

POTENCIALIDADES BIOTECNOLÓGICAS DE BACILLUS CEREUS ISOLADO EM UMA CAVERNA

Ariana Alves RODRIGUES*

Aysha Jussara Ivonilde CARRIM*

Geraldo SADOYMA**

José Daniel Gonçalves VIEIRA** - jdgvieira62@yahoo.com.br

* Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical do Instituto de Patologia Tropical da Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás.

** Instituto de Patologia Tropical da Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás.

Abstract

There is a few known concerning distribution, population dynamics and biogeochemical processes of cave microorganisms. The objective of this study was to isolate cave microorganisms to determine your relative and potential activity of enzymatic and antibiotic production. The collection of samples, for subsequent isolation, they were accomplished at the Garganta cave, located in the municipal district of Vila Propício – GO, SBE GO - 321, (15° 19' 3900" S 48° 54' 0400" W). The biochemical identification was made with the BBL Crystal kit. The antimicrobial activity was determinated with extracts obtained in the Kado agar and plates containing Müeller-Hinton agar was previously inoculated with the indicative bacteria. Determination of the enzymatic activity included: amylase, esterase, lipase, cellulase, protease, pectinase, - glucosidase and endoglucanase production. The isolated CAV1 was identified as Bacillus cereus and demonstrated to be producing of amylases, esterases, proteases, glucosidases and presented activity antimicrobial for the Staphylococcus aureus ATCC 25923, MRSA, Bacillus cereus ATCC 14579 and Bacillus subtilis ATCC 6633, Micrococcus luteus ATCC 9341. Therefore the isolated CAV1 demonstrated to be producing of biomolecules of biotechnological interest like antimicrobial and enzymes.

Introdução

As cavernas são consideradas ambientes pobres em nutrientes, nas quais a concentração de carbono orgânico fica abaixo de 0,5 mg de TOC/L (carbono orgânico total por litro). Diferentes microambientes podem ser habitados pelos microrganismos. Esta comunidade pode diferir devidos as diferentes condições de umidade, temperatura baixa e estável, a natureza dos recursos nutricionais e o pH presentes em diferentes cavernas e mesmo em locais diferentes no seu interior (Mulec et al. 2002; Engel 2007).

Os microrganismos podem habitar transitoriamente ou ser residentes em cavernas. Os microrganismos residentes sobrevivem exclusivamente dos nutrientes que estão distribuídos na caverna, diferente dos transitórios que desenvolvem-se apenas enquanto houver disponibilidade de matéria orgânica estes, entram nas mesmas através das correntes de ar, pelo fluxo de água, fluxo de sedimentos, em insetos, nos morcegos ou pelo homem (Barton e Northup 2007; Engel 2007). Qualquer organismo ou objeto que entre em uma caverna carrega microrganismos (Barton e Northup 2007).

Esporos de fungos e bactérias são normalmente encontrados no filme de água que se forma na

superfície da rocha calcária e de espeleotemas de calcita e podem contribuir na sua formação e degradação. Esta formação pode ser devida a precipitação extracelular do carbonato de cálcio mediada pelo metabolismo das bactérias (Engel et al. 2004; Barton & Luiszer 2005; Baskar et al. 2005; Baskar et al. 2006).

Pouco se sabe sobre a distribuição, dinâmica populacional e biogeoquímica dos microrganismos das cavernas e grutas (Northup & Welbourn 1997; Northup & Lavoie 2001; Geric et al. 2004; Northup & Lavoie 2004). A presença de bactérias quimiolitotróficas em cavernas é usualmente correlacionada com o aumento da diversidade de organismos nestes ambientes (Geric et al. 2004; Engel 2007). Este conhecimento freqüentemente baseia-se em estudos dependentes do cultivo microbiano, que subestimam a diversidade por incapacidade de cultivar muitos dos microrganismos (Hugenholz et al. 1998; Mulec et al. 2002, Engel 2007).

Nosso conhecimento do mundo microbiano em geral é limitado e nosso conhecimento da diversidade microbiana de cavernas é ainda mais limitado. Assim, o potencial existente para a descoberta de novos microrganismos e mesmo de microrganismos já conhecidos com novas atividades

e funções em cavernas é imenso. A investigação de tais organismos pode prover novos detalhes sobre as relações evolutivas de bactérias e fungos (Barton e Northup 2007; Kambesis 2007). O estudo de microrganismos em cavernas também é importante para a elucidação a formação dos espeleotemas. Embora haja boas evidências que os microrganismos estejam envolvidos na formação de ferro e óxidos de manganês, compostos de enxofre, depósitos de salitre e carbonato de cálcio, elas ainda são limitadas (Barton e Northup 2007; Kambesis 2007).

Objetivos

Isolar microrganismos de ambiente cavernícola, determinar sua atividade antimicrobiana, potencial de produção enzimática.

Metodologia

Isolamento e identificação de microrganismos de caverna.

As coletas de amostras foram realizadas na caverna da Garganta, situada no município de Vila Propício – GO, SBE GO - 321, (15° 19' 3900" S 48° 54' 0400" W), com desnível de 47 metros. O isolamento foi realizado a partir da exposição por 30 minutos, em diversos pontos da caverna, de placas contendo ágar nutriente. Após esse período as placas foram vedadas e transportadas ao Laboratório de Microbiologia Ambiental e Biotecnologia do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás (IPTSP/UFG), onde foram incubadas a 30°C por 7 dias. Após o crescimento os microrganismos foram isolados e purificados por esgotamento em meio sólido. Este procedimento foi repetido cinco vezes, visando à obtenção de colônias puras. A identificação foi realizada pela afinidade à coloração de Gram e através do kit bioquímico *BBL Crystal*. O microrganismo foi preservado em glicerol 50% (v/v) em freezer a -20°C.

Determinação da atividade antimicrobiana

A produção de substâncias com atividade antimicrobiana seguiu a metodologia descrita por Romeiro (1989), com modificações. Uma alíquota de 50µL do isolado preservado em glicerol foi inoculado em 5mL de caldo BHI e incubado por 24

horas a 30°C. Após este período uma alíquota de 100 µL do caldo, foi transferida para placas contendo meio sólido de Kado, de forma a ocupar toda a superfície do meio, formando um “tapete” e incubada por 48 horas a 30°C. Após o crescimento as placas foram expostas por 30 minutos à luz ultravioleta. O ágar foi então cortado e tratado com água destilada esterilizada para a extração das substâncias com atividade antimicrobiana. Os extratos resultantes foram esterilizados por filtração em filtros Millipore (0.25 µm) e mantidos a -20°C até a utilização.

Placas contendo ágar Müller-Hinton foram previamente inoculadas com as bactérias indicadoras. Após a inoculação, poços de 5,0 mm de diâmetro foram feitos e inoculados com 30 µL dos extratos previamente obtidos e incubados por 24 horas a 30°C. Após este tempo os halos de inibição de crescimento foram determinados. Como controle negativo, utilizou-se a mesma alíquota (30 µL) de extrato obtido a partir de uma placa contendo meio sólido de Kado isento de crescimento (Santos 1993).

Foram avaliadas as seguintes bactérias indicadoras:

A) gram-positivas: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* meticilina resistente (MRSA), *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 e *Bacillus cereus* ATCC 14579.

B) gram-negativas: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 e *Serratia marcescens* ATCC 14756.

Determinação da atividade enzimática

Para a determinação da atividade enzimática, o isolado foi inoculado em caldo BHI e incubado por 24 horas a 30°C. Após esse tempo, alíquotas de 100 µL foram inoculadas na superfície dos meios de cultura específicos para cada enzima a ser avaliada com o auxílio de uma multi-alça (inoculador de Stiers). As placas foram incubadas a 30°C por 48 horas. Após a incubação, foi determinado o índice enzimático que corresponde ao diâmetro dos halos de atividade enzimática em mm dividido pelo diâmetro da colônia em mm. Se o índice enzimático for maior do que 1, sugere-se a produção da enzima de interesse. Foram avaliadas a produção de

amilase, esterase, lipase, celulase, protease, pectinase, -glucosidase e endoglucanase.

Resultados

Identificação microbiana

A caracterização morfológica determinou a presença de um bastonete gram-positivo sendo identificado bioquimicamente como *Bacillus cereus*, CAV1.

Determinação da atividade antimicrobiana

Analisando os resultados da atividade antimicrobiana, observou-se que o isolado CAV1 apresentou atividade frente à *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (Figura 1), MRSA, *Bacillus cereus* ATCC 14579 e *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, não apresentando atividade frente à *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 e as bactérias gram-negativas avaliadas (Figura 1 e Tabela 1).

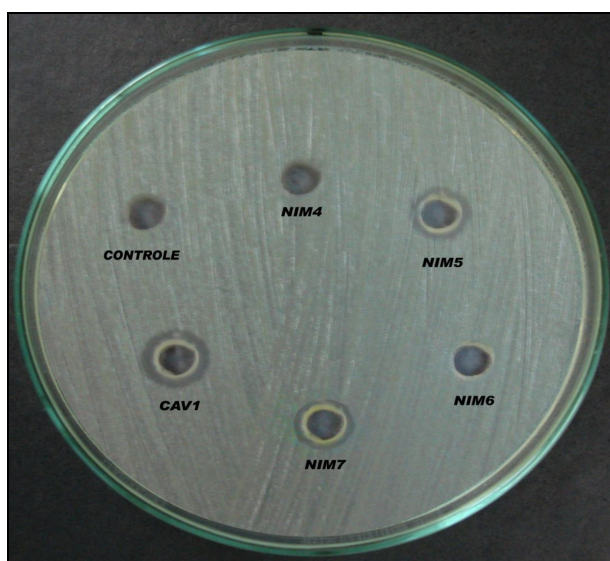


Figura 1: Atividade antimicrobiana do extrato aquoso de diferentes microrganismos frente à *S. aureus* ATCC 25923

Determinação da atividade enzimática.

O isolado *Bacillus cereus* CAV1 demonstrou ser produtor de amilases, esterases, proteases e -glucosidases, sendo negativo para as demais enzimas testadas.

Discussão

A descoberta de novos microrganismos produtores de compostos naturais desconhecidos ou de compostos previamente conhecidos ocorre quando novos sistemas de seleção são utilizados ou quando locais ainda não explorados são examinados (Nolan & Cross 1988; Vieira 1999). As cavernas são consideradas ambientes pobres em nutrientes, nas quais a concentração de carbono orgânico fica abaixo de 0.5 mg de TOC/L (carbono orgânico total por litro), entretanto encontramos uma população de microrganismos de aproximadamente 10^6 células/grama de material rochoso, diversa e metabolicamente versátil, que obtêm energia por diversos meios, incluindo a quebra de compostos aromáticos, fixação de gases e oxidando metais presentes nas rochas (Barton & Jurado 2007; Porter 2007).

Nas cavernas diferentes microambientes podem ser habitados pelos microrganismos. Estes constituem uma população microbiana de aproximadamente 10^6 células/grama de material rochoso. A comunidade pode assim possuir uma diversidade metabólica e de espécies devidos as diferentes condições de umidade, temperatura baixa e estável, a natureza dos recursos nutricionais e o pH (Northup e Lavoie 2001; Mulec et al. 2002; Engel 2007). Obtendo sua energia por diversos meios, incluindo a quebra de compostos aromáticos, fixação de gases e oxidação de metais presentes nas rochas (Barton & Jurado 2007; Porter 2007).

Bactérias e fungos que habitam cavernas são importantes por várias razões. Devido ao seu longo isolamento em relação à superfície e pelo seu crescimento em ambientes com baixa concentração de nutrientes, alguns microrganismos presentes em caverna, parecem ter evoluído para a produção de biomoléculas especializadas, ou toxinas, que são antagônicas a outros. Estas biomoléculas microbianas podem ser úteis aos humanos no combate a doenças e/ou poluição (Kambesis 2007; Portillo et al. 2008). Nosso conhecimento do mundo microbiano em geral é limitado e nosso conhecimento da diversidade microbiana de cavernas é ainda mais limitada. Assim, o potencial existente para a descoberta de novos microrganismos e mesmo de microrganismos já conhecidos com novas atividades e funções em cavernas é imenso. A investigação de tais organismos pode prover novos detalhes sobre as relações evolutivas de bactérias e fungos (Barton e Northup 2007; Kambesis 2007).

Tabela 1: Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato do isolado de caverna frente às bactérias indicadoras. Os valores dos halos indicados na tabela correspondem à média de três repetições.

Bactérias Indicadoras	Halos de Inibição (Ø mm)	
	C ¹	CAV1
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	- ²	11
<i>S. aureus</i> MRSA	-	11
<i>M. luteus</i> ATCC 9341	-	15
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	-	12
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	-	-
<i>B. cereus</i> ATCC 14579	-	11
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	-	-
<i>E. aerogenes</i> ATCC 13048	-	-
<i>S. choleraesuis</i> ATCC 10708	-	-
<i>E. coli</i> ATCC 25922	-	-
<i>S. typhimurium</i> ATCC 14028	-	-
<i>S. marcescens</i> ATCC 14756	-	-

1. (C) - Controle negativo 2. (-) indica ausência de halo

O *B. cereus* é comumente encontrado em solos úmidos, vegetais em decomposição e ainda em laticínios e abatedouros de animais, como contaminantes de seus subprodutos. São produtores das bacteriocinas denominadas cereínas e que comprovadamente apresentam um amplo e variado espectro de ação (OSCÁRIZ *et al.*, 1999). O isolado CAV1 apresentou a capacidade de inibir o crescimento da cepa-padrão *S. aureus* ATCC 25923, MRSA e a maioria dos indicadores gram-positivos avaliados.

A produção de substâncias com atividade antimicrobiana pelo isolado de caverna, pode ser explicada pela complexidade do ambiente cavernícola. Dessa forma acredita-se que haja uma cooperação entre os microrganismos de caverna, visto que poucas espécies são capazes de sintetizar todas as substâncias necessárias ao seu crescimento, sendo freqüentemente encontrados associados à biofilmes. Podendo ocorrer a competição para a aquisição dos escassos nutrientes presentes neste ambiente, independentemente das mesmas estarem em associação ou não. Esta competição pode levar a produção de substâncias que inibam o crescimento de outros microrganismos (Barton e Northup 2007; Kambesis 2007).

O espectro de ação das substâncias com atividade antimicrobiana mostrou-se restrito a gram-positivas. Microrganismos gram-positivos geralmente produzem substâncias com espectro restrito a gram-positivas, enquanto as gram-negativas podem inibir o crescimento de ambas (Klaenhammer 1988; James *et al.* 1991), tal fato foi demonstrado por Carrim (2005), que ao analisar o espectro de ação de dez endofíticos gram-positivos isolados de *Jacaranda decurrens* CHAM. (Carobinha do Campo) verificou que nenhum dos

isolados apresentou atividade antimicrobiana frente aos gram-negativos avaliados no estudo. Este padrão de atividade era esperado uma vez que o microrganismo isolado de caverna foi caracterizado como gram-positivo.

Sabe-se que as condições de crescimento microbiano *in vitro* não reproduzem totalmente as reais condições aos quais os microrganismos estão adaptados. Este fato interfere no espectro biocida observado quando há variação meio de cultivo utilizado para a produção de moléculas bioativas inibidoras de crescimento de outros microrganismos (Romeiro 1989).

O Índice Enzimático é uma ferramenta prática que viabiliza a seleção e a comparação da produção enzimática de diferentes isolados microbianos, uma vez que este índice leva em consideração a correlação direta entre o tamanho do halo e a capacidade degradativa dos microrganismos (Lin *et al.* 1991; Fungaro e Maccheroni 2002). Índices enzimáticos maiores que 1,0 são indicativos de excreção de enzimas (Fungaro e Maccheroni 2002).

Pela determinação da atividade enzimática podemos traçar um perfil das enzimas de interesse biotecnológico produzidas pelo isolado de caverna. O isolado CAV1 é produtor de diferentes enzimas (amilolítica, esterase, proteolítica e de β -glucosidase) estas, permitem possivelmente uma melhor utilização dos nutrientes e uma melhor adaptação às condições diferenciadas do ambiente cavernícola. Estas enzimas são amplamente utilizadas nas indústrias de alimentos, farmacêuticas, de detergentes, têxteis e cosméticas. As propriedades hidrolíticas das proteases, amilases e lipases favorecem o desenvolvimento das tecnologias de produção de combustíveis líquidos (álcool, biodiesel), solventes, plásticos

biodegradáveis, bem como produtos de química fina como corantes, defensivos agrícolas, sabores, fragrâncias e produtos farmacêuticos para uso humano e veterinário, a partir de matérias primas renováveis, processos menos agressivos, economicamente viáveis e ecologicamente aceitáveis (Barreto 1997; Lima 1997).

Conclusões

A partir do isolamento de microrganismos de caverna, obtivemos um isolado, *Bacillus cereus*

CAV1, que demonstrou ser produtor de biomoléculas de interesse biotecnológico como antimicrobianos e enzimas.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq pela bolsa de mestrado da primeira autora, a Coordenadoria do Curso de Pós-graduação em Medicina tropical do IPTSP/UFG e a FUNAPE (UFG) pelo aporte financeiro.

Referências bibliográficas

- Barreiro EJ, Ferreira VF, Costa PRR 1997. Substâncias Enantiomericamente Puras: A Questão dos Fármacos Quirais, *Química Nova*, v.20, p. 647.
- Barton HA, Luiszer F 2005. Microbial metabolic structure in a sulfidic cave hot spring: Potential mechanisms of biospeleogenesis. *Journal of Cave and Karst Studies*, v. 67, no. 1, p. 28-38.
- Barton HA & Jurado V 2007. What's up down there? Microbial diversity in caves. *Microbe*, v. 3, p.132-138.
- Barton HA, Northup DE 2007. Geomicrobiology in cave environments: past, current and future perspectives. *Journal of Cave and Karst Studies*, v.69, p.163-178.
- Baskar S, Baskar R, Mauclair L, McKenzie JA 2005. Evidences for microbial involvement in the genesis of speleothem carbonates, Borra Caves, Visakhapatnam, India. *Current Science*, v. 88, p.1305- 1308.
- Baskar S, Baskar R, Kaushik A 2006. Role of microbial community in stalactite formation, Sahastradhara caves, Dehradun, India. *Current Science*, v. 92, p. 350- 355.
- Carrim AJI 2005. Bioprospecção de microrganismos endofíticos com atividade enzimática e bacteriocinogênica em isolados de *Jacaranda decurrens* Cham. (CAROBINHA DO CAMPO). Dissertação de Mestrado. UFG Goiânia Goiás. 94p.
- Engel AS 2007. Observations on the biodiversity of sulfidic karst habitats. *Journal of Cave and Karst Studies*, v.69, p.187-206.
- Fungaro MHP, Maccheroni Jr W 2002. Melhoramento genético para produção de enzimas aplicadas a Indústria de Alimentos. In: Melo IS, Valadares-Inglis MC, Nass LL, Valois ACC, ed. *Recursos Genéticos e Melhoramento- Microrganismo*. Jaguariúna, São Paulo, Brasil: Embrapa Meio Ambiente, p. 426-453.
- Geric B, Pipan T, Mulec J 2004. Diversity of culturable bacteria and meiofauna in the Jame caves (Slovenia). *Acta Carsologica*, v.33, p.301-309.
- Hugenholtz P, Goebel BM, Pace NR 1998. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *J. of Bacteriology*, v.180, p.4765-4774.
- James R, Lazdunski C, Pattus F (Ed.) 1991. *Bacteriocins, Microcins and Lantibiotics*, New York: Springer, p. 519.
- Kambesis P 2007. The importance of cave exploration to scientific research. *J. of Cave and Karst Studies*, v.69, p. 46-58.

- Klaenhammer TR, 1988. Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochemie*, v.70, p.337-349.
- Lima VLE 1997. Os Fármacos e a Quiralidade uma Breve Abordagem, *Química Nova*, v.20, p.657.
- Lin JE, Chang DCN, Shen GJ 1991. Correlations among several screening methods used for identifying wood-decay fungi that can degrade toxic chemicals. *Biotechniques*, v.5, p. 275-280.
- Mulec J, Zalar P, Hajna NZ, Rupnik M 2002. Screening for culturable microorganisms from cave environments (Slovenia). *Acta Carsologica*, v.31, p.177-187.
- Nolan, RD. & Cross, T 1988. Isolation and screening of Actinomycetes. In: Actinomycetes in Biotechnology. Goodfellow, M; Willians, ST; Mordaeski, M (eds) Academic Press, 1-32, p. 501.
- Northup DE & Lavoie KH 2001. Geomicrobiology of caves. *Geomicrobiology J.*, v.18, p.199-222.
- Northup DE, Welbourn WC 1997. Life in the twilight zone: Lava tube ecology. *New Mexico Bureau of Mines & Mineral Resources Bulletin*, v.156, p.69-82.
- Northup DE, Lavoie KH 2004. Microbiology in caves. pp. 506-509. In: Gunn, John (ed.) Encyclopedia of Cave and Karst Science. New York: Fitzroy Dearborn Publishers.
- Oscáriz JC, Lasa I, Pisabarro AG 1999. Detection and characterization of cerein 7, a new bacteriocin produced by *Bacillus cereus* with a broad spectrum of activity. *FEMS Microbiology Letters*, 178, p.337-341
- Porter ML 2007. Subterranean biogeography: what have we learned from molecular techniques? *J. of Cave and Karst Studies*, v.69, p.179-186.
- Portillo MC, Gonzalez JM, Saiz-Jimenez C 2008. Metabolically active microbial communities of yellow and grey colonizations on the walls of Altamira Cave, Spain *J. of Applied Microbiology*, v.104, p. 681-691.
- Romeiro RS 1989. Constatação da produção de bacteriocinas por isolamentos de bactérias fitopatogênicas. Departamento de Fitopatologia - UFV, Viçosa, MG Brasil. p. 10.
- Santos WLM 1993. Aislamiento y caracterización parcial de una bacteriocina producida por *Pediococcus sp.* 347, de origem cárnico. Dissertação de Doutorado. Madrid: Universidade Complutense de Madrid, 294p.
- Vieira, JDG 1999. Purificação e caracterização de uma α -amilase de *Streptomyces sp.* São Paulo (Tese de Doutorado). USP, p. 116.