservation and Human Health – A Review*. Pakistan Journal of Nutrition, 2002. **1**(1): p. 20-24.
60. Stiles, M.E. and Holzapel, W.H., *Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy*. International journal of food microbiology, 1997. **36**(1): p. 1-29.
61. Tamang, J.P., *Biochemical and modern identification techniques / Microfloras of Fermented Foods*. 2014: p. 250-258.
62. Terefe, N.S., *Food Fermentation*. 2016.
63. Terral, J.F., Tabard, E., Bouby, L., Ivorra, S., Pastor, T., Figueiral, I., Picq, S., Chevance, J.B., Jung, C., Fabre, L., et al., *Evolution and history of grapevine (Vitis vinifera) under domestication: new morphometric perspectives to understand seed domestication syndrome and reveal origins of ancient European cultivars*. Ann Bot, 2010. **105**(3): p. 443-55.
64. Teuber, M., *Lactic acid bacteria*. Biotechnology Set, Second Edition, 1993: p. 325-366.
65. Torres, E.F., Rodrigo, D., and Martínez, A., *Preservation of Foods*. 2016: p. 491-496.
66. Van Dijk, E.L., Auger, H., Jaszczyszyn, Y., and Thermes, C., *Ten years of next-generation sequencing technology*. Trends Genet, 2014. **30**(9): p. 418-26.
67. van Maris, A., Abbott, D.A., Bellissimi, E., van den Brink, J., Kuyper, M., Luttik, M.A., Wisselink, H.W., Scheffers, W.A., van Dijken, J.P., and Pronk, J.T., *Alcoholic fermentation of carbon sources in biomass hydrolysates by Saccharomyces cerevisiae: current status*. Antonie Van Leeuwenhoek, 2006. **90**(4): p. 391-418.
68. Van Neer, W. and Thomas Parker, S., *First archaeozoological evidence for haimation, the 'invisible' garum*. Journal of Archaeological Science, 2008. **35**(7): p. 1821-1827.
69. Veloso, T.P.G. and Cavalcanti, J.E.A., *O turismo em sítios arqueológicos: algumas modalidades de apresentação do patrimônio arqueológico*. Revista de Arqueologia, 2007. **20**(1).
70. Vila Socías, L., Prats Picó, N., and Buxeda i Garrigós, J., *Análisis químico y mineralógico de un conjunto de ánforas romanas de época augústea procedentes*

- del centro productor de Sant Antoni de Calonge (Gerona)*. Boletín de la Sociedad Española de Cerámica y Vidrio, 2016. **55**(1): p. 29-37.
71. Villa, F., Cappitelli, F., Principi, P., Polo, A., and Sorlini, C., *Permeabilization method for in-situ investigation of fungal conidia on surfaces*. Lett Appl Microbiol, 2009. **48**(2): p. 234-40.
72. Wang, C., Garcia-Fernandez, D., Mas, A., and Esteve-Zarzoso, B., *Fungal diversity in grape must and wine fermentation assessed by massive sequencing, quantitative PCR and DGGE*. Front Microbiol, 2015. **6**: p. 1156.
73. Wood, B.J., *Microbiology of fermented foods*2012: Springer Science & Business Media.
74. Yadav, A.N., Verma, P., Kumar, V., Sangwan, P., Mishra, S., Panjiar, N., Gupta, V.K., and Saxena, A.K., *Chapter 1 - Biodiversity of the Genus Penicillium in Different Habitats, in New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*2018, Elsevier: Amsterdam. p. 3-18.
75. Zwietering, M., Jongenburger, I., Rombouts, F., and Van't Riet, K., *Modeling of the bacterial growth curve*. Applied and Environmental Microbiology, 1990. **56**(6): p. 1875-1881.
76. [www.ancient-origins.net](http://www.ancient-origins.net) consultado a 25 de novembro de 2017;
77. [mundoeducacao.bol.uol.com](http://mundoeducacao.bol.uol.com) consultado a 25 de novembro de 2017





# **Anexos**



## A. Composição dos meios de cultura e tampões

### Meios de cultura

#### ➤ Meios de cultura sólidos

##### • Yeast Production $\alpha$ -Dextrose (YPD)

- 10 g de extrato de levedura
- 10 g peptona bacteriológica
- 20 g glucose
- 20 g agar bacteriológico

Dissolveu-se tudo em 1 L de água destilada. Em seguida autoclavou-se a 121°C durante 20 min a 1 atm.

##### • Meio de Malte Extrato Agar – MEA

- 20 g de extrato de malte
- 1 g de peptona
- 20 g de glucose
- 20 g de agar

Dissolveu-se tudo em 1 L de água destilada. Em seguida autoclavou-se a 121°C durante 20 min a 1 atm.

##### • Meio de Nutriente Agar – NA

- 5 g de “Peptic digest animals”
- 1,5 g de “Beef extract”
- 1,5 g de extrato de levedura
- 5 g de Cloreto de sódio

Dissolveu-se tudo em 1 L de água destilada. Em seguida autoclavou-se a 121°C durante 20 min a 1 atm.

##### • Meio TSA

- 15 g de peptona

- 5 g de peptona caseína
- 5 g de peptona de papaoca de soja
- 5 g de agar

Dissolveu-se tudo em 1 L de água destilada. Em seguida autoclavou-se a 121°C durante 20 min a 1 atm.

- **Meio MRS**

- 10 g de peptona
- 8 g de “Beef extrat”
- 4 g de extrato de levedura
- 20 g de glucose
- 1 mL de Tween 80
- 2 g de Hidrogenofosfato Di-potássio
- 2 g de Acetato de sódio
- 2 g de Tri-amonium citrate
- 0,2 g de Sulfato de magnésio 7H<sub>2</sub>O
- 0,05 g de Sulfato de manganês 4H<sub>2</sub>O
- 15 g de agar

Dissolveu-se tudo em 1 L de água destilada. Em seguida autoclavou-se a 121°C durante 20 min a 1 atm.

➤ **Meios de cultura líquidos**

- **Meio MRS**

**Tabela A 1-** Composição do meio MRS líquido com diferentes concentrações de NaCl.

[NaCl]	0%	2,50%	5%	7,50%	10%	15%
Peptona (g)			5			
"Beef extract" (g)			4			
Extrato de levedura (g)			2			
Glucose (g)			10			
Tween 80 µL			500			
Hidrogenofosfatode-potássio (g)			1			
Acetato de sódio (g)			1			
Sulfato de magnésio 7H <sub>2</sub> O (g)			0,1			
Sulfato de manganês 4H <sub>2</sub> O (g)			0,025			
Cloreto de sódio (g)	0	12,5	25	37,5	50	75

Dissolveu-se tudo em 500 mL de água destilada. Em seguida autoclavou-se a 121°C durante 20 min a 1 atm.

### **Composição de soluções**

- **Solução de Azul de metileno saturada**

Dissolver 1 g de Azul de metileno e 2 g de Cloreto de sódio em 100 mL de água destilada

- **Tampão de lise:**

Tris-HCl - 50mM; NaCl - 250 mM; EDTA - 50 mM; SDS – 0.3%; pH 8

Dissolver 0,3030 g de Tris-HCl, 0,7305 g de NaCl e 0,9305 g de EDTA em 40 mL de água ultra-pura e acertar a pH 8. Depois, transferir para um balão e perfazer o volume a 50 mL com água ultra-pura. Esterilizar em autoclave a 121°C, durante 15 min, deixar arrefecer e adicionar 0,1500 g de SDS. Guardar à temperatura ambiente.

- **Tampão de extração (TE)**

Tris – 10mM; EDTA – 1mM; pH 8

Dissolver 0,3029 g de Tris e 0,0931 g de EDTA em 200 mL de água ultra-pura e acertar a pH 8. Depois, transferir para um balão e perfazer volume a 250 mL com água ultra-pura. Esterilizar em autoclave a 121°C, durante 15min e guardar à temperatura ambiente.

- **Gel de agarose 1%**

-0,65 g de agarose

-65 mL de TBE 0,5x

Aqueceu-se até a agarose estar totalmente dissolvida. Depois de arrefecer, adicionaram-se 6,5 µL de SYBR green (corante de DNA), agitou-se ligeiramente e colocou-se no suporte para géis com o pente adequado e deixou-se solidificar.

## B. Tabelas de isolamentos de microrganismos

Tabela B 1 - Identificação dos microrganismos isolados da camada 1 da peça 1.

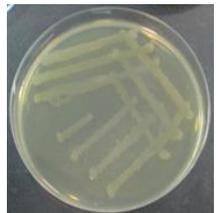
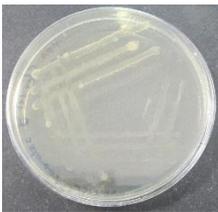
Código	Aspetto das colónias na placa		Aspetto microscópico	
	Frente	Verso		
A				<i>Bacillus</i> Gram +
B				<i>Bacillus</i> Gram +
C				<i>Bacillus</i> Gram +
H				<i>Bacillus</i> Gram +
I				<i>Bacillus</i> Gram +
J				<i>Bacillus</i> Gram +

Tabela B 1 (Cont.) - Identificação dos microrganismos isolados da camada 1 da peça 1.

Código	Aspeto das colónias na placa		Aspeto microscópico	
	Frente	Verso		
P				<i>Bacillus</i> Gram +
O				<i>Bacillus</i> Gram -
Q				<i>Bacillus</i> Gram +

Tabela B 2 - Identificação dos microrganismos isolados da camada 2 da peça 1.

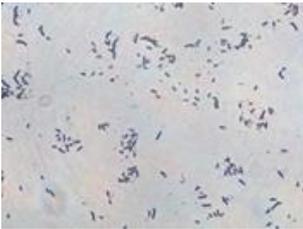
Código	Aspeto das colónias na placa		Aspeto microscópico	
	Frente	Verso		
A				<i>Bacillus</i> Gram +
B				<i>Bacillus</i> Gram +

Tabela B 2 (Cont.) - Identificação dos microrganismos isolados da camada 2 da peça 1.

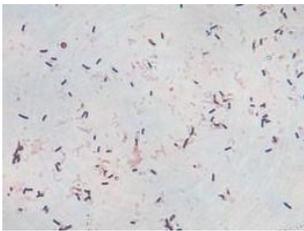
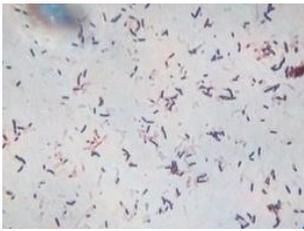
Código	Aspetto das colónias na placa		Aspetto microscópico	
	Frente	Verso		
D				<i>Bacillus</i> Gram +
E				<i>Bacillus</i> Gram +
K				<i>Bacillus</i> Gram +
G				<i>Bacillus</i> Gram +
J				<i>Bacillus</i> Gram +

Tabela B 2 (Cont.) - Identificação dos microrganismos isolados da camada 2 da peça 1.

Código	Aspetto das colónias na placa		Aspetto microscópico	
	Frente	Verso		
R				<i>Bacillus</i> Gram +
S				<i>Bacillus</i> Gram +

Tabela B 3 - Identificação dos microrganismos isolados da camada 3 da peça 1.

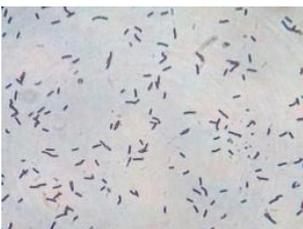
Código	Aspetto das colónias na placa		Aspetto microscópico	
	Frente	Verso		
A				<i>Bacillus</i> Gram +
C				<i>Bacillus</i> Gram +
F				<i>Bacillus</i> Gram +

Tabela B 3 (Cont.) - Identificação dos microrganismos isolados da camada 3 da peça 1.

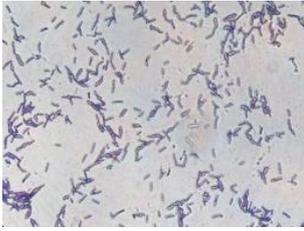
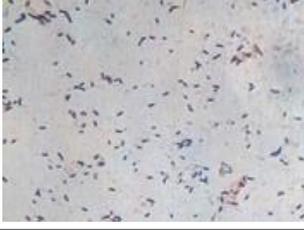
Código	Aspetto das colónias na placa		Aspetto microscópico	
	Frente	Verso		
G				<i>Bacillus</i> Gram +
H				<i>Bacillus</i> Gram +
J				<i>Bacillus</i> Gram +
K				<i>Bacillus</i> Gram +
Q				<i>Bacillus</i> Gram +
T				<i>Bacillus</i> Gram +

Tabela B 4 - Identificação dos microrganismos isolados da camada 4 da peça 1

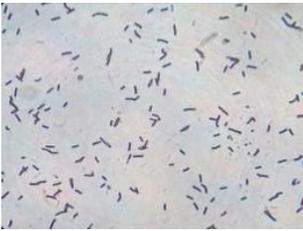
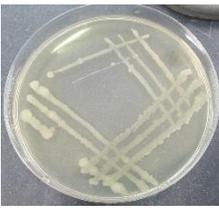
Código	Aspeto das colónias na placa		Aspeto microscópico	
	Frente	Verso		
F				<i>Bacillus</i> Gram +
M				<i>Bacillus</i> Gram +
N				<i>Bacillus</i> Gram +
Q				<i>Bacillus</i> Gram +
S				<i>Bacillus</i> Gram +
T				<i>Bacillus</i> Gram +

Tabela B 5 . Identificação dos microrganismos isolados da camada 5 da peça 1

Código	Aspetto das colónias na placa		Aspetto microscópico	
	Frente	Verso		
L				<i>Bacillus</i> Gram -
O				<i>Bacillus</i> Gram -

Tabela B 6 - Identificação dos microrganismos isolados da camada 1 da peça 2

Código	Aspetto das colónias na placa		Aspetto microscópico	
	Frente	Verso		
A				<i>Bacillus</i> Gram +
M				<i>Bacillus</i> Gram +

**Tabela B 7** - Identificação dos microrganismos isolados da camada 2 da peça 2

Código	Aspetto das colónias na placa		Aspetto microscópico	
	Frente	Verso		
E1				<i>Micélio</i> sp.

**Tabela B 8** - Identificação dos microrganismos isolados da camada 1 da peça 3

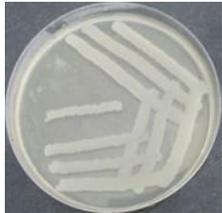
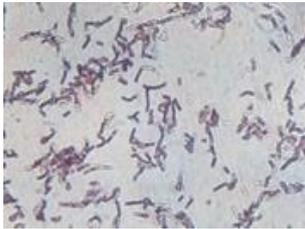
Código	Aspetto das colónias na placa		Aspetto microscópico	Microrganismo
	Frente	Verso		
A1				<i>Bacillus</i> Gram +
B1				<i>Bacillus</i> Gram +

Tabela B 9 - Identificação dos microrganismos isolados da camada 2 da peça 3

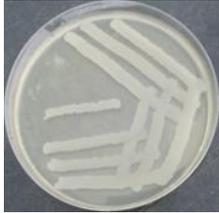
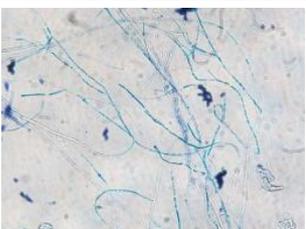
Código	Aspetto das colónias na placa		Aspetto microscópico	
	Frente	Verso		
A1				<i>Bacillus</i> Gram +
B1				<i>Bacillus</i> Gram +

Tabela B 10 - Identificação dos microrganismos isolados da camada 3 da peça 3

Código	Aspetto das colónias na placa		Aspetto microscópico	
	Frente	Verso		
C1				<i>Bacillus</i> Gram +
D1				<i>Micelio</i> sp.

## C. Quantificação de DNA

Tabela C 1 – Quantificação de DNA dos isolados bacterianos.

<b>Bactérias</b>	<b>[DNA] <math>\mu\text{g}/\text{mL}</math></b>	<b>AbS260/280</b>	<b>Abs260/230</b>
<b>A1</b>	485,53 $\pm$ 12,56	1,67	1,16
<b>A2</b>	425,76 $\pm$ 3,87	1,71	1,17
<b>A3</b>	429,63 $\pm$ 14,60	1,69	1,18
<b>A4</b>	450,12 $\pm$ 31,94	1,67	1,15
<b>A5</b>	425,00 $\pm$ 14,42	1,69	1,16
<b>A6</b>	434,66 $\pm$ 31,62	1,66	1,16
<b>B1</b>	422,52 $\pm$ 10,45	1,68	1,14
<b>B2</b>	409,17 $\pm$ 4,83	1,69	1,12
<b>C1</b>	419,07 $\pm$ 5,36	1,68	1,14
<b>C2</b>	409,85 $\pm$ 3,88	1,69	1,12