



## ANAIS do 33º Congresso Brasileiro de Espeleologia

Eldorado SP, 15-19 de julho de 2015 - ISSN 2178-2113 (online)



O artigo a seguir é parte integrando dos Anais do 33º Congresso Brasileiro de Espeleologia disponível gratuitamente em [www.cavernas.org.br/33cbeanais.asp](http://www.cavernas.org.br/33cbeanais.asp)

Sugerimos a seguinte citação para este artigo:

MARQUES, E.L.S.; CORREIA, D.C.; OLIVEIRA, R.B.F.; SILVA, K.B.; DIAS, J.C.T.; PIROVANI, C.P.; REZENDE, R.P.. Potencial biotecnológico de microrganismos isolados de cavernas de Paripiranga, Bahia. In: RASTEIRO, M.A.; SALLUN FILHO, W. (orgs.) CONGRESSO BRASILEIRO DE ESPELEOLOGIA, 33, 2015. Eldorado. *Anais...* Campinas: SBE, 2015. p.161-168. Disponível em: <[http://www.cavernas.org.br/anais33cbe/33cbe\\_161-168.pdf](http://www.cavernas.org.br/anais33cbe/33cbe_161-168.pdf)>. Acesso em: *data do acesso*.

Esta é uma publicação da Sociedade Brasileira de Espeleologia.  
Consulte outras obras disponíveis em [www.cavernas.org.br](http://www.cavernas.org.br)

## POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE MICRORGANISMOS ISOLADOS DE CAVERNAS DE PARIPIRANGA, BAHIA

BIOTECHNOLOGICAL POTENTIAL OF MICROORGANISMS ISOLATED FROM PARIPIRANGA CAVES, BAHIA

Eric de Lima Silva MARQUES; Denisson Chaves CORREIA; Rhyan Barros Farias de OLIVEIRA; Kaique Brito SILVA; João Carlos Teixeira DIAS; Carlos Priminho PIROVANI; Rachel Passos REZENDE

Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilheus BA.

Contatos: [marques.ericls@gmail.com](mailto:marques.ericls@gmail.com); [rezende.rachel@gmail.com](mailto:rezende.rachel@gmail.com).

### Resumo

Cavernas são ambientes pouco estudados do ponto de vista microbiológico e o potencial biotecnológico nesse ambiente ainda é muito pouco conhecido. Devido as dificuldades de cultivo com meios de cultura tradicionais, o meio solo de caverna foi testado para o cultivo desses microrganismos. Com base nisso, amostras de sedimento coletadas em duas cavernas do município de Paripiranga, Bahia foram analisadas para a presença de atividades proteolítica, amilolítica, antimicrobiana, lipolítica e de dissolução do carbonato de cálcio. Dos 31 microrganismos isolados obtidos, apenas quatro não apresentaram nenhuma atividade. Além disso, nenhuma bactéria apresentou crescimento nos dois meios de cultura tradicionais testados. Os microrganismos que apresentaram atividade antimicrobiana foram identificados por sequenciamento, sendo associados aos gêneros *Paenibacillus*, *Bacillus*, *Burkholderia* e *Acinetobacter*. Os resultados demonstraram que o meio solo pode ser utilizado para cultivo de bactérias que não são cultivadas em meios de cultura tradicionais e que o ambiente de caverna possui enzimas com potencial biotecnológico.

**Palavras-Chave:** Meio solo de caverna; biotecnologia; bactéria.

### Abstract

*Caves are poorly studied environments from a microbiological point of view and the biotechnological potential of this environment is practically unknown. Given the difficulties of cultivation using traditional culture media, 1% cave soil medium was tested for cultivation of these microorganisms. Based on this, samples collected from two caves in the municipality of Paripiranga, Bahia were analyzed for the presence of proteolytic, amylolytic, antimicrobial, lipolytic and dissolution of calcium carbonate activities. Of the 31 microorganisms obtained, only 4 showed no activity. Furthermore, no bacteria grew in both traditional culture media tested. Microorganisms that presented antimicrobial activity were identified by sequencing, being associated with genera *Paenibacillus*, *Bacillus*, *Burkholderia* and *Acinetobacter*. The results showed that the soil medium can be used for cultivation of bacteria that are not grown in traditional culture media and the cave environment has the potential biotechnological enzymes.*

**Key-words:** cave soil medium; biotechnology; Bacteria.

## 1. INTRODUÇÃO

As cavernas são ambientes pouco estudados do ponto de vista microbiológico. O isolamento físico associado às características singulares do ambiente cavernícola propiciam um habitat microbiano único, com pressões evolutivas diferentes da superfície e, com isso há uma tendência de desenvolver novos compostos e, ou novas rotas metabólicas (BARTON, 2006; BARTON & JURADO, 2007).

Dentre os novos compostos, os antimicrobianos representam um dos metabólitos mais desejados devido a sua aplicação na área

médica e industrial. As cavernas são locais com grande potencial para descoberta de novos antimicrobianos devido ao isolamento do ambiente associado a proteção da comunidade original contra microrganismos invasores (BARTON & JURADO, 2007; NAKAEW et al, 2009; CHEEPHAM, 2013), mas há poucas informações sobre atividade antimicrobiana em cavernas (LAORPAKSA et al., 1987; KIM et al., 1998; HEROLD et al., 2005).

Entretanto, a demanda por enzimas está crescendo cada vez mais (ALLBUSINESS, 2009) e as proteases, enzimas que degradam proteínas, constituem o maior mercado de enzimas. As

industriais necessitam de proteases estáveis em diferentes condições de temperatura, pH e, ou concentrações de diferentes substâncias, dependendo da utilização (SHOWEL et al., 1999; GUPTA et al., 2002). As amilases são enzimas que degradam o amido e são muito utilizadas na indústria farmacêutica e de alimentos (VAN DER MAAREL et al., 2002; SIVARAMAKRISHNAN et al., 2006). As lipases tem seu potencial biotecnológico aplicado na biotransformação, processamento de óleos, indústria farmacêutica, formulação de pesticidas, produção de detergente, entre outras atividades (HASAN et al., 2006). Essas atividades enzimáticas foram pouco estudadas em cavernas (GLAVAN, 1997; RODRIGUES et al., 2009).

A dissolução do carbonato de cálcio tem, por sua vez, uma aplicação direta na obtenção de micronutrientes associados às rochas e é uma atividade estudada em cavernas devido a possível participação na degradação natural de espeleotemas e na contribuição microbiana no processo de precipitação do carbonato (NORTHUP, 1997; LAIZ et al., 1999; BARTON et al., 2007; BANKS et al., 2010).

Com isso, o presente trabalho avaliou o potencial biotecnológico de duas cavernas no município de Paripiranga, Bahia para as atividades antimicrobianas, proteolítica, lipolítica, amilolítica e a capacidade de dissolver o carbonato de cálcio.

## 2. METODOLOGIA

### 2.1 Coleta de amostras

Amostras de solo e água de gotejamento foram coletadas (autorização do ICMBio/SISBio nº 26304-1) na Furna do Fim do Morro do Parafuso (FFMP; 10°38'25.89" S e 37°52'04.13" O) e Gruta do Bom Pastor (GBP; 10°39'05.99" S e 37°55'26.87" O) localizadas no município de Paripiranga, Bahia.

Duas amostragens de sedimento foram feitas em cada caverna no final da última e da penúltima câmaras das cavernas citadas. A amostragem foi feita de maneira composta em cinco pontos de coleta com distância entre dois pontos de aproximadamente 1 m. As amostras foram coletadas e armazenadas em sacos plásticos estéreis e mantidas a temperatura de 4 a 10°C até chegar ao laboratório.

### 2.2 Isolamento de bactérias

As bactérias foram isoladas utilizando meio solo a 1% para as amostras de sedimento e meio água de gotejamento para as amostras de água de gotejamento. Uma solução de 10% de sedimento foi preparada com cada amostra e dela foi retirada uma alíquota para que a concentração final do meio fique a 1% contendo também 15 g/L de ágar.

Para o isolamento de microrganismos, 100 µL das amostras de sedimento a 10% foram semeadas em superfície nos respectivos meios de cultura e posteriormente incubadas a 30°C e 60 dias, com verificação de colônias no 21º e no 60º dia. As colônias obtidas foram purificadas, um exemplar de cada morfotipo para cada plaqueamento, e armazenadas em solução de glicerol a 20% em freezer -20°C.

### 2.3 Tentativas de cultivo em meios TSA (tryptic soy agar) e LB (Luria-Bertani)

Os isolados obtidos foram inoculados em meios TSA e meio LB. 10 µL de cada cultura foi inoculada nesses meios e incubadas por até 30 dias a 30 e 37°C. Após esse tempo a presença de colônia foi verificada.

### 2.4 Avaliação do potencial biotecnológico

Os isolados foram cultivados em meio líquido contendo água destilada e solo de caverna a 1% por 15 a 21 dias sob agitação de 150 rpm a 30°C. Posteriormente foram retiradas alíquotas para os ensaios realizados em triplicatas dos itens 2.3.1 a 2.3.5.

Os ensaios foram realizados inoculando 10 µL da cultura bacteriana em placas de Petri contendo meio solo de caverna a 1% acrescido de substrato também a 1%. Exceto para a atividade antimicrobiana que não houve acréscimo de substrato. A incubação foi realizada em estufa a 30°C por até quinze dias.

#### 2.4.1 Atividade proteolítica

O substrato utilizado foi leite desnatado a 1%. Após incubação, a presença, ou ausência do halo de degradação da proteína do leite indicava se a bactéria possui ou não a atividade.

#### 2.4.2 Atividade amilolítica

O substrato utilizado para esse teste foi amido a 1%. A visualização do halo foi feito com solução de iodo KI:I2 segundo Lämmle et al. (2007). Essa solução reage com amido dando uma coloração roxa, sendo o halo de degradação do amido presente em locais sem essa coloração.

#### 2.4.3 Atividade lipolítica e para esterase

O substrato utilizado foi tributirina a 1%. A presença de halos claros foram visualizados para os isolados positivos.

#### 2.4.4 Capacidade de dissolução do Carbonato de cálcio

O substrato desse teste foi carbonato de cálcio a 1%. Além do meio solo de caverna descrito anteriormente, também foi utilizado o meio B4-C (BANKS et al. 2010) com 1% de carbonato de cálcio.

#### 2.4.5 Determinação da atividade antimicrobiana

Para a determinação da atividade antimicrobiana dos isolados contra *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) foram utilizados dois métodos: (1) o método de dupla-camada onde os microrganismos foram cultivados por 5 a 10 dias a 30°C em placa de Petri contendo meio Ágar solo de caverna a 1%. Posteriormente foi adicionado 1mL de clorofórmio em cada tampa das placas de Petri mantidas em posição invertida por 30 min. Após esse tempo as placas foram abertas para evaporação do clorofórmio residual e foram adicionados 3 mL de meio Agar Müller-Hinton semi-sólido (0,7% de ágar) acrescido de 20 µL da cultura da bactéria reveladora (*Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*) cultivada a 37°C por 24h. Posteriormente incubados a 37°C por 24h e visualizado a presença, ou ausência de halos. (2) O método de poços foi realizado com o sobrenadante da cultura microbiana. Após centrifugação a 4000 g por 10 minutos, 25 µL do sobrenadante foram colocados em poços em placa de Petri contendo meio Müller-Hinton e inoculada com a bactéria reveladora. Posteriormente foi incubado por mesmo período e temperatura do método anterior e visualizado a presença, ou ausência de halos.

#### 2.5 Amplificação por PCR (reação de polimerase em cadeia) de isolados selecionados

Os isolados que apresentaram os melhores resultados foram amplificados com os primers F27 (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3') e R1525 (5'-AAG GAG GTG WTC CAR CC-3') (LANE, 1991) em reações de 25 µL contendo 3 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1X de tampão de PCR, 0,2 mM de cada dNTP, 5 pmol de cada primer, 0,05 U/µL de Taq DNA polimerase (Promega) e 1,5 uL de DNA. O termociclador foi programado com as seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos seguido de 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 minuto, anelamento a 57°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 3 minutos. Posteriormente ocorreu uma extensão final a 72°C por 30 minutos. Foi realizada eletroforese em gel de agarose a 1% visualização do gel em transluminador ultravioleta (ImageQuant 400), foi realizada purificação padrão com isopropanol absoluto e acetato de sódio a 3M. Os amplicons foram quantificados em espectrofotômetro e preparados para sequenciamento em sequenciador ABI-Prism 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Os cromatogramas gerados foram analisadas com programas Phred, Phrap e consed para, respectivamente, remover sequências de baixa qualidade, formação e visualização dos contigs formados (ERWING & GREEN, 1998; ERWING et al., 1998). Após processamento, as sequências nucleotídicas foram comparadas com banco de dados do GenBank através do programa Basic Local Allignment Search Tool (BLAST) (ALTSCHUL et al., 1990).

### 3. DISCUSSÃO E RESULTADOS

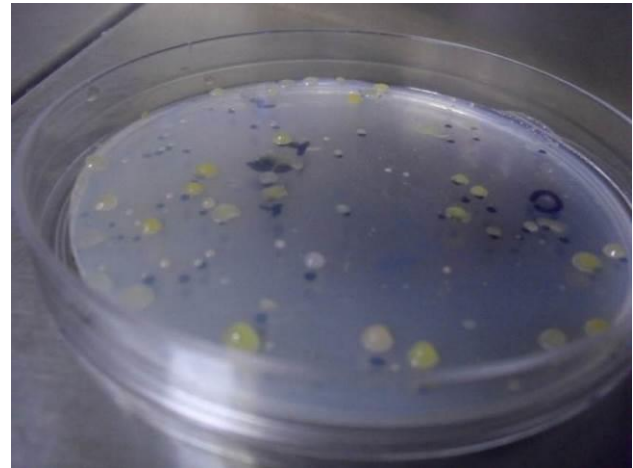
O isolamento da caverna o torna um ambiente propício para a prospecção de novos de novos compostos, tendo em vista que as comunidades microbianas que habitam a caverna, podem estar isoladas ou parcialmente isoladas do contato com seres da superfície e com características morfofisiológicas diferentes das observadas no ambiente externo (NORTHUP & LAVOIE, 2001; NORTHUP et al., 2005; BARTON & JURADO, 2007; SNIDER et al., 2009).

Um dos grandes problemas ao se cultivar microrganismos é que cerca de 95% deles não são cultiváveis em meios de cultura tradicional (AMANN et al., 1995), assim utilização do meio ágar solo de caverna foi uma tentativa de simular as condições ambientais encontradas no ambiente de

coleta (HAMAKI et al., 2005). Essa tentativa resultou em 31 isolados (Figura 1; Tabela 1).

Quando testados a respeito da capacidade de crescer em dois meios de cultura tradicionais (TSA e LB), nenhum entre os 31 isolados apresentaram essa capacidade. O que indica que esses microrganismos não seriam isolados nesses meios. E, assim, o uso do meio solo de caverna se mostrou eficiente para isolar microrganismos que não são cultivados em dois dos meios de cultivo tradicionais, aumentando a possibilidade de se conseguir novos microrganismos e novos compostos.

O resultado dos testes dos 31 isolados quanto as atividades listadas na metodologia está apresentado na tabela 2. Alguns exemplos de resultado positivo podem ser vistos na figura 2.



**Figura 1.** Foto de uma das placas contendo meio solo de caverna para isolamento de microrganismos. Amostra da última câmara da Furna do Fim do Morro do Parafiso (FFMP2) com 60 dias de cultivo.

**Tabela 1.** Caracterização morfológica dos microrganismos isolados em meio solo de caverna a 1%.

Amostra	Consistência	Coloração	Borda	Crescimento <sup>1</sup>	Forma
FFMP2 01	Gelatinosa	Verde claro	Lisa	Rápido	Sino
FFMP2 02	Gelatinosa	Verde	Lisa	Rápido	Sino
FFMP2 03	Gelatinosa	Verde escuro	Lisa	Rápido	Redonda
FFMP2 04	Gelatinosa	Verde escuro	Lisa	Rápido	Sino
FFMP2 05	Gelatinosa	Laranja claro	Lisa	Rápido	Sino
FFMP2 06	Gelatinosa	Laranja	Lisa	Rápido	Sino
FFMP2 07	Gelatinosa	Laranja	Lisa	Rápido	Achatada
FFMP2 08	Gelatinosa	Laranja	Lisa	Rápido	Redonda
FFMP2 09	Gelatinosa	Transparente	Lisa	Rápido	Achatada
FFMP2 10	Gelatinosa	Transparente	Lisa	Rápido	Redonda
FFMP2 11	Gelatinosa	Transparente	Lisa	Rápido	Sino
FFMP2 12	Butirosa	Branca	Lisa	Lento	Achatada
FFMP2 13	Butirosa	Branca	Lisa	Lento	Redonda
FFMP2 14	Butirosa	Branca	Irregular	Lento	Achatada
FFMP1 01	Gelatinosa	Transparente	Lisa	Rápido	Sino
FFMP1 02	Gelatinosa	Transparente	Lisa	Rápido	Achatada
FFMP1 03	Butirosa	Branca	Lisa	Rápido	Redonda
FFMP1 04	Butirosa	Branca	Lisa	Lento	Achatada
GBP2 01	Gelatinosa	Transparente	Lisa	Rápido	Sino
GBP2 02	Gelatinosa	Transparente	Lisa	Rápido	Achatada
GBP2 03	Butirosa	Branca	Lisa	Rápido	Achatada
GBP2 04	Butirosa	Branca	Lisa	Rápido	Redonda
GBP1 01	Gelatinosa	Transparente	Lisa	Rápido	Redonda
GBP1 02	Gelatinosa	Transparente	Lisa	Rápido	Sino
GBP1 03	Gelatinosa	Laranja	Lisa	Rápido	Achatada
GBP1 04	Gelatinosa	Laranja	Lisa	Rápido	Redonda
GBP1 05	Gelatinosa	Transparente	Lisa	Rápido	Achatada
GBP1 06	Butirosa	Transparente	Irregular	Rápido	Achatada
GBP1 07	Butirosa	Transparente	Lisa	Rápido	Achatada
GBP1 08	Butirosa	Branca	Lisa	Lento	Redonda
GBP1 09	Butirosa	Branca	Lisa	Lento	Achatada

<sup>1</sup> Foi considerado de crescimento rápido aquelas que apresentaram colônia visível em até 21 dias e de crescimento lento as que levaram de 21 a 60 dias.

**Tabela 2.** Caracterização morfológica dos microrganismos isolados em meio solo de caverna a 1%.

Amostra	Protease	Lipase	Amilase	Dissolução do CaCO <sub>3</sub>	Antimicrobiano **
FFMP2 01	X	X	X	X	X
FFMP2 02	X	X	X		
FFMP2 03	X	X		X	
FFMP2 04	X	X	X	X	X
FFMP2 05	X		X	X	X
FFMP2 06	X	X	X		
FFMP2 07	X				
FFMP2 08	X	X		X	
FFMP2 10			X	X	
FFMP2 11				X	
FFMP2 12				X	
FFMP2 13	X		*		
FFMP2 14		X	*		
FFMP1 01	X		X	X	
FFMP1 02			X		
FFMP1 03	X				
FFMP1 04				X	
GBP2 01	X	X			
GBP2 02			X		
GBP2 03		X		X	X
GBP2 04			*	X	
GBP1 01	X				
GBP1 03				X	X
GBP1 05	X	X		X	
GBP1 07	X				
GBP1 08	X		X	X	
GBP1 09				X	

\* Não foi observado crescimento microbiano nesses ensaios com esses isolados.

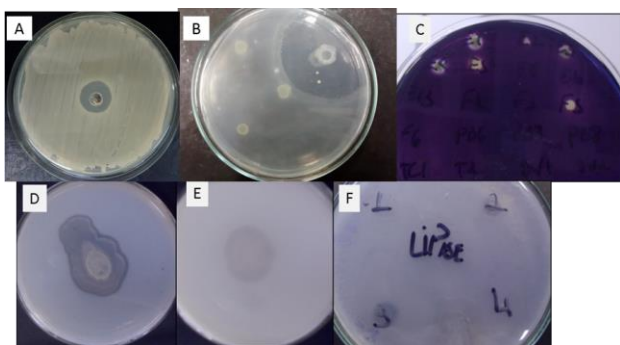
\*\* Resultados positivos apenas para *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina.

Nenhum isolado testado produziu composto antimicrobiano contra *P. aeruginosa*, porém cinco isolados produziram composto antimicrobiano para *S. aureus* e desses, dois isolados (FFMP2 01 e 04) apresentaram halo significativo no teste de dupla-camada e apenas um deles (FFMP2 01) apresentou um pequeno halo no teste pelo método de poços. Essa variação se dá devido a variação da condição na qual o microrganismo é colocado para produção do antimicrobiano. Enquanto no método de dupla-camada é em meio sólido, no de poços, os microrganismos são colocados para produzir o composto em meio líquido que não se mostrou favorável a produção da maioria dos antimicrobianos.

Os isolados FFMP2 09, GBP1 02, GBP1 04 e GBP1 06 não apresentaram atividade positiva em nenhum dos ensaios realizados. Enquanto que três não apresentaram crescimento visível na atividade amilolítica provavelmente por estresse osmótico devido a mecanismos de assimilação de nutrientes

de maneira descontrolada (KOCH,1997; KOCH, 2001).

Foi visualizada a presença de 32% de isolados com atividade lipolítica, 29% dos isolados apresentando atividade amilolítica e 51% de isolados com atividade proteolítica. Por terem sido isoladas em um ambiente relativamente restrito com meio de cultura único e específico para o ambiente, essas atividades enzimáticas tem o potencial de serem realizadas por novas biomoléculas. O mesmo é válido para os cinco isolados (16%) com atividade antimicrobiana, valor próximo dos 18% de isolados com atividade antimicrobiana em caverna (BARTON, 2010) baseados no princípio de que ambientes menos impactados resultam em quantidades elevadas de microrganismos produtores de antimicrobianos. O valor encontrado foi superior aos cerca de 11% comumente encontrados no solo da superfície (BARTON, 2010).



**Figura 2.** Ensaios antimicrobianos contra *S. aureus* pelo método de poços (A) e dupla-camada (B); atividade amilolítica (C), proteolítica (D), de dissolução do carbonato de cálcio (E) e lipolítica (F).

O alto percentual de microrganismos isolados em meio solo capaz de dissolver o carbonato de cálcio mostra que há um grande número de microrganismos capazes de liberar ácidos que podem dissolver a rocha carbonática com diferentes finalidades. Dentre esses ácidos, alguns podem apresentar potencial biotecnológico (SAUER et al., 2008). Geralmente isso está associado com a disponibilização de micronutrientes associados a rocha ou a liberação de resíduos metabólicos ácidos que podem ser utilizados por outros microrganismos da comunidade (HOSE & PISAROWICZ, 1999; JAGNOW et al., 2000; NORTHUP et al., 2000; ENGEL et al., 2001; MACALADY et al., 2007; BANKS et al., 2009).

Na tabela 3 estão listados os microrganismos que apresentaram atividade antimicrobiana. A obtenção de dois isolados que apresentaram similaridade de 99% com bactérias não cultiváveis pode estar correlacionado com a utilização do meio solo de caverna, já que esses microrganismos não puderam ser cultivados em meios LB e TSA. Esses

resultados citados corroboram com os dados de Hamaki et al. (2005). Em análise filogenética realizada com esses dois isolados (dados não mostrados), GBP1 03 agrupou no grupo de *Bacillus* enquanto que GBP2 03 agrupou com *Burkholderia*.

**Tabela 3.** Identificação taxonômica dos isolados de caverna sequenciados

Isolado	Identificação taxonômica	Nº de acesso	Similaridade
FFMP 2 01	<i>Paenibacillus mucilaginosus</i>	JF810842	99%
FFMP 2 04	<i>Paenibacillus mucilaginosus</i>	JF810842	99%
FFMP 2 05	<i>Acinetobacter</i> não cultivável	DQ06660 4	99%
GBP2 03	Bactéria não cultivável	EF45167 8	99%
GBP1 03	<i>Bacillus</i> não cultivável	JN187412	99%

#### 4. CONCLUSÕES

O meio solo de caverna a 1% apresenta grande potencial para obtenção de microrganismos de difícil cultivo ou não cultiváveis em meios de cultura tradicionais. Além disso, os microrganismos de caverna apresentam alto potencial biotecnológico. E estudos estão sendo feitos para identificar os antimicrobianos.

#### AGRADECIMENTOS

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) pela bolsa concedida e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento do projeto.

#### REFERÊNCIAS

- ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**. v.215, n.3, p. 403–410, 1990.
- AMANN, R. I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K. H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiological Reviews**, v. 59, p.143-169, 1995.
- BANKS, E. D.; TAYLOR, N. M.; GULLEY, J. et al. Bacterial Calcium Carbonate Precipitation in Cave Environments: A Function of Calcium Homeostasis. **Geomicrobiology Journal**, v. 27, n. 5, p. 444-454, 2010.
- BARTON, H. A. Introduction to cave microbiology: a review for the non-specialist. **Journal of Cave and Karst Studies**, v. 68, n. 2, p. 43-54, 2006.

- BARTON, H. A.; JURADO, V. What's Up Down There? Microbial Diversity in Caves. **Microbe**, v. 2, n. 3, p. 132-138, 2007.
- BARTON, H. A.; NORTHUP, D. E. Geomicrobiology in cave environments: Past, current and future perspectives. **Journal of Cave And Karst Studies**, v. 69, n. 1, p. 163-178, 2007.
- BARTON, H. A.; TAYLOR, N. M.; KREATE, M. P. *et al.* The Impact of Host Rock Geochemistry on Bacterial Community Structure in Oligotrophic Cave Environments. **International Journal of Speleology**, v. 36, p. 93-104, 2007.
- BARTON, H. A. Amazing caves, amazing microbes. Indiana State University, Fevereiro de 2010. Disponível em: <http://www.indstate.edu/darwin/grammicrobiology2010.htm>. Acessado em Janeiro de 2011.
- CHEEPHTAM, N. **Cave microbiomes: A novel resource for drug discovery**. Springer, 2013. 130 p
- ENGEL, A. S.; PORTER, M. I.; KINKLE, B.K.; KANE, T.C. Ecological assessment and geological significance of microbial communities from Cesspool Cave, Virginia. **Geomicrobiology Journal** n.18, p.259-274, 2001.
- EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. **Genome Research**, Woodbury, v.8, p.186-194, 1998.
- EWING, B.; HIJJER, L.; WENDL, M.C.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome Research**, Woodbury, v.8, p.175-185, 1998.
- GLAVAN, G. Production of enzymes by *Mucor* fungi, isolated from cave tricket. Graduation thesis, University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Ljubljana. 64p. 1997.
- GUPTA, R.; BEG, Q.K.; LORENZ, P. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 59, p. 15–32, 2002.
- HAMAKI, T.;SUZUKI, M.; FUDOU, R.; JOJIMA, Y.; KAJIURA, T.;TABUCHI, A.; SEN, K.; SHIBAI, H. Isolation of novel bacteria and actinomycetes using soil-extract agar medium. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. v.99, p. 485–492. 2005.
- HASAN, F.; SHAH, A.A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Tecnology**. v. 39, p. 235-251, 2006.
- HEROLD, K.; GOLLMICK, F.A. GROTH, I. ROTH, M. MENZEL, K.D.; MÖLLMANN, U.; GRAFE, U.; HERTWECK, C. CERVIMYCIN A-D: A polyketide glycoside complex from a cave bacterium can defeat vancomycin resistance. **Chemistry European Journal**. v.11, p. 5523-5530, 2005.
- HOSE, L. D.; PISAROWICZ, J. A. Cueva de Villa Luz, Tabasco, Mexico: reconnaissance study of an active sulfur spring cave and ecosystem. **Journal of Cave and Karst Studies**, v. 61, p. 13-21, 1999.
- JAGNOW, D. H.; HILL, C. A.; DAVIS, D. G. *et al.* History of the sulfuric acid theory of speleogenesis in the Guadalupe mountains, New Mexico. **Journal of Cave and Karst Studies**, v. 62, n. 2, p. 54-59, 2000.
- KIM, B.S.; LEE, J. Y.; HWANG, B.K. Diversity of actinomycetes antagonistic to plant pathogenic fungi in cave and sea-mud soils of Korea. **Journal of Microbiology**. v.36, n.2, p. 86-92, 1998
- KOCH, A. L. Microbial physiology and ecology of slow growth. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, n.61, p. 305-318. 1997.
- KOCH, A.L. Oligotrophs versus copiotrophs. **BioEssays**, v. 23, p. 657-661. 2001.



- LAIZ, L.; GROTH, I; GONZALES, I; SAIZ-JIMENEZ, C. Microbiological study of the dripping waters in Altamira cave (Santillana del Mar, Spain). **Journal of Microbiological Methods**. v.36, p.29–138, 1999
- LÄMMLE, K.; ZIPPER, H.; BREUER, M.; HAUER, B.; BUTA, C.; BRUNNER, H.; RUPP, S. Identification of novel enzymes with different hydrolytic activities by metagenome expression cloning. **Journal of Biotechnology**. v. 127, p. 575–592, 2007.
- LANE, D.J. (1991) 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt, E.; Goodfellow, M. (ed) **Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics**. pp. 115–175. New York: Wiley.
- LAORPAKSA, S.; YINGYONG, A.; THOONGSUWAN, S.; PONGSOPIDA, A. Study of antibiotic-producing actinomycetes from cave soil in central region of Thailand. **Journal of the National Research Council of Thailand**, v.19, p.61-79, 1987.
- MACALADY, J. L.; JONES, D. S.; LYON, E. H. Extremely acidic , pendulous cave wall biofilms from the Frasassi cave system , Italy. **Environmental Microbiology**, v. 9, n. 6, p. 1402-1414, 2007.
- NAKAEW, N.; PATHOM-AREE, W.; LUMYONG, S. First Record of the Isolation, Identification and Biological Activity of a New Strain of *Spirillospora albida* from Thai Cave Soil. **Actinomycetologica**, v. 23, n. 1, p. 1-7, 2009.
- NORTHUP, D. E.; REYSENBACH, A. L.; PACE, N. R. Microorganisms and speleothems. In: HILL, C.; FORTI, P. (ed) **Cave minerals of the world**, 2<sup>nd</sup> ed. Huntsville, AL: National Speleology Society. p 261-266. 1997.
- NORTHUP, D. E.; DAHN, C. N.; MELIM, L. A. *et al.* Evidence for geomicrobiology interactions in Guadalupe caves. **Journal of Cave and Karst Studies**, v. 62, n. 2, p. 80-90, 2000.
- NORTHUP, D. E. LAVOIE, K. H. Geomicrobiology of caves. **Geomicrobiology Journal**, v.18, p.199-222, 2001
- NORTHUP, D. E.; BOSTON, P. J.; PLACE, L. **Microbial Speleology : Opportunities and Challenges**. National Cave and Karst Management Symposium. **Anais**. 2005
- RODRIGUES, A. A.; CARRIM, A. J. I.; SADOYMA, G.; VIEIRA, J. D. G. **Potencialidades biotecnológicas de *Bacillus cereus* isolado em uma caverna**. Anais do XXX Congresso Brasileiro de Espeleologia. **Anais**. 2009. Disponível em: <[http://www.cavernas.org.br/anais30cbe/30cbe\\_215-220.pdf](http://www.cavernas.org.br/anais30cbe/30cbe_215-220.pdf)>.
- SAUER, M.; PORRO, D.; MATTANOVICH, D.; BRANDUARDI, P. Microbial production of organic acids: expanding the markets. **Trends in Biotechnology**. V. 26, p. 100–108, 2008.
- SHOWELL, M.S. Enzymes, detergent. In: FLICKINGER, M.C.; DREW, S.W. (eds) **Encyclopedia of bioprocess technology: fermentation, biocatalysis and bioseparation**. v. 2. Wiley, New York, p. 958–971, 1999.
- SIVARAMAKRISHNAN, S.; GANGADHARAN, D.; NAMPOOTHIRI, K. M.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A.  $\alpha$ -Amylases from Microbial Sources – An Overview on Recent Developments. **Food Technology Biotechnology**, v. 44, p.173–184, 2006.
- SNIDER, JESSICA R; GOIN, CAITLIN; MILLER, ROBERT V; *et al.* Ultraviolet Radiation Sensitivity in Cave Bacteria : Evidence of Adaptation to the Subsurface ? **International Journal of Speleology**, v. 38, n. January, p. 11-22, 2009.
- VAN DER MAAREL, M.J.E.C.; VAN DER VEEN, B.; UITDEHAAG, J.C.M.; LEEMHUIS, H.; DIJKHUIZEN, L. Properties and applications of starch-converting enzymes of the  $\alpha$ -amylase family. **Journal of Biotechnology**. v. 94, p. 137–155, 2002.