

ESTUDO DAS COMUNIDADES MICROBIANAS ASSOCIADAS A GRUTAS LITORAIS DE EROÇÃO DE SANTA MARIA, AÇORES

PAULA AGUIAR^{1,2*}, VITOR GONÇALVES^{1,2,3}, EVA LIMA⁴, ANDREIA CUNHA^{2,3},
JOÃO RAMOS^{2,3} & JOÃO CARLOS NUNES⁴

¹CCPA - Centro de Conservação e de Protecção do Ambiente
Departamento de Biologia, Rua da Mãe de Deus, 13-A
Apartado 1422 - 9501-801 Ponta Delgada

²CIBIO-Açores, Departamento de Biologia, Rua da Mãe de Deus, 13-A
Apartado 1422 - 9501-801 Ponta Delgada

³Departamento de Biologia, Universidade dos Açores, Rua da Mãe de Deus
Apartado 1422, 9501-801 Ponta Delgada

⁴Departamento de Geociências, Universidade dos Açores, Rua da Mãe de Deus
Apartado 1422, 9501-801 Ponta Delgada

RESUMO

O presente trabalho surge no âmbito da XIV Expedição Científica a Santa Maria/2009, do Departamento de Biologia da Universidade dos Açores. Durante esta expedição foram amostrados habitats cavernícolas de duas grutas litorais da Ilha de Santa Maria: Furna Velha (ou das Pombas) e Gruta de Santana (ou dos Anjos). As amostragens consistiram, maioritariamente, em amostras de biofilmes nos locais em que estes foram detectados a olho nu. Amostras complementares de água, sedimentos e material encrostante foram recolhidas em algumas áreas. O estudo realizado insere-se no objectivo geral de caracterização da biodiversidade microbiana troglóbia do arquipélago, em particular, neste trabalho, das comunidades microbianas associadas às grutas resultantes da erosão marinha da ilha mais antiga dos Açores.

INTRODUÇÃO

O Arquipélago dos Açores, constituído por nove ilhas de natureza vulcânica, situa-se no Atlântico Norte, entre as latitudes 37°-40° N e as longitudes 25°-31° W. O conjunto das ilhas toma, de uma forma geral, uma direcção WNW-ESSE. A Ilha de Santa Maria, a mais oriental do arquipélago, constitui juntamente com a ilha de S. Miguel o Grupo Oriental.

As ilhas representam a parte emersa da designada plataforma dos Açores, que é definida pela curva batimétrica dos 2000m (Needham & Francheteau, 1974). Esta área corresponde, por outro lado, ao contacto de três placas litosféricas: a Norte Americana, a Euroasiática e a Africana. A Ilha de Santa Maria apresenta características climáticas e geomorfológicas distintas das restantes ilhas do arquipélago. Para além de ser a ilha mais antiga dos Açores, é também a ilha em que as formações geológicas apresentam maiores índices de alteração e um maior grau de erosão (Nunes *et al.*, 2007).

O litoral da Ilha de Santa Maria possui grande valor paisagístico e é nas arribas e baías da ilha que se encontra a maioria das entradas para as grutas ou furnas. Estão actualmente inventariadas quatro grutas litorais nesta ilha formadas através de processos de erosão marinha: a Furna de Santana (ou dos Anjos), a Furna do Ilhéu do Romeiro, a Furna Velha (ou das Pombas) e a Gruta das Figueiras (Figura 1) (Nunes *et al.*, 2007). A maioria das cavidades subterrâneas do arquipélago (furnas ou grutas e algares) corresponde a cavidades

vulcânicas. Contudo, as grutas de Santa Maria são distintas do ponto de vista da sua génese, visto resultarem da erosão marinha (www.speleoazores.com).

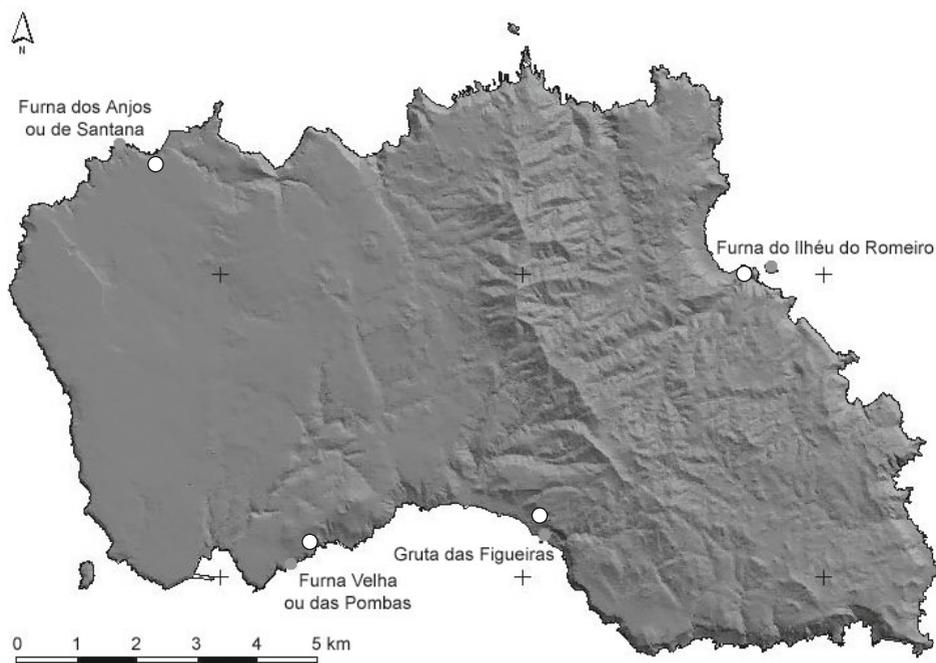


Figura 1 - Modelo digital do terreno com a localização geográfica das grutas litorais de Santa Maria, incluindo as abordadas neste estudo: Furna de Santana (ou dos Anjos) e Furna Velha (ou das Pombas). *Fonte:* Nunes *et al.*, 2007.

As grutas e cavernas são ecossistemas frágeis, com comunidades únicas devido ao elevado grau de endemismos (Borges *et al.*, 2004). Existem cerca de 250 cavidades subterrâneas naturais inventariadas no Arquipélago dos Açores (www.speleoazores.com). Algumas destas cavidades são autênticas “ilhas” do ponto de vista de isolamento biogeográfico e albergam uma fauna única, como por exemplo as aranhas e escaravelhos do Algar do Carvão, Terceira (Borges & Pereira, 2004), e o escaravelho da Gruta de Água de Pau, S. Miguel (Oromi & Borges, 1991). Recentemente, têm vindo a ser desenvolvidos alguns trabalhos no que diz respeito aos briófitos característicos da zona de transição de luz, perto das aberturas exteriores destas cavidades (Gabriel *et al.*, 2004). Contudo, pouco se sabe sobre as comunidades microbianas associadas a estas estruturas. É possível que, à semelhança do que acontece em outras regiões cavernícolas, nas zonas mais interiores das grutas, muitos destes microorganismos possuam metabolismos quimiossintéticos e sirvam de base às teias alimentares destes ecossistemas.

Estudos dos ecossistemas microbianos dos Açores têm incidido, maioritariamente, sobre as comunidades de habitats dulçaquícolas (Gonçalves *et al.*, 2005; 2007) ou em ecossistemas hidrotermais (Aguiar, 1999; 2005; Aguiar *et al.* 2004). Um dos objectivos deste

trabalho foi estudar a composição da comunidade microbiana troglóbia utilizando técnicas de ecologia microbiana não tradicionais (Aguiar, 2005; Câmara *et al.*, 2009). Estas amostragens foram direccionadas de modo a privilegiar o estudo de comunidades microbianas quimiossintéticas troglóbias e de comunidades microbianas formadas maioritariamente por cianobactérias possivelmente adaptadas a condições de baixa exposição à luz solar.

METODOLOGIA

Em virtude da limitação de tempo e dos meios logísticos disponíveis para a realização do trabalho, seleccionaram-se apenas duas furnas (ou grutas) para efectuar o estudo: Furna Velha e Furna de Santana (Figura 1). Ambas as estruturas estão localizadas na Freguesia de Vila do Porto, no Concelho com o mesmo nome. A Furna Velha estende-se ao longo de 337 m enquanto que a Furna de Santana é mais curta, com cerca de 118 m de comprimento. Apesar de possuírem largura máxima semelhante, a Furna Velha possui secções mais altas (máx. 14,5 m) que a Furna de Santana (máx. 8,6m) (www.speleoazores.com).

As amostragens biológicas consistiram na recolha de biofilmes para frascos estéreis, que foram resguardados da luz solar até serem processados. Foram efectuadas colheitas em seis zonas distintas na Furna Velha (Figura 2) e em três zonas distintas da Furna de Santana (Figura 3). A escolha dos locais de colheita em cada gruta foi feita tendo em conta o aspecto macroscópico e a localização dos biofilmes microbianos que revestiam as paredes das furnas e que eram passíveis de detecção a olho nu.

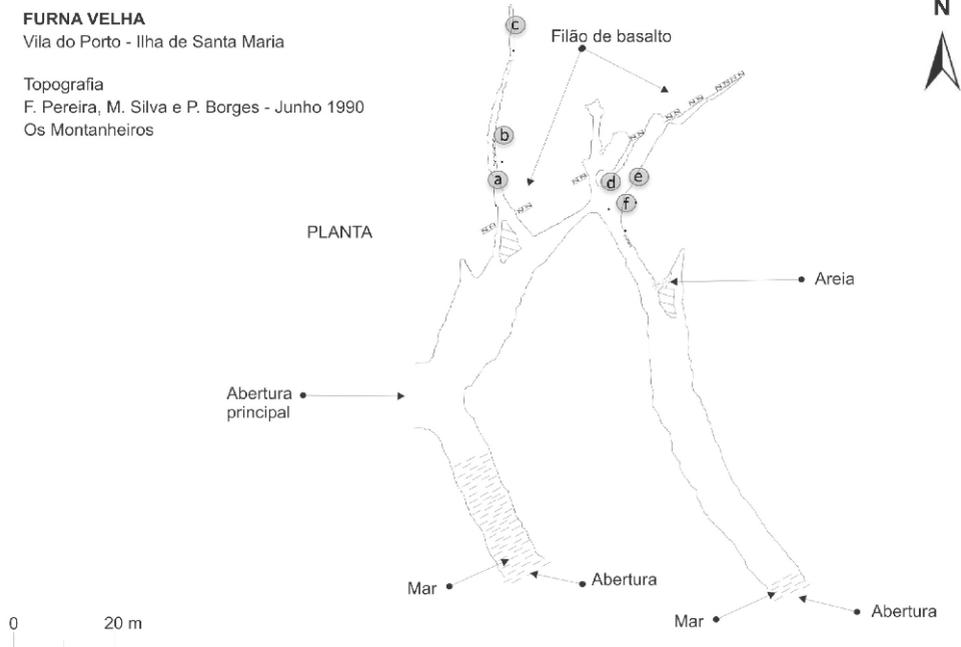


Figura 2 - Topografia da Furna Velha com a localização das zonas de colheita de amostras biológicas assinalada pelos círculos (a, b, c, d, e, f). *Adaptado de: Nunes et al.*, 2007.

Por cada amostra biológica recolhida foram processadas duas réplicas para estudos filogenéticos (estudos de marcadores de DNA) da composição comunidade microbiana. O material biológico destas duas réplicas foi preservado em 50% etanol. As amostras foram armazenadas a -20°C até à chegada ao Departamento de Biologia, onde foram colocadas na câmara ultracongeladora a -86°C , para armazenamento a médio prazo. O DNA destas amostras será posteriormente extraído e separado utilizando a técnica de electroforese em gel com um gradiente químico desnaturante (DGGE), como descrito em Aguiar (2005). Além das amostras para a análise de DNA da comunidade microbiana, também se acondicionaram amostras para microanálise com sonda de raio-X (Câmara *et al.*, 2009) e amostras que serão posteriormente utilizadas em microscopia óptica e microscopia de epifluorescência com sondas filogenéticas (FISH) (Aguiar, 1999; 2005).

FURNA DE SANTANA

Vila do Porto - Ilha de Santa Maria

Topografia

F. Pereira, M. Silva e P. Borges - Junho 1990

Os Montanhosos



Figura 3- Topografia da Furna de Santana com a localização das zonas de colheita de amostras biológicas assinaladas pelos círculos (a, b, c). *Adaptado de: Nunes et al.*, 2007.

As amostras biológicas para microanálise de química elementar com sonda de raio-X foram congeladas para transporte e armazenamento até serem processadas em S. Miguel. Posteriormente foram colocadas sobre suportes de microscopia electrónica de varrimento. Os suportes com as amostras foram colocados a secar numa estufa a 90°C durante 24 horas. Ao fim deste tempo as amostras foram recobertas com uma fina camada de carbono e foram analisadas com a sonda de raio-X utilizada para microanálise. Só elementos cuja concentração na amostra seja superior a 0,1% são detectados (Câmara *et al.*, 2009). Em cada amostra seleccionaram-se três áreas aleatórias nas quais se efectuaram seis leituras ao acaso. Utilizou-se a média dos valores destas leituras pontuais como representativa da

composição química elementar da amostra. Foram subtraídos da análise os valores de carbono e oxigênio do suporte utilizado para determinar a linha de base da análise.

RESULTADOS

Em ambas as furnas estudadas foram detectadas vastas extensões de tapetes de cianobactérias à entrada das cavidades (Figura 4). Após o desaparecimento da luz visível quase todos os tapetes/biofilmes microbianos encontrados apresentavam um aspecto pálido (Figura 5. a-c), com ausência de pigmentação de cores fortes, com exceção de uma zona da Furna Velha, no troço da direita (FVe, Figura 2), em que os tapetes microbianos apresentavam alguma pigmentação esverdeada (Figura 5.e).

A Furna Velha possui uma maior biodiversidade macroscópica quando comparada com a Furna de Santana. É possível observar no interior da Furna Velha tapetes microbianos encrostantes com elevado grau de mineralização (FVa) (Figura 5.a) e tapetes/biofilmes microbianos extensos que retêm maior teor de água (FVb-d) (Figura 5.b-d). Foram ainda detectados, em ambas as grutas, extensos biofilmes espessos, de coloração branca e/ou creme, com porções de aspecto mucilaginoso e hidrófilas, alternados com porções de

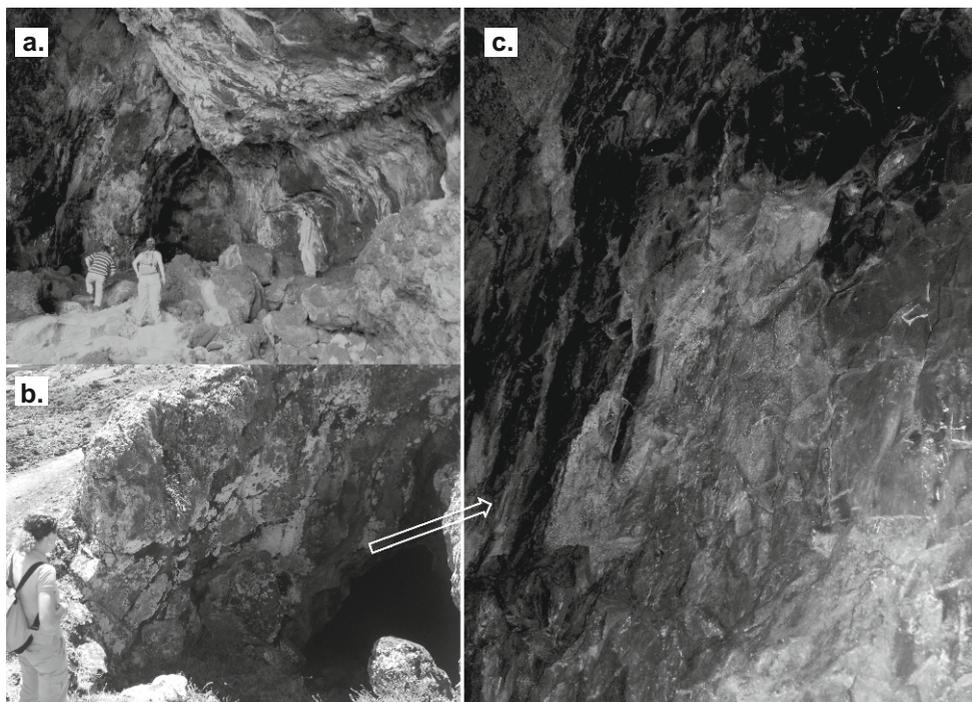


Figura 4 - Aspecto das entradas pela linha de costa para as duas furnas em consideração neste estudo. a. Entrada para a Furna Velha com as paredes revestidas na área mais externa por briófitos que são substituídos por extensos tapetes de cianobactérias. b. Entrada para a Furna de Santana onde líquenes se misturam com briófitos. c. Detalhe da parede perto da entrada da Furna de Santana.

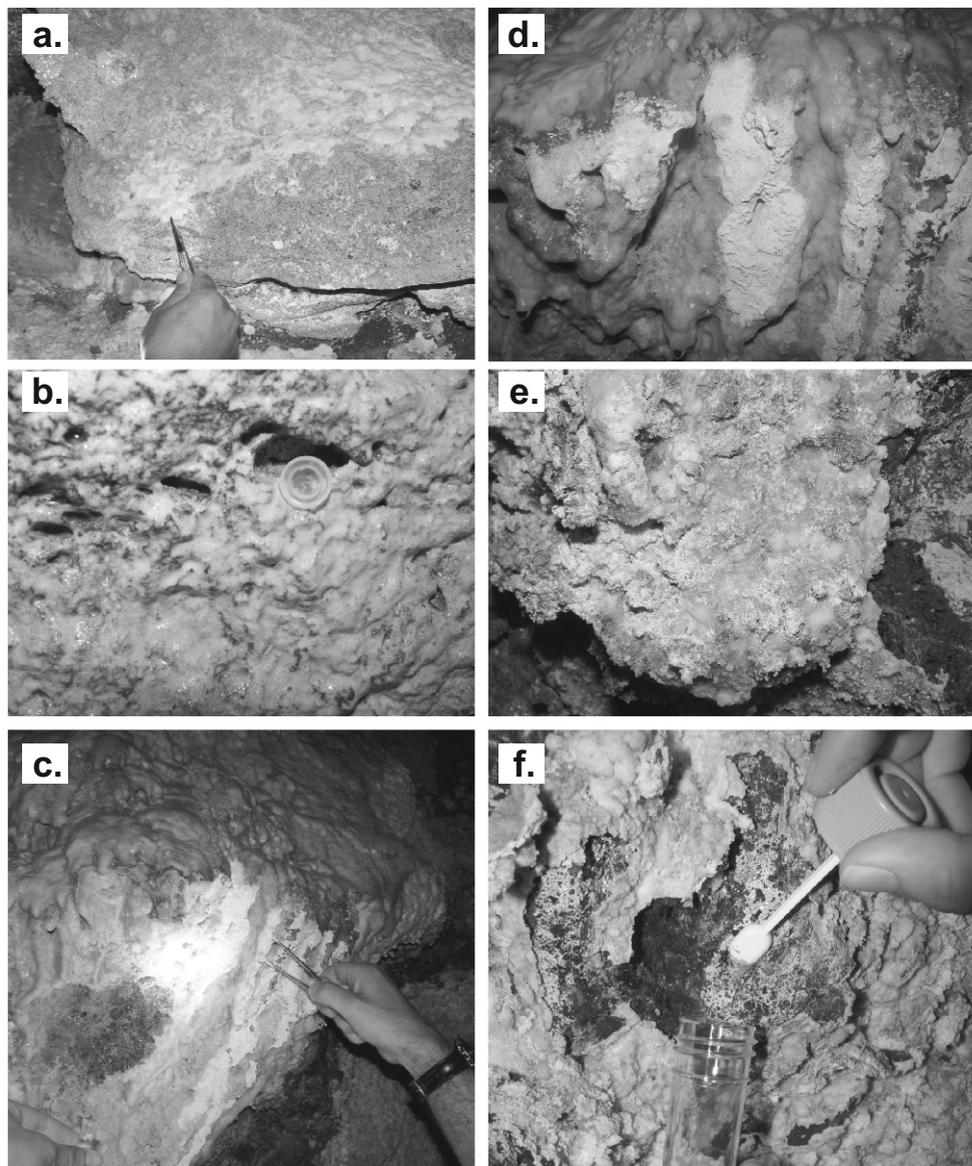


Figura 5 - Diversos aspectos dos tapetes/biofilmes microbianos amostrados no interior da Furna Velha. **a.** Recolha tapetes microbianos encrostados de minerais na zona designada por FVa e FVb. **b.** Biofilmes microbianos mucilaginosos revestem as paredes da gruta numa região mais interior da Furna Velha. A tampa do tubo de criopreservação de 2 ml serve de escala. Amostra da área FVb. **c.** Aspecto macroscópico geral do biofilme microbiano que revestia parte da parede do troço da direita na Furna Velha (FVd). **d.** Detalhe do biofilme da área FVd em que é possível observar as superfícies mucilaginosas húmidas em contraste com as áreas hidrófobas. **e.** Detalhe dos tapetes/biofilmes encrostantes encontrados na área de amostragem designada de FVe que apresentam alguma pigmentação verde. **f.** Colheita da amostra na área FVf em que se encontram maioritariamente tapetes microbianos altamente mineralizados.

Até ao momento foi apenas analisada a composição química elementar de uma das amostras colhida no interior da Furna de Santana (Figura 6). Espera-se processar durante os próximos meses as restantes amostras biológicas de modo a efectuar a comparação entre os biofilmes da mesma gruta. Pretende-se, ainda, correlacionar a composição química com a estrutura das comunidades microbianas visto que a composição química se encontra relacionada com o metabolismo predominante da comunidade (Aguiar, 2009).

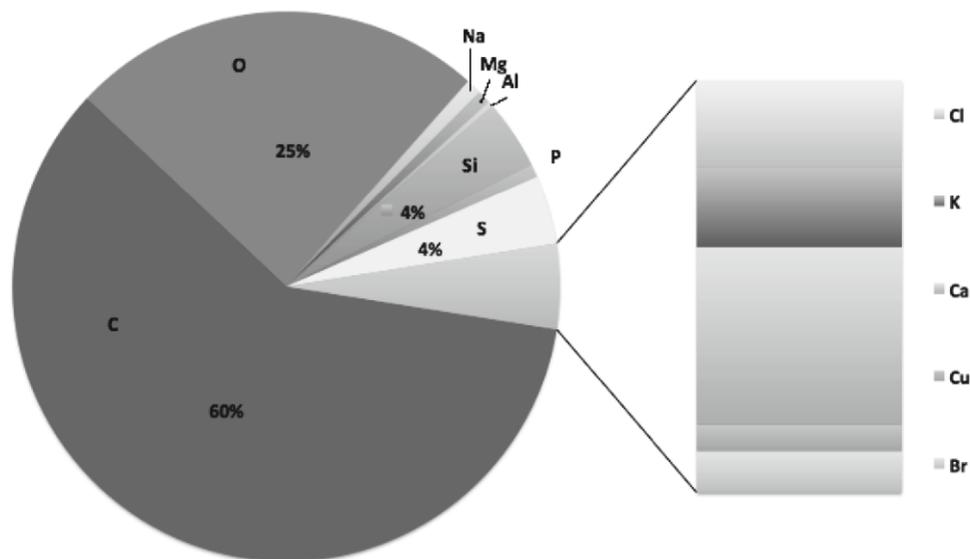


Figura 6 - Composição química elementar do biofilme recolhido na Furna de Santana na área b da furna (Figura 3) designada por amostra FSb. Cerca de 85% da amostra é constituída por carbono (C) e oxigénio (O) seguido por sódio (Na), magnésio (Mg), sílica (Si) e enxofre (S).

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES PRELIMINARES

A partir da composição química elementar obtida para o único biofilme analisado até ao momento com a micro-sonda de raio-X (Figura 6), conjuntamente com a análise das imagens de microscopia óptica e electrónica de varrimento (observações), foi possível confirmar que, mesmo as amostras altamente mineralizadas (Figura 5), possuíam uma elevada diversidade de microrganismos metabolicamente activos. Para além da esperada elevada composição de carbono (C) e oxigénio (O) elementares foram ainda detectadas elevadas quantidades de sílica (Si) e enxofre (S) no biofilme analisado (Figura 6). É provável que o rácio de elementos químicos detectados com a micro-sonda de raio-X varie consoante a composição biológica da comunidade microbiana à semelhança do detectado em biofilmes termais em que os microrganismos funcionam como agentes nucleadores de minerais que directa ou indirectamente são utilizados no metabolismo microbiano da comunidade (Aguiar, 2009; Câmara *et al.*, 2009).

Estudos efectuados na comunidade de artrópodes cavernícolas marienses indicam claramente uma maior diversidade biológica na Furna Velha e Furna de Santana em relação às outras grutas da ilha (Pereira *et al.*, in press). Os resultados de diversidade microbiana obtidos até ao momento são apenas dados preliminares. A identificação taxonómica dos

principais grupos microbianos constituintes das comunidades troglóbias marienses só será possível após a análise molecular das amostras acondicionadas para estudos de DNA. É possível no entanto afirmar que na altura da amostragem (Verão de 2009) a biodiversidade microbiana era maior na Furna Velha quando comparada com a diversidade morfológica dos biofilmes microbianos da Furna de Santana. Partindo do princípio que a amostragem efectuada é representativa da biodiversidade característica das grutas em estudo, pode-se entender que a maior biodiversidade detectada na Furna Velha será devido à existência de maior variedade de nichos ecológicos resultantes de uma maior extensão da gruta (337 m) quando comparada com a da Furna de Santana. Adicionalmente, a Furna Velha encontra-se numa arriba com acesso difícil, em contraste ao que ocorre com o acesso para a Furna de Santana. O maior grau de dificuldade no acesso acaba por reduzir a acção antropogénica sobre o ecossistema. O efeito negativo da pressão antrópica na biodiversidade microbiana de extremófilos nos Açores foi já observada em ambientes termais (Aguiar, 1999) e parece ser semelhante nestes ambientes troglóbios.

De acordo com dados do IPEA - Inventário de Património Espeleológico dos Açores (Constância *et al.*, 2004) e trabalhos em curso do GESPEA Grupo de Estudo do Património Espeleológico dos Açores, a Furna Velha, tendo em conta as suas características geológicas, biológicas, espectacularidade e integridade, é a mais importante da ilha (Classe B), sendo as restantes grutas da Classe C, isto é, de menor importância científica. Contudo, seria importante incluir ambas na lista de grutas com valor científico tendo em conta que são as grutas de erosão de maior extensão no arquipélago e que se encontram na ilha mais antiga dos Açores (Feraud *et al.*, 1981). Tanto a idade geológica como a extensão das estruturas subterrâneas podem ser entendidas como indicadores de isolamento prolongado dos organismos residentes que poderá estar na origem de consórcios microbianos únicos. Futuramente, será possível comparar a composição das comunidades microbianas troglóbias de Santa Maria com a de outras cavidades subterrâneas dos Açores.

BIBLIOGRAFIA

- AGUIAR, P., 1999. *Ecologia Microbiana de Fontes Hidrotermais em S. Miguel*, Dissertação de estágio de Licenciatura apresentada à Universidade dos Açores, Ponta Delgada, 55 p.
- AGUIAR, P., T.J. BEVERIDGE & A.-L. REYSENBACH, 2004. *Sulfurihydrogenibium azorense*, sp. nov., a Thermophilic Hydrogen-oxidizing Microaerophile from Terrestrial Hot Springs in the Azores. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 54:33-39.
- AGUIAR, P., 2005. *Microbial Ecology of Azorean Hot Springs Revealed by Culture and Molecular Techniques*. Dissertação apresentada à Portland State University, OR, USA para obtenção do Grau de Doctor in Philosophy, 270 p..
- AGUIAR, P., 2009. Isto é o que Acontece Quando se Adiciona a Vida à Panela! *Actas do Encontro Internacional de Termalismo e Turismo Termal*. Açores, Portugal, 85-88.
- BORGES, P. A.V. & F. PEREIRA, 2004. Long-term Study of Population Density of the Troglolitic Azorean Ground-beetle *Trechus terceiranus* at Algar do Carvão Show Implications for Cave Management. XI International Symposium on Vulcanospeleology, Azores, 44.
- BORGES, P.A.V., F. PEREIRA & J.P. CONSTÂNCIA, 2004. Indicators of Conservation Value of Azorean Caves Based on Arthropod Fauna. XI International Symposium on Vulcanospeleology, Azores, 45.
- CÂMARA, J., J. MEDEIROS & P. AGUIAR, 2009. Estudo Comparativo da Composição Química de Lamas e Biofilmes Termiais das Furnas. *Actas do Encontro Internacional de Termalismo e Turismo Termal*. Açores, Portugal, 419-424.

- CONSTÂNCIA, J.P., P.A.V. BORGES, M.P. COSTA, J.C. NUNES, P. BARCELOS, F. PEREIRA & T. BRAGA, 2004. Ranking Azorean Caves Base on Management Indices. XI International Symposium on Vulcanospeleology, Azores, 21-22.
- FERAUD, G., U. SCHMINCKE, J. LIETZ, J. GASTAUD, G. PRITCHARD & U. BLEIL, 1981. New K-Ar Ages, Chemical Analyses and Magnetic Data of Rocks from the Island of Santa Maria (Azores), Porto Santo (Madeira) and Gran Canaria (Canary Islands). *Bull. Volcanol*, 44(3): 359-375.
- GONÇALVES, V., A.C. COSTA, P. RAPOSEIRO & H. MARQUES, 2005. Caracterização Biológica das Massas de Água Superficiais das Ilhas de São Miguel e Santa Maria. *Universidade dos Açores - Ponta Delgada*, 240 p.
- GONÇALVES, V., P. RAPOSEIRO, A. C. COSTA, H. MARQUES, V. MALHÃO, J. MICAEL & A. CUNHA, 2007. Caracterização Ecológica das Massas de Água Interiores das Ilhas de Pico, Faial, Flores e Corvo. Definição de Ecótipos de Lagoas e Ribeiras. *CCPA, Departamento de Biologia, Universidade dos Açores, Ponta Delgada*, 131 p.
- NEEDHAM, H. & J. FRANCHETEAU, 1974. Some Characteristics of the Rift Valley in the Atlantic Ocean Near 36° 48' North. *Earth. Planet. Sci. Lett.*, 22: 29-43.
- NUNES, J.C., E. LIMA & S. MEDEIROS, 2007. Os Açores, Ilhas de Geodiversidade: Contributo da Ilha de Santa Maria. *Açoreana*, 5: 74-111.
- OROMI, P. & P.A. BORGES, 1991. New Trechodinae and Trechinae from the Azores (Col.: Carabidae). *Bocagiana*, 152: 1-10.
- PEREIRA, F., P.A.V. BORGES, M.P. COSTA, J.P. CONSTÂNCIA, J.C. NUNES, P. BARCELOS, T. BRAGA, R. GABRIEL & I.R. AMORIM, *in press*. Catálogo das Cavidades Vulcânicas dos Açores (Grutas Lávicas, Algarés e Grutas de Erosão Marinha). Direcção Regional do Ambiente, Horta, 286 p.