

1 2 9 0



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Ana Rita Marques Fonseca

**IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS DE
MICOBACTÉRIAS NÃO TUBERCULOSAS
ENVOLVIDAS NA AGREGAÇÃO CELULAR E
FORMAÇÃO DE BIOFILME**

Dissertação no âmbito do Mestrado em Bioquímica, orientada pela Doutora Susana Isabel Elias Alarico (Centro de Neurociências e Biologia Celular, Universidade de Coimbra), coorientada pelo Doutor Nuno Miguel da Silva Empadinhas (Centro de Neurociências e Biologia Celular, Universidade de Coimbra) e coorientação institucional da Professora Doutora Paula Cristina Veríssimo Pires (Departamento de Ciências da Vida, UC) e apresentada ao Departamento de Ciências da Vida, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

Julho de 2021

“We are the music makers,
And we are the dreamers of dreams,”
‘Ode’ by Arthur O’Shaughnessy

Identificação de proteínas de micobactérias não tuberculosas envolvidas na agregação celular e formação de biofilme

Dissertação no âmbito do Mestrado em Bioquímica, orientada pela Doutora Susana Isabel Elias Alarico (Centro de Neurociências e Biologia Celular, Universidade de Coimbra), coorientada pelo Doutor Nuno Miguel da Silva Empadinhas (Centro de Neurociências e Biologia Celular, Universidade de Coimbra) e coorientação institucional da Professora Doutora Paula Cristina Veríssimo Pires (Departamento de Ciências da Vida, UC) e apresentada ao Departamento de Ciências da Vida, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

Ana Rita Marques Fonseca
Universidade de Coimbra
Departamento de Ciências da Vida
Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra
Coimbra | 2021



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE
COIMBRA

Agradecimentos

Finda uma das melhores aventuras da minha vida, apesar da palavra saudade já estar a soar no meu coração, este foi só o início da aventura.

A primeira pessoa a quem tenho que agradecer (e muito) é à Doutora Susana Alarico, por me ter dado esta oportunidade, por me ensinar, por toda a paciência (não foi pouca) e ajuda, acima de tudo por me deixar explorar ciência com liberdade.

Ao Doutor Nuno Empadinhas, agradeço pela incrível oportunidade e disponibilidade de puder desenvolver este trabalho no seu grupo, obrigada por tudo. Agradeço também a todas as pessoas com quem tive contacto no laboratório, Daniela Nunes-Costa e também à Doutora Ana Maranha, em especial pela ajuda e esclarecimentos que me deu na parte dos antibióticos. Quero deixar um enorme obrigada (que não chega) à Inês Cravo Roxo, por todas as dicas que me deu, conselhos, conversas e pela enorme paciência que teve comigo e por me ter ensinado tanto. Quero também agradecer à Inês Figueiredo pela ajuda e companhia na pipetagem.

À Doutora Paula Veríssimo por assumir a responsabilidade interna da orientação para o projeto de Tese e também pela disponibilidade no esclarecimento de dúvidas.

Aos meus Marsupiais, por serem os melhores amigos que podia ter feito nestes anos, as vídeo chamadas neste último ano, mantiveram a minha sanidade mental e a falta da vossa fez-me também mais feliz. Aliceeee, Matildeee, Fidalgoos e Carlooos, obrigada pelas conversas parvas, as intelectuais e tudo mais que houve e vai haver pelo meio, adoro-vos. Agradecer claro à Maria, por ser a minha amiga mais antiga, por me conhecer tão bem e estar sempre lá para mim. À Sara pela companhia ao longo destes anos, mesmo depois do nosso percurso se ter separado, o nosso amor por micro uniu-nos novamente no lab.

Não menos importante, os meus pais, um obrigado não chega por todo o sacrifício que vocês fizeram por mim, por quererem sempre ouvir o que tinha para dizer e por nunca deixarem de me apoiar, este trabalho é dedicado a vocês. Sara, és mais que uma irmã, és a minha melhor amiga, obrigada pela amizade e também pelas fotos e vídeos do Flash, fizeram diminuir as saudades.

Henrique, és o meu porto seguro, obrigada por nunca me deixares desistir de nada, pela tamanha paciência, por me perguntares a toda a oportunidade quanto é 8x7 e por me deixares a chorar de tanto rir. Acima de tudo, por teres feito com que tudo isto fosse mais fácil.

Agradeço o apoio do Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER), através do Programa Operacional Regional do Centro (Centro 2020) com o projeto CENTRO-01-0145-FEDER-000012 (HealthyAging2020) e do COMPETE 2020 - Programa Operacional para Competitividade e Internacionalização e fundos FCT - Fundação para a Ciência e a Tecnologia através dos projetos POCI-01-0145-FEDER-029221 (PTDC/BTM-TEC/29221/2017) e UIDB/04539/2020.

Agradeço o acesso ao equipamento do Centro de Microscopia e Imagiologia de Coimbra e o apoio das pessoas envolvidas, tornando possível o registo fotográfico apresentado na tese.

Índice

Resumo	VIII
Abstract	X
Lista de Abreviaturas	XI
Índice de Figuras	XI
Índice de Tabelas	XII
Capítulo I – Introdução.....	1
1.1 Gênero <i>Mycobacterium</i>	1
1.2 Taxonomia.....	2
1.3 Fisiologia	3
1.4 Patologia	5
1.5 <i>Mycobacterium smegmatis</i>	6
1.6 <i>Mycobacterium hassiacum</i>	7
1.7 Formação intrínseca de agregados celulares e biofilme	8
1.8 Fonte de nutrientes: influência no crescimento de MNT	10
1.8.1 Limitação de Zinco em culturas de micobactérias.....	11
1.9 Identificação e caracterização taxonômica de micobactérias.....	11
1.9.1 Métodos bioquímicos chave na distinção de espécies de micobactérias	12
1.9.2 Determinação de perfis de suscetibilidade a antibacterianos.....	14
1.10 Objetivos do presente trabalho	14
Capítulo II - Materiais e Métodos	17
2.1 Preparação das culturas.....	17
2.2 Preparação do pré-inóculo	17
2.3 Variação da composição dos meios de cultura.....	17
2.4 Condições de crescimento para avaliação de alterações morfológicas	19
2.5 Extração e quantificação de proteínas totais	19
2.6 SDS-PAGE.....	20
2.7 Formação de biofilme	20
2.8 Análise morfológica por microscopia	21
2.9 Extração de DNA, amplificação do gene 16S rRNA e sequenciação.....	21

2.10 Suscetibilidade a antibióticos: determinação da concentração mínima inibitória em diferentes condições de crescimento.....	22
2.10.1 <i>M. smegmatis</i> e <i>M. hassiacum</i> : Meios de cultura modificados	22
2.10.2 Isolado NTM21.....	23
2.11 Testes bioquímicos para caracterização de espécies de micobactérias	23
2.11.1 Teste da Catalase	24
2.11.2 Hidrólise de monooleato de polioxietileno ou Tween-80.....	24
2.11.3 Crescimento em MacConkey Agar sem cristal violeta.....	24
2.11.4 Redução de Telurito.....	25
Capítulo III - Resultados e Discussão	26
3.1 Curvas de crescimento de <i>M. smegmatis</i> e <i>M. hassiacum</i> : Meio Sauton versus Middlebrook 7H9 com OADC	26
3.2 Perfis de expressão de proteínas totais dos extratos celulares	31
3.3 Formação de biofilme e morfologia celular	34
3.4.1 <i>Mycobacterium smegmatis</i>	35
3.4.2 <i>M. hassiacum</i>	39
3.5 Influência das condições de crescimento na suscetibilidade a antibióticos.....	42
3.6 Isolado NTM21	45
3.6.1 Testes bioquímicos	46
3.6.2 Testes de suscetibilidade	47
Capítulo IV - Conclusão	48
Bibliografia.....	51

Resumo

O género *Mycobacterium* possui 208 espécies, a maioria ubíquas do ambiente, designadas de micobactérias não tuberculosas (MNT), que podem ser potenciais patogénios oportunistas.

As MNT proliferam em ambientes naturais (solos e águas) ou ambientes artificiais, como hospitais e sistemas de distribuição de água da rede pública. A sua resiliência inata está intrinsecamente associada às suas características fisiológicas, como a parede celular, formada pelo complexo micolil-arabinogalactano-peptidoglicano, que origina células altamente hidrofóbicas com elevada impermeabilidade.

A disponibilidade de nutrientes, poderá ter influência direta na morfologia, induzir a expressão de proteínas e por isso contribuir para a sua resistência a antibióticos e patogénicidade. Foram escolhidas as espécies *M. smegmatis* e *Mycobacterium hassiacum*, para avaliar a influência de diferentes meios na sua morfologia, agregação celular e expressão de proteínas totais. Verificaram-se alterações morfológicas nas células, nas colónias e na formação de biofilme, (alterações morfológicas a nível macro e microscópio). Foram identificadas proteínas hipotéticas com potencial envolvimento na formação de biofilmes, como a Hsp60 GroEL1, que foram investigadas quanto à possibilidade de serem potenciais alvos terapêuticos. A suscetibilidade a antibióticos foi avaliada nas diferentes condições, resultando em alterações do perfil de suscetibilidade com uso do antibiótico meropenem.

Neste trabalho, foi também testada a suscetibilidade a diferentes antibióticos de um isolado ambiental (NTM21), de uma fonte de água natural. A sequenciação do genoma revelou tratar-se de uma nova espécie do género *Mycobacterium*. No contexto do trabalho, em que se pretende compreender como ocorre a adaptação e o crescimento de micobactérias de acordo com as condições do ambiente, nomeadamente no que diz respeito à disponibilidade de nutrientes, procedeu-se ainda à caracterização bioquímica da nova espécie de micobactéria. Dada a importância científica e de saúde pública, que novas espécies do género *Mycobacterium* têm de serem potenciais patogénicos, os testes realizados contribuem para um melhor conhecimento deste grupo de bactérias no que diz respeito à distribuição e prevalência no ambiente e às características intrínsecas de resiliência e resistência.

Palavras-chave: Micobactérias não tuberculosas, biofilme, agregados celulares, suscetibilidade micobacteriana, testes bioquímicos.

Abstract

The genus *Mycobacterium* includes 208 species, many of which are ubiquitous environmental species designated nontuberculous mycobacteria (NTM), with the potential for being opportunistic pathogens.

NTM have the capacity to proliferate in natural environments (soils and waters), or artificial environments, such as hospitals and public water distribution systems. Their innate resilience is intrinsically associated with physiological characteristics, since the cell wall is formed by the mycolyl-arabinogalactan-peptidoglycan complex that originates highly hydrophobic cells with low permeability.

Nutrient's availability, may also have direct influence on their morphology, induce different proteins expression and therefore contribute to their resistance to antibiotics and pathogenicity. *Mycobacterium smegmatis* and *Mycobacterium hassiacum* were selected to evaluate the influence of different media on phenomena of biofilm formation and cell aggregation, morphology, and proteins expression. In the different conditions tested, morphological alterations were verified in the cells, colonies and in the formation of biofilm (morphological alterations at the macro and microscopic level). Hypothetical proteins with potential involvement in biofilm formation have been identified, like Hsp60 GroEL 1 and investigated as possible therapeutic targets. The susceptibility to antibiotics was evaluated under different conditions, which resulted in the alteration of susceptibility profiles with the use of meropenem. In this work, the susceptibility to different antibiotics of an environmental isolate (NTM21) from a natural water source was also tested. Genome sequencing revealed that it was a new species of genus *Mycobacterium*. In the context of this work, which intends to understand how the adaptation and growth of mycobacteria take place according to environmental conditions, namely with regard to nutrient availability, the biochemical characterization of a new species was also carried out. Given the scientific and public health importance that new *Mycobacterium* species have as potential pathogens, the tests carried out contribute to a better understanding of this group of bacteria with regard to their distribution and prevalence in the environment and the intrinsic characteristics of resilience and resistance.

Keywords: Nontuberculous mycobacteria, biofilm, cell aggregates, mycobacterial susceptibility, biochemical tests.

Lista de Abreviaturas

μ – Taxa específica de crescimento (h^{-1})

AG – Arabinogalactano

AltRPs – Proteínas ribossômicas alternativas independentes de zinco

ATP – Trifosfato de adenosine

B.A.A.R – Bacilos álcool-ácido-resistentes

BCG – Bacilo Calmette-Guérin

BHI – Brain-Heart Infusion

BSA - albumina de soro bovino fração V

Ca – Cálcio

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute

CMI – Concentração mínima inibitória

CMT – Complexo *Mycobacterium tuberculosis*

CNC-UC – Centro de Neurociências e Biologia Celular, Universidade de Coimbra

CPV – Cloreto polivinílico

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DO – Densidade ótica

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

FAP – Proteínas de ligação a fibronectina

FASTA – Fast Adaptive Shrinkage Thresholding Algorithm

gDNA – Ácido desoxirribonucleico genómico

GPHF – Glucose, peptona de caseína, extrato de levedura, extrato de carne, cloreto de cálcio

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência

K – Potássio

kDa – Kilodalton

LJ – Lowenstein-Jensen

mAGP - complexo micolil-arabinogalactano-peptidoglicano

MCL – Micobactérias de crescimento lento

MCR – Micobactérias de crescimento rápido

Mg – Magnésio

MGLPs – Lipoliasacarídeos 6-Ometilglucose

MH – Muller Hinton

MMPs – Polissacarídeos 3-O-metilmanose

MNT – Micobactérias não tuberculosas

NCBI – National Center for Biotechnology Information

OADC – Ácido oleico, albumina de soro bovino fração V, dextrose, catalase e cloreto de sódio

P – Fósforo

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PG – Peptidoglicano

PMPS – Polissacarídeos polimetilados intracelulares

rpm – Rotações por minuto

rRNA – Ácido ribonucleico ribossômico

S – Enxofre

SDS-PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio

SINAVE – Sistema Nacional de Vigilância Epidemiológica

TB – Tuberculose

tRNA – Ácido ribonucleico transportador

VIH – Vírus da imunodeficiência humana

ZnSO₄ – Sulfato de Zinco

α – alpha

β – Beta

Índice de Figuras

Figura 1 - Árvore filogenética do género <i>Mycobacterium</i> construída a partir de sequências do gene 16S rRNA (adaptado de Devulder et al. 2005).....	4
Figura 2 - Formação da pelicula de biofilme e esquema da composição da parede celular de <i>Mycobacterium</i> spp. Retirado de Chakraborty, P., & Kumar, A. (2019).....	5
Figura 3 - Cultura de <i>Mycobacterium smegmatis</i> mc ² 155 em Middlebrook 7H10 Agar suplementado com OADC.	7
Figura 4 - Cultura de <i>Mycobacterium hassiacum</i> DSM 44199 em meio Middlebrook 7H10 Agar suplementado com OADC.	7
Figura 5 - Formação de Biofilme e ciclo de dispersão. Retirado de Chakraborty, P., & Kumar, A. (2019). 10	
Figura 6 - Curva de crescimento de <i>M. smegmatis</i> (35° C) e <i>M. hassiacum</i> (50°C) em diferentes condições: fontes de carbono e azoto alternativas.	28
Figura 7 - Perfis de expressão de proteínas totais de <i>M. smegmatis</i>	32
Figura 8 - Perfis de expressão de proteínas totais de <i>M. hassiacum</i>	32
Figura 9 - Observação da formação de biofilme e morfologia celular de <i>M. smegmatis</i> ao final de 10 dias de incubação das culturas a 35°C em diferentes condições. I) observação por microscopia ótica da formação de biofilme, Nikon Eclipse E200, numa ampliação de 40x. II) observação da morfologia celular com o microscópio Axio Imager Z2 com a objetiva Plan-Apochromat 100x/1.40 Oil Ph3 M27. A - Meio Middlebrook 7H9 suplementado com OADC; B - Meio A; C - Meio J; D - Meio S1; E - Meio S2.....	37
Figura 10 - Observação da morfologia de culturas de <i>M. smegmatis</i> em diferentes meios com agar, incubados 2-3 dias a 35°C. I) registo fotográfico observado com microscópio de zoom estéreo, SMZ-171, numa ampliação de 50x. II) observação da morfologia das células com o microscópio Axio Imager Z2 com a objetiva Plan-Apochromat 100x/1.40 Oil Ph3 M27. A - Middlebrook 7H9 suplementado com OADC; B - Meio A; C - Meio S1; D - Meio S2. A vermelho estão identificados componentes ausentes	39
Figura 11 - Observação da formação de biofilme e morfologia celular de <i>M. hassiacum</i> ao final de 10 dias de incubação das culturas a 50°C em diferentes condições. I) Observação por microscopia ótica da formação de biofilme, Nikon Eclipse E200, numa ampliação de 40x. II) observação da morfologia celular com o microscópio Axio Imager Z2 com a objetiva Plan-Apochromat 100x/1.40 Oil Ph3 M27 A - Meio Middlebrook 7H9 suplementado com OADC; B - Meio A; C - Meio J; D - Meio S1; E - Meio S2; F - GPHF. A vermelho estão identificados componentes ausentes.	40
Figura 12 - Observação da morfologia de culturas de <i>M. hassiacum</i> em diferentes meios com agar, incubados 2-3 dias a 35°C. I) Registo fotográfico observado com microscópio de zoom estéreo, SMZ-171, numa ampliação de 50x. II) Observação da morfologia celular com o microscópio Axio Imager Z2 com a objetiva Plan-Apochromat 100x/1.40 Oil Ph3 M27. A - Middlebrook 7H9 suplementado com OADC; B - Meio A; C - Meio S1; D - Meio S2; E - GPHF.....	42

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Composição das formulações preparadas tendo como base o meio Sauton.....	18
Tabela 2 - Modificações ao meio Middlebrook 7H9.....	19
Tabela 3 - Taxa específica de crescimento nos meios definidos, até 16 h para <i>M. smegmatis</i> e e 26 h para <i>M. hassiacum</i>	29
Tabela 4 - Taxa específica de crescimento nos meios definidos, até 16 h para <i>M. smegmatis</i> e e 26 h para <i>M. hassiacum</i>	31
Tabela 5 - Proteínas identificadas por LC-MS.....	33
Tabela 6 - Breakpoints da CMI ($\mu\text{g/mL}$) de 4 agentes antimicrobianos utilizados em MCR.....	43
Tabela 7 - Susceptibilidade de culturas de <i>M. smegmatis</i> a 4 antibacterianos.....	44
Tabela 8 - Susceptibilidade de culturas de <i>M. hassiacum</i> a 4 antibacterianos.....	45
Tabela 9 - Características fenotípicas do isolado NTM21.....	46
Tabela 10 - Suscetibilidade do isolado NTM21 a 9 antibacterianos, em meio MH catião ajustado.....	47

Capítulo I – Introdução

1.1 Género *Mycobacterium*

As micobactérias são membros do género *Mycobacterium* pertencente à família Mycobacteriaceae, ordem Actinomycetales (Forbes, 2017). O género *Mycobacterium* inclui 208 espécies validamente descritas¹. O número de espécies deste género tem aumentado significativamente nos últimos anos, principalmente devido a novas metodologias de identificação molecular e genómica, que permitem uma identificação mais sensível e precisa de novas espécies (Tortoli, 2014).

Algumas espécies de micobactérias são saprófitas, enquanto outras são patogénicas obrigatórias intracelulares ou oportunistas. Características distintivas do género incluem o facto de serem espécies ácido-álcool resistentes e possuírem uma camada de ácidos micólicos na parede celular. São descritas como bacilos sem motilidade, não capsulados e aeróbios, com capacidade de formar estruturas multicelulares designadas de biofilme (Tortoli et al., 2017). Dentro das espécies patogénicas obrigatórias, estão incluídas as espécies pertencentes ao Complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMT) e a espécie *Mycobacterium leprae* ou bacilo de Hansen. As espécies do CMT, causam tuberculose em humanos e animais. Em 2019, a tuberculose foi a principal causa de morte por doença infecciosa a nível mundial, com 1,4 milhões de vítimas, segundo o Relatório Global da Tuberculose de 2020, publicado pela Organização Mundial de Saúde². A espécie *Mycobacterium leprae* causa a doença de Hansen, que afeta a pele, nervos periféricos e as superfícies mucosas do trato respiratório superior (Trautman, 1984). Existe tratamento para esta doença, com antibióticos, sendo possível evitar o seu avanço se o diagnóstico for realizado nas primeiras fases da doença.

As restantes espécies do género são comumente designadas por micobactérias não tuberculosas (MNT), inicialmente descritas como micobactérias atípicas, uma vez que são frequentemente isoladas do ambiente, de solos e águas, mas também de animais, principalmente de tecido animal infetado (Rigouts & Cogneau, 2021) e, ao contrário das espécies do CMT e da espécie *M. leprae* (Hu et al., 2019; Lee et al., 2002), não precisam de um hospedeiro para sobreviver, no entanto, têm sido consideradas também relevantes a nível clínico.

¹ LPSN—list of prokaryotic names with standing in nomenclature. 1997. www.bacterio.net/mycobacterium.html. Último acesso 05 de julho 2021.

² WHO - World Health Organization. https://www.who.int/health-topics/tuberculosis#tab=tab_1. Último acesso 22 junho 2021

1.2 Taxonomia

As primeiras MNT descritas foram as espécies *M. smegmatis* (1889) e *M. phlei* (1899), no entanto, a classificação fenotípica foi iniciada mais tarde por Ernest H. Runyon (Runyon, 1959; Turenne, 2019). Desde então, com o avanço de novas tecnologias de sequenciação do genoma de organismos e o aumento do interesse por estas espécies patogénicas oportunistas (responsáveis por infeções em humanos bastante difíceis de tratar), levaram a que, nas últimas décadas, se verifica-se um aumento do número de novas espécies identificadas e classificadas como pertencentes a este género (Domenech et al., 1994). Apesar de a base da identificação de espécies estar na análise do gene 16S rRNA, existe uma similaridade ou igualdade, 94-100%, entre as diferentes espécies. Assim, tem sido demonstrado que usar a metodologia com base apenas em um gene para identificar as micobactérias até à espécie pode levar a uma identificação errada, sendo necessário analisar adicionalmente, e em conjunto, as sequências de outros genes como *hsp65*, *rpoB* e *sod* (Devulder et al., 2005). Fedrizzi e os seus colaboradores, em 2017, apresentaram uma proposta de divisão do género *Mycobacterium*, em que as espécies do complexo *M. tuberculosis* e *M. leprae*, seriam separadas das restantes, as denominadas Micobactérias não-tuberculosas (Fedrizzi et al., 2017). Recentemente foi proposta uma divisão do género *Mycobacterium* em 5 géneros (Gupta et al., 2018), com base numa árvore filogenética, construída tendo em conta 1941 proteínas essenciais do género *Mycobacterium*, 136 proteínas essenciais do filo Actinobacteria e 8 proteínas conservadas. Estes autores consideraram também a semelhança do genoma de espécies micobacterianas, determinada com base na identidade de aminoácidos de famílias de proteínas conservadas. Esta proposta de reclassificação do género *Mycobacterium* foi inicialmente aceite e até alterada nas bases de dados, no entanto, outros investigadores e médicos opuseram-se e refutaram posteriormente esta alteração (Tortoli et al., 2019). Os 4 géneros novos propostos por Gupta e colaboradores (2018) são considerados sinónimos heterotípicos (nomes diferentes que foram associados a diferentes estirpes tipo) do género *Mycobacterium*, publicados de forma válida sob aprovação do ICNP (International Code of Nomenclature of Prokaryotes) (Oren et al., 2019).

As micobactérias podem ser classificadas em dois grandes grupos (Fig.1) (Veyrier et al., 2009), as micobactérias de crescimento rápido (MCR) e as micobactérias de crescimento lento (MCL), sendo estes dois grupos definidos segundo o tempo de surgimento de colónias em condições ótimas de crescimento, a partir de um inóculo, ou seja, se este aparecimento de colónias não ultrapassa ou ultrapassa 7 dias,

respetivamente. Dentro das MNT classificadas como MCR, alguns exemplos são: *M. smegmatis*, *M. hassiacum* e o complexo *M. abscessus*, numa posição intermediária as espécies do complexo *M. terrae* e por fim, como MCL as espécies *M. kansasii*, *M. celatum*, *M. marinum* ou pertencentes ao complexo *M. simiae* (Tomioka, 1998). As MNT podem ser classificadas também de acordo com o tempo de crescimento e pigmentação das colônias segundo a classificação de Runyon, existindo 4 grupos: As MCL são divididas pelos 3 primeiros grupos: Grupo I | Fotocromogénicas: exibem pigmentação amarela após exposição luminosa; Grupo II | Escotocromogénicas: produzem pigmentação apenas na ausência de luz; Grupo III | Não-cromogénicas: sem pigmentação. As MCR pertencem ao Grupo IV e podem apresentar pigmentação ou não (Stahl & Urbance, 1990; Tomioka et al., 1990; Turenne, 2019).

1.3 Fisiologia

A base para a resistência inata das micobactérias é sua parede celular, rica em lipídios, originando células altamente hidrofóbicas com elevada impermeabilidade, o que poderá também estar associada à sua capacidade imunomodulatória e de crescimento lento. A parede celular das micobactérias é diferente da parede celular das bactérias de Gram-positivo e Gram-negativo, pois é formada pelo complexo micolil-arabinogalactano-peptidoglicano (mAGP) (Fig.2), que são estruturas macromoleculares características destas bactérias resultando no aumento da sua robustez. O peptidoglicano (PG), situado exterior à membrana plasmática, torna a parede rígida, mantendo a integridade e forma da parede mesmo em condições de osmolaridade adversas (Alderwick et al., 2015). A camada seguinte é composta por arabinogalactano (AG), que tem ligação fosfodiéster ao PG, através de resíduos de ácido murâmico. Trata-se de um heteropolissacarídeo composto por arabinose e galactose e que perfaz cerca de 35% da massa total da parede celular (Alderwick et al., 2015). Os ácidos micólicos (cadeias com 60-90 carbonos) estão na parte mais exterior da parede e são também responsáveis pela elevada resistência destas bactérias a diversos agentes químicos, nomeadamente desinfetantes, mas também a antibióticos (Chakraborty & Kumar, 2019). As micobactérias produzem dois tipos de polissacarídeos polimetilados intracelulares (PMPS), os polissacarídeos 3-O-metilmanose (MMPs) e os lipolissacarídeos 6-O-metilglucose (MGLPs) (Jackson & Brennan, 2009). Os MGLPs já foram isolados em espécies do Complexo *M. tuberculosis*, *M. leprae* e de espécies do género *Nocardia*. Os MMPs apenas foram isolados em MNT, nomeadamente em MCR não patogénicas. Estes polissacarídeos são importantes no metabolismo de ácidos gordos e na síntese da parede das MNT,

nomeadamente dos ácidos micólicos (Ripoll-Rozada et al., 2019). No entanto, genes que codificam enzimas envolvidas na síntese dos MGLPs têm sido identificados na generalidade das espécies de micobactérias, enquanto, genes envolvidos na síntese de MMPs têm sido apenas identificados em MNT (Mendes et al., 2012).

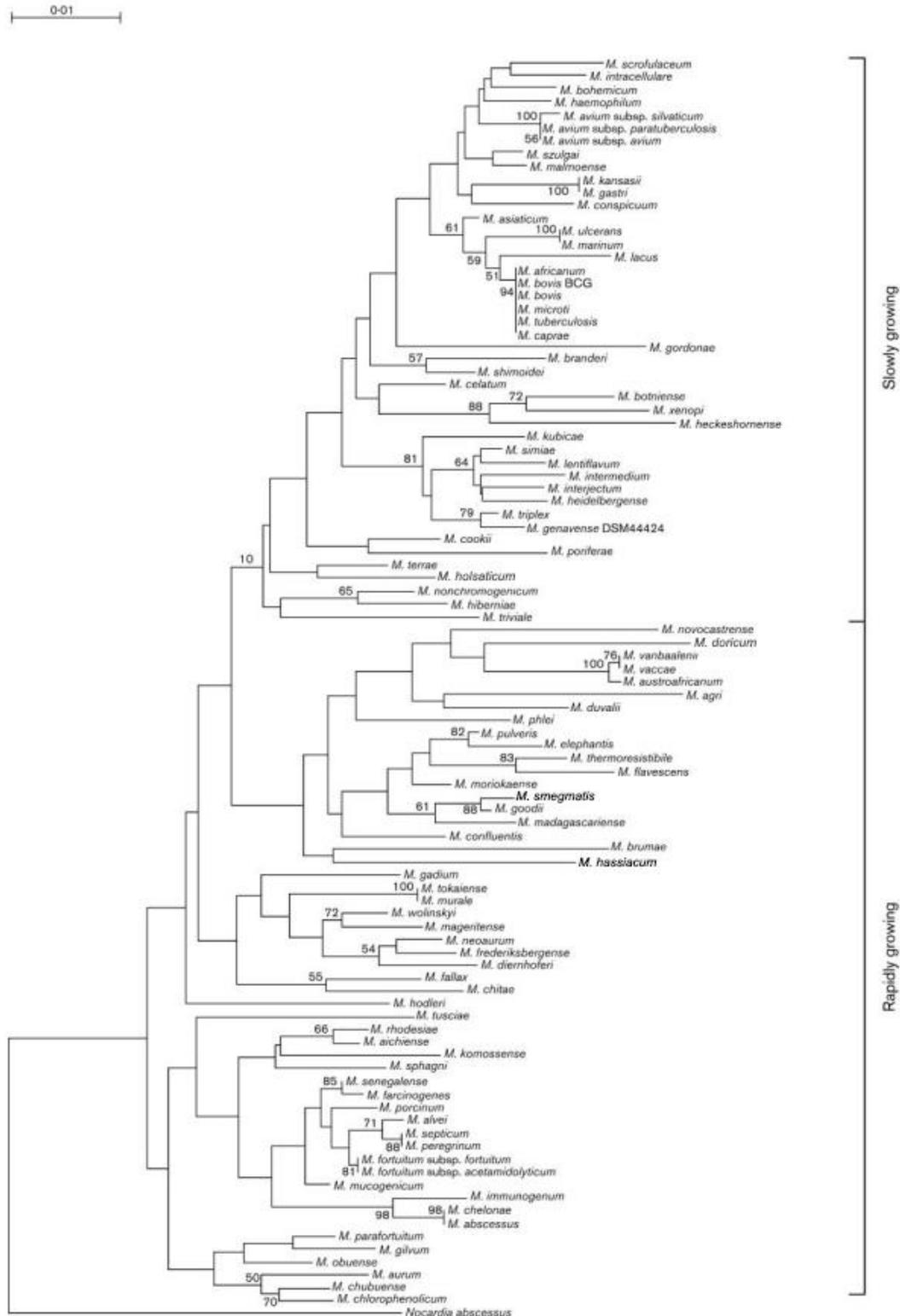


Figura 1 - Árvore filogenética do género *Mycobacterium* construída a partir de sequências do gene 16S rRNA (adaptado de Devulder et al. 2005).

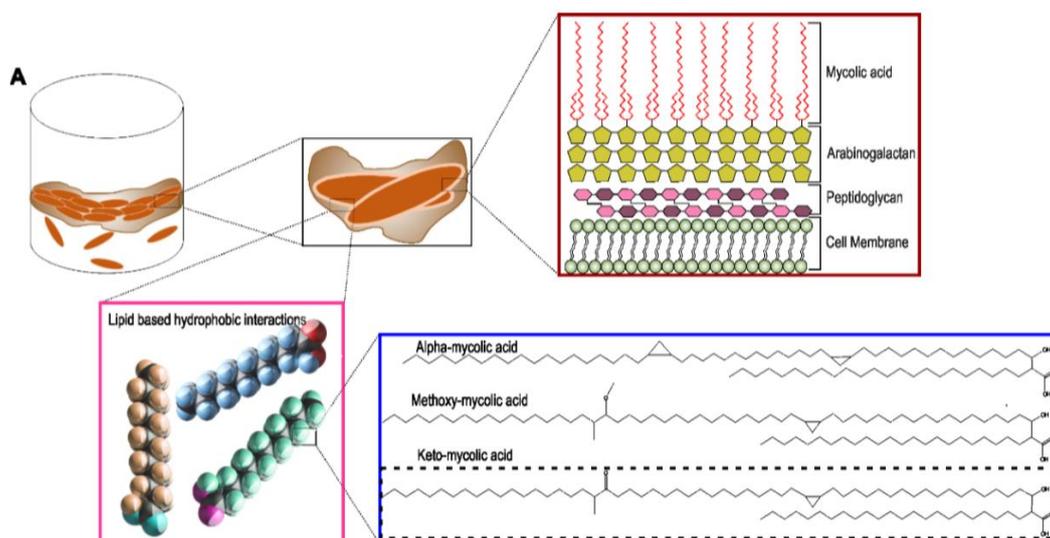


Figura 2 - Formação da película de biofilme e esquema da composição da parede celular de *Mycobacterium spp.* Retirado de Chakraborty, P., & Kumar, A. (2019)

1.4 Patologia

Em Portugal, não é obrigatório a comunicação ao SINAVE (Sistema Nacional de Vigilância Epidemiológica) de infeções por MNT, em contraste com o que acontece em situações de infeção por espécies do CMT, o que constitui um problema na aquisição de dados epidemiológicos importantes (Sousa et al., 2015). A infeção por MNT, resulta da interação MNT-hospedeiro-ambiente, não se transmite pessoa-a-pessoa, e é sobretudo prevalente em pessoas com patologia estrutural, como bronquiectasia, fibrose quística ou outras pneumoconioses, mas também em imunodeprimidos, no entanto, tem sido sugerido que a maioria da população já teve contacto com MNT, mas não desenvolveu doença (Sousa et al., 2015). Doença humana por MNT pode ser classificada em quatro quadros clínicos: doença pulmonar, linfadenite, doença cutânea e doença disseminada (Campbell et al., 2000).

O complexo *M. avium* está identificado como principal causa de infeção em indivíduos diagnosticados com a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida, causada pelo vírus da imunodeficiência humana (VIH). Infeções pulmonares crónicas são a forma mais comum de manifestação de doença por MNT (Gundavda et al., 2017), sendo a tosse crónica o sintoma mais comum, podendo ainda haver outras manifestações clínicas como febre, mal estar, perda de peso, dispneia ou hemoptise, que ocorrem com uma frequência mais variada. Em crianças entre 1 e 5 anos, o tipo de infeção mais comum por MNT é a ocorrência de um distúrbio conhecido como linfadenite, que afeta os nódulos linfáticos do pescoço e cabeça. Quando se trata de

doença disseminada, a situação reporta sobretudo a indivíduos com VIH, sendo provocada 95% das vezes por *M. avium intracellulare*, no entanto já foi também reportado com origem em outras espécies como, por exemplo, *M. chelonae*, *Complexo M. abscessus* ou *M. xenopi* (Jarzembowski & Young, 2008). As MNT são intrinsecamente multi-resistentes a antibióticos, o que está associado à sua fisiologia e características genéticas, acima descritas, o que contribuem para que o tratamento de infeções provocadas por estas bactérias seja difícil, moroso e limitado (Ryu et al., 2016). Estudos têm demonstrado que estirpes isoladas de um único paciente podem apresentar diferentes concentrações mínimas inibitórias (CMI), isto é, a concentração mais baixa de antibiótico que inibe o crescimento de micobactérias pode variar, ou seja, a CMI determinada para células em suspensão não correspondem à realidade, uma vez que as MNT têm capacidade de formar biofilme e aglomerados celulares (Falkinham, 2018) o que pode induzir a erros no momento da escolha do tratamento. O tratamento intensivo, que pode durar mais de 1 ano, para além de variados efeitos secundários, poderá deixar sequelas na saúde dos indivíduos afetados e sabe-se que o risco de reincidência de infeção por MNT é elevado (Ryu et al., 2016). É necessário investir em terapias que tenham como alvo as particularidades da fisiologia das MNT (Falkinham, 2018).

1.5 *Mycobacterium smegmatis*

A espécie *Mycobacterium smegmatis* é uma MNT de crescimento rápido, que foi descrita a primeira vez por Trevisan, em 1889, como *Bacillus smegmatis* e cuja temperatura ótima de crescimento é 37°C (Skerman et al., 1980). É bastante utilizada em estudos moleculares, servindo como modelo, de modo a substituir espécies do CMT, sendo por isso uma das espécies mais bem estudadas deste género. Não é considerada uma espécie patogénica humana, apesar de existirem casos de infeção a que está associada (Best & Best, 2009).



Figura 3 - Cultura de *Mycobacterium smegmatis* mc²155 em Middlebrook 7H10 Agar suplementado com OADC.

1.6 *Mycobacterium hassiacum*

A espécie *M. hassiacum* foi inicialmente descrita e isolada em 1997, trata-se de uma MNT de crescimento rápido, que desenvolve pigmentação no escuro, sendo por isso designada de escotocromogénica. Até à data, é a espécie mais termófila conhecida deste género, podendo crescer até 65°C, sendo a sua temperatura ótima de crescimento 50°C (Alarico et al., 2020; Schröder et al., 1997). A morfologia das colónias depende da temperatura de crescimento, tendo aparência húmida a 37°C e mais seca a 60°C. Possui mecanismos moleculares que permite a sobrevivência em condições onde a presença de azoto é limitante (Alarico et al., 2014; Schröder et al., 1997). Não existe ainda relevância clínica definida associada a esta espécie, porém alguns casos de infeção foram já associados à mesma (Deinhardt-Emmer et al., 2018).



Figura 4 - Cultura de *Mycobacterium hassiacum* DSM 44199 em meio Middlebrook 7H10 Agar suplementado com OADC.

1.7 Formação intrínseca de agregados celulares e biofilme

As MNT conseguem resistir e persistir no ambiente tendo apenas água como fonte de nutrientes. Estas bactérias conseguem também, formar agregados celulares que repelem o efeito de substâncias devido à sua elevada hidrofobicidade. Meios de cultura com diferentes composições têm um impacto na alteração e formação destas estruturas, influenciado pelo equilíbrio carbono-azoto (DePas et al., 2019). Um biofilme é definido como um conjunto de comunidades bacterianas que co-habitam numa matriz extracelular polimérica (Esteban & García-Coca, 2018). Esta capacidade permite que as bactérias se consigam fixar, crescer e proliferar nos mais diversificados ambientes, quer sejam naturais ou antropogénicos. A formação de biofilme fornece-lhes vantagens de sobrevivência, tornando-as mais aptas a viver em ambientes hostis, onde estão expostas, por exemplo, a stress osmótico, toxinas, desinfetantes e antibióticos (Dincer et al., 2013), uma vez que a comunidade resulta em diversidade de expressão genética, metabolismo e metabolitos, aumentando o “fitness” (Melaugh et al., 2016). A formação de biofilme, por norma, inicia com a deposição e adesão de células individuais a uma superfície (Fig. 5), no entanto, as micobactérias não produzem os típicos exopolissacarídeos, comuns componentes da matriz extracelular, mas conseguem fixar-se em diversas superfícies (Esteban & García-Coca, 2018). No caso de *M. smegmatis*, sabe-se que os glicopeptidolípidos são essências para o passo de fixação. Muitas das espécies que formam biofilme, têm também tendência para formar densos agregados celulares em forma planctónica (Borrego et al., 2000), que também contribuem para a resistência a stresses e elevada patogenicidade, como é o caso das MNT.

A capacidade das MNT de formar tanto biofilme como agregados celulares, relaciona-se com a hidrofobicidade das células e impermeabilidade da membrana externa que força a criação de uma ligação célula-célula. O meio e o tipo de nutrientes a que as células estão expostas, são fatores que influenciam estes mecanismos, sabendo-se que o equilíbrio e disponibilidade das fontes de carbono e azoto podem ter um papel na agregação (DePas et al., 2019). No entanto, os fenómenos moleculares que causam estes eventos continuam desconhecidos. Em laboratório, é comum a adição de detergentes às culturas, uma vez que ajudam a inibir a formação destes agregados, para facilitar o crescimento, no entanto estes detergentes podem alterar o comportamento e interação célula-célula. Um dos detergentes utilizado é o Tween 80 (monooleato de polioxietileno). Em alguns estudos, foi analisada a influência da adição deste detergente aos meios de cultura tendo sido avaliada: a morfologia dos biofilmes; o modo como o detergente poderia inibir ou aumentar a capacidade das

bactérias de formarem biofilme; a eficácia de antimicrobianos hidrofóbicos; e a permeabilização da membrana celular. Este detergente, pode ainda afetar a disponibilidade de nutrientes ao reduzir e homogeneizar as partículas, assim como atuar como fonte de nutrientes (Nielsen et al., 2016).

A capacidade de formação de biofilme por parte das MNT pode resultar num aumento da sua patogenicidade, com uma consequente CMI mais elevada e, por isso, dificultando um tratamento eficaz com recurso a antibióticos (Falkinham, 2018). Por outro lado, a agregação celular das MNT pode induzir a biogénese de fagolisossomas em neutrófilos humanos enquanto que células planctónicas não apresentam esta capacidade de indução (Cougoule et al., 2002). Noutra perspetiva, estes agregados acabam por formar cordões microscópicos, que são um conhecido fator de virulência de micobactérias, induzindo possivelmente a sua persistência e sobrevivência dentro de macrófagos (Julián et al., 2010).

Existem algumas hipóteses para explicar o motivo pelo qual as micobactérias formam agregados celulares em meio líquido, como a hidrofobicidade característica resultante da existência de longas cadeias de ácidos micólicos, enquanto outros estudos incidem sobre possíveis proteínas que sejam expressas na parede celular e que tenham direta influência nesta particularidade (Esteban & García-Coca, 2018). Foi descrito que a ausência ou baixa quantidade de glicopeptidolipídios (GPLs), era induzida pela redução da atividade de enzimas biossintéticas (Etienne et al., 2002) e poderia ser esse o agente causativo da agregação das bactérias. Um dos passos mais importantes para a infeção bacteriana é a ligação às células hospedeiras. Nas micobactérias, é típico a existência de uma família de proteínas, denominada proteínas de ligação a fibronectina (FAP) (Pasula et al., 2002), que facilitam o processo de infeção. Um estudo avaliou a disrupção do gene *fapS*, que codifica FAP em *M. smegmatis*. A disrupção deste gene em mutantes demonstrou um aumento das características hidrofóbicas e alteração morfológica aumentando a agregação celular apesar de não ter havido alterações na biossíntese da parede celular (Miyamoto et al., 2004).

Para além de GPLs, ácidos micólicos ou mesmo proteínas como a chaperone GroEL1, é especulado que os nutrientes, iões e fontes de carbono possam ter um papel bastante importante na formação de biofilmes e agregados celulares (Esteban & García-Coca, 2018). A regulação genética e metabólica das micobactérias, influenciadas pelas fontes de nutrientes disponíveis, podem por isso ser um dos principais fatores que influencia a produção de biofilmes e agregados celulares (Baker & Abramovitch, 2018). Um estudo com *Candida glabrata*, uma espécie de fungo

haploide, demonstrou que fontes de carbono alternativas induziram alterações na arquitetura da parede celular, assim como na formação de biofilme (Chew et al., 2019).

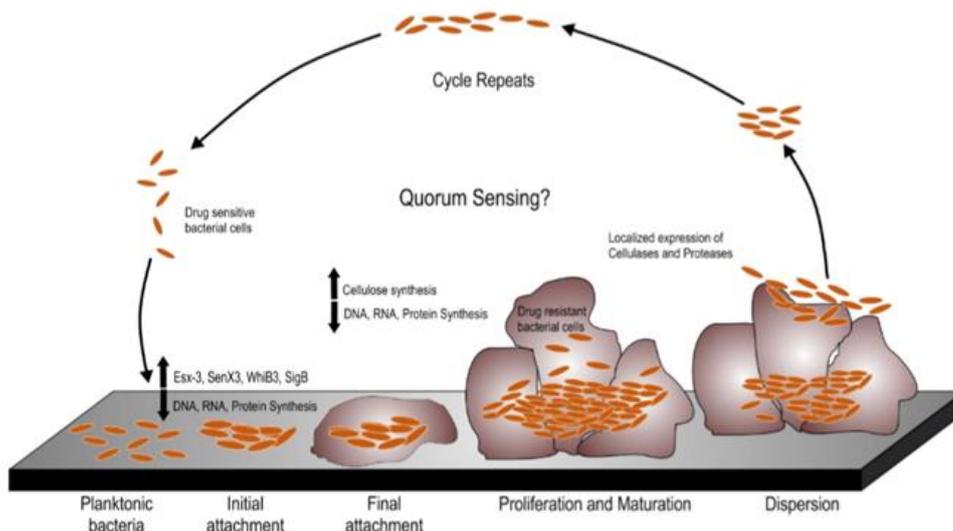


Figura 5 - Formação de Biofilme e ciclo de dispersão. Retirado de Chakraborty, P., & Kumar, A. (2019)

1.7 Fonte de nutrientes: influência no crescimento de MNT

As fontes de nutrientes são importantes para o crescimento, desenvolvimento e reprodução de todos os organismos vivos. As bactérias possuem uma elevada capacidade de se adaptar a diferentes ambientes, quer através de mecanismos inatos ou mecanismos adquiridos. Como já referido no ponto anterior, diferentes nutrientes, ou mesmo a falta deles, tem um papel importante na sobrevivência das MNT e na tipologia do seu desenvolvimento. Em laboratório, utilizam-se diferentes meios de cultura para diferentes fins. Os meios de cultura mais utilizados em laboratório para o crescimento de MNT são o meio líquido Middlebrook 7H9 suplementado com OADC (ácido oleico, albumina de soro bovino fração V (BSA), dextrose e catalase), e o meio sólido Middlebrook 7H10 suplementado com OADC. Outro meio relevante é o meio Sauton, que não possui componentes de origem animal, permite diferentes formulações, nomeadamente, variação da composição da fonte de aminoácidos (Piddington et al., 2000). Este último, é o meio mais utilizado pelos fabricantes da única vacina aprovada para a prevenção de tuberculose, a vacina BCG que tem na sua composição a espécie *Mycobacterium bovis* atenuada. Existem várias formulações, mas a maioria dos laboratórios que produzem esta vacina, fazem-no crescendo a bactéria em película, na superfície do meio Sauton (Venkataswamy et al., 2012).

O crescimento de culturas em meios ricos em glicerol, aumenta a quantidade de lípidos e glicolípidos presentes na parede micobacteriana, que pode também resultar na alteração do metabolismo e da taxa de crescimento. Quando o glicerol entra nas células por difusão membranar, induz catabolismo para obtenção de ATP ou anabolismo, desencadeando níveis elevados de compostos da parede celular (Baker & Abramovitch, 2018).

1.7.1 Limitação de Zinco em culturas de micobactérias

O zinco é um micronutriente importante para a estrutura e função basal de muitas proteínas. Foi descrito que as micobactérias possuem um operão conservado que codifica proteínas ribossômicas alternativas independentes de zinco (AltRPs), que são expressas quando a concentração de zinco é baixa ou inexistente no meio (Dow & Prisic, 2018). Quando este componente está ausente, as células de *M. smegmatis* alongam no final da fase exponencial de crescimento (após a expressão de AltRPs) e, para além de apresentarem o genoma mais condensado, verifica-se um aumento do número de grânulos de polifosfato, assim como de corpos lipídicos em comparação com as células das culturas crescidas na presença de zinco (Dow & Prisic, 2018).

1.8 Identificação e caracterização taxonómica de micobactérias

Existem diversas estratégias para a identificação de espécies do género *Mycobacterium*, nomeadamente, morfologia da cultura, testes bioquímicos e moleculares, parâmetros quimiotaxonómicos e, em alguns casos, é necessário a inoculação dos bacilos em animais para avaliar a patogenicidade e a capacidade de induzir doença infecciosa (Castro-Escarpulli et al., 2015).

A caracterização fenotípica é um método clássico, utilizado na identificação de novas espécies bacterianas. Apesar das suas limitações e de não permitir a identificação ao nível da espécie, permite uma identificação inicial, uma vez que resulta na combinação de vários testes, podendo ajudar a tomar decisões, particularmente em contexto hospitalar uma vez que são de baixo custo e execução acessível (Castro-Escarpulli et al., 2015). A determinação do fenótipo inclui a determinação da morfologia a nível microscópico, tamanho e forma das células e características das colónias formadas, tal como cor e aspeto (Pradhan & Tamang, 2019). Um dos testes primários utilizado para a identificação de micobactérias é a Coloração de Ziehl-Neelsen, que permite identificar bacilos álcool-ácido-resistentes (B.A.A.R), isto é, que resistem a esta coloração devido à composição da parede

celular. Na identificação e descrição de novas espécies é importante analisar a morfologia bacteriana - tamanho e forma das células e descrever o aspeto em meios de cultura, como a cor, textura e opacidade das colónias (Bhalla et al., 2018).

A nível fisiológico é relevante identificar o intervalo de temperaturas em que crescem, qual a temperatura ótima, assim como duração do período incubação até surgirem colónias, nomeadamente para identificar se são de crescimento rápido ou lento.

Devem também ser realizados testes bioquímicos, importantes para identificar o metabolismo de azoto, utilização de hidratos de carbono, degradação de macromoléculas e tipo de enzimas presentes.

É importante a caracterização quimiotaxonómica, como a composição em proteínas e lipopolissacarídeos. Em micobactérias é feita a análise da distribuição de componentes específicos na parede celular, como aminoácidos, açúcares, lípidos polares, ácidos micólicos e ácidos gordos (Wang & Yi, 2016). A determinação de perfis da composição destes componentes permite a identificação de espécies de micobactérias. A análise dos ácidos micólicos tem o propósito de conferir uma identificação rápida das espécies e é realizada através de uma técnica sofisticada, cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (Butler & Guthertz, 2001).

Na identificação e descrição de novas espécies de micobactérias são realizados também testes de suscetibilidade a antibióticos, que são bastante relevantes no caso de estas serem filogeneticamente relacionadas com espécies patogénicas ou com espécies oportunistas. Em contexto clínico, esta análise é determinante na escolha do tratamento (Cook et al., 2009).

1.8.1 Métodos bioquímicos chave na distinção de espécies de micobactérias

Teste Arilsulfatase

O teste de deteção de atividade da enzima arilsulfatase é utilizado para diferenciar espécies do género *Mycobacterium*. Esta enzima hidrolisa o substrato dissulfito de fenolftaleína tripotássio, libertando fenolftaleína. A interpretação dos resultados é feita após o período de incubação que decorre de acordo com o tipo de crescimento da espécie, isto é, se se trata de MCR ou MCL, e após a adição de carbonato de sódio que resulta numa alteração de cor do meio para uma gama entre rosa-vermelho (Tomioka et al., 1990)

Teste Catalase

Permite verificar a presença/ ausência da enzima catalase. Esta enzima converte peróxido de hidrogénio em água e oxigénio. A observação de bolhas significa libertação de oxigénio resultante da atividade da enzima (Manca et al., 1999). Para além da realização do teste à temperatura ambiente, é necessário testar a enzima a 68°C, uma vez que algumas formas da enzima em micobactérias são termo-estáveis.

Hidrólise de monooleato de polioxietileno ou Tween-80

O teste tem como objetivo identificar a presença de esterases que ao degradarem Tween-80 libertam ácido oleico. As interpretações variam com o tipo de método escolhido para a deteção. O teste realizado em meio sólido é considerado positivo se for possível observar grânulos ou um halo em redor da zona da inoculação (Lelliott & Stead, 1987).

Captação de ferro do meio de cultura

Permite detetar micobactérias que convertem citrato de amónio férrico a óxido de ferro, o que resulta na alteração da coloração das colónias e do meio, resultando num aspeto ferruginoso (Kent & Kubica, 1985). A maioria das MCR têm a capacidade de utilizar ferro do meio, ao contrário das MCL, que normalmente não possuem esta capacidade (De Voss et al., 1999). Este teste é realizado num ambiente com dióxido de carbono numa percentagem 5-10%.

Crescimento em MacConkey Agar sem cristal violeta

O meio MacConkey Agar sem cristal violeta é um meio seletivo e diferencial para a deteção de coliformes, patógenos entéricos e *Staphylococcus* spp. Este meio pode diferenciar ainda as bactérias de Gram-negativo com base no seu metabolismo, isto é, diferenciar entre fermentadores ao não-fermentadores de lactose (Jung et al., 2020), bactérias Lac positivas apresentam colónias rosa e Lac negativas apresentam colónias brancas. Como teste na identificação de micobactérias, tem importância para a distinção taxonómica de MCR. Por norma, MCR potencialmente patogénicas, como espécies do complexo *M. fortuitum*, crescem neste meio entre 5 a 11 dias, enquanto que outras espécies saprófitas são inibidas neste meio (Kubica & Vitvitsky, 1974).

Hidrólise de Ureia

A enzima urease hidrolisa a ureia para formar dióxido de carbono e amónia. A libertação de amónia resulta na alcalinização e no aumento do pH do meio, tornando o meio rosa devido à presença de um indicador. Assim, o aparecimento de cor rosa é

indicador do resultado positivo para esta enzima, enquanto que a não alteração de cor significa resultado negativo (Steadham, 1979).

Redução de Telurito

Baseia-se na capacidade de certas micobactérias reduzirem os sais de telurito a telúrio metálico, formando um precipitado preto, sendo esta interpretação visual utilizada para a confirmação desta capacidade. Algumas espécies de micobactérias reduzem potássio de telurito a ritmos diferentes permitindo, por exemplo, distinguir espécies do complexo *M. avium* da maioria das restantes espécies não-fotocromogénicas (Smith et al., 1977). A maioria das MCR têm a capacidade de reduzir telurito em 3 dias.

Redução de nitrato

As micobactérias que possuem a enzima nitrato redutase convertem nitrato a nitrito. O nitrito produzido é detetado pela adição de α -naftalamina e ácido sulfanílico, que formam o corante vermelho, p-sulfobenzeno-azo- α -naftalamina (Meneguello et al., 2018). Desta forma, o aparecimento de cor vermelha é indicativo da presença desta enzima.

1.8.2 Determinação de perfis de suscetibilidade a antibacterianos

Na identificação de novas espécies de micobactérias, é importante determinar a suscetibilidade a antibacterianos e definir a concentração mínima inibitória (CMI). O método recomendado é o método de microdiluição em meio líquido. A CMI não representa um valor absoluto, a verdadeira CMI estará entre a concentração mínima testada, em que não existe crescimento de um organismo, e a concentração imediatamente acima testada. Existem vários métodos para testar a suscetibilidade a antimicrobianos, incluindo microdiluições sucessivas ou difusão em agar. O “Clinical and Laboratory Standards Institute” (CLSI) recomenda a utilização de métodos baseados em diluições sucessivas com uso do meio de cultura Mueller-Hinton catião ajustado suplementado com OADC (G. Li et al., 2013).

1.9 Objetivos do presente trabalho

O presente projeto de Dissertação de Mestrado foi estruturado com o objetivo de compreender a relação entre a formação de agregados celulares e biofilme, por parte de micobactérias, e as condições de crescimento testadas, assim como identificar

moléculas/ proteínas envolvidas nestes fenómenos. Como ponto de partida do trabalho, cultivaram-se as espécies *Mycobacterium smegmatis* e *Mycobacterium hassiacum* (ambas micobactérias de crescimento rápido e com temperaturas ótimas de crescimento de 37 e 50°C, respetivamente) sob diferentes condições nutricionais, com incidência no equilíbrio e tipologia carbono-azoto (Priestman et al., 2017) e analisaram-se os perfis de expressão de proteínas nos extratos celulares. Avaliaram-se nas diferentes condições de crescimento i) a alteração morfológica das células e colónias, ii) a ocorrência de formação de agregados celulares e de biofilme e iii) a suscetibilidade das culturas a diferentes antibióticos.

A importância destes ensaios relaciona-se com o facto de as micobactérias não-tuberculosas (MNT) terem a capacidade intrínseca de formação de biofilme, em ambientes naturais e em ambientes com influência humana e, de essa característica estar associada à sua patogenicidade e resistência a antibióticos e desinfetantes (Alderwick et al., 2015; Bhalla et al., 2018). Perceber estes mecanismos poderá auxiliar no desenvolvimento de novas estratégias para reduzir ou impedir a formação de biofilme em estruturas antropogénicas, mas poderá também permitir desenvolver técnicas mais específicas para o tratamento de patologias associadas a estas espécies.

Com base na revisão da bibliografia sobre o tema, determinou-se avaliar as seguintes condições de crescimento: i) variação da concentração da fonte de carbono, glicerol; ii) variação da concentração de fonte de azoto, L-asparagina ou L-glutamato; iii) adição ou ausência de sulfato de zinco (ZnO_4) e iv) variação de diferentes componentes do suplemento OADC do meio de cultura Middlebrook 7H9.

A aprendizagem de diferentes técnicas laboratoriais foi outro objectivo do plano de trabalho. Assim, foram colocadas em prática: técnicas de microbiologia clássica, cultivo de micobactérias em diferentes meios de cultura e análise fenotípica; técnicas de microbiologia molecular, extração de DNA e amplificação do gene 16S rRNA; e execução de antibiogramas, isto é, determinação da suscetibilidade das culturas a diferentes antibióticos. De forma a fazer o registo fotográfico dos resultados obtidos, relativamente a alterações da morfologia das células e colónias, decorreu uma formação na Unidade de Microscopia do Centro de Neurociências e Biologia Celular, Universidade de Coimbra (CNC-UC) de modo a permitir, posteriormente, e sempre que necessário, a utilização do microscópio Axio Imager Z2, Zeiss.

Em paralelo a este plano de trabalhos e integrado num outro projeto científico a decorrer no laboratório de Microbiologia Molecular e Microbioma (CNC-UC) foram realizados testes fenotípicos, bioquímicos e de suscetibilidade a antibióticos com isolados de micobactérias de ambientes naturais e domésticos. A sequenciação do

genoma, destes isolados revelou tratarem-se de novas espécies MNT. Este trabalho de isolamento e caracterização de novas espécies permitiu aprofundar conhecimentos sobre micobactérias e o contacto adicional com testes específicos usados na identificação e caracterização de micobactérias. Este trabalho será brevemente publicado.

Capítulo II - Materiais e Métodos

2.1 Preparação das culturas

As estirpes *M. smegmatis* mc²155 (ATCC® 700084™) e *M. hassiacum* DSM 44199 (DSMZ, Alemanha) foram cultivadas e mantidas em meio agar Middlebrook 7H10, contendo glicerol (5 mL/L) e suplementado com Middlebrook OADC 10% (por Litro: ácido oleico 0.6 mL, BSA 50 g, dextrose 20 g, catalase 0.03 g, cloreto de sódio 8.5 g). As culturas foram incubadas consoante a temperatura ótima de crescimento de cada espécie, 35°C no caso de *M. smegmatis* e 50°C no caso de *M. hassiacum*, durante 1-2 dias, até formarem colónias visíveis, sendo depois mantidas a 4°C. Em todos os procedimentos realizados foram sempre utilizadas culturas frescas, repicando as culturas para novo meio de cultura e mantendo as condições ótimas de crescimento.

2.2 Preparação do pré-inóculo

Para o crescimento das culturas em diferentes meios e condições, para o procedimento de formação de biofilme e para a realização de testes de suscetibilidade a antibióticos, foram preparados pré-inóculos em meio Middlebrook 7H9 com glicerol (2 mL/L) suplementado com OADC 10%, em fracos Erlenmeyer com tampa metálica apropriada. Os pré-inóculos foram colocados numa incubadora com agitação orbital, a 35°C (*M. smegmatis*) e 50°C (*M. hassiacum*), com velocidade de agitação de 120 rotações por minuto (rpm), durante aproximadamente 18h, sendo depois feita a leitura da densidade ótica (DO_{610nm}) usando um espectrofotómetro (Lambda 35 UV/Vis, Perkin Elmer).

2.3 Variação da composição dos meios de cultura

Os meios de cultura utilizados para variação da composição e quantidade de nutrientes, de modo a avaliar a influência na formação de agregados celulares e biofilme foram: Sauton (Guallar-Garrido et al., 2020), Middlebrook 7H9 suplementado com OADC (Meio 857, DSMZ) e GPHF (glucose 10 g/L, peptona de caseína 5 g/L, extrato de levedura 5 g/L, extrato de carne 5 g/L, cloreto de cálcio dihidratado 0.74 g/, pH 7.2 – Meio 553, DSMZ).

Foram preparadas 8 formulações diferentes do meio Sauton (meio livre de componentes de origem animal), variando a fonte de aminoácidos, a concentração de glicerol e sem adição de ZnSO₄ (Tabela 1). O pH dos meios foi ajustado entre 7.3 -7.4.

Realizou-se uma segunda série de formulações de meio de cultura com base na comparação da composição dos meios Sauton e Middlebrook 7H9 suplementado com OADC, para remoção um-a-um de cada componente que não era comum a ambos os meios, dando origem também a 8 formulações diferentes (Tabela 2). *Nota: Inicialmente, foi também planeada a variação de cada componente do suplemento OADC, no entanto não foi possível concretizar devido a constrangimentos na encomenda/aquisição destes componentes em separado, tendo sido feito apenas uma formulação do meio em que a BSA não foi adicionada.*

As condições S1, S2 e A foram selecionados para fazer meio sólido, adição de 1.5% de Agar, para posterior plaqueamento das culturas e avaliação da morfologia das colónias nestas condições.

Tabela 1 - Composição das formulações preparadas tendo como base o meio Sauton.

Condição (g/L)	Ácido Cítrico	Fosfato monopotássico	Citrato Férrico de Amónio	Sulfato de magnésio hepta- hidratado	Sulfato de Zinco	L-asparagina	L-glutamato	Glicerol
S1					-	4	-	60
S2					0.014	4	-	60
S3					-	-	4	60
S4	2	0.5	0.05	1	0.014	-	4	60
S5					0.014	4	-	30
S6					0.014	2	-	60
S7					0.014	-	2	60
S8					0.014	-	4	30
Meio Sauton (1912) ¹	2	0.5	0,05	0.5	-	4	-	60

1-Fórmula original do meio Sauton (Sauton, 1912).

Tabela 2 - Modificações ao meio Middlebrook 7H9.

Condição (g/L)	7H9 com OADC sem o seguinte composto
A	BSA 2.50
F	Sulfato de Amónio 0.5
G	Citrato de Sódio 0.1
H	Piridoxina 0.001
I	Biotina 0.0005
J	Fosfato Dissódico 2.5
K	Cloreto de Cálcio 0.0005
L	Sulfato de Cobre 0.001
	L-glutamato 0.5
	Fosfato monopotássico 1
	Citrato Férrico de Amónio 0.04
	Sulfato de magnésio 0.05
	Sulfato de zinco 0.001

2.4 Condições de crescimento para avaliação de alterações morfológicas

A partir do pré-inoculo, preparado como descrito na secção 2.2, inocularam-se as diferentes formulações dos meios Sauton (Tabela 1) e Middlebrook 7H9 suplementado com OADC (Tabela 2) e respetivos meios de cultura sem modificações (controles), de modo que o crescimento se iniciasse com uma $DO_{610nm} \sim 0.08$. As culturas foram colocadas a crescer numa incubadora com agitação orbital, a 35°C (*M. smegmatis*) e 50°C (*M. hassiacum*), com velocidade de agitação de 120 rotações por minuto (rpm) durante 3-4 dias. Durante este período, de modo a construir curvas de crescimento para cada condição, recolheram-se alíquotas para leitura da turbidez das culturas (DO_{610nm}), usando um espectrofotómetro (Lambda 35 UV/Vis, Perkin Elmer) e, em paralelo, recolheram-se também alíquotas em triplicado (2mL para tubos eppendorfs) que foram preservados a -80°C, para posterior análise do perfil de proteínas totais.

2.5 Extração e quantificação de proteínas totais

Selecionaram-se amostras das culturas obtidas nas diferentes condições e de acordo com DO_{610nm} semelhantes, para extração das proteínas totais e análise e comparação dos perfis de proteínas. As amostras selecionadas, foram centrifugadas e o sobrenadante descartado, seguido de lavagem com 1000µL de tampão GTE (Glucose 50 mM/Tris 25 mM/EDTA 10 mM). Em seguida, procedeu-se à lise das células por sonicação, durante cerca de 4 min, com pausas de 10s de 20 em 20s de

sonicação, de modo a garantir a ruptura das células, uma vez que, as micobactérias possuem uma parede mais complexa e rígida do que a maioria das bactérias

A quantificação das proteínas totais dos extratos celulares foi realizada seguindo o protocolo do Método de Bradford, elaborando uma curva padrão para o cálculo da concentração de proteína total por amostra (Fanglian, 2011).

2.6 SDS-PAGE

A separação das várias frações de proteínas, foi feita através de eletroforese em gel de poliácridamida SDS-PAGE 12%. Calculou-se o volume de cada amostra, necessário para carregar cada poço do gel com 10 µg de proteína total. Perfez-se o volume de cada uma das amostras, até um volume final de 20 µL, com água ultrapura. e adicionou-se 2.5 µL de tampão de carga - Loading buffer SDS-Page (NZYTech). As amostras foram desnaturadas a 95°C durante 5 min. Adicionou-se o tampão de corrida (Tris-Base 25mM, Glicina 192mM, SDS 0.1%), sendo depois carregadas as amostras no gel e submetidas a uma corrida, a 200 V durante 40 min. Utilizou-se um marcador de proteínas de baixo peso molecular (Low Molecular Weight Protein Marker II, NZYTech). A revelação foi feita com uma solução corante (BlueSafe, NZYTech), durante a noite, sendo depois o gel lavado 3x com água ultrapura de modo a visualizar as bandas resultantes da separação das frações de proteínas. Algumas bandas de interesse foram removidas do gel e preservadas a -80°C em 100 µL de água ultrapura. Uma banda foi posteriormente selecionada, e enviada para o Serviço de Proteómica do i3S - Instituto de Investigação e Inovação em Saúde, Universidade do Porto, para deteção e identificação de moléculas por espectrometria de massa com recurso ao equipamento LC-MS Orbitrap.

2.7 Formação de biofilme

Foram utilizadas placas “multiwell” de cloreto polivinílico (CPV) transparentes de 96 poços, para verificação e avaliação da formação de biofilme das culturas das duas espécies em estudo, *M. hassiacum* e *M. smegmatis* nas diferentes condições de crescimento. Em cada poço colocaram-se 200 µL de cada meio correspondente às formulações indicadas nas Tabelas 1 e 2, e posteriormente adicionaram-se 10 µL de suspensão de *M. hassiacum* e *M. smegmatis* com $DO_{610nm} \sim 0.08$. Foram feitos triplicados de cada condição. As tampas das placas “multiwell” foram envolvidas com parafilm, de modo a prevenir a evaporação do conteúdo dos poços. As placas “multiwell” foram colocadas em estufas incubadoras a 35°C (*M. smegmatis*) e 50°C (*M.*

hassiacum), durante 10 dias. No final deste período, foi realizado um registo fotográfico usando o microscópio ótico Nikon Eclipse E200, com uma ampliação de 40x.

2.8 Análise morfológica por microscopia

A observação de alterações da morfologia das células das duas espécies em estudo foi feita por microscopia ao fim de 10 dias, após a preparação das culturas de acordo com o protocolo para a formação de biofilme. Para tal, foram recolhidos 10 µL de cultura de cada poço das placas “multiwell”, para realizar preparações temporárias em lâminas de microscópio. As preparações foram visualizadas por Microscopia Ótica de Transmissão, usando o método de contraste de fase, no aparelho Axio Imager Z2 com a objetiva Plan-Apochromat 100x/1.40 Oil Ph3 M27 (Centro de Microscopia e Imagiologia de Coimbra, CNC-UC). Fizeram-se também preparações das culturas provenientes nos meios S1, S2 e A, Middlebrook 7H10 e GPHF Agar (apenas para *M. hassiacum*), como indicado na **secção 2.1** para serem analisadas por microscopia com recurso ao mesmo equipamento acima mencionado.

A observação da morfologia das colónias foi feita com recurso ao registo fotográfico realizado com o microscópio de zoom estéreo, SMZ-171, com uma ampliação de 50x.

2.9 Extração de DNA, amplificação do gene 16S rRNA e sequenciação

Como se verificaram alterações significativas relativamente à morfologia e agregação das células nas diferentes condições de crescimento, de forma a confirmar a identidade das culturas, isto é, de forma a garantir que não tinha ocorrido contaminação, foram selecionadas 2 amostras: uma recolhida do meio sólido S1, sem zinco, a outra de um poço na mesma condição (em meio líquido) para extração de DNA e posterior amplificação do gene 16S rRNA.

A extração do DNA genómico foi realizada com um kit NZY Microbial gDNA Isolation kit (NZYTech, Portugal) seguindo o protocolo de acordo com as instruções do fabricante, salvo alguns ajustes quanto ao tempo nos passos de agitação no vórtex e de centrifugação. A quantificação e qualidade do DNA foram determinados com recurso a um NanoDrop 2000c (ThermoScientific™). Em seguida, a amplificação do gene 16S rRNA foi feita por PCR, usando os primers universais 27F (5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG) e 1525R (5'-AGAAAGGAGGTGATCCAGCC). Para as reações de amplificação (volume final 50 µL) foi usado o kit Supreme NZYTaq (NZYTech, Portugal). Usou-se o termociclador UnoCycler (VWR) com o seguinte

programa: 30 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 55 °C, e 1 min a 72 °C. Para separação e isolamento do gene 16S rRNA amplificado, foi realizada eletroforese em gel de agarose 1% contendo Green Safe (NZYTech, Portugal). Após a separação dos produtos de PCR por eletroforese, o gel foi observado com luz ultra-violeta no aparelho GelDoc Sistema XR (Bio-Rad) e as bandas de interesse, correspondentes a fragmentos de DNA com cerca de 1500pb, foram removidas e o DNA purificado com o kit PCR GeneJET (Thermo Fisher). Os fragmentos de DNA foram preservados a -20°C e posteriormente enviados para o serviço de sequenciação da Eurofins Genomics (Alemanha). A análise dos resultados obtidos e enviados pelo serviço de sequenciação (cromatogramas) foram analisados com recurso ao programa BioEdit (editor de alinhamento de sequências biológicas). Foram selecionadas zonas com menor ruído, com cerca de 880 pb, guardadas em formato FASTA e usadas para comparação com as sequencias da base de dados da plataforma NCBI Blast por forma a identificar/confirmar a espécie.

2.10 Suscetibilidade a antibióticos: determinação da concentração mínima inibitória em diferentes condições de crescimento

2.10.1 *M. smegmatis* e *M. hassiacum*: Meios de cultura modificados

A concentração mínima inibitória (CMI) foi determinada nas seguintes condições: meio Middlebrook 7H9 suplementado com OADC, Sauton 1 e 2 (Tabela 1), condição A (Tabela 2) e GPHF (apenas para *M. hassiacum*), seguindo a recomendação do CLSI para espécies MNT de crescimento rápido de acordo com o manual M24-A2 do CLSI. Utilizaram-se 4 antibióticos para espécies de crescimento rápido: Amicacina (Alfa Aesar), Ciprofloxacina (Sigma–Aldrich), Isoniazida (Sigma–Aldrich) e Meropenem (Sigma–Aldrich). Os antibióticos foram preparados de acordo com a fórmula:

$$\text{peso (mg)} = \frac{1000}{\text{Potência } (\mu\text{g}/\text{mg})} \times \text{volume solvente (mL)} \times \text{concentração desejada (mg/L)}$$

A potência e o solvente de cada antibiótico são fornecidos pelo fabricante. O solvente para todos os antibióticos testados foi água ultrapura filtrada e esterilizada por autoclavagem. Foram preparadas soluções de antibiótico com concentração 10 mg/mL, que depois foram diluídas também com água ultrapura filtrada e esterilizada, para uma concentração de 1 mg/mL. Os testes foram realizados em placas “multiwell” de cloreto polivinílico (CPV) transparentes de 96 poços. Das soluções de antibiótico com concentração 1 mg/L, foram transferidos 25,6 µL para 200 µL de meio, nos poços correspondentes à primeira coluna da placa “multiwell”. Nos restantes poços foram

colocados 100 µL de meio. Realizaram-se diluições em série, retirando 100 µL da primeira coluna e transferido para a seguinte, repetindo o processo até à décima coluna. Este processo resultou numa série de concentrações de 128 µg/mL a 0.25 µg/mL, correspondente aos poços 1-10.

A suspensão de cada espécie, foi preparada de modo a obter uma turbidez equivalente a 0.5 na escala de McFarland, a partir de um crescimento em meio líquido, como descrito na **secção 2.4**. A suspensão, foi depois diluída 1000x, em Middlebrook 7H9 suplementado com OADC. Da suspensão final foram transferidos 10µL para os poços de 1 a 11 da placa “multiwell”, funcionando o poço 12 como controlo negativo e também como branco. O poço 11, ao qual não foi adicionado antibiótico corresponde ao controlo positivo. Procedeu-se de forma a ter duplicados, na placa “multiwell”, de cada uma das concentrações de antibiótico e também dos controlos positivo e negativo. As placas “multiwell” foram incubadas a 35°C, no caso de *M. smegmatis* e 50°C, no caso de *M. hassiacum*, durante 4 a 5 dias. Após este tempo, foi feita a leitura da densidade ótica a 610_{nm}, no Espectrofotómetro Spectramax plus 384.

2.10.2 Isolado NTM21

A CMI para o isolado NTM21 foi determinada em meio de cultura Muller Hinton (MH) catião ajustado suplementado com 5% OADC, de acordo com as recomendações do manual M24-A2 do CLSI. Prepararam-se os seguintes antibióticos: Amicacina (Alfa Aesar), Cefoxitina (Sigma–Aldrich), Ciprofloxacina (Sigma–Aldrich), Claritromicina (Sigma–Aldrich), Isoniazida (Sigma–Aldrich), Linezolida (Acros organics), e Meropenem (Sigma–Aldrich), Moxifloxacina (TCI chemicals) e Trobramicina (Sigma-Aldrich). Os restantes passos foram realizados de forma semelhante ao descrito na secção **2.10.1**

2.11 Testes bioquímicos para caracterização de espécies de micobactérias

Foram realizados testes bioquímicos para a identificação e caracterização do isolado NTM21, obtido no âmbito do projeto “Prevalence and genetic variability of nontuberculous mycobacteria in the domestic environment” - em colaboração com a equipa da Doutora Raquel Duarte (Pneumologista no Centro Hospital de Vila Nova de Gaia, Portugal). Alguns dos testes foram realizados com recurso a galerias API 20E (bioMérieux) e API Coryne (bioMérieux) (Guérin-Faubleé et al., 2013), seguindo as instruções de acordo com o recomendado pelo fabricante, com exceção do tempo de incubação, que foi 7 dias a 35°C. Estas galerias incluem testes como, determinação da presença da enzima urease, redução de nitrato e fermentação de alguns açúcares.

2.11.1 Teste da Catalase

Este teste foi realizado sobre uma lâmina de microscópio, à temperatura ambiente e também em tubos de ensaio com tampa de rosca, a 68°C para testar a termo-estabilidade da enzima. Utilizaram-se colónias frescas, obtidas a partir do crescimento em meio Middlebrook 7H10 suplementado com OADC. O tampão fosfato 0.067 mol/litre, pH 7.0, foi preparado a partir de duas soluções posteriormente filtradas: 1 - Fosfato monopotássico 9.07 g/L e 2 - Fosfato dissódico dodecahidratado 23.68 g/L. Misturaram-se 38.9 mL da solução 1 com 61.1 mL da solução 2, pH ajustado a 7.0 e prepararam-se os tubos com 500 µL desta mistura. Preparou-se uma solução com igual volume de peróxido de hidrogénio 30% e Tween 80 a 10%. Para o teste à temperatura ambiente, colocaram-se 20 µL de tampão fosfato no centro da lâmina e com a ajuda de uma ansa, ressuspendeu-se um pouco do material celular. Para verificar se a enzima era termo-estável, os tubos com material celular, foram colocados em banho-maria a 68°C, durante 20 minutos. Depois dos tubos arrefecerem, foram transferidos 500 µL da solução de peróxido de hidrogénio e Tween-80. É considerado resultado positivo se forem observada bolhas de oxigénio no tubo (Bhalla et al., 2018). O controlo positivo para este teste foi a espécie *M. hassiacum*.

2.11.2 Hidrólise de monooleato de polioxietileno ou Tween-80

A capacidade de hidrólise de monooleate de polioxietileno, foi testada em placas de Petri com Middlebrook 7H10, com glicerol (5 mL/L), suplementado com OADC 10% e contendo 1 g/L de Tween-80 (0,1% p/v). Depois de solidificar, foram desenhados quadrados com 1 cm² de área, no centro da tampa das placas de Petri, para utilizar como guia e posteriormente inocular esta área com uma ansa de cultura fresca. Durante a incubação a 35°C, a observação do aparecimento de grânulos ou de um halo em redor da zona de inoculação, 1, 5 e 10 dias após a inoculação inicial (Lelliott & Stead., 1987) é indicativo de um resultados positivo. O controlo positivo escolhido para este teste foi a espécie *M. smegmatis*.

2.11.3 Crescimento em MacConkey Agar sem cristal violeta

A habilidade do isolado NTM21, crescer em MacConkey Agar sem cristal violeta (Difco) foi também testada. O meio foi preparado, autoclavado a 121°C, durante 15 minutos e distribuído por placas de Petri. Depois de o meio solidificar, foi inoculado com cultura fresca, do isolado NTM21 obtida a partir de crescimento em meio

Middlebrook 7H10 agar suplementado com OADC. Incubaram-se as placas a 35°C durante 11 dias. A leitura dos resultados foi realizada ao 5º e 11º dias. O controlo positivo utilizado foi a espécie *M. fortuitum*.

2.11.4 Redução de Telurito

A capacidade da redução de telurito, foi testada em tubos de ensaio com tampas de enroscar, contendo 5 mL de Middlebrook 7H9 suplementado com OADC. Depois de inoculados com cultura fresca, os tubos foram incubados a 35°C durante 7 dias. Após este tempo, foram adicionados aos tubos duas gotas de uma solução com 0.2% de telurito de potássio e os tubos foram novamente incubados nas mesmas condições, durante 2, 5 e 9 dias. O resultado é considerado positivo quando se forma um precipitado preto e metálico no fundo do tubo. Como controlo positivo foram utilizadas as espécies *M. chelonae* e *P. aeruginosa*.

Capítulo III - Resultados e Discussão

3.1 Curvas de crescimento de *M. smegmatis* e *M. hassiacum*: Meio Sauton versus Middlebrook 7H9 com OADC

Os diferentes meios de cultura influenciam o crescimento de MNT, a morfologia das células e das colônias, a capacidade de formação de biofilme, agregação celular e permeabilização da membrana celular.

As fontes inorgânicas e orgânicas de azoto no meio Sauton são limitadas e a sua única fonte de carbono é o glicerol. Sais como amônio ferro (III) citrato e sulfato de magnésio são fonte de iões inorgânicos e azoto. L-asparagina é o aminoácido normalmente utilizado neste meio, podendo em alternativa ser utilizado L-glutamato, o qual é adicionado para aumentar a taxa de crescimento inicial. O meio Middlebrook 7H9 suplementado com OADC, possui várias fontes de azoto e carbono, assim como maior diversidade de sais inorgânicos, como potássio (K), fósforo (P), cálcio (Ca), enxofre (S) e magnésio (Mg) e ainda vitaminas, como piridoxina e biotina (Vitamina H). A biotina tem um papel importante na síntese de lípidos, que são blocos estruturais importantes na membrana celular de micobactérias (Salaemae et al., 2016). O suplemento OADC, utilizado em culturas para proporcionar o crescimento de microrganismos fastidiosos, contém ácido oleico, BSA, catalase, dextrose e cloreto de sódio. Num artigo publicado por Lynn e colaboradores (1979) foi avaliada a capacidade de *M. tuberculosis* utilizar albumina como única fonte de carbono. Para isso removeram, ou os aminoácidos glutamato e asparagina ou então albumina, de um meio basal. Verificaram que na ausência de albumina não houve crescimento e que por isso esta seria utilizada como fonte de carbono, mas que os seus amino resíduos não eram utilizados como fonte de azoto.

Para a espécie *M. bovis* BCG, o uso de diferentes meios com diferentes componentes influencia os perfis de proteínas totais e antigénios, resistência a intermediários reativos de azoto, resultando em diferentes respostas imunitárias, em estudos de imunidade, com células *in vitro* e murinhos (Florio et al., 2006 & Venkataswamy et al., 2012).

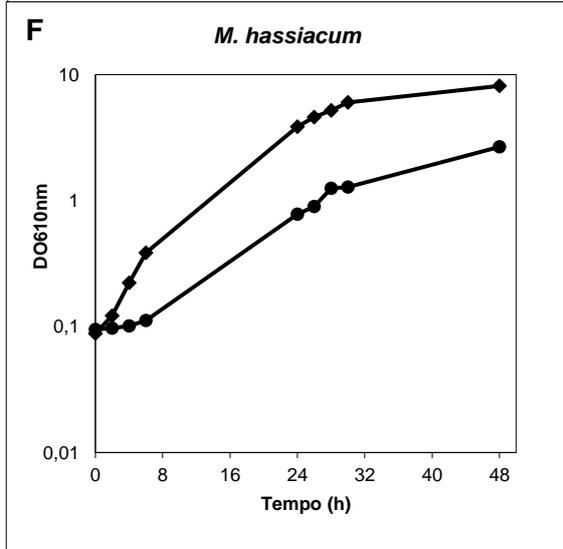
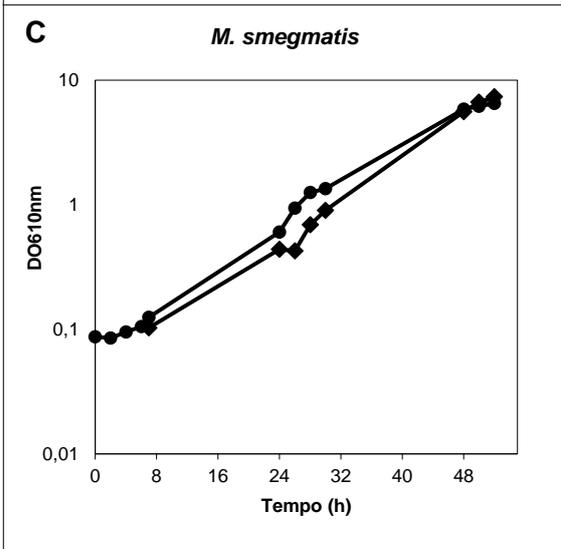
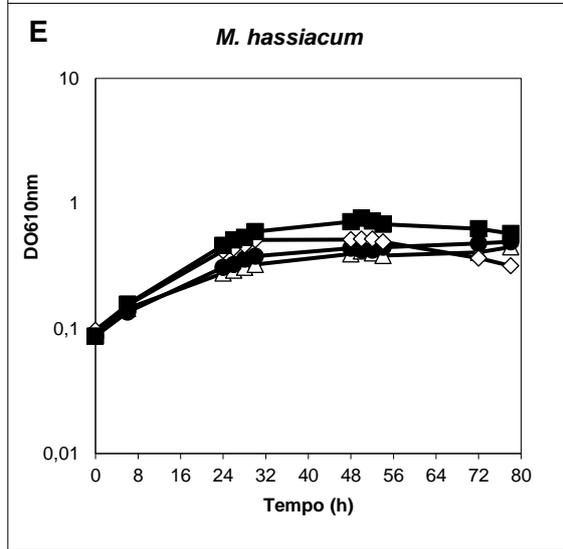
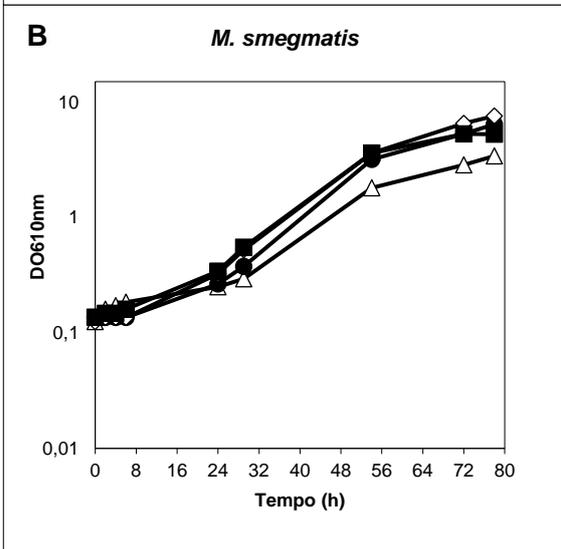
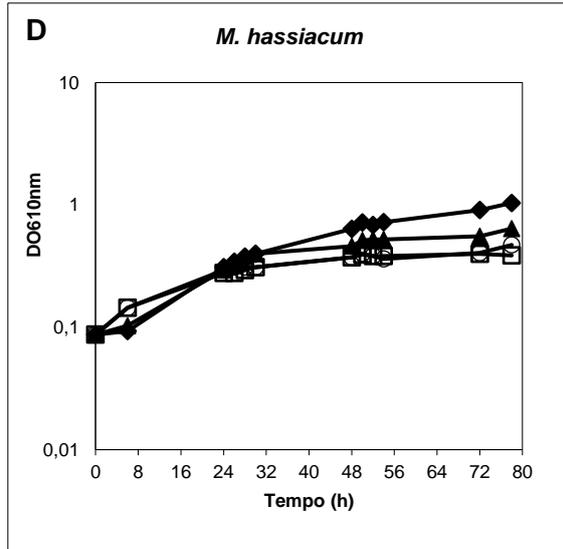
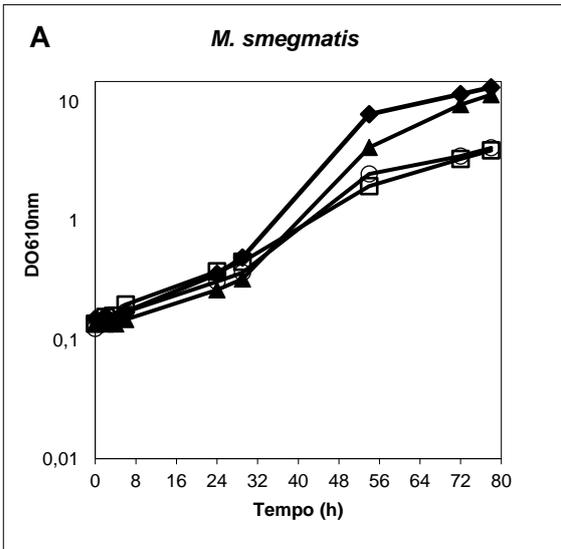


Figura 6 - Curva de crescimento de *M. smegmatis* (35° C) e *M. hassiacum* (50°C) em diferentes condições: fontes de carbono e azoto alternativas.

A: Curva de crescimento de *M. smegmatis*: ◆ - **S1**: sem ZnSO₄ + 4 g/L L-asparagina + 60 mL/L glicerol | □ - **S2**: com ZnSO₄ + 4 g/L L-asparagina + 60 mL/L glicerol | ▲ - **S3**: sem ZnSO₄ + 4 g/L L-glutamato + 60 mL/L glicerol | ○ - **S4**: com ZnO₄ + 4 g/L L-glutamato + 60 mL/L glicerol;

B: Curva de crescimento de *M. smegmatis*: ▲ - **S5**: com ZnSO₄ + 4 g/L L-asparagina + 30 mL/L glicerol | ● - **S6**: com ZnSO₄ + 2 g/L L-asparagina + 30 mL/L glicerol | ◇ - **S7**: com ZnSO₄ + 2 g/L L-glutamato + 60 mL/L glicerol | ■ - **S8**: com ZnSO₄ + 4 g/L L-glutamato + 30 mL/L glicerol;

C: Curva de crescimento de *M. smegmatis*: ● - **Controlo 7H9 suplementado com OADC** | ◆ - **S1**: sem ZnSO₄ + 4 g/L L-asparagina + 60 mL/L glicerol;

D: Curva de crescimento de *M. hassiacum*: ◆ - **S1**: sem ZnSO₄ + 4 g/L L-asparagina + 60 mL/L glicerol | □ - **S2**: com ZnSO₄ + 4 g/L L-asparagina + 60 mL/L glicerol | ▲ - **S3**: sem ZnSO₄ + 4 g/L L-glutamato + 60 mL/L glicerol | ○ - **S4**: com ZnSO₄ + 4 g/L L-glutamato + 60 mL/L glicerol;

E: Curva de crescimento de *M. hassiacum*: ▲ - **S5**: com ZnSO₄ + 4 g/L L-asparagina + 30 mL/L glicerol | ● - **S6**: com ZnSO₄ + 2 g/L L-asparagina + 30 mL/L glicerol | ◇ - **S7**: com ZnSO₄ + 2 g/L L-glutamato + 60 mL/L glicerol | ■ - **S8**: com ZnSO₄ + 4 g/L L-glutamato + 30 mL/L glicerol;

F: Curva de crescimento de *M. hassiacum*: ● - **Controlo 7H9 suplementado com OADC** | ◆ - **Controlo GPHF**.

Foi avaliada a influência de vários componentes no crescimento das espécies *M. smegmatis* e *M. hassiacum*, como a presença ou ausência de ZnO₄, a concentração e tipo de fonte de azoto ou ainda a concentração da fonte de carbono, de modo a verificar também se algum seria limitante do seu crescimento. Para tal, foram elaborados graficos de curvas de crescimento apresentados na Figura 6.

Nas diferentes formulações do meio Sauton, a espécie *M. smegmatis*, atingiu valores de DO_{610nm} semelhantes ao controlo, Middlebrook 7H9 suplementado com OADC, em particular a condição S1, sem ZnSO₄ na sua formulação (Fig. 6 A-C). Os meios de cultura onde se verificou maior crescimento não continham ZnSO₄ na sua composição, continham glicerol 60 mL/L e L-asparagina 4 g/L ou L-glutamato 4 g/L, como fonte de aminoácidos (Fig.6 A_{S1} e A_{S3}). O crescimento em meios ricos em glicerol, aumenta a quantidade de lípidos e glicolípidos presentes na parede micobacteriana, podendo também resultar na alteração do metabolismo e da taxa de crescimento. Quando o glicerol entra nas células por difusão membranar, induz catabolismo para obtenção de ATP ou anabolismo, desencadeando níveis elevados de diferentes compostos da parede celular (Baker & Abramovitch, 2018).

Também se avaliou a taxa específica de crescimento, que está relacionada com o tempo de cada geração, que ocorre por unidade de tempo numa cultura em crescimento exponencial. Quanto maior for a taxa específica de crescimento, mais rápida é a divisão da população e maior é o número de gerações que ocorrem no mesmo período de tempo. A maior taxa específica de crescimento foi registada no meio controlo Middlebrook 7H9 suplementado com OADC. Nas diferentes formulações

do meio Sauton (Tabela 3), a maior taxa específica de crescimento foi registada em S1 e S3, os mesmos onde o crescimento atingiu uma densidade ótica maior.

O crescimento de *M. hassiacum* nos meios correspondentes a modificações do meio Sauton, foi menor em relação aos controlos. No meio usado como controlo, o meio GPHF (Fig. 6F), os valores de densidade ótica registados em fase exponencial, foram superiores aos registados nas restantes condições. Nas condições S1-S8, nos meios onde a concentração de fonte de carbono era maior (S1-S4, S6 e S7), o crescimento foi menor, nunca chegando a atingir valores semelhantes aos controlos (Fig.6D, E e F). Em geral, a condição onde se verificou maior crescimento, foi S1 – sem ZnSO₄ + 60 mL glicerol + L-asparagina 4 g/L. A taxa específica de crescimento registada nas diferentes condições do meio Sauton (Tabela 3), foi menor em comparação aos controlos, Middlebrook 7H9 suplementado com OADC e GPHF e com o crescimento de *M. smegmatis* nas mesmas condições.

Através da análise dos gráficos (Figura 6) verificou-se existirem alterações no crescimento das culturas nas diferentes condições. De seguida, avaliou-se que alterações que poderiam estar a ocorrer a nível da morfologia das células e de que forma estas condições podiam influenciar a agregação das células e a formação de biofilme. Paralelamente, e aproveitando a recolha de amostras das culturas ao longo da curva de crescimento para cada condição, analisou-se o perfil de proteínas totais dos extratos celulares.

Tabela 3 - Taxa específica de crescimento nos meios definidos, até 16 h para *M. smegmatis* e 26 h para *M. hassiacum*.

Condição	Taxa específica de crescimento (μ) h⁻¹ <i>M. smegmatis</i>	Taxa específica de crescimento (μ) h⁻¹ <i>M. hassiacum</i>
7H9 + OADC	0.087	0.095
GPHF	-	0.139
S1	0.061	0.022
S2	0.044	0.012
S3	0.061	0.011
S4	0.044	0.016
S5	0.041	0.012
S6	0.052	0.010
S7	0.055	0.012
S8	0.049	0.015

Realizou-se uma segunda série de condições de crescimento tendo o meio Middlebrook 7H9 como base, mantendo os constituintes em comum com o meio Sauton, mantendo o suplemento OADC e variando um-a-um dos restantes componentes. Uma das condições foi o meio Middlebrook 7H9, suplementado com ácido oleico, dextrose e catalase, mas sem BSA (Tabela 4).

Durante o crescimento, foi visível a agregação celular, o que não permitiu a correta leitura da densidade ótica a partir de determinado tempo. Foi possível apenas obter curvas de crescimento até $t=16h$ para *M. smegmatis* e $t=26h$ para *M. hassiacum* (resultados não apresentados) e calcular as respetivas as taxas de crescimento neste intervalo de tempo.

Observou-se que os meios com maior taxa específica de crescimento foram G e H sem citrato de sódio e piridoxina respetivamente (Tabela 4), semelhantes ao obtido no controlo Middlebrook 7H9 suplementado com OADC. Com menor taxa específica de crescimento, destacaram-se o F e J, sem sulfato de amónio e fosfato dissódico respetivamente. Só foi detetado mais tarde que o meio J, sem o tampão fosfato dissódico ficava com pH 4, o que poderá explicar a taxa de crescimento baixa e alterações de morfologia. No caso do crescimento de *M. hassiacum*, destaca-se a taxa específica de crescimento registada em I, sem biotina, sendo superior em relação a todos os meios, incluindo o controlo. Para esta espécie, o meio onde a taxa específica de crescimento foi menor em J, sem fosfato dissódico.

Ambas as espécies cresceram no meio com pH baixo, o meio J, que foi onde se registou a menor taxa específica de crescimento. O pH ótimo de crescimento de espécies do género *Mycobacterium* pode variar, nomeadamente em MCR, que por norma conseguem crescer numa gama de pH mais ampla (Tsukamura, 1983). A capacidade adaptativa a alterações de pH tem um papel importante na sobrevivência em ambientes naturais (O'Brien et al., 1996).

Ao longo do crescimento de ambas espécies nos diferentes meios, foi feita a recolha de alíquotas em triplicado, para posterior análise do perfil de proteínas totais.

Tabela 4 - Taxa específica de crescimento nos meios definidos, até 16 h para *M. smegmatis* e e 26 h para *M. hassiacum*

Condição	Componente eliminado	Taxa específica de crescimento (μ) h ⁻¹	Taxa específica de crescimento (μ) h ⁻¹
		<i>M. smegmatis</i>	<i>M. hassiacum</i>
7H9 + OADC	-	0.132	0.107
A	BSA	0.098	0.106
F	Sulfato de Amónio	0.064	0.111
G	Citrato de Sódio	0.123	0.114
H	Piridoxina	0.125	0.109
I	Biotina	0.107	0.143
J	Fosfato Dissódico	0.064	0.034
K	Cloreto de Cálcio	0.087	0.109
L	Sulfato de Cobre	0.099	0.109

3.2 Perfis de expressão de proteínas totais dos extratos celulares

A visualização do gel poliacrilamida a 12%, permitiu visualizar os perfis de expressão de proteínas para as condições testadas. Para ambas as espécies, destacou-se uma banda forte com cerca de 55-60 kDa, correspondente ao crescimento no meio Middlebrook 7H9 com OADC (Fig. 7 e 8).

A análise dos péptidos terminais das proteínas, gerados por digestão proteolítica (Baldwin, 2004), com recurso a espectrometria de massa, permitiu a sua identificação.

Esta banda (55-60 kDa) parece também estar presente nos extratos obtidos para as restantes condições, talvez com exceção do meio A, em que o perfil de proteínas é bastante diferente do observado nas outras condições.

A banda assinalada na Figura 8A, foi escolhida para análise por PMF (Peptid Mass Fingerprinting) no serviço de Proteómica do i3S, Porto. A pesquisa para a identificação de proteínas foi realizada tendo em conta o proteoma de *M. hassiacum*, disponível na base de dados da UniProt. Foram detetadas várias proteínas desta espécie, com elevada confiança estatística, no entanto também se observaram elevados nível de BSA, um contaminante, que possui um peso molecular de 66 kDa.

Durante o trabalho foi colocada a hipótese de que a banda obtida com 55-60 kDa detetada, quando o meio utilizado foi Middlebrook 7H9 com OADC, poderia resultar da presença de BSA nas amostras, por incorreta lavagem com o tampão GTE. Os resultados da impressão digital em massa dos peptídeos, revelou que, o que aparentava ser sobreexpressão, era na verdade uma contaminação da proteína utilizada no meio de crescimento. Apesar disso, é evidente que existe outras proteínas com cerca de 55-60 kDa, nas diferentes formulações do meio Sauton (Fig. 7A e 8A-B) e também no Meio A (Fig. 7B e 8B) em ambas as espécies, pois estes meios não têm

BSA na composição. Da análise por PMF, identificaram-se 45 péptidos de *M. hassiacum*, mas apenas 10 apresentaram um “coverage” (percentagem de aminoácidos de uma sequência de proteína, determinados por LC-MS, Matthiesen, 2007) igual ou superior a 10% (Tabela 5). A Tabela 5 apresenta a seleção de proteínas, que pela revisão bibliográfica estão anotadas como tendo uma função relacionada com a síntese de componentes da parede celular ou outras funções com significado para os objetivos do estudo.

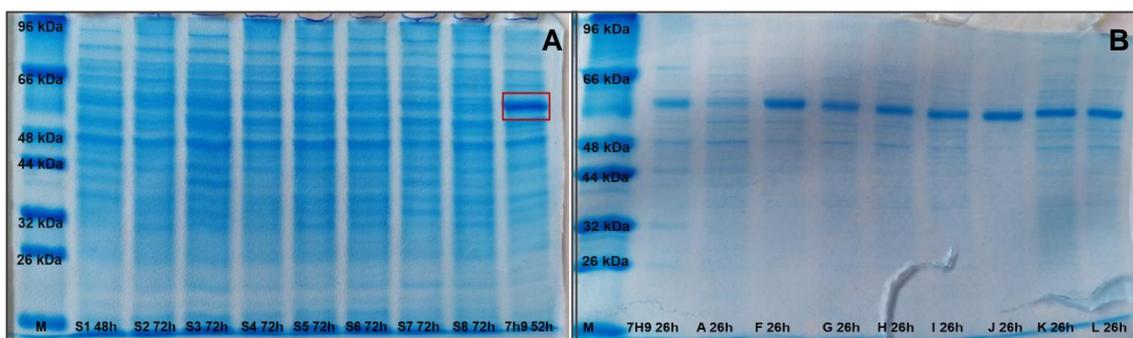


Figura 7 - Perfis de expressão de proteínas totais de *M. smegmatis*.

A: Condições tendo como base o meio Sauton S1-S8 e controlo Middlebrook 7H9 com OADC;

B: Modificações do meio Middlebrook 7H9 com OADC;

M - Marcador para proteínas de baixo peso molecular (NZYTech).

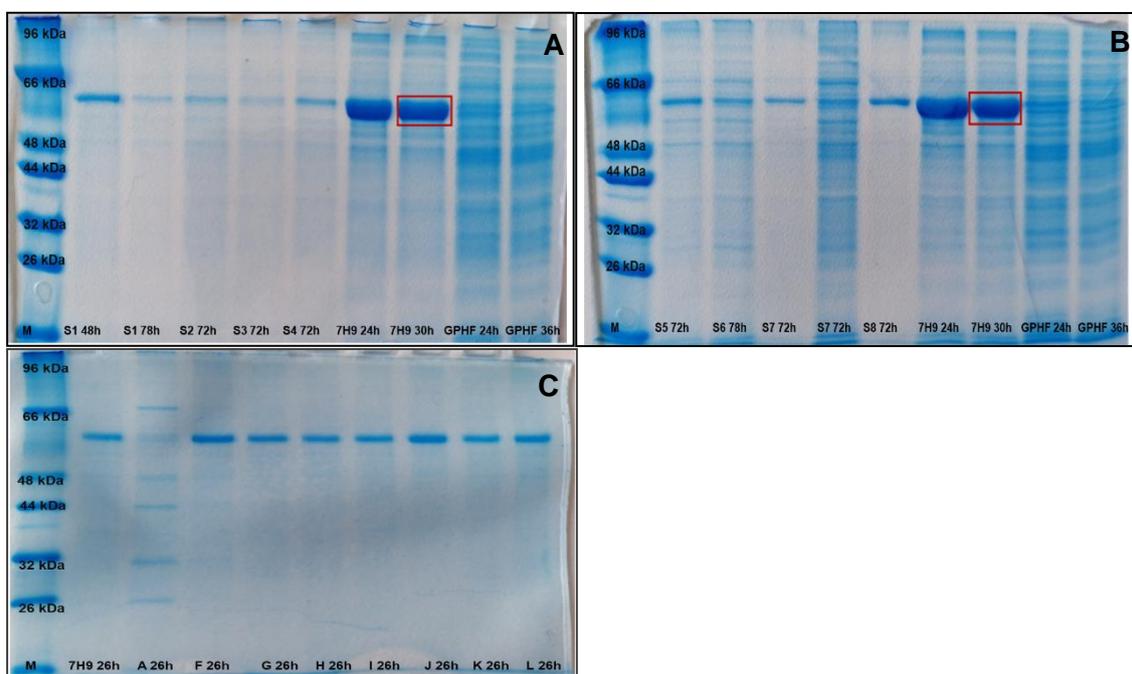


Figura 8 - Perfis de expressão de proteínas totais de *M. hassiacum*.

A: Condições tendo como base o meio Sauton S1-S4, controlo Middlebrook 7H9 com OADC e GPHF;

B: Condições tendo como base o meio Sauton S5-S8, controlo Middlebrook 7H9 com OADC e GPHF;

C: Modificações do meio Middlebrook 7H9 com OADC;

M – Marcador para proteínas de baixo peso molecular (NZYTech).

Tabela 5 - Proteínas identificadas por LC-MS

Número de acesso	Proteína	Gene	Coverage %	MW [kDa]
K5B9I5	Ligase acil Coenzima-A de ácidos gordos de cadeia longa	<i>lcfB_18</i>	32	61,1
K5BAV1	ATP sintase subunidade alfa	<i>atpA</i>	30	59,1
K5BHZ1	Chaperona Hsp70 DnaK	<i>dnaK</i>	23	66,9
A0A3P3ZYI2	Metilmalonil-CoA mutase	<i>mutA</i>	14	64,9
A0A3P3ZY44	CTP sintase	<i>pyrG</i>	13	63,8
K5BHN7	Ligase acil Coenzima-A de ácidos gordos de cadeia longa	<i>lcfB_16</i>	10	59,3
K5BH39	Chaperona Hsp60 GroEL 1	<i>groL1</i>	2	56,6

A proteína identificada com maior “coverage”, é uma ligase acil-CoA de ácidos gordos de cadeia longa (K5B9I5), cuja função é ativar a oxidação de ácidos gordos complexos, tendo por isso um papel importante no metabolismo de ácidos gordos. Segundo os dados do UniProt, esta proteína tem 50% de semelhança com a ligase FadD2 acil-CoA envolvida na síntese de ácidos gordos de cadeia longa da *M. smegmatis* mc² 155. Esta enzima, está associada com a resistência intrínseca da estirpe *M. tuberculosis* H37Rv a pirazinamida (Rosen et al., 2016). Também foi identificada outra enzima (K5BHN7) com a mesma função da K5B9I5, no entanto com menor “coverage”. A enzima mutase metilmalonil-coa (A0A3P3ZYI2), catalisa a isomerização de succinil-CoA em metilmalonil-CoA, durante a síntese de propionato, a partir de intermediários do ciclo do ácido tricarbóxico. Tem por isso, um papel importante no metabolismo de ácidos gordos e aminoácidos (Matthiesen, 2007). A subunidade alfa da adenosina trifosfato (ATP) sintase e trifosfato de citidina, relacionada com a produção de energia, e (CTP) sintase, importante na biossíntese de nucleótidos-pirimidina também foram identificadas com um “coverage” significativo. Foram ainda identificadas duas proteínas chaperonas, essenciais para a conformação de proteínas, a Hsp70 DnaK (K5BHZ1) e Hsp60 GroEL 1 (K5BH39). A DnaK participa no enrolamento correto de proteínas sintetizadas de novo, transporte de proteínas através de membranas e desagregação de proteínas agregadas. Em *M. smegmatis*, é essencial para o crescimento e a sua deleção resulta na disrupção da estrutura membranar e aumento da permeabilidade celular (Fay & Glickman, 2014). É importante tanto no correto enrolamento de proteínas nativas como induzidas por stress. A proteína identificada tem 90% de semelhança com a DnaK da *M. smegmatis* mc² 155, sendo possível pressupor que tenha um papel idêntico em *M. hassiacum*. Nas espécies do complexo *M. tuberculosis*, esta proteína tem um papel na

patogenicidade ao modelar respostas do sistema imunitário do hospedeiro (Spiering et al., 2013). A chaperona GroEL1, para além de ter um papel no enrolamento, ajuda na maquinaria de montagem de polipeptídeos desenrolados, que são gerados em condições de stress. Tem também 90% de semelhança com a GroEL1 de *M. smegmatis* mc² 155. Foi sugerido que esta proteína em *M. smegmatis* tem um papel na biossíntese de ácidos micólicos durante a formação de biofilme (Ojha et al., 2005). Num artigo publicado por Ojha et al., (2005) criaram mutantes de *M. smegmatis* mc² 155 para a proteína GroEL1 e realizaram testes para avaliar a capacidade de formação de biofilme, verificando que o mutante conseguia iniciar o processo de formação de biofilme, mas não avançava para os estágios finais de desenvolvimento.

Estas proteínas identificadas, poderão ser possíveis alvos terapêuticos tendo em conta as funções descritas. O próximo passo deste trabalho seria a construção de mutantes, através de técnicas de knockdown ou knockout, para depois avaliar a influência na formação de biofilmes, agregados celulares e suscetibilidade a antimicrobianos.

Para ter uma comparação absoluta, seria necessário otimizar e repetir o protocolo, de modo que a contaminação por BSA não fosse uma influência nos perfis de expressão de proteínas totais, nos meios tendo como base Middlebrook 7H9 suplementado com OADC. Uma vez que a identificação por espectrometria, apenas foi realizada para uma das bandas obtidas, seria interessante a identificação das bandas presentes na mesma zona de 55-60 kDa, nas formulações do meio Sauton, em ambas as espécies.

3.3 Formação de biofilme e morfologia celular

As micobactérias possuem diferenças no modo como crescem e se dividem, sendo o tamanho das células bastante heterogéneo, dentro de uma população. Crescem exclusivamente a partir dos seus polos, apresentando assimetria no processo de divisão celular (Manina et al., 2015). Esta particularidade poderá ter impacto na sobrevivência das micobactérias e mesmo nos métodos de terapia utilizados no caso de infeção. Sabe-se que nutrientes e iões, como Ca²⁺, Mg²⁺ e Zn²⁺, ou fontes de carbono, como glucose e peptona, influenciam o crescimento e poderão ter um papel na formação de biofilme (Carter et al., 2003).

Na análise da morfologia da formação de biofilme feita no presente trabalho, foi possível observar alterações influenciadas pela presença ou ausência de diferentes compostos, obtendo-se registos fotográficos ao final de um período de 10 dias, seguida de análise por microscopia, com o método de contraste de fase. O protocolo

de formação de biofilme e a avaliação da morfologia celular, foi realizada nos meios/condições que mais se destacaram, tendo em conta o crescimento e os perfis de expressão de proteínas totais.

3.4.1 *Mycobacterium smegmatis*

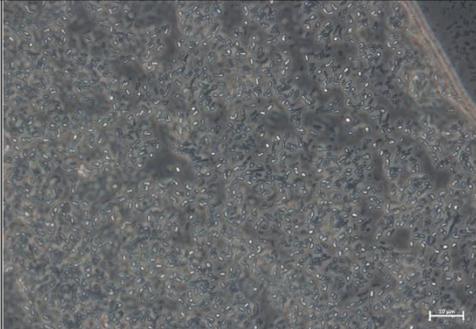
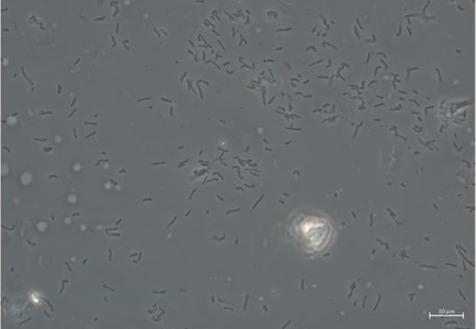
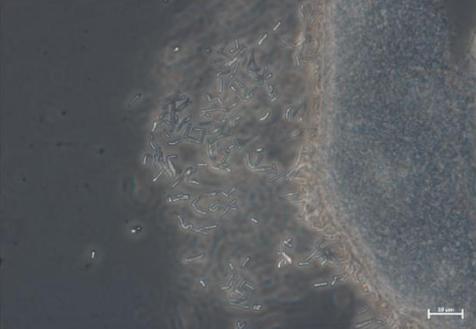
Na avaliação de alterações morfológicas, as condições que mais se destacaram foram S1, S2 e J, meio modificado com base em Middlebrook 7H9 suplementado com OADC e sem fosfato dissódico na composição (Fig. 9 C, D e E). Sais de fosfato são comumente utilizados como tampão, e atuam no intervalo de pH onde a maioria das bactérias cresce, não são tóxicos nas quantidades corretas e fornecem fósforo, que é um nutriente essencial.

M. smegmatis tem crescimento ótimo a pH 5-7.4 e cresce parcialmente a pH 4.6 (Portaels & Pattyn, 1982). O'Brien e colaboradores (1982), demonstraram que a exposição a um pH mais baixo, por exemplo pH 5, conferia maior proteção e adaptabilidade quando as células eram transferidas para um meio com pH ácido, por exemplo pH 3, do que se tivessem sido expostas a um pH inicial superior, como pH 7.6 (O'Brien et al., 1996). São desconhecidos os mecanismos específicos que resultam nesta capacidade de adaptação (Rao et al., 2001). Nenhum dos artigos acima, menciona alterações na morfologia celular e formação de biofilme em meio ácido. Não é possível concluir se a aparência filamentosa é apenas resultante de pH ácido, de menor quantidade de fósforo disponível ou por influência de ambos (Fig. 9 C-I).

A formação de biofilme também foi avaliada no meio Sauton, nas modificações S1 e S2. No meio S1, sem ZnSO₄, a cultura apresenta uma película com aparência lisa e seca (Fig. 9 D-I). Já no meio S2, com ZnSO₄ (Fig. 9 E-I), observou-se a formação de "véus" que ascendiam as paredes dos poços, com aspeto áspero. Apesar da única diferença entre estes dois meios ser a presença ou ausência de zinco, observaram-se diferenças no aspeto da película de biofilme e na morfologia das células. A formação deste tipo de "véus" ou películas em *M. smegmatis*, foi anteriormente relacionado com disponibilidade de ferro, podendo ter funções nas fases finais da formação de biofilme (Ojha & Hatfull, 2007), ou com o aumento da síntese de cadeias curtas de ácidos micólicos (Ojha et al., 2005). Assim, neste estudo coloca-se a hipótese, com base nos resultados observados, se a presença de zinco poderá também influenciar ou ter um papel na formação destas estruturas, à semelhança do ferro.

As imagens obtidas por microscopia de contraste de fase, de amostras de biofilme nas diferentes condições, revelam alterações na morfologia das células. Em

Middlebrook 7H9 com OADC, as células apresentam a forma típica de bacilo, neste caso bastante curtos, formando agregados que parecem estar envoltos numa matriz (Fig. 9 A-II). É possível observar células mais curtas e em diferentes fases de crescimento, incluindo algumas que apresentam a típica disposição de duas células em “V” de divisão de micobactérias (Dahl, 2004), sendo possível também observar isto nas restantes amostras. No geral, as células apresentam morfologia bastante heterogénea, observando-se células finas e com diferentes tamanhos. No meio A (Fig. 9 B-II), as células apresentam-se mais “soltas”, sem agragarem, completamente diferente do meio 7H9 com OADC. No meio J (Fig. 9 C-II) e S2 (Fig. 9 E-II) verifica-se novamente agregação e as células parecem envoltas numa matriz. No meio S1, as células são mais compridas e finas em relação aos restantes meios (Fig. 9 D-II), característica descrita na fase final de crescimento logarítmico, quando o zinco está limitado no ambiente (Dow & Prisic, 2018) e foi possível visualizar a conformação das células em “V” e também em “estrela”, típico de micobactérias e que normalmente antecede a agregação das células.

	I) Registo microscópico da formação de biofilme	II) Registo microscópico da morfologia celular
A <i>M. smegmatis</i> Middlebrook 7H9 com OADC 35°C 10 dias		
B <i>M. smegmatis</i> Meio A Fração de Albumina Sérica V 35°C 10 dias		
C <i>M. smegmatis</i> Meio J Fosfato Dissódico 35°C 10 dias		

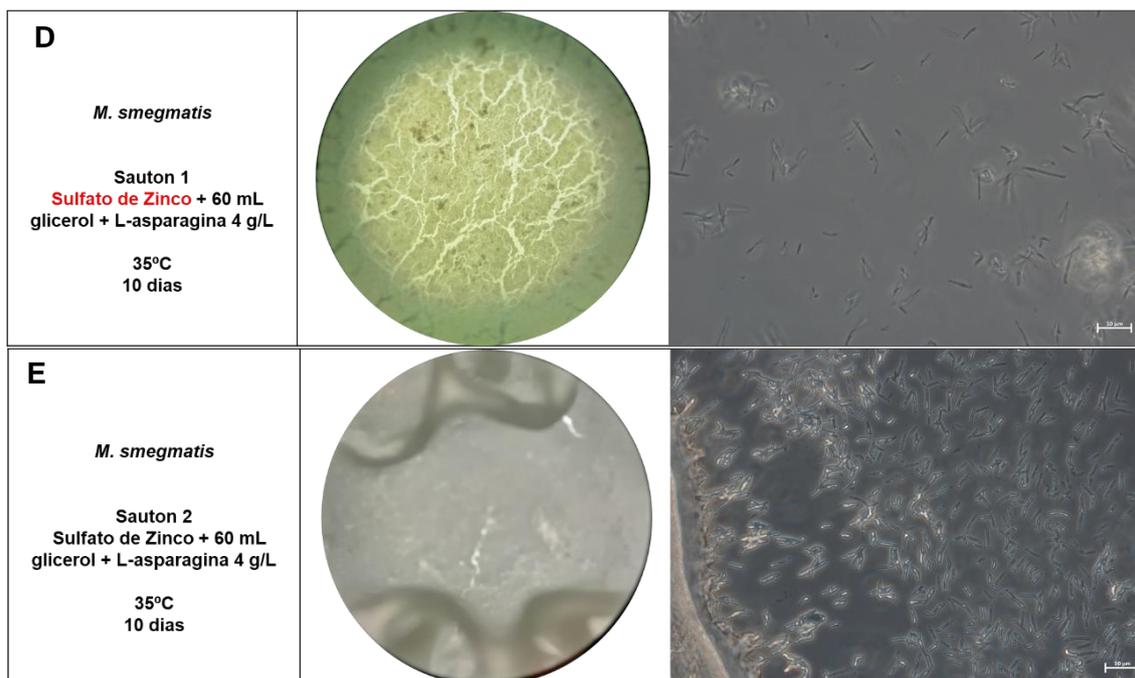


Figura 9 - Observação da formação de biofilme e morfologia celular de *M. smegmatis* ao final de 10 dias de incubação das culturas a 35°C em diferentes condições. **I)** observação por microscopia ótica da formação de biofilme, Nikon Eclipse E200, numa ampliação de 40x. **II)** observação da morfologia celular com o microscópio Axio Imager Z2 com a objetiva Plan-Apochromat 100x/1.40 Oil Ph3 M27. **A** - Meio Middlebrook 7H9 suplementado com OADC; **B** - Meio A; **C** - Meio J; **D** - Meio S1; **E** - Meio S2.

A possível alteração da morfologia das colónias nas diferentes condições também foi avaliada nos respectivos meios com agar. Este registo não foi realizado com o meio J, sem fosfato dissódico a pH 4, uma vez que o agar exposto a condições ácidas sofre hidrólise dos polissacarídeos, o que resulta numa solução de açúcares sem capacidade de solidificar (Kim et al., 2017).

A espécie *M. smegmatis* está descrita como sendo não-pigmentada ou amarela ténue a branca. A morfologia da superfície da cultura pode ser, cremosa ou brilhante, levemente rugosa ou granulosa. Em meio sólido com diversos suplementos disponíveis, a sua aparência é branca e leitosa e levemente rugosa (T et al., 2020). Em meio Midlebrook 7H10 suplementado com OADC (Fig. 10 A-I), a cultura apresenta estas características. As células são mais compridas (Fig. 10 A-II), em comparação ao observado em meio líquido durante a formação de biofilme (Fig. 9 A-II), mas mantendo a heterogeneidade. A cultura no meio A agar (Fig. 10 B-I), sem BSA, apresentou características semelhante à cultura em 7H9 com OADC, mas com aparência mais seca e com menos “pregas” rugosas. As margens são onduladas em ambos os meios. A nível celular (Fig. 10 B-II), nestes dois meios não existem diferenças relevantes. Nos meios S1 (Fig. 10 C-I) e S2 agar (Fig. 10 D-I), as apresentam um aspeto semelhante, rugosas, em relevo com bastantes “pregas”

/enrugadas, opacas e cor branca-amarela pálida. As margens em S1 são onduladas e em S2 irregulares. A nível celular, S1 (Fig. 10 C-II) e S2 (Fig. 10 D-I) possuem morfologia semelhante ao observado na formaao de biofilme (Fig. 9 D-II) (Fig. 9 E-II).

A extraao do DNA das culturas do meio S1 agar e líquido e sequenaciaao do gene rRNA 16S, foi realizada de forma a confirmar tratar-se da estirpe *M. smegmatis* mc² 155, podendo desta forma ter um grau de confiança nos resultados e afastar a possibilidade de contaminaoes.

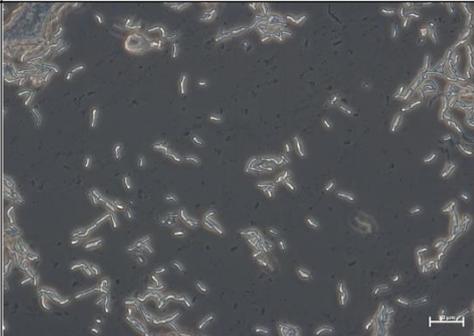
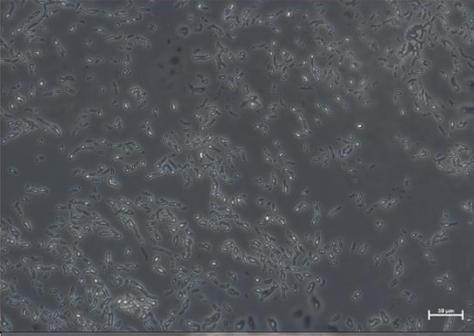
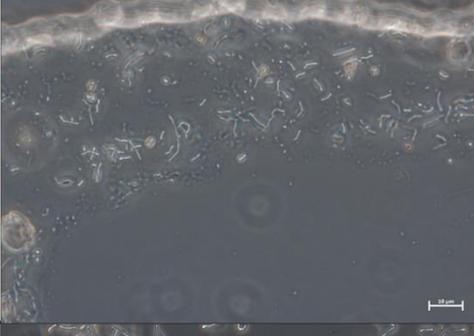
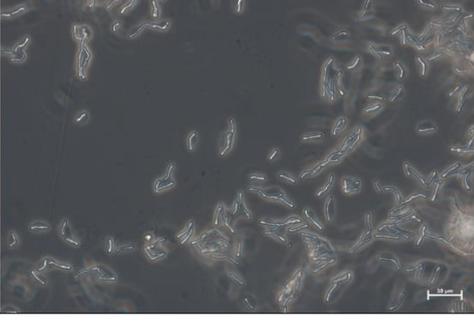
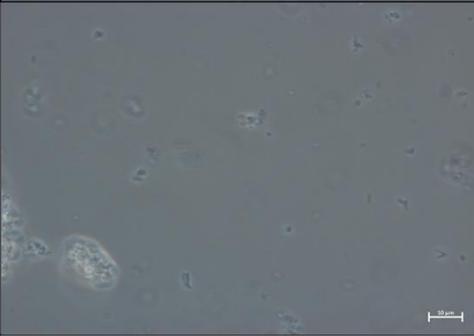
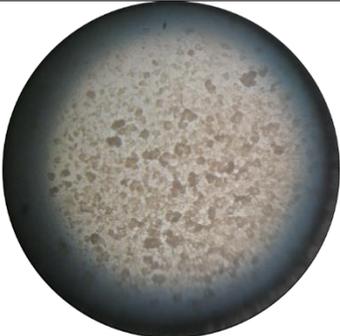
	I) Registo fotográfico do crescimento em agar	II) Registo microscópico da morfologia celular
A <i>M. smegmatis</i> Middlebrook 7H10 com OADC 35°C 3 dias		
B <i>M. smegmatis</i> Meio A Agar Fracao de Albumina Sérica V 35°C 3 dias		
C <i>M. smegmatis</i> Sauton 1 Agar Sulfato de Zinco + 60 mL glicerol + L-asparagina 4 g/L 35°C 3 dias		
D <i>M. smegmatis</i> Sauton 2 Agar Sulfato de Zinco + 60 mL glicerol + L-asparagina 4 g/L 35°C 3 dias		

Figura 10 - Observação da morfologia de culturas de *M. smegmatis* em diferentes meios com agar, incubados 2-3 dias a 35°C. **I)** registo fotográfico observado com microscópio de zoom estéreo, SMZ-171, numa ampliação de 50x. **II)** observação da morfologia das células com o microscópio Axio Imager Z2 com a objetiva Plan-Apochromat 100x/1.40 Oil Ph3 M27. **A** - Middlebrook 7H9 suplementado com OADC; **B** - Meio A; **C** - Meio S1; **D** - Meio S2. A vermelho estão identificados componentes ausentes

3.4.2 *M. hassiacum*

Nas diferentes condições em que se cultivou *M. hassiacum* não se verificaram diferenças morfológicas relevantes (Fig. 11 A-F). A exceção foi o meio A (Fig. 11 B-I), onde a película de biofilme tinha um aspecto muito distinto dos restantes. Foi descrito que presença de BSA, reduz significativamente a formação de biofilme em *Pseudomonas aeruginosa* (Hammond et al., 2010). Em *C. albicans*, também foi descrito que soro humano pode reduzir essa capacidade, através da infrarregulação de genes relacionados com adesão, durante a formação de biofilme (Ding et al., 2014). Sabe-se ainda que, o tamanho da cadeia de ácidos micólicos, pode influenciar a agregação (Bhatt et al., 2007). Assim, poderia considerar-se que o aspecto da cultura de *M. hassiacum* no meio A, representa uma possível consequência da ausência de BSA, aumentado a capacidade de agregação.

As imagens obtidas por microscopia, revelam heterogeneidade no tamanho das células em todos os meios. Em GPHF (Fig. 11 F-II), as células são mais alongadas e robustas em relação a todas as outras condições.

	I) Registo microscópico da formação de biofilme	II) Registo microscópico da morfologia celular
<p>A</p> <p><i>M. hassiacum</i></p> <p>Middlebrook 7H9 com OADC</p> <p>50°C 10 dias</p>		
<p>B</p> <p><i>M. hassiacum</i></p> <p>Meio A Fração de Albumina Sérica V</p> <p>50°C 10 dias</p>		

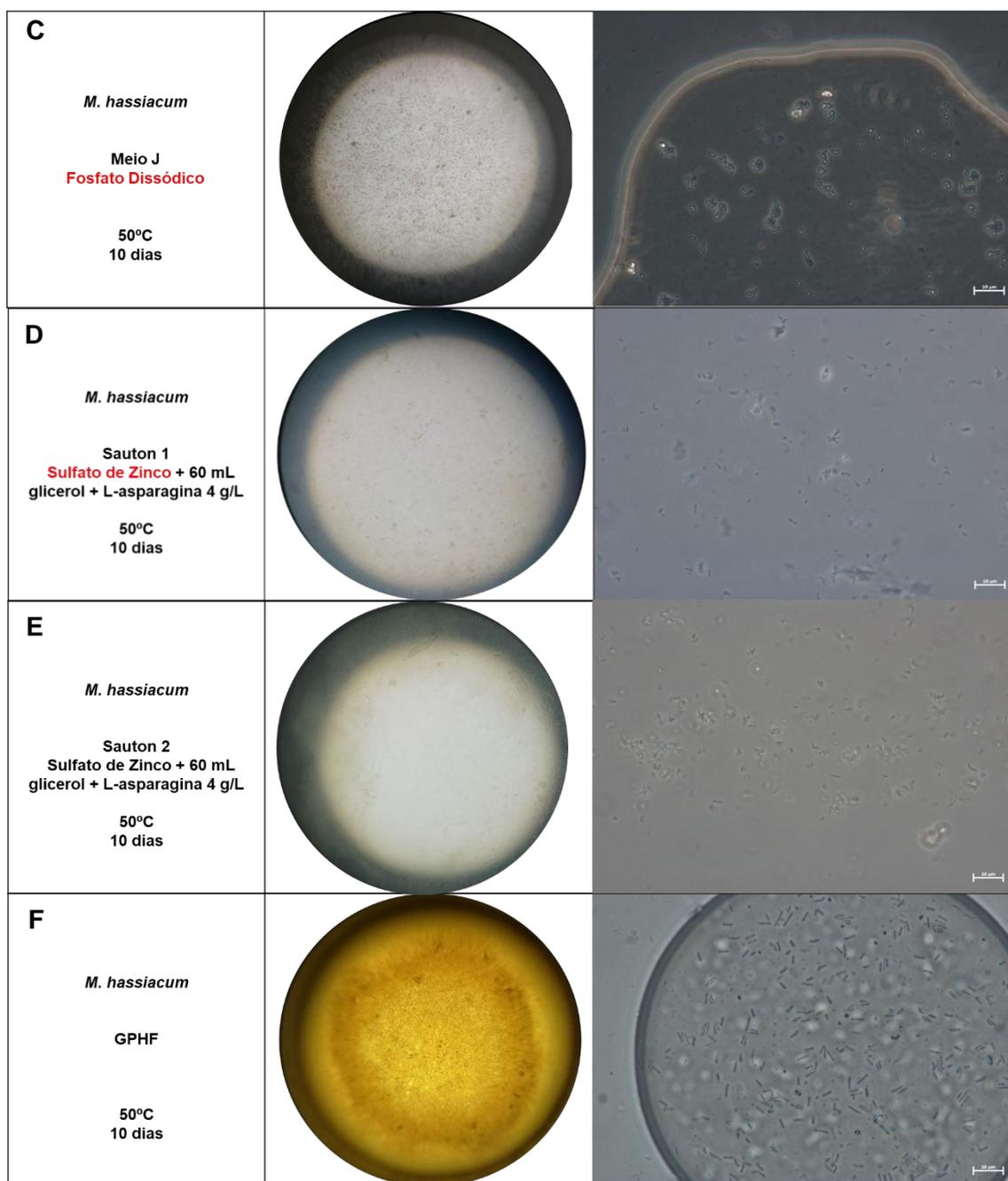
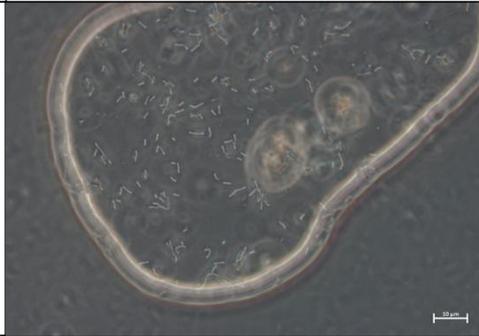
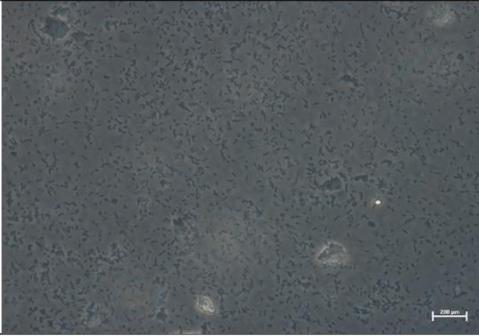


Figura 11 - Observação da formação de biofilme e morfologia celular de *M. hassiacum* ao final de 10 dias de incubação das culturas a 50°C em diferentes condições. **I)** Observação por microscopia ótica da formação de biofilme, Nikon Eclipse E200, numa ampliação de 40x. **II)** observação da morfologia celular com o microscópio Axio Imager Z2 com a objetiva Plan-Apochromat 100x/1.40 Oil Ph3 M27 **A** - Meio Middlebrook 7H9 suplementado com OADC; **B** - Meio A; **C** - Meio J; **D** - Meio S1; **E** - Meio S2; **F** - GPHF. A vermelho estão identificados componentes ausentes.

As principais diferenças, foram observadas na morfologia de culturas de *M. hassiacum* em meio sólido. *M. hassiacum* desenvolve pigmentação no escuro e está descrita como formadora de colónias lisas, densas e mucosas, quando crescida em Lowenstein-Jensen (LJ) (Schröder et al., 1997).

Em Middlebrook 7H10 suplementado com OADC (Fig. 12 A-I), a superfície das culturas é leitosa, lisa e as margens suaves. As células (Fig. 12 A-II), aparentam ser mais robustas do que o observado durante a formação de biofilme (Fig. 11 A-II). No meio A (Fig. 12 B-I), a cultura tem aspeto mais rugoso e seco, apesar de manter margens leitosas e suaves. A nível microscópico (Fig. 12 B-II), as células são bastante mais curtas e menos robustas em comparação ao meio anterior. Em S1 e S2, ausência (Fig. 12 C-I) ou presença de zinco (Fig. 12 D-I), respetivamente, as culturas têm aspeto mucoso, liso e brilhante, sendo também mais notável o desenvolvimento de pigmentação amarela um pouco mais forte. Apesar do aspeto semelhante, as células em S1 agar (Fig. 12 C-II) são mais compridas e exibem agregação, formando uns “clusters” em comparação com as células em S2 agar (Fig. 12 D-II). Em GPHF com agar (Fig. 12 E-I), a cultura apresenta aspeto seco e rugoso, com margens irregulares e “filamentosas”. A morfologia celular (Fig. 12 E-II), é semelhante ao observado na amostra obtida da formação de biofilme em GPFH e ao controlo Middlebrook 7H10 suplementado com OADC.

	I) Registo fotográfico do crescimento em agar	II) Registo microscópico da morfologia celular
A <i>M. hassiacum</i> Middlebrook 7H10 com OADC 50°C 3 dias		
B <i>M. hassiacum</i> Meio A Agar Fração de Albumina Sérica V 50°C 3 dias		

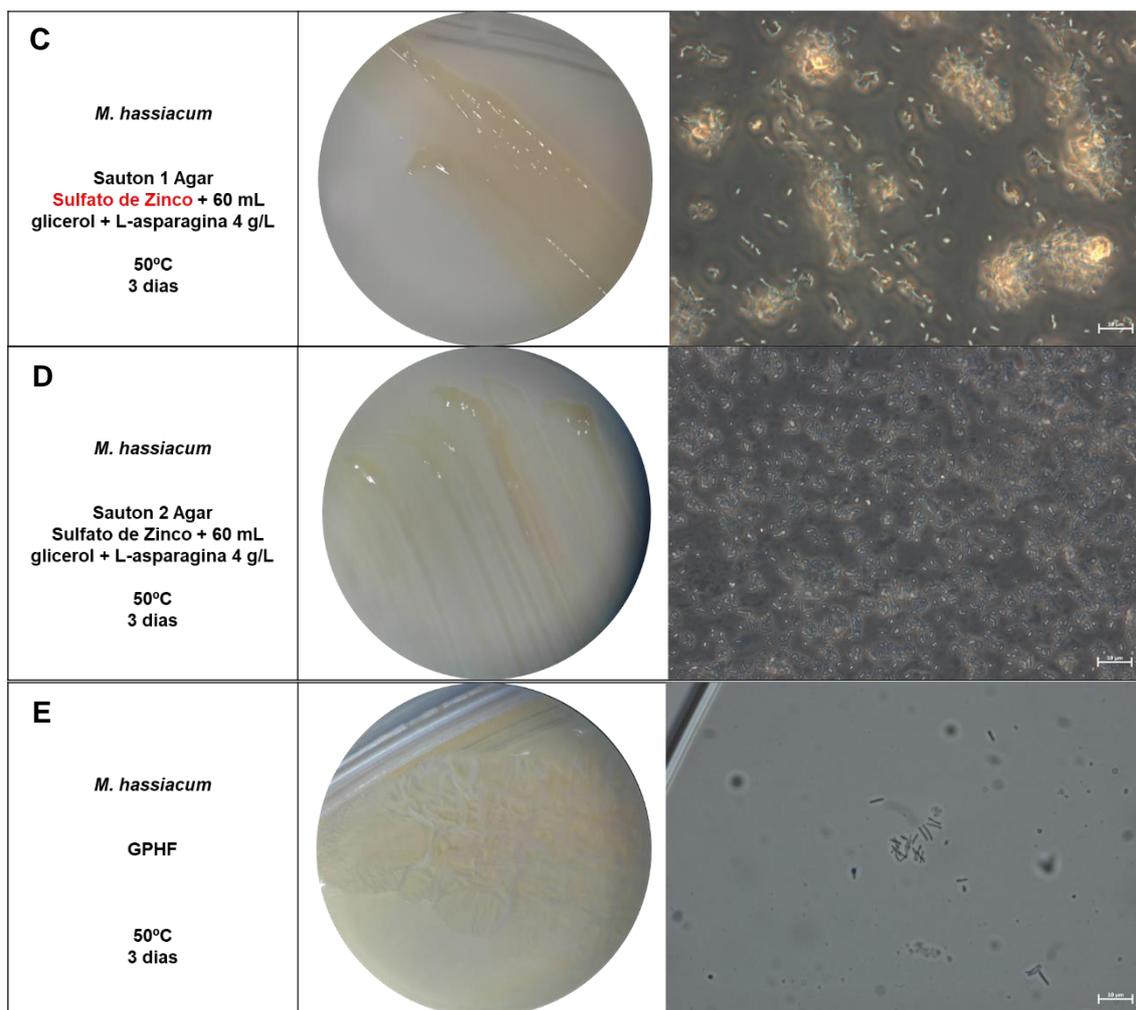


Figura 12 - Observação da morfologia de culturas de *M. hassiacum* em diferentes meios com agar, incubados 2-3 dias a 50°C. **I)** Registro fotográfico observado com microscópio de zoom estéreo, SMZ-171, numa ampliação de 50x. **II)** Observação da morfologia celular com o microscópio Axio Imager Z2 com a objetiva Plan-Apochromat 100x/1.40 Oil Ph3 M27. **A** - Middlebrook 7H9 suplementado com OADC; **B** - Meio A; **C** - Meio S1; **D** - Meio S2; **E** - GPHF.

3.5 Influência das condições de crescimento na suscetibilidade a antibióticos

É comum a utilização de detergentes não-iônicos, para prevenir a agregação celular e estimar o crescimento em meio líquido, através da medição da turbidez das culturas. No entanto, a utilização de detergentes, como Tween-80, pode induzir efeitos positivos ou negativos quando se determina a concentração mínima inibitória (CMI), aumentando ou não a potência do antibacteriano a testar. Sabe-se também que com a adição de BSA ao meio, alguns desses efeitos podem ser revertidos. Isto porque, BSA, poderá ter um efeito protetor na presença de ácidos gordos livres, que podem induzir toxicidade (Franzblau et al., 2012).

Por norma, para o método de microduição, utiliza-se o meio Mueller-Hinton catião ajustado, mas também é comum encontrar autores que utilizam Middlebrook 7H9, suplementado ou não com OADC (Lelovic et al., 2020).

Para avaliar a influência do meio na suscetibilidade a antibióticos, escolheram-se quatro antibióticos utilizados para MCR, com diferentes mecanismos de atuação. A amicacina pertence à classe dos aminoglicosídeos, liga-se às subunidades 30S do ribossoma bacteriano e interfere com a ligação do mRNA e com os locais receptores de tRNA. Interfere por isso no crescimento, uma vez que interrompe a síntese de proteínas (Ramirez & Tolmasky, 2017). A ciproflaxina é uma fluoroquinolona de segunda geração, atua na DNA topoisomerase II (DNA girase) e topoisomerase IV, impedindo a replicação do DNA (Zhang et al., 2018). A isoniazida é um antibiótico utilizado para tratar infeções micobacterianas em combinação com outros agentes antimicrobianos. Tem efeito bactericida em MCR e bacteriostático em MCL. A isoniazida necessita de ser ativada pela catalase bacteriana, no estado ativo. Inibe a síntese de ácidos micólicos, essenciais para a parede celular (Pym et al., 2001). O meropenem é um carbapenemo, que pertence à classe beta-lactâmicos. A sua atividade resulta na inibição da síntese da parede celular (Brown-Elliott et al., 2016).

Tabela 6 - Breakpoints da CMI ($\mu\text{g/mL}$) de 4 agentes antimicrobianos utilizados em MCR.

Antibiótico	Breakpoints CMI ($\mu\text{g/mL}$) ¹		
	Suscetível (S)	Intermédio (I)	Resistente (R)
Amicacina	≤ 16	32	≥ 64
Ciprofloxacina	≤ 1	2	≥ 4
Isoniazida	-	-	≥ 1
Meropenem	≤ 4	8-16	≥ 32

1 – Retirados de (Pang et al., 2015; Hatakeyama et al., 2017)

Nesta parte do trabalho utilizaram-se os meios: Middlebrook 7H9 suplementado com OADC, A, S1, S2 e GPHF, este último apenas para *M. hassiacum*. As concentrações de antibióticos usadas variaram entre 0.25 $\mu\text{g/mL}$ e 128 $\mu\text{g/mL}$ para todos os antibióticos. Na avaliação da suscetibilidade de culturas de *M. smegmatis* aos antibióticos nos diferentes meios, foi possível observar diferenças nas CMI (Tabela 7). No caso de *M. smegmatis* existem diferenças na CMI dos antibióticos nos meios, com exceção da CMI para meropenem que é igual em todos os meios, salvo no meio S1 e para ciprofloxacina que é diferente apenas no meio A. Comparando a CMI dos

antibióticos testados para *M. smegmatis* nos diferentes meios, o perfil resistente ou sensível está de acordo com o encontrado na bibliografia. Em todas as condições, *M. smegmatis* é sensível à amicacina, no entanto, os valores de CMI determinados foram inferiores aos reportados na bibliografia, no caso do meio 7H9 com OADC e S2 (<0,25 µg/mL) e, superiores no caso do meio A e S1 (1.0 µg/mL, 4x superior em relação a 7H9 com OADC e S2. A CMI de ciprofloxacina, destacou-se quando *M. smegmatis* cresceu no meio A, sendo 4x menor do que nos restantes meios. A CMI para isoniazida determinada nos diferentes meios foi diferente, 16 µg/mL nos meios A e S1 e 2 µg/mL no meio S2. Comparando com um estudo em que usaram a mesma estirpe de *M. smegmatis* e o mesmo método, mas em meio Brain-Heart Infusion (BHI), a CMI determinada foi de 0.25 µg/mL para isoniazida (Abebe & , Zegeye Bonsa, 2017). Com outra estirpe de *M. smegmatis* (ATCC607), a suscetibilidade a isoniazida foi avaliada em Middlebrook 7H9 com 0.5% de Tween 80 e 0.4% de glicerol, e a CMI > 25 µg/mL (Lelovic et al., 2020). Comparando os valores das CMI para os diferentes antibióticos, nas diferentes condições com os breakpoints indicados para MCR (Tabela 6), apenas para meropenem houve alteração no perfil de suscetível para intermédio, quando a espécie cresceu no meio S1, sem ZnSO₄.

Tabela 7 - Suscetibilidade de culturas de *M. smegmatis* a 4 antibacterianos.

Antibiótico (µg/mL)	<i>M. smegmatis</i> mc ² 155 7H9 + OADC	<i>M. smegmatis</i> mc ² 155 Meio A	<i>M. smegmatis</i> mc ² 155 Meio S1	<i>M. smegmatis</i> mc ² 155 Meio S2	<i>M. smegmatis</i> mc ² 155 ¹	<i>M. smegmatis</i> ATCC607 ²
Amicacina	<0.25 ^S	1 ^S	1 ^S	<0.25 ^S	-	0.39 ^S
Ciprofloxacina	64 ^R	16 ^R	64 ^R	64 ^R	-	3.2-6.25 ^R
Isoniazida	4 ^R	16 ^R	16 ^R	2 ^R	0.25 ^S	>25 ^R
Meropenem	4 ^S	4 ^S	8 ^I	4 ^S	-	-

1 – Retirado de (Abebe & , Zegeye Bonsa, 2017)

2 – Retirado de (Lelovic et al., 2020)

No caso de *M. hassiacum*, para além dos meios mencionados acima, a suscetibilidade foi testada para culturas em meio GPHF (Tabela 8).

Em 7H9 suplementado com OADC e no meio A, a CMI para de amicacina, foi 2x superior ao determinado nas restantes condições (Tabela 8). Para isoniazida e meropenem, nos meios A e GPHF registaram-se menores CMI em comparação com os restantes meios. De um modo geral, para as culturas em S2, as CMI registadas para os diferentes antibacterianos foi superior.

Semelhante ao verificado para *M. smegmatis*, o perfil de suscetibilidade analisado tendo em conta a Tabela 6, apenas teve alterações com o uso do meropenem, sendo

suscetível ao antibiótico, quando *M. hassiacum* cresceu no meio A e GPHF, intermédio em 7H9 com OADC e resistente em S1 e S2.

Tabela 8 - Susceptibilidade de culturas de *M. hassiacum* a 4 antibacterianos.

Antibiótico (µg/mL)	<i>M. hassiacum</i> 44199 7H9+OADC	<i>M. hassiacum</i> 44199 Meio A	<i>M. hassiacum</i> 44199 Meio S1	<i>M. hassiacum</i> 44199 Meio S2	<i>M. hassiacum</i> 44199 GPHF	<i>M. hassiacum</i> JZ2014 ¹
Amicacina	0.5 ^S	0.5 ^S	<0.25 ^S	<0.25 ^S	<0.25 ^S	-
Ciprofloxacina	32 ^R	8 ^R	64 ^R	128 ^R	8 ^R	0.125 ^S
Isoniazida	>128 ^R	64 ^R	128 ^R	128 ^R	64 ^R	-
Meropenem	16 ^I	4 ^S	32 ^R	>128 ^R	1 ^S	-

1 – Retirado de (Deinhardt-Emmer et al., 2018)

Existem evidências que a ausência de zinco, induz hibernação dos ribossomas em *M. tuberculosis* e que poderá estar associado a resistência aos antibióticos aminoglicosídeos, kanamicina e estreptomicina (Y. Li et al., 2018). A substituição de proteínas ribossômicas que têm o motivo CXXC (C +), locais de ligação de zinco, com os seus parálogos sem zinco (C-), poderá ter influenciado a CMI de amicacina em *M. smegmatis* (Y. Li et al., 2018). No entanto, essa diferença poderá não ser relevante, uma vez que no crescimento em meio sem BSA, a CMI foi igual ao obtido para o crescimento no meio S1, sem ZnSO₄. Isto não foi relevante para a suscetibilidade de *M. hassiacum* a este antibiótico da classe aminoglicosídeos, uma vez que a CMI obtida no crescimento em S1 foi igual a S2 e GPHF.

É relevante que as diferenças na CMI e perfis de suscetibilidade, tenham sido principalmente observadas com uso de meropenem no crescimento de ambas as espécies nos diversos meios. O meropenem atua nas proteínas de ligação à penicilina na membrana citoplasmática, inibindo a biossíntese de peptidoglicano e por isso da parede celular (Drusano, 1997). Isto pode indicar que a exposição e crescimento em condições com diferentes formulações, poderá induzir alterações na parede celular, nomeadamente a integridade do complexo mAGP.

3.6 Isolado NTM21

Neste segmento do trabalho, vão ser apresentados alguns dos resultados obtidos na identificação de um isolado ambiental, que por sequenciação do genoma revelou tratar-se de uma espécie nova de micobactéria. Alinhado com o objetivo principal do trabalho, a caracterização desta nova espécie de MNT é relevante, não só contribui para o enriquecer a descrição taxonómica deste grupo de bactérias, mas é também fundamental do ponto de vista clínico, uma vez que, apesar de as MNT serem

ambientais e de não haver evidências de transmissão pessoa-a-pessoa, o potencial patogênico é uma possibilidade a ter em conta.

3.6.1 Testes bioquímicos

O isolado NTM21, é uma micobactéria de crescimento rápido. Possui a enzima catalase termoestável, consegue degradar Tween-80 pela presença de esterases. Reduz telurito e nitrato, apresenta atividade da enzima pirazinamidase e produz acetoína, que é resultado da fermentação de glucose. Não utiliza nenhum dos açúcares testados como única fonte de carbono (Tabela 9).

Tabela 9 - Características fenotípicas do isolado NTM21

Características	Resultado		
Catalase	t=0	RT	+
		68°C	+
	t=20	RT	+
		68°C	+
Tween 80	30°C		+
	35°C		+
McConkey Agar			-
Redução de Telurito			+
Nitrato redutase			+
Pirazinamidase			+
Pirrolidonil arilamidase			-
Fosfatase alcalina			-
β-Galactosidade			-
Esculina			-
Urease			-
Citrato			-
Produção de acetoína			+
Produção de indol			-
Triptofano deaminase			-
Gelatinase			-
Arginina dihidrolase			-
Lisina descarboxilase			-
Ornitina descarboxilase			-
Utilização como única fonte de carbono:	D-Mannitol		-
	Inositol		-
	D-Sorbitol		-
	L-Rhamnose		-
	L-Arabinose		-
	D-Glucose		-
	D-Sacarose		-
	Amigdalina		-

3.6.2 Testes de suscetibilidade

Dos agentes antibacterianos testados, o isolado NTM21 é resistente a ciproflaxina e isoniazida e suscetível a todos aos restantes (Tabela 10).

Tabela 10 - Suscetibilidade do isolado NTM21 a 9 antibacterianos, em meio MH catião ajustado.

Antibiótico ($\mu\text{g/mL}$)	Breakpoints CMI ($\mu\text{g/mL}$) ¹			Isolado NMT 21
	Suscetível (S)	Intermédio (I)	Resistente (R)	
Amicacina	≤ 16	32	≥ 64	$<0.25^{\text{S}}$
Cefoxitina	≤ 16	32-64	≥ 128	$<0.25^{\text{S}}$
Ciproflaxina	≤ 1	2	≥ 4	32^{R}
Claritromicina	≤ 2	4	≥ 8	$<0.25^{\text{S}}$
Isoniazida	-	-	≥ 1	4^{R}
Linezolida	≤ 8	16	≥ 32	1^{S}
Meropenem	≤ 4	8-16	≥ 32	$<0.25^{\text{S}}$
Moxifloxacina	≤ 1	2	≥ 4	$<0.25^{\text{S}}$
Trobramicina	≤ 2	4	≥ 8	1^{S}

1 – Retirados de (Pang et al., 2015; Hatakeyama et al., 2017)

Capítulo IV - Conclusão

O aumento de infecções causadas por MNT, revela que existe uma necessidade de compreender as suas características, para o desenvolvimento de alvos terapêuticos eficazes e desenhar estratégias de prevenção, dado o seu crescente impacto na saúde pública. Para isso é importante perceber os mecanismos intrínsecos que as tornam aptas à sobrevivência ambiental, assim como a sua capacidade de infecção. É especulado que os nutrientes, iões e fontes de carbono possam ter um papel importante na formação de biofilmes e agregados celulares, resultantes de alterações na regulação genética e metabólica das micobactérias.

Este trabalho baseou-se na tentativa de compreender, de que forma o meio e nutrientes disponíveis têm impacto no crescimento, na expressão do perfil de proteínas, formação de agregados celulares e biofilme, assim como na alteração da morfologia das colónias e das células.

O crescimento nos diferentes meios testados, confirmou que *M. smegmatis*, possui elevada capacidade de proliferação, mesmo quando a concentração de carbono não é elevada, quando zinco está ausente do meio e em meio com pH ácido. *M. hassiacum* não possui a mesma capacidade de proliferação em meios basais, mesmo quando exposta à sua temperatura ótima de crescimento. Isto pode resultar da necessidade de meios ricos para função ótima do metabolismo e biossíntese de moléculas.

Uma parte relevante deste trabalho, foi fazer o registo da formação de biofilme, assim como alteração da morfologia celular, quando as espécies são expostas a diferentes condições, uma vez que existem poucos estudos que se focam nestas áreas. Esta avaliação morfológica é de extrema importância, para complementar o conhecimento que temos sobre a morfologia e qual o seu papel na patologia e proliferação. Estas alterações foram evidentes em *M. smegmatis*, que apresentou morfologias distintas nos diversos meios, destacando-se no meio sem dissódio de fosfato, que atua como tampão e fonte de fosfato. A ausência deste composto torna o meio ácido e, *M. smegmatis*, para além de proliferar, forma também estruturas distintas. Em meio sólido também foram evidentes alterações morfológicas, em ambas as espécies. É perceptível que o meio e a disponibilidade de diversos compostos influenciam a morfologia das colónias. Tendo em conta estes resultados, a expressão de proteínas totais nestas condições, poderá revelar alterações que não foram registadas em meio líquido. Isto poderia ser um dos passos, para perceber o que provoca estas modificações morfológicas. O registo com microscopia de contraste de fase, foi outro passo relevante, sendo evidente que o meio tem influência a nível da

morfologia celular. Seria ainda importante utilizar outras técnicas, como microscopia eletrônica de varrimento, para avaliar a estrutura dos biofilmes e das células, e microscopia eletrônica de transmissão, para estudar possíveis alterações na arquitetura da parede celular nas diferentes condições.

A avaliação da suscetibilidade a antibióticos permitiu verificar que o meio pode influenciar a resistência a antibióticos, uma vez que foram registradas diferentes CMI, nos diferentes meios. Esta influência, foi sobretudo evidente com uso de meropenem, que é um dos antibióticos β -lactâmicos avaliados para tratamento de infecção por *M. tuberculosis*, o que indica que poderá haver correlação entre o meio, o fitness da espécie e resistência a antibióticos.

Apesar da pista inicial, de que poderia existir uma sobreexpressão de proteínas no meio Middlebrook 7H9 suplementado com OADC, ter culminado na descoberta de contaminação por BSA, presente no meio, foi claro que em todos os meios se destacou uma banda com 55-60 kDa. Com a análise dessa banda foi possível identificar possíveis proteínas, que podem estar envolvidas em vias essenciais de sobrevivência de micobactérias e que podem por isso ser possíveis alvos terapêuticos, havendo evidências de que podem ter um papel na formação de biofilme e agregados celulares, assim como nos mecanismos de resistência intrínsecos das micobactérias. Para confirmar isto seria necessário construir mutantes para os genes identificados, através de técnicas de knockout ou knockdown e reavaliar o crescimento e morfologia na formação de biofilmes nas condições testadas.

A caracterização de novas espécies é importante para registrar a diversidade do gênero *Mycobacterium*, permitindo compreender o comportamento dessa espécie no ambiente e, permitindo também ter ferramentas de identificação rápida no caso de serem patogênicos oportunistas. e houver necessidade de tratamento. Testes como o crescimento em MacConkey Agar sem cristal violeta, são importantes porque podem auxiliar um diagnóstico rápido acerca da patogenicidade da espécie, no caso de ser uma MCR. Adicionalmente é importante realizar testes de suscetibilidade e disponibilizar o seu resultado, para que a informação esteja acessível no caso de a espécie ter potencial patogênico e ser possível proceder ao tratamento adequado e direcionado, sendo também necessário, no caso desta infecções atípicas, ter em conta fatores como sintomas, comorbidades do paciente e possíveis alergias.

Este trabalho é relevante tendo em conta o aumento de casos de infecção por MNT, nas últimas décadas, e o conhecimento é a melhor ferramenta para o desenvolvimento de novas terapias.

Bibliografia

- Abebe, G., & Zegeye Bonga, W. K. (2017). Treatment Outcomes and Associated Factors in Tuberculosis Patients at Jimma University Medical Center: A 5-Year Retrospective Study Gemed. *International Journal of Mycobacteriology*, 6(3), 239–245. <https://doi.org/10.4103/ijmy.ijmy>
- Alarico, S., Costa, M., Sousa, M. S., Maranhã, A., Lourenço, E. C., Faria, T. Q., Ventura, M. R., & Empadinhas, N. (2014). Mycobacterium hassiacum recovers from nitrogen starvation with up-regulation of a novel glucosylglycerate hydrolase and depletion of the accumulated glucosylglycerate. *Scientific Reports*, 4, 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep06766>
- Alarico, S., Nunes-Costa, D., Silva, A., Costa, M., Macedo-Ribeiro, S., & Empadinhas, N. (2020). A genuine mycobacterial thermophile: Mycobacterium hassiacum growth, survival and GpgS stability at near-pasteurization temperatures. *Microbiology (United Kingdom)*, 166(5), 474–483. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000898>
- Alderwick, L. J., Harrison, J., Lloyd, G. S., & Birch, H. L. (2015). *T 1969*; 1–15.
- B, J., & GJ., H. (2020). MacConkey Medium. *StatPearls [Internet]*.
- Baker, J. J., & Abramovitch, R. B. (2018). Genetic and metabolic regulation of Mycobacterium tuberculosis acid growth arrest. *Scientific Reports*, 8(1), 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22343-4>
- Baldwin, M. A. (2004). Protein identification by mass spectrometry: Issues to be considered. *Molecular and Cellular Proteomics*, 3(1), 1–9. <https://doi.org/10.1074/mcp.R300012-MCP200>
- Best, C. A., & Best, T. J. (2009). Mycobacterium smegmatis infection of the hand. *Hand*, 4(2), 165–166. <https://doi.org/10.1007/s11552-008-9147-6>
- Bhalla, G. S., Sarao, M. S., Kalra, D., Bandyopadhyay, K., & John, A. R. (2018). Methods of phenotypic identification of non-tuberculous mycobacteria. *Practical Laboratory Medicine*, 12(March). <https://doi.org/10.1016/j.plabm.2018.e00107>
- Bhatt, A., Fujiwara, N., Bhatt, K., Gurcha, S. S., Kremer, L., Chen, B., Chan, J., Porcelli, S. A., Kobayashi, K., Besra, G. S., & Jacobs, W. R. (2007). Deletion of kasB in Mycobacterium tuberculosis causes loss of acid-fastness and subclinical latent tuberculosis in immunocompetent mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(12), 5157–5162. <https://doi.org/10.1073/pnas.0608654104>
- Borrego, S., Niubó, E., Ancheta, O., & Espinosa, M. E. (2000). Study of the microbial aggregation in Mycobacterium using image analysis and electron microscopy. *Tissue and Cell*, 32(6), 494–500. [https://doi.org/10.1016/S0040-8166\(00\)80005-1](https://doi.org/10.1016/S0040-8166(00)80005-1)
- Brown-Elliott, B. A., Killingley, J., Vasireddy, S., Bridge, L., & Wallace, R. J. (2016). In vitro comparison of ertapenem, meropenem, and imipenem against isolates of rapidly growing mycobacteria and nocardia by use of broth microdilution and etest. In *Journal of Clinical Microbiology* (Vol. 54, Issue 6, pp. 1586–1592). <https://doi.org/10.1128/JCM.00298-16>
- Butler, W. R., & Guthertz, L. S. (2001). Mycolic acid analysis by high-performance liquid

- chromatography for identification of mycobacterium species. *Clinical Microbiology Reviews*, 14(4), 704–726. <https://doi.org/10.1128/CMR.14.4.704-726.2001>
- Campbell, I., Drobniewski, F., Novelli, V., Ormerod, P., & Pozniak, A. (2000). Management of opportunist mycobacterial infections: Joint Tuberculosis Committee guidelines 1999. *Thorax*, 55(3), 210–218. <https://doi.org/10.1136/thorax.55.3.210>
- Carter, G., Wu, M., Drummond, D. C., & Bermudez, L. E. (2003). Characterization of biofilm formation by clinical isolates of *Mycobacterium avium*. *Journal of Medical Microbiology*, 52(9), 747–752. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.05224-0>
- Castro-Escarpulli, G., Alonso-Aguilar, N. M., Sánchez, G. R., Bocanegra-Garcia, V., Guo, X., Juárez-Enríquez, S. R., Luna-Herrera, J., Martínez, C. M., & Guadalupe, A.-A. M. (2015). Identification and Typing Methods for the Study of Bacterial Infections: a Brief Review and Mycobacterial as Case of Study. *IMedPub Journals*, 7(December), 1–10. <https://www.semanticscholar.org/paper/Identification-and-Typing-Methods-for-theStudy-of-a-Castro-Escarpulli-Alonso-Aguilar/7932c77b1c7a684d11d200a070e80eec4de05cf5>
- Chakraborty, P., & Kumar, A. (2019). The extracellular matrix of mycobacterial biofilms: Could we shorten the treatment of mycobacterial infections? *Microbial Cell*, 6(2), 105–122. <https://doi.org/10.15698/mic2019.02.667>
- Chew, S. Y., Ho, K. L., Cheah, Y. K., Sandai, D., Brown, A. J. P., & Lung Than, L. T. (2019). Physiologically relevant alternative carbon sources modulate biofilm formation, cell wall architecture, and the stress and antifungal resistance of *Candida glabrata*. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(13), 1–13. <https://doi.org/10.3390/ijms20133172>
- Cook, G. M., Berney, M., Gebhard, S., Heinemann, M., Cox, R. A., Danilchanka, O., & Niederweis, M. (2009). Physiology of Mycobacteria. *Advances in Microbial Physiology*, 55(09). [https://doi.org/10.1016/S0065-2911\(09\)05502-7](https://doi.org/10.1016/S0065-2911(09)05502-7)
- Cougoule, C., Constant, P., Etienne, G., Daffé, M., & Maridonneau-Parini, I. (2002). Lack of fusion of azurophil granules with phagosomes during phagocytosis of *Mycobacterium smegmatis* by human neutrophils is not actively controlled by the bacterium. *Infection and Immunity*, 70(3), 1591–1598. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.3.1591-1598.2002>
- Dahl, J. L. (2004). Electron microscopy analysis of *Mycobacterium tuberculosis* cell division. *FEMS Microbiology Letters*, 240(1), 15–20. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.09.004>
- De Voss, J. J., Rutter, K., Schroeder, B. G., & Barry, C. E. (1999). Iron acquisition and metabolism by mycobacteria. *Journal of Bacteriology*, 181(15), 4443–4451. <https://doi.org/10.1128/jb.181.15.4443-4451.1999>
- Deinhardt-Emmer, S., Horing, S., Mura, C., Hillemann, D., Hermann, B., Sachse, S., Bohnert, J., & Löffler, B. (2018). First time isolation of *Mycobacterium hassiacum* from a respiratory sample. *Clinical Medicine Insights: Circulatory, Respiratory and Pulmonary Medicine*, 12, 13–15. <https://doi.org/10.1177/1179548417747529>
- DePas, W. H., Bergkessel, M., & Newman, D. K. (2019). Aggregation of nontuberculous mycobacteria is regulated by carbon: Nitrogen balance. *BioRxiv*, 10(4), 1–17. <https://doi.org/10.1101/631283>

- Devulder, G., de Montclos, M. P., & Flandrois, J. P. (2005). A multigene approach to phylogenetic analysis using the genus *Mycobacterium* as a model. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *55*(1), 293–302. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63222-0>
- Dincer, S., Uslu Masume, F., & Delik, A. (2013). Antibiotic Resistance in Biofilm. *Intech*, *15*(1), 13. <https://www.intechopen.com/books/advanced-biometric-technologies/liveness-detection-in-biometrics%0Ahttps://doi.org/10.32725/jab.2004.016>
- Ding, X., Liu, Z., Su, J., & Yan, D. (2014). Human serum inhibits adhesion and biofilm formation in *Candida albicans*. *BMC Microbiology*, *14*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-14-80>
- Domenech, P., Menendez, M. C., & Garcia, M. J. (1994). Restriction fragment length polymorphisms of 16S rRNA genes in the differentiation of fast-growing mycobacterial species. *FEMS Microbiology Letters*, *116*(1), 19–24. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1994.tb06669.x>
- Dow, A., & Priscic, S. (2018). Alternative ribosomal proteins are required for growth and morphogenesis of *Mycobacterium smegmatis* under zinc limiting conditions. *PLoS ONE*, *13*(4), 1–22. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196300>
- Drusano, G. (1997). Meropenem: Laboratory and clinical data. *Clinical Microbiology and Infection*, *3*(SUPPL. 4), 4S51-4S59. [https://doi.org/10.1016/s1198-743x\(14\)65034-5](https://doi.org/10.1016/s1198-743x(14)65034-5)
- Esteban, J., & García-Coca, M. (2018). *Mycobacterium* biofilms. *Frontiers in Microbiology*, *8*(JAN), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02651>
- Etienne, G., Villeneuve, C., Billman-Jacobe, H., Astarie-Dequeker, C., Dupont, M. A., & Daffé, M. (2002). The impact of the absence of glycopeptidolipids on the ultrastructure, cell surface and cell wall properties, and phagocytosis of *Mycobacterium smegmatis*. *Microbiology*, *148*(10), 3089–3100. <https://doi.org/10.1099/00221287-148-10-3089>
- Falkinham, J. O. (2018). Challenges of NTM drug development. *Frontiers in Microbiology*, *9*(JUL), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01613>
- Fanglian, H. (2011). Bradford Protein Assay Fanglian He. *Bio-Protocol*, *1*, 4–5.
- Fay, A., & Glickman, M. S. (2014). An Essential Nonredundant Role for Mycobacterial DnaK in Native Protein Folding. *PLoS Genetics*, *10*(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004516>
- Fedrizzi, T., Meehan, C. J., Grottola, A., Giacobazzi, E., Fregni Serpini, G., Tagliazucchi, S., Fabio, A., Bettua, C., Bertorelli, R., De Sanctis, V., Rumpianesi, F., Pecorari, M., Jousson, O., Tortoli, E., & Segata, N. (2017). Genomic characterization of Nontuberculous Mycobacteria. *Scientific Reports*, *7*(August 2016), 1–14. <https://doi.org/10.1038/srep45258>
- Florio, W., Batoni, G., Esin, S., Bottai, D., Maisetta, G., Favilli, F., Brancatisano, F. L., & Campa, M. (2006). Influence of culture medium on the resistance and response of *Mycobacterium bovis* BCG to reactive nitrogen intermediates. *Microbes and Infection*, *8*(2), 434–441. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2005.07.013>
- Forbes, B. A. (2017). Mycobacterial taxonomy. *Journal of Clinical Microbiology*, *55*(2), 380–383.

<https://doi.org/10.1128/JCM.01287-16>

- Franzblau, S. G., Degroote, M. A., Cho, S. H., Andries, K., Nuermberger, E., Orme, I. M., Mdluli, K., Angulo-Barturen, I., Dick, T., Dartois, V., & Lenaerts, A. J. (2012). Comprehensive analysis of methods used for the evaluation of compounds against *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis*, *92*(6), 453–488. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2012.07.003>
- Guallar-Garrido, S., Ez, V., Sánchez-Chardi, A., Luquin, M., & Julián, E. (2020). Each mycobacterium requires a specific culture medium composition for triggering an optimized immunomodulatory and antitumoral effect. *Microorganisms*, *8*(5), 1–16. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8050734>
- Guérin-Faubleé, V., Flandrois, J. P., Pichat, C., Boschiroli, M. L., & Lamy, B. (2013). *Mycobacterium bourgelatii* sp. nov., a rapidly growing, non-chromogenic species isolated from the lymph nodes of cattle. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *63*(PART 12), 4669–4674. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.051979-0>
- Gundavda, M. K., Patil, H. G., Agashe, V. M., Soman, R., Rodrigues, C., & Deshpande, R. B. (2017). Nontuberculous mycobacterial infection of the musculoskeletal system in immunocompetent hosts. *Indian Journal of Orthopaedics*, *51*(2), 205–212.
- Gupta, R. S., Lo, B., & Son, J. (2018). Phylogenomics and comparative genomic studies robustly support division of the genus *Mycobacterium* into an emended genus *Mycobacterium* and four novel genera. *Frontiers in Microbiology*, *9*(FEB), 1–41. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00067>
- Hammond, A., Dertien, J., Colmer-Hamood, J. A., Griswold, J. A., & Hamood, A. N. (2010). Serum inhibits *P. aeruginosa* biofilm formation on plastic surfaces and intravenous catheters. *The Journal of Surgical Research*, *159*(2), 735–746. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2008.09.003>
- Hatakeyama, S., Ohama, Y., Okazaki, M., Nukui, Y., & Moriya, K. (2017). Antimicrobial susceptibility testing of rapidly growing mycobacteria isolated in Japan. In *BMC Infectious Diseases* (Vol. 17, Issue 1). <https://doi.org/10.1186/s12879-017-2298-8>
- Hu, C., Huang, L., Cai, M., Wang, W., Shi, X., & Chen, W. (2019). Characterization of non-tuberculous mycobacterial pulmonary disease in Nanjing district of China. *BMC Infectious Diseases*, *19*(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/s12879-019-4412-6>
- Jackson, M., & Brennan, P. J. (2009). Polymethylated polysaccharides from *Mycobacterium* species revisited. *Journal of Biological Chemistry*, *284*(4), 1949–1953. <https://doi.org/10.1074/jbc.R800047200>
- Jarzembowski, J. A., & Young, M. B. (2008). Nontuberculous mycobacterial infections. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, *132*(8), 1333–1341.
- Julián, E., Roldán, M., Sánchez-Chardi, A., Astola, O., Agustí, G., & Luquin, M. (2010). Microscopic cords, a virulence-related characteristic of *Mycobacterium tuberculosis*, are also present in nonpathogenic mycobacteria. *Journal of Bacteriology*, *192*(7), 1751–1760. <https://doi.org/10.1128/JB.01485-09>
- Kent, P. T., & Kubica, G. P. (1985). *Public Health Mycobacteriology: A Guide for the Level III*

Laboratory. *Centers for Disease Control (U.S.)*.

- Kim, J. H., Yun, E. J., Seo, N., Yu, S., Kim, D. H., Cho, K. M., An, H. J., Kim, J., Choi, I., & Kim, K. H. (2017). Enzymatic liquefaction of agarose above the sol – gel transition temperature using a thermostable endo-type β -agarase , Aga16B. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1111–1120. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7831-y>
- Kubica, G. P., & Vitvitsky, J. (1974). Comparison of Two Commercial Formulations of the MacConkey Agar Test for Mycobacteria. *Applied Microbiology*, 27(5), 917–919. <https://doi.org/10.1128/am.27.5.917-919.1974>
- Lee, H. W., Kim, M. N., Shim, T. S., Bai, G. H., & Pai, C. H. (2002). Nontuberculous mycobacterial pulmonary infection in immunocompetent patients. *Tuberculosis and Respiratory Diseases*, 53(2), 173–182. <https://doi.org/10.4046/trd.2002.53.2.173>
- Lelliott, R. A., & Stead., D. E. (1987). Methods for the Diagnosis of Bacterial Diseases of Plants. In *Methods in plant pathology* (pp. 195–196). British Society for Plant Pathology by Blackwell Scientific Publications.
- Lelliott, R. A., & Stead, D. E. (1987). Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants. In Oxford (Ed.), *Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants*. (p. 195,196). Blackwell Scientific Publications.
- Lelovic, N., Mitachi, K., Yang, J., Lemieux, M. R., Ji, Y., & Kurosu, M. (2020). Application of Mycobacterium smegmatis as a surrogate to evaluate drug leads against Mycobacterium tuberculosis. *Journal of Antibiotics*, 73(11), 780–789. <https://doi.org/10.1038/s41429-020-0320-7>
- Li, G., Lian, L. L., Wan, L., Zhang, J., Zhao, X., Jiang, Y., Zhao, L. L., Liu, H., & Wan, K. (2013). Antimicrobial susceptibility of standard strains of nontuberculous mycobacteria by microplate Alamar Blue assay. *PLoS ONE*, 8(12), 4–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084065>
- Li, Y., Sharma, M. R., Koripella, R. K., Yang, Y., Kaushal, P. S., Lin, Q., Wade, J. T., Gray, T. A., Derbyshire, K. M., Agrawal, R. K., & Ojha, A. K. (2018). Zinc depletion induces ribosome hibernation in mycobacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(32), 8191–8196. <https://doi.org/10.1073/pnas.1804555115>
- Lynn, M., Wilson, A. R., & Solotorovsky, M. (1979). Role of bovine serum albumin in the nutrition of Mycobacterium tuberculosis. *Applied and Environmental Microbiology*, 38(5), 806–810. <https://doi.org/10.1128/aem.38.5.806-810.1979>
- Manca, C., Paul, S., Barry, C. E., Freedman, V. H., & Kaplan, G. (1999). Mycobacterium tuberculosis catalase and peroxidase activities and resistance to oxidative killing in human monocytes in vitro. *Infection and Immunity*, 67(1), 74–79. <https://doi.org/10.1128/iai.67.1.74-79.1999>
- Manina, G., Dhar, N., & McKinney, J. D. (2015). Stress and host immunity amplify mycobacterium tuberculosis phenotypic heterogeneity and induce nongrowing metabolically active forms. *Cell Host and Microbe*, 17(1), 32–46.

<https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.11.016>

- Matthiesen, R. (2007). *Mass Spectrometry Data Analysis in Proteomics* (367th ed.). Humana Press.
- Melaugh, G., Hutchison, J., Kragh, K. N., Irie, Y., Roberts, A., Bjarnsholt, T., Diggle, S. P., Gordon, V. D., & Allen, R. J. (2016). Shaping the growth behaviour of biofilms initiated from bacterial aggregates. *PLoS ONE*, *11*(3), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149683>
- Mendes, V., Maranha, A., Alarico, S., & Empadinhas, N. (2012). Biosynthesis of mycobacterial methylglucose lipopolysaccharides. *Natural Product Reports*, *29*(8), 834–844.
- Meneguello, J. E., Oliveira, J. V., Lima, L. S., Siqueira, V. L. D., Scodro, R. B. de L., Caleffi-Ferracioli, K. R., & Cardoso, R. F. (2018). Fast detection of *Mycobacterium tuberculosis* in culture-positive sputum samples by nitrate reductase activity. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, *54*(1), 1–8. <https://doi.org/10.1590/s2175-97902018000100014>
- Miyamoto, Y., Mukai, T., Takeshita, F., Nakata, N., Maeda, Y., Kai, M., & Makino, M. (2004). Aggregation of mycobacteria caused by disruption of fibronectin-attachment protein-encoding gene. *FEMS Microbiology Letters*, *236*(2), 227–234. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.05.047>
- Nielsen, C. K., Kjems, J., Mygind, T., Snabe, T., & Meyer, R. L. (2016). Effects of tween 80 on growth and biofilm formation in laboratory media. *Frontiers in Microbiology*, *7*(NOV), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01878>
- O'Brien, L. M., Gordon, S. V., Roberts, I. S., & Andrew, P. W. (1996). Response of *Mycobacterium smegmatis* to acid stress. *FEMS Microbiology Letters*, *139*(1), 11–17. [https://doi.org/10.1016/0378-1097\(96\)00098-5](https://doi.org/10.1016/0378-1097(96)00098-5)
- Ojha, A., Anand, M., Bhatt, A., Kremer, L., Jacobs, W. R., & Hatfull, G. F. (2005). GroEL1: A dedicated chaperone involved in mycolic acid biosynthesis during biofilm formation in mycobacteria. *Cell*, *123*(5), 861–873. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.09.012>
- Ojha, A., & Hatfull, G. F. (2007). The role of iron in *Mycobacterium smegmatis* biofilm formation: The exochelin siderophore is essential in limiting iron conditions for biofilm formation but not for planktonic growth. *Molecular Microbiology*, *66*(2), 468–483. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05935.x>
- Oren, A., Chuvochina, M., Schink, B., & Ventura, S. (2019). Naming classes of prokaryotes based on the rules of Latin grammar. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *69*(5), 1526–1527. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003311>
- Pang, H., Li, G., Zhao, X., Liu, H., Wan, K., & Yu, P. (2015). Drug susceptibility testing of 31 antimicrobial agents on rapidly growing mycobacteria isolates from China. *BioMed Research International*, *2015*. <https://doi.org/10.1155/2015/419392>
- Pasula, R., Wisniowski, P., & Martin, W. J. (2002). Fibronectin facilitates *Mycobacterium tuberculosis* attachment to murine alveolar macrophages. *Infection and Immunity*, *70*(3), 1287–1292. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.3.1287-1292.2002>
- Piddington, D. L., Kashkouli, A., & Buchmeier, N. A. (2000). Growth of *Mycobacterium*

- tuberculosis in a defined medium is very restricted by acid pH and Mg²⁺ levels. *Infection and Immunity*, 68(8), 4518–4522. <https://doi.org/10.1128/IAI.68.8.4518-4522.2000>
- Portaels, F., & Pattyn, S. R. (1982). Growth of mycobacteria in relation to the pH of the medium. *Annales de Microbiologie*, 133(2), 213–221. <http://europepmc.org/abstract/MED/7149523>
- Pradhan, P., & Tamang, J. P. (2019). Phenotypic and Genotypic Identification of Bacteria Isolated From Traditionally Prepared Dry Starters of the Eastern Himalayas. *Frontiers in Microbiology*, 10(November), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02526>
- Priestman, M., Thomas, P., Robertson, B. D., & Shahrezaei, V. (2017). Mycobacteria modify their cell size control under sub-optimal carbon sources. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 5(JUL). <https://doi.org/10.3389/fcell.2017.00064>
- Pym, A. S., Domenech, P., Honoré, N., Song, J., Deretic, V., & Cole, S. T. (2001). Regulation of catalase-peroxidase (KatG) expression, isoniazid sensitivity and virulence by furA of Mycobacterium tuberculosis. *Molecular Microbiology*, 40(4), 879–889. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02427.x>
- Ramirez, M. S., & Tolmasky, M. E. (2017). Amikacin: Uses, resistance, and prospects for inhibition. *Molecules*, 22(12). <https://doi.org/10.3390/molecules22122267>
- Rao, M., Streur, T. L., Aldwell, F. E., & Cook, G. M. (2001). Intracellular pH regulation by Mycobacterium smegmatis and Mycobacterium bovis BCG. *Microbiology*, 147(4), 1017–1024. <https://doi.org/10.1099/00221287-147-4-1017>
- Rigouts, L., & Cogneau, S. (2021). The Genus Mycobacterium. *Practical Handbook of Microbiology*, 443–464. <https://doi.org/10.1201/9781003099277-35>
- Ripoll-Rozada, J., Costa, M., Manso, J. A., Maranhã, A., Miranda, V., Sequeira, A., Rita Ventura, M., Macedo-Ribeiro, S., Pereira, P. J. B., & Empadinhas, N. (2019). Biosynthesis of mycobacterial methylmannose polysaccharides requires a unique 1-O-methyltransferase specific for 3-O-methylated mannosides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(3), 835–844. <https://doi.org/10.1073/pnas.1813450116>
- Rosen, B. C., Dillon, N. A., Peterson, N. D., Minato, Y., & Baughn, A. D. (2016). Long-Chain Fatty Acyl Coenzyme A Ligase FadD2 Mediates Intrinsic Pyrazinamide Resistance in Mycobacterium tuberculosis. 61(2), 1–13.
- Runyon, E. H. (1959). Anonymous mycobacteria in pulmonary disease. *Medical Clinics of North America*, 43(1), 273–290.
- Ryu, Y. J., Koh, W. J., & Daley, C. L. (2016). Diagnosis and treatment of nontuberculous mycobacterial lung disease: Clinicians' perspectives. *Tuberculosis and Respiratory Diseases*, 79(2), 74–84. <https://doi.org/10.4046/trd.2016.79.2.74>
- Salaemae, W., Booker, G. W., & Polyak, S. W. (2016). The Role of Biotin in Bacterial Physiology and Virulence: a Novel Antibiotic Target for Mycobacterium tuberculosis. *Microbiology Spectrum*, 4(2), 1–20. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.vmbf-0008-2015>
- Schröder, K. H., Naumann, L., Kroppenstedt, R. M., & Reischl, U. (1997). Mycobacterium hassiacum sp. nov., a new rapidly growing thermophilic mycobacterium. *International*

Journal of Systematic Bacteriology, 47(1), 86–91. <https://doi.org/10.1099/00207713-47-1-86>

- Skerman, V. B. D., McGowan, V., & Sneath, P. H. A. (1980). Approved lists of bacterial names. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 30(1), 225–420. <https://doi.org/10.1099/00207713-30-1-225>
- Smith, R. F., Voss, J. L., & Bailey, R. K. (1977). Tellurite reduction test to aid in the recognition of *Corynebacterium vaginale*. *Journal of Clinical Microbiology*, 5(3), 375–377.
- Sousa, S., Bandeira, M., Carvalho, P. A., Duarte, A., & Jordao, L. (2015). Nontuberculous mycobacteria pathogenesis and biofilm assembly. *International Journal of Mycobacteriology*, 4(1), 36–43. <https://doi.org/10.1016/j.ijmyco.2014.11.065>
- Spiering, R., Van Der Zee, R., Wagenaar, J., Van Eden, W., & Broere, F. (2013). Mycobacterial and mouse HSP70 have immuno-modulatory effects on dendritic cells. *Cell Stress and Chaperones*, 18(4), 439–446. <https://doi.org/10.1007/s12192-012-0397-4>
- Stahl, D. A., & Urbance, J. W. (1990). The division between fast- and slow-growing species corresponds to natural relationships among the mycobacteria. *Journal of Bacteriology*, 172(1), 116–124. <https://doi.org/10.1128/jb.172.1.116-124.1990>
- Steadham, J. E. (1979). *Reliable Urease Test for Identification of Mycobacteria*. 10(2), 134–137.
- T, J. A. S., J, R., Rajan, A., & Shankar, V. (2020). Features of the biochemistry of *Mycobacterium smegmatis*, as a possible model for *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Infection and Public Health*, 13(9), 1255–1264. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2020.06.023>
- Tomioka, H., Saito, H., Sato, K., & Dawson, D. J. (1990). Arylsulfatase activity for differentiating *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare*. *Journal of Clinical Microbiology*, 28(9), 2104–2106. <https://doi.org/10.1128/jcm.28.9.2104-2106.1990>
- Tortoli, E. (2014). Microbiological features and clinical relevance of new species of the genus *Mycobacterium*. *Clinical Microbiology Reviews*, 27(4), 727–752. <https://doi.org/10.1128/CMR.00035-14>
- Tortoli, E., Brown-Elliott, B. A., Chalmers, J. D., Cirillo, D. M., Daley, C. L., Emler, S., Andres Floto, R., Garcia, M. J., Hoefsloot, W., Koh, W. J., Lange, C., Loebinger, M., Maurer, F. P., Morimoto, K., Niemann, S., Richter, E., Turenne, C. Y., Vasireddy, R., Vasireddy, S., ... Van Ingen, J. (2019). Same meat, different gravy: Ignore the new names of mycobacteria. *European Respiratory Journal*, 54(1), 19–21. <https://doi.org/10.1183/13993003.00795-2019>
- Tortoli, E., Fedrizzi, T., Meehan, C. J., Trovato, A., Grottola, A., Giacobazzi, E., Serpini, G. F., Tagliazucchi, S., Fabio, A., Bettua, C., Bertorelli, R., Frascarò, F., De Sanctis, V., Pecorari, M., Jousson, O., Segata, N., & Cirillo, D. M. (2017). The new phylogeny of the genus *Mycobacterium*: The old and the news. *Infection, Genetics and Evolution*, 56(August), 19–25. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.10.013>
- Trautman, J. R. (1984). A brief history of Hansen's disease. *Bulletin of the New York Academy of Medicine: Journal of Urban Health*, 60(7), 689–695.

- Trevisan, V. (1889). *Generi e le Specie delle Batteriacee. Milano:Zanaboni and Gabuzzi, I.*
- Tsukamura, M. (1983). Numerical Classification of 280 Strains of Slowly Growing Mycobacteria. In *Microbiology and Immunology* (Vol. 27, Issue 4, pp. 315–334). <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.1983.tb00591.x>
- Turenne, C. Y. (2019). Nontuberculous mycobacteria: Insights on taxonomy and evolution. *Infection, Genetics and Evolution*, 72(November 2018), 159–168. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.01.017>
- Venkataswamy, M. M., Goldberg, M. F., Baena, A., Chan, J., Jacobs, W. R., & Porcelli, S. A. (2012). In vitro culture medium influences the vaccine efficacy of Mycobacterium bovis BCG. *Vaccine*, 30(6), 1038–1049. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.12.044>
- Veyrier, F., Pletzer, D., Turenne, C., & Behr, M. A. (2009). *step-wise genesis of Mycobacterium tuberculosis*. 14, 1–14. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-9-196>
- Wang, Y., & Yi, J. (2016). *Chemotaxonomy of Actinobacteria*.
- Zhang, G. F., Liu, X., Zhang, S., Pan, B., & Liu, M. L. (2018). Ciprofloxacin derivatives and their antibacterial activities. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 146, 599–612. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.01.078>