

POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE BACTÉRIAS CULTIVÁVEIS OBTIDAS A PARTIR DA GRUTA MARTIMIANO II, PARQUE ESTADUAL DO IBITIPOCA – MG

BIOTECHNOLOGICAL POTENTIAL OF CULTURABLE BACTERIA OBTAINED FROM MARTIMIANO II CAVE, IBITIPOCA STATE PARK - MG

Autora

Lara Chaves Carvalho Guerra

Universidade de São Paulo
e-mail: laraguerra@usp.br

Coautores

Camila Gracyelle de Carvalho Lemes; Lendro Marcio Moreira

RESUMO

A Gruta Martimiano II é a maior caverna quartzítica do Brasil e está localizada no Parque Estadual do Ibitipoca – Minas Gerais. As condições ambientais únicas e o baixo aporte energético das cavidades atuam como pressões seletivas nos organismos que as habitam. A microbiota tem grande importância ecológica e biotecnológica, uma vez que microrganismos cultiváveis são amplamente utilizados como recursos na agricultura, indústria farmacêutica e em bioprocessos. Entretanto, são poucos os estudos sobre a microbiota cavernícola e seu potencial biotecnológico. Os objetivos deste trabalho foram bioprospectar e analisar o potencial biotecnológico de bactérias associadas ao piso, teto e parede da Gruta Martimiano II. Um total de 12 amostras oriundas de quatro áreas da caverna foram obtidas. A caracterização das fases minerais foi feita por difração de raios X. As amostras foram então lavadas e diluídas em série com água de torneira autoclavada. O lavado foi plaqueado em meio de cultura rico e após 3 dias as colônias bacterianas foram isoladas, preser-

ABSTRACT

The Martimiano II Cave is the largest quartzite cave in Brazil and is located in the Ibitipoca State Park - Minas Gerais. The unique environmental conditions and the low energy input of the cavities act as selective pressures on the organisms inhabiting them. The microbiota has great ecological and biotechnological importance, since cultivable microorganisms are widely used as resources in agriculture, pharmaceutical industry and in bioprocesses. However, there are few studies on cave microbiota and their biotechnological potential. The objectives of this work were to bioprospect and analyze the biotechnological potential of bacteria associated with the floor, ceiling and wall of the Martimiano II Cave. A total of 12 samples from four areas of the cave were obtained. Characterization of the mineral phases was done by X-ray diffraction. The samples were then washed and serially diluted with autoclaved tap water. The wash was plated on rich culture medium and after 3 days the bacterial colonies were isolated,

vadas, os testes bioquímicos foram realizados e o isolado de maior potencial foi identificado. As fases minerais caracterizadas foram as mesmas entre as amostras, compostas por quartzo, muscovita, caulinita e gibbsita. Foram obtidos 72 isolados bacterianos que constituem hoje o primeiro banco de isolados bacterianos desta caverna. Três isolados tiveram a capacidade em fixar nitrogênio e um em solubilizar fosfato, componentes fundamentais ao desenvolvimento de plantas. Cinco isolados apresentaram possível antagonismo a *Klebsiella pneumoniae* e o isolado 14 foi capaz de inibir o crescimento de *K. pneumoniae* e *Staphylococcus aureus*. Em ensaio de inibição indireta o isolado 14 impediu o crescimento dos patógenos, foi caracterizado como móvel, Gram-negativo e identificado como *Peribacillus*. O ineditismo desta pesquisa corrobora o potencial de geração de novos conhecimentos acompanhado do desenvolvimento de novos produtos, agregando valor a serviços ecossistêmicos oriundos de um patrimônio genético desconhecido.

Palavras-chave: bioprospecção, caverna em quartzito, Gruta Martimiano II, microbiota, Parque Estadual do Ibitipoca, potencial biotecnológico.

INTRODUÇÃO

Caracterização da Área de Estudo

O Parque Estadual do Ibitipoca (PEIB) foi criado em 1973, por meio da Lei nº 6.126 do Governo de Minas Gerais, abrange as cidades de Lima Duarte, Santa Rita de Ibitipoca e Bias Fortes (Figura 1), totalizando 1488 hectares de extensão (Instituto Estadual de Floresta, 2007). Segundo o Instituto Estadual de Florestas (2007), o PEIB se localiza ao sul de Minas Gerais, no domínio fitogeográfico da Mata Atlântica, na região denominada Zona da Mata (Figura 1), conta com diversas atrações turísticas como mirantes, quedas d'água, riachos e cavernas. O relevo do PEIB constitui-se de baixadas e serras que sobressaem num contexto regional, com altitudes médias de 1500 m, conhecido como Serra do Ibitipoca (Correa-Neto & Filho, 1997).

*preserved, biochemical tests were performed and the isolate with the highest potential was identified. The mineral phases characterized were the same among the samples, consisting of quartz, muscovite, kaolinite and gibbsite. A total of 72 bacterial isolates were obtained that now constitute the first bank of bacterial isolates from this cave. Three isolates had the ability to fix nitrogen and one to solubilize phosphate, fundamental components for plant development. Five isolates showed possible antagonism to *Klebsiella pneumoniae* and isolate 14 was able to inhibit the growth of *K. pneumoniae* and *Staphylococcus aureus*. In indirect inhibition assay isolate 14 prevented the growth of the pathogens, was characterized as mobile, Gram-negative and identified as *Peribacillus*. The novelty of this research corroborates the potential of generating new knowledge accompanied by the development of new products, adding value to ecosystem services from an unknown genetic heritage.*

Keywords: *bioprospecting, quartzite cave, Martimiano II Cave, microbiota, Ibitipoca State Park, biotechnological potential.*

INTRODUCTION

Study Area Characterization

The Ibitipoca State Park (Parque Estadual do Ibitipoca - PEIB) was created in 1973, by law 6.126 of the Minas Gerais State Government. It covers the cities of Lima Duarte, Santa Rita de Ibitipoca and Bias Fortes (Figure 1), totaling 1488 hectares in extension (INSTITUTO ESTADUAL DE FLORESTA, 2007). According to the State Forestry Institute (Instituto Estadual de Floresta - IEF) (2007), the PEIB is located in southern Minas Gerais, in the phytogeographic domain of the Atlantic Forest, in the region called Zona da Mata (Figure 1), and has several tourist attractions such as viewpoints, waterfalls, streams and caves. The relief of the PEIB is composed of lowlands and hills that stand out in a regional context, with average altitudes of 1500 m, known as Serra do Ibitipoca (Correa-Neto & Filho, 1997).

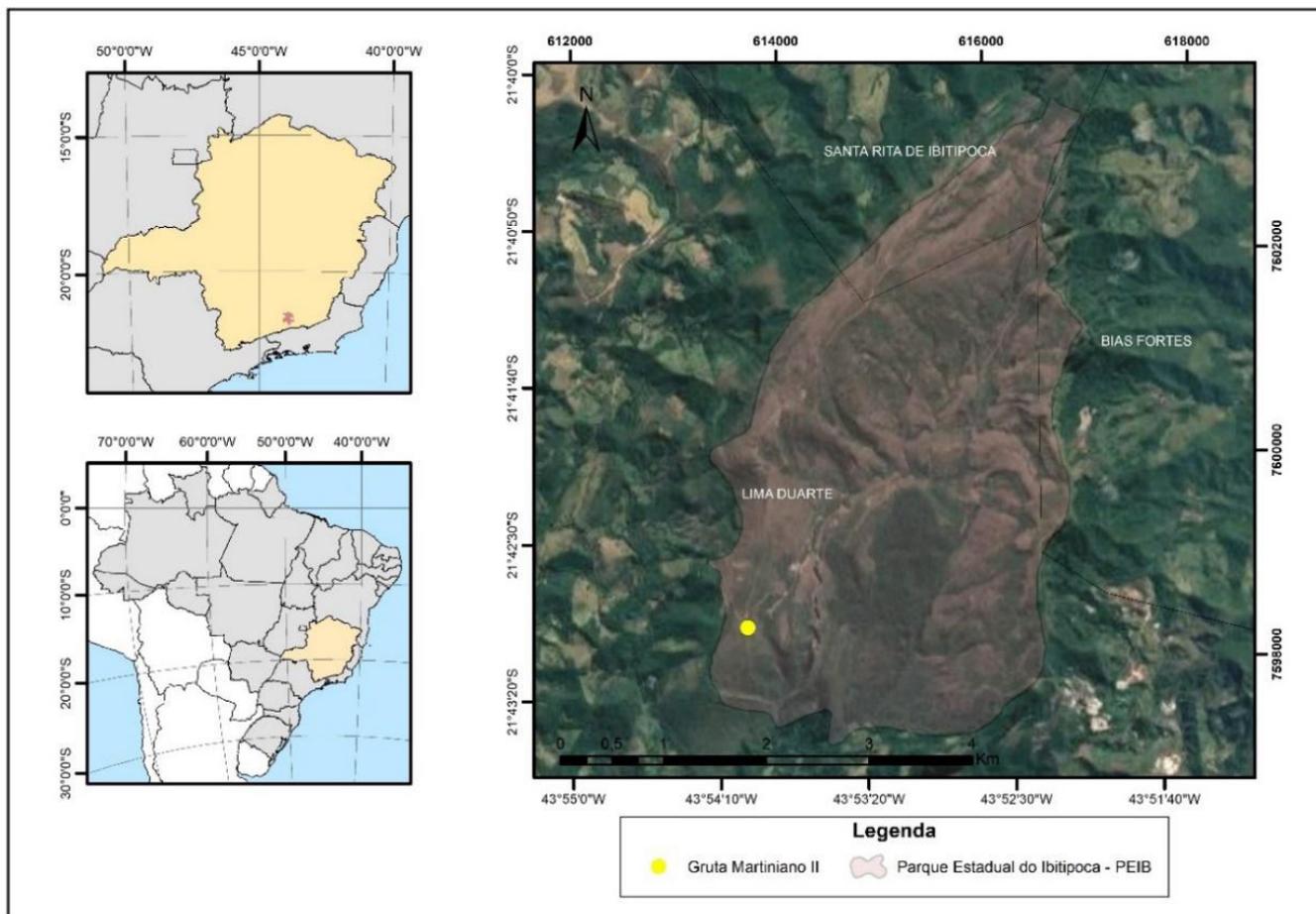


Figura 1 – Mapa de localização do Parque Estadual do Ibitipoca.

Figure 1 – Mapa de localização do Parque Estadual do Ibitipoca.

Segundo o Cadastro Nacional de Cavernas (CNC), administrado pela Sociedade Brasileira de Espeleologia, 40 cavernas são conhecidas no PEIB, por isso, é reconhecido por muitos autores como um importante distrito espeleológico mundial (Perez & Grossi, 1987; Nummer, 1991; Correa-Neto & Filho, 1997; Nummer, 2012; Bento, 2015). Tal importância se dá pela alta concentração de cavernas quartzíticas e suas dimensões notáveis, como a Gruta das Bromélias (2560 m de projeção horizontal) e a Gruta Martimiano II (4170 m de projeção horizontal).

A Gruta Martimiano II possui características únicas que a fazem notória no cenário nacional. Além do grande desenvolvimento, pouco comum para as rochas quartzíticas, possui morfologia com feições freáticas, com partes ativas e inativas (Lima *et al.*, 2017). Ela se desenvolve no contato entre três diferentes tipos de quartzitos, seus condutos e salões são

According to the National Cave Register (Cadastro Nacional de Cavernas - CNC), managed by the Brazilian Speleological Society (Sociedade Brasileira de Espeleologia - SBE), 40 caves are known in the PEIB. Therefore, it is recognized by many authors as an important speleological district worldwide (Perez & Grossi, 1987; Nummer, 1991; Correa-Neto & Filho, 1997; Nummer, 2012; Bento, 2015). Such importance is given by the high concentration of quartzite caves and their remarkable dimensions, such as the Bromélias Cave (2560 m horizontal projection) and the Martimiano II Cave (4170 m horizontal projection).

*The Martimiano II Cave has unique characteristics that make it nationally notorious. Besides the great development, unusual for quartzite rocks, it has morphology with phreatic features, with active and inactive parts (Lima *et al.*, 2017). It develops in the contact between three different types of quartzite, its conduits and halls are volumi-*

volumosos e os espeleotemas, de coloração avermelhada, chamam atenção por sua variedade e frequência (Figura 2) (Lima *et al.*, 2017). Nesse contexto, a Gruta Martimiano II, pode se apresentar como um importante reservatório de microbiota com função biológica específica

nous and the speleothems, of reddish color, draw attention for their variety and frequency (Figure 2) (Lima et al., 2017). In this context, the Martimiano II Cave, may present itself as an important reservoir of microbiota with specific biological function.



Figura 2 – Gruta Martimiano II. A) extenso conduto; B) salão da claraboia; C) segunda entrada; D) conduto da fechadura.

Figure 2 – Martimiano II Cave. A) extensive conduit; B) skylight hall; C) second entrance; D) keylock conduit.

Ambiente Cavernícola

Cada caverna é única em suas características biológicas, químicas e físicas (Ghosh *et al.*, 2017). Segundo Culver (1982), as cavernas são caracterizadas pela ausência de luz nas zonas mais profundas, escassez nutricional, taxas de

Cave Environment

Each cave is unique in its biological, chemical, and physical characteristics (GHOSH et al., 2017). According to Culver (1982), caves are characterized by the absence of light in the deeper zones, nutritional scarcity, humidity

umidade próximas a saturação e a temperatura do meio hipógeo se aproxima da média anual de temperatura do ambiente epígeo. Ressalta-se que os parâmetros ambientais são de grande relevância para o estudo da biologia subterrânea, por propiciarem as especializações a este ambiente (Culver, 1982; Trajano & Moreira, 1991; Ferreira & Pompeu, 1997; Gomes *et al.*, 2000).

A ocorrência de organismos fotossintetizantes é limitada às áreas com incidência luminosa e impossibilitada pela ausência de luz no interior das cavernas (Ferreira & Pompeu, 1997; Ferreira & Martins, 1999). Dessa forma, na maioria das cavernas, a entrada dos recursos alimentares é feita especialmente pela importação provocada por enxurradas, cursos d'água e águas de percolação (GILBERT *et al.*, 1994). Além disso, os animais presentes no ambiente cavernícola geram recursos alimentares para outros organismos (Ferreira, 2005) e os microrganismos presentes participam da produção primária e secundária de energia no ambiente hipógeo (Figura 5) (Ferreira *et al.*, 2004).

As cavernas são pouco estudadas do ponto de vista microbiológico e as características deste ambiente propiciam um habitat microbiano único, com pressões evolutivas diferentes do ambiente epígeo (Barton *et al.*, 2007). Com isso, os organismos presentes são mais especializados ao baixo aporte energético das cavernas, o que aumenta o interesse na identificação de microrganismos e estudos de caracterização biotecnológica.

Importância da Microbiota em um Contexto Ecológico

Os microrganismos estão presentes em todos os ambientes e apresentam grande importância num contexto ecológico (Moreira & Siqueira, 2006). Devido à enorme diversidade metabólica, os microrganismos participam ativamente de todos os ciclos biogeoquímicos e desempenham a função de reciclar grande parte da matéria na biosfera (Gaylarde, 2005). Os fatores abióticos e bióticos do ambiente influenciam diretamente na comunidade

rates close to saturation, and by the temperature of the hypogeous environment that approaches the annual average temperature of the epigeous environment. It is worth noting that environmental parameters are of great relevance to the study of subterranean biology, as they provide the specifics of this environment (Culver, 1982; Trajano & Moreira, 1991; Ferreira & Pompeu, 1997; Gomes et al., 2000).

The occurrence of photosynthesizing organisms is limited to light incidence areas and is made impossible by the absence of light in the interior of the caves (Ferreira & Pompeu, 1997; Ferreira & Martins, 1999). Therefore, entrance of food resources in most caves is made especially by the input provoked by torrents, water courses and percolation waters (Gilbert et al, 1994). In addition, the animals present in the cave environment, generate food resources for other organisms (Ferreira, 2005) and the microorganisms present participate in the primary and secondary production of energy in the hypogeous environment (Figure 5) (Ferreira et al., 2004).

Caves are scarcely studied from the microbiological point of view. The characteristics of this environment provide a unique microbial habitat, with different evolutionary pressures from the epigeal environment (Barton et al., 2007). The organisms present are more specialized to the low energy input of caves, which increases the interest in the identification of microorganisms and biotechnological characterization studies.

Microbiota Importance in an Ecological Context

Microorganisms are present in all environments and have great importance in an ecological context (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006). Due to the enormous metabolic diversity, microorganisms actively participate in all biogeochemical cycles and perform the function of recycling much of the matter in the biosphere (Gaylarde, 2005). The abiotic and biotic factors of the environment directly influence the microbial community (Gaylarde, 2005),

microbiana (Gaylarde, 2005), o que torna ainda mais importante o conhecimento das condições ambientais para um completo conhecimento sobre a composição microbiana e seu funcionamento metabólico em diferentes ambientes (Lemes, 2018; Lemes, 2021).

As cavernas são consideradas ambientes extremos, por propiciarem formas de vida especializadas (Candiroglu, 2017). Embora suas peculiaridades sejam chamariz para novos estudos biotecnológicos, são ambientes pouco estudados do ponto de vista microbiológico, especialmente no Brasil. O que coloca a proposta deste trabalho em evidência na busca de novos organismos e conhecimentos biológicos que possam ser utilizados na geração de produtos e serviços.

Apesar de sua vasta distribuição e importância na manutenção da biosfera, os microrganismos ainda são pouco conhecidos. No caso de bactérias e arqueas, é estimado que menos de 1% da diversidade seja conhecida (Canhos & Manfio, 2001), e menos de 10% dos microrganismos existentes no planeta foram caracterizados e descritos (Staley, 2001). Isso é justificado pelo fato de que apenas cerca de 1 a 3% dos microrganismos terem a capacidade de cultivo em condições laboratoriais (Streit & Schmitz, 2004). Apesar disso, os métodos dependentes de cultivo continuam sendo utilizados, por possibilitarem a realização de experimentos *in vitro* e *in vivo* com os isolados obtidos (Hill *et al.*, 2000).

Potencial Biotecnológico dos Microrganismos

Na biotecnologia, a diversidade e o potencial bioquímico dos microrganismos é essencial como fonte de vários produtos com aplicações em praticamente todos os setores industriais (Figura 6) (Demain & Adrio, 2008). Os produtos microbianos são usados, por exemplo, como antibióticos, agentes tumorais e imunossupressores em indústrias farmacêuticas, sendo que, as cavernas apresentam alto potencial para a descoberta de compostos bacterianos bioativos e produção de novas drogas (Ghosh *et al.*, 2017).

which makes it even more important to know the environmental conditions for a complete understanding of the microbial composition and its metabolic functioning in different environments (Lemes, 2018; Lemes, 2021).

Because they provide specialized life forms, caves are considered extreme environments (Candiroglu, 2017). Although their peculiarities are an attraction for new biotechnological studies, they are rarely studied from the microbiological point of view, especially in Brazil. This puts the proposal of this work in evidence in the search for new organisms and biological knowledge that can be used in the generation of products and services.

*Despite their vast distribution and importance in maintaining the biosphere, microorganisms are still poorly known. In the case of bacteria and archaea, it is estimated that less than 1% of the diversity is known (Canhos & Manfio, 2001), and less than 10% of the existing microorganisms on the planet have been characterized and described (Staley, 2001). This is justified by the fact that only about 1 to 3% of microorganisms can be cultivated under laboratory conditions (Streit & Schmitz, 2004). Regardless, culture-dependent methods continue to be used, because they enable *in vitro* and *in vivo* experiments with the obtained isolates (Hill *et al.*, 2000).*

Microorganisms Biotechnological Potential

*In biotechnology, the diversity and biochemical potential of microorganisms is essential as a source of various products with applications in virtually all industrial sectors (Figure 6) (Demain & Adrio, 2008). Microbial products are used, for example, as antibiotics, tumor agents, and immunosuppressants in pharmaceutical industries. Caves present high potential for the discovery of bioactive bacterial compounds and production of new drugs (Ghosh *et al.*, 2017).*

*Many bacteria have the ability to facilitate plant growth and development (Calvo *et al.*,*

Muitas bactérias possuem a capacidade de facilitar o crescimento e o desenvolvimento de plantas (Calvo *et al.*, 2014), podem ser utilizadas como biocontroladores e até mesmo na produção de organismos transgênicos de interesse econômico (Pereira & Martins, 2016). São empregadas como agentes de processamento alimentício e no setor da agricultura (Demain & Adrio, 2008). Bactérias também podem ser utilizadas na biolixiviação de metais (Francisco, 2007), e na biorremediação de ambientes contaminados, permitindo a remoção ou redução dos níveis de poluentes, algumas vezes gerando por meio de processos metabólicos complexos, outros subprodutos de interesse comercial (Gaylarde, 2005).

Fatores como baixo custo de produção, alta produtividade, estabilidade a temperaturas extremas, especificidade, pH ou outras condições fisiológicas fazem com que o estudo de bactérias em ambientes peculiares, como o cavernícola, seja uma alternativa em destaque na busca por novos medicamentos (Prakash *et al.*, 2013). As pressões seletivas do ambiente podem favorecer grupos de bactérias com capacidade de produção de antimicrobianos (Barton *et al.*, 2007), por exemplo, as actinobactérias, as quais têm sido amplamente encontradas nos ambientes cavernícolas (Jurado *et al.*, 2005).

Tendo em vista o contexto ecológico, o estudo da microbiota cavernícola se torna necessário, devido à escassez de pesquisas relacionadas ao tema, quando comparado aos demais estudos de biologia subterrânea. Somado a isto, a maioria dos estudos envolvendo a microbiota cavernícola se restringem a rochas carbonáticas (Barton *et al.*, 2007). Dessa forma este trabalho investiga pela primeira vez a bioprospecção e o potencial biotecnológico de bactérias da maior caverna em quartzito do Brasil, a Gruta Martiniano II. Assim sendo, pode contribuir com a realização do plano de manejo espeleológico no Parque Estadual do Ibitipoca e para a conservação da Gruta Martiniano II.

2014), can be used as biocontrollers and even in the production of transgenic organisms of economic interest (Pereira & Martins, 2016). They are employed as food processing agents and in the agricultural sector (Demain & Adrio, 2008). Bacteria can also be used in metal biolixiviation (Francisco, 2007), and in the bioremediation of contaminated environments, allowing the removal or reduction of pollutant levels, sometimes generating through complex metabolic processes, other by-products of commercial interest (Gaylarde, 2005).

*Factors such as low production cost, high productivity, stability at extreme temperatures, specificity, pH or other physiological conditions make the study of bacteria in peculiar environments, such as cave environments, a highlighted alternative in the search for new drugs (Prakash *et al.*, 2013). The selective pressures of the environment may favor groups of bacteria with antimicrobial production capacity (Barton *et al.*, 2007), for example, the actinobacteria, which have been widely found in cave environments (Jurado *et al.*, 2005).*

*In view of the ecological context, the study of cave microbiota becomes necessary, due to the scarcity of research related to the subject, when compared to other studies of subterranean biology. In addition, most studies involving cave microbiota are restricted to carbonate rocks (Barton *et al.*, 2007). This work investigates for the first time the bioprospecting and biotechnological potential of bacteria from the largest quartzite cave in Brazil, the Martiniano II Cave. Furthermore, it can contribute to the implementation of the speleological management plan in the Ibitipoca State Park and to the conservation of the Martiniano II Cave.*

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta do Material Microbiológico

Uma análise do mapa topográfico da Gruta Martimiano II foi previamente estabelecida para determinação dos pontos de relevância para a realização de coletas de solo e rochas. Foram considerados fatores fundamentais para seleção dos pontos de coletas: área fótica, área afótica, regiões secas e úmidas, isolamento geográfico, e reduzidos sinais de pisoteio. Durante as coletas, foi feita uma análise visual para caracterizar e descrever as áreas de coleta.

Foram utilizados materiais esterilizados para a coleta, como espátulas para a retirada das amostras e tubos Falcon de 50 mL para o transporte do material coletado. Para cada ponto da caverna, foram coletados pelo menos uma amostra de piso, uma de parede e uma de teto, geralmente em torno de 50 g de material sólido.

Caracterização Mineralógica

Para a caracterização mineralógica, as amostras foram moídas em cadinho com o objetivo de adequar a granulometria ($< 0,045$ mm), para realizar as análises por difração de raios X (DRX) no equipamento EMPYREAN PANalytical diffractometer, com tubo de CuK α ($\lambda = 1,5418$ angstrom), com 45 kV e corrente de 40 mA. O 2θ variou de $2-70^\circ$ com 40 segundos de tempo de análise. A interpretação dos padrões gerados foi efetuada no programa PANalytical (Bleith *et al.*, 2015).

Isolamento das Colônias Bacterianas

A partir das amostras coletadas, 1g de material foi lavado em 10 mL de água de torneira autoclavada. As soluções dos lavados foram diluídas em fatores de 1:10 e 1:100, e 100 μ L desta solução diluída foi plaqueada em placas de Petri contendo meio de cultura Luria-Bertani (LB) (Felestrino, 2017). As placas foram incubadas à temperatura de 28°C por um período de até três dias, e as colônias que apresentaram diferentes morfologias foram repicadas em novas placas de Petri contendo o mesmo meio a fim de isolá-las. Cada isolado foi preservado em meio LB líquido

MATERIALS AND METHODS

Microbiological Material Sampling

An analysis of Martimiano II Cave topographic map was previously established to determine the relevant points to collect soil and rocks. Fundamental factors for the selection of collection points were considered: photic area, aphotic area, dry and humid regions, geographic isolation, and reduced signs of trampling. During the collections, a visual analysis was made to characterize and describe the sampling areas.

Sterile materials were used for the collection, such as spatulas for removing the samples and 50 mL Falcon tubes for transporting the collected material. For each point in the cave at least one floor, one wall and one ceiling sample were collected, usually around 50 g of solid material.

Mineralogical Characterization

*For the mineralogical characterization, the samples were ground in crucible in order to adequate the granulometry (< 0.045 mm), to perform the analyses by X-ray diffraction (XRD) in EMPYREAN PANalytical diffractometer equipment, with CuK α tube ($\lambda = 1.5418$ angstrom), with 45 kV and 40 mA current. The 2θ ranged from $2-70^\circ$ with 40 seconds of analysis time. Interpretation of the generated patterns was performed in the PANalytical program (Bleith *et al.*, 2015).*

Bacterial Colonies Isolation

From the collected samples, 1g of material was washed in 10 mL autoclaved tap water. The wash solutions were diluted in factors of 1:10 and 1:100, and 100 μ L of this diluted solution was plated onto Petri dishes containing Luria-Bertani (LB) culture medium (Felestrino, 2017). The plates were incubated at a temperature of 28°C for up to three days, and the colonies that presented different morphologies were plated onto new Petri plates containing the same medium in order to isolate them. Each isolate was preserved

contendo glicerol, em uma concentração final de 15%, e estocado em freezer -20°C. Para a realização dos ensaios bioquímicos, foram geradas placas matrizes, em que foram colocados 200 µL de meio LB líquido em placas de 96 poços onde os preservados foram novamente cultivados para posterior inoculação e realização dos ensaios.

Potencial Biotecnológico

Com objetivo de testar o potencial biotecnológico dos microrganismos coletados após esses processos, no que tange o desenvolvimento de biofertilizantes e antibióticos, foram realizados os seguintes ensaios bioquímicos:

- Ensaio de fixação de nitrogênio

Partindo das placas matrizes, os isolados foram inoculados em meio de cultura Baz semi-sólido, livre de N₂, por 14 dias a 28°C, o teste foi realizado em duplicata. As bactérias que modificaram a coloração do meio de amarelo para esverdeado indicam a potencial capacidade de fixar nitrogênio (Dobereiner *et al.*, 1976).

- Ensaio de solubilização de fosfato

A capacidade de solubilização de fosfato foi avaliada, em duplicata, mediante uso do meio National Botanical Research Institute's Phosphate (NBRIP), e após 4 dias à 28°C a formação de um halo transparente ao redor da colônia indica o potencial do isolado em solubilizar fosfato (Nautiyal, 1999).

- Ensaio de inibição do crescimento bacteriano

Foram colocados 1000 µL de LB líquido e 5 µL do preservado de *Staphylococcus aureus* e *Klebsiella pneumoniae* em microtubos de 1,5 ml e para crescer no Shaker a 28°C e 180 rpm, o crescimento foi observado em dois dias. Posteriormente, 20 µL dos patógenos foram espalhados com alça de drigalsky em placas de Petri (150 x 15mm) com meio LB sólido, formando uma manta microbiana.

in LB liquid medium containing glycerol, at a final concentration of 15%, and stored in a freezer at -20°C. To perform the biochemical assays, matrix plates were generated, in which 200 µL of LB liquid medium were placed in 96-well plates where the preserved isolates were grown again for further inoculation and performance of the assays.

Biotechnological Potential

In order to test the biotechnological potential of the microorganisms collected after these processes, with regard to the development of biofertilizers and antibiotics, the following biochemical assays were performed:

- *Nitrogen Fixation Assay*

*Starting from the matrix plates, the isolates were inoculated on semi-solid, N₂-free Baz culture medium for 14 days at 28°C, the test was performed in duplicate. Bacteria that changed the coloration of the medium from yellow to greenish indicate the potential ability to fix nitrogen (Dobereiner *et al.*, 1976).*

- *Phosphate solubilization test*

The phosphate solubilizing capacity was evaluated, in duplicate, using National Botanical Research Institute's Phosphate solubilizing medium (NBRIP), and after 4 days at 28°C the formation of a transparent halo around the colony indicates the potential of the isolate to solubilize phosphate (Nautiyal, 1999).

- *Bacterial Growth Inhibition Assay*

*1000 µL of liquid LB and 5 µL of the preserved *Staphylococcus aureus* and *Klebsiella pneumoniae* were placed in 1.5 ml microtubes to grow in the Shaker at 28°C and 180 rpm. Growth was observed within 2 days. Subsequently, 20 µL of the pathogens were spread with drigalsky spatula into Petri dishes (150 x 15 mm) with solid LB medium, forming a microbial blanket.*

Partindo da matriz de isolados bacterianos, foram colocados 100 µL dos isolados em placas de 96 poços e com um multi-inoculador os isolados da caverna foram inoculados nas placas de Petri. O crescimento e a formação de halos foram observados por dois dias, os halos indicam a inibição do crescimento das bactérias patogênicas e o experimento foi realizado em duplicata. Os halos de inibição do isolado de maior potencial foram medidos com um paquímetro. Apenas o isolado que apresentou o melhor resultado na inibição passou pelos próximos testes.

- Ensaio de caracterização do composto inibitório

Em placa de Petri (90 x 15mm) com meio LB, foi colocado celofane semipermeável autoclavado e espalhou-se com a alça de drigalsky 200 µL do isolado de maior interesse sobre o celofane. O crescimento foi observado por 1 dia a 28 °C, após o crescimento, o celofane com o isolado foi retirado da placa e descartado. No centro da placa adicionou-se 2 µL da bactéria patogênica, o crescimento foi observado por 2 dias a 28 °C. Todo o experimento foi feito em duplicata e um menor crescimento dos patógenos em relação às placas controle indica a inibição do crescimento bacteriano por um composto produzido anteriormente pelo isolado bacteriano de interesse biotecnológico. Este método foi modificado do trabalho de Nourozian *et al.* (2006).

- Ensaio de caracterização quanto à motilidade

O isolado foi cultivado em meio LB semi-sólido (0,3% de ágar) por 2 dias a 28°C, em duplicata. O crescimento em toda a placa de Petri indica a motilidade por swimming (Sperandio *et al.*, 2003).

Starting with the matrix of bacterial isolates, 100 µL of the isolates were placed in 96-well plates and with a multi-inoculator the cave isolates were inoculated into the Petri plates. The growth and formation of halos were observed for two days, the halos indicate the inhibition of the growth of the pathogenic bacteria. The experiment was performed in duplicate. The inhibition halos of the isolate with the highest potential were measured with a caliper. Only the isolate with the best inhibition result went through the next tests.

- *Inhibitory compound characterization assay*

*In a Petri dish (90 x 15 mm) with LB medium, autoclaved semipermeable cellophane was placed and 200 µL of the isolate of greatest interest was spread on it with a drigalsky spatula. Growth was observed for 1 day at 28 °C. After growth, the cellophane with the isolate was removed from the plate and discarded. In the center of the plate 2 µL of the pathogenic bacteria was added, growth was observed for 2 days at 28 °C. The whole experiment was done in duplicate and a lower growth of the pathogens compared to the control plates indicates inhibition of bacterial growth by a compound previously produced by the bacterial isolate of biotechnological interest. This method was modified from the work of Nourozian *et al.* (2006).*

- *Motility characterization assay*

*The isolate was grown on semi-solid LB medium (0.3% agar) for 2 days at 28°C in duplicate. Growth throughout the Petri dish indicates swimming motility (SPERANDIO *et al.*, 2003).*

- Ensaio de caracterização de Gram

Seguindo o protocolo do Ministério da Saúde (1997), o esfregaço foi preparado transferindo 20 µL do isolado bacteriano para lâminas previamente limpas e flambadas e fixado na chama do bico de bussen. O esfregaço foi coberto com o corante cristal violeta-de-metila por um minuto e lavado com água destilada; posteriormente, o esfregaço foi coberto com lugol diluído (1/20) por um minuto, foi lavado com água destilada e com etanol 95 %, descolorando-a. Após este processo, o esfregaço foi coberto com fucsina por 30 segundos e lavado com água destilada.

Finalizados os processos de coloração e descoloração, as lâminas secaram ao ar livre e o resultado foi observado no microscópio óptico em lente objetiva de imersão (100 X). A coloração rosa das bactérias as caracteriza como Gram-negativas e a coloração roxa como Gram-positivas.

- Identificação do isolado 14

Foi realizado o sequenciamento do gene 16S usando NGS (Sequenciamento de Nova Geração).

RESULTADOS

Caracterização Mineralógica

Foi realizada a difração de raio X para a caracterização mineralógica dos pontos de coleta (Tabela 1). Os minerais presentes nas amostras são o quartzo, muscovita, a caulinita e a gibbsita. Os resultados completos da difração de raio X podem ser observados nos apêndices A à L.

- Gram characterization assay

Following the protocol of the Ministry of Health (1997), the smear was prepared by transferring 20 µL of the bacterial isolate to previously cleaned and flamed slides and fixed in the bunsen burner flame. The smear was covered with crystal methyl violet dye for 1 minute and washed with distilled water; subsequently, the smear was covered with diluted lugol (1/20) for 1 minute, was washed with distilled water and with 95 % ethanol, bleaching it. After this process the smear was covered with fuchsin for 30 seconds and washed with distilled water.

After the staining and decolorization processes were completed, the slides were dried in the open air and the result was observed under the light microscope with an immersion objective (100 X). Pink staining of the bacteria characterizes them as Gram-negative and purple staining as Gram-positive.

- Identification of isolate 14

Sequencing of the 16S gene was performed using NGS (Next Generation Sequencing).

RESULTS

Mineralogical Characterization

X-ray diffraction was performed for the mineralogical characterization of the collection points (Table 1). The minerals present in the samples are quartz, muscovite, kaolinite and gibbsite. The complete X-ray diffraction results can be seen in Appendices A to L.

Tabela 1: Resultados da difratometria de raio X, demonstrando as fases minerais observadas em cada amostra.

Amostra		Mineral			
		Quartzo	Muscovita	Caulinita	Gibbsita
ÁREA 1	Lateral 1	X	X	X	
	Piso 1	X	X		
	Teto 1	X	X	X	
ÁREA 2	Lateral 2	X	X	X	X
	Piso 2	X	X	X	
	Teto 2	X	X	X	
ÁREA 3	Lateral 3	X	X	X	X
	Piso 3	X	X	X	X
	Teto 3	X	X	X	X
ÁREA 4	Lateral 4	X	X	X	
	Piso 4	X	X	X	
	Teto 4	X	X	X	

Table 1: X-ray diffractometry results, showing the mineral phases observed in each sample.

Sample		Mineral			
		Quartz	Muscovite	Kaolinite	Gibbsite
AREA 1	Wall 1	X	X	X	
	Floor 1	X	X		
	Ceiling 1	X	X	X	
AREA 2	Wall 2	X	X	X	X
	Floor 2	X	X	X	
	Ceiling 2	X	X	X	
AREA 3	Wall 3	X	X	X	X
	Floor 3	X	X	X	X
	Ceiling 3	X	X	X	X
AREA 4	Wall 4	X	X	X	
	Floor 4	X	X	X	
	Ceiling 4	X	X	X	

Isolados Bacterianos e Descrição das Áreas de Coleta

Foram produzidas descrições espeleológicas (Tabela 2) das áreas de coleta. A partir do cultivo em meio LB das colônias bacterianas, obteve-se um total de 72 isolados, que geraram um banco de isolados bacterianos (Tabela 2).

Bacterial Isolates and Sampling Areas Description

Speleological descriptions (Table 2) of the collection areas were produced. From the bacterial colonies culture in LB medium, a total of 72 isolates were obtained, which generated a bank of bacterial isolates (Table 2).

Tabela 2- Descrição das áreas de coleta e correlação com os isolados bacterianos.

ÁREA DE COLETA	ZONA DE INCIDÊNCIA LUMINOSA	DESCRIÇÃO DA ÁREA	PONTO DE COLETA	ISOLADOS	ISOLADOS POR ÁREA
1	Zona de entrada/ Zona crepuscular	Boca da Gruta Martimiano II, conduto com desenvolvimento em quartzito grosseiro sacaroidal, com serapilheira depositada no piso, resultando em maior concentração de matéria orgânica.	Piso	4	17
			Teto	6	
			Parede	7	
2	Zona profunda	Conduto com teto e parede se desenvolvendo em quartzito fino feldspático, com presença de escorrimentos, marcando percolação de água próximo ao local de coleta e baixo aporte energético.	Piso	5	18
			Teto	5	
			Parede	8	
3	Zona profunda	Salão dos espeleotemas vermelhos, com desenvolvimento em quartzito grosseiro sacaroidal, com percolação de água constante.	Piso	12	16
			Teto	3	
			Parede	1	
4	Zona profunda	Conduto com teto e piso com desenvolvimento em quartzito grosseiro sacaroidal e parede em fino feldspático, próxima a fluxo de água, com presença de matéria orgânica carregada pelo riacho.	Piso	10	21
			Teto	6	
			Parede	5	
TOTAL DE ISOLADOS					72

Table 2- Sampling areas description and correlation with bacterial isolates.

SAMPLING AREA	INCIDENCE OF LIGHT ZONE	AREA DESCRIPTION	SAMPLING POINT	ISOLATES	ISOLATES PER AREA
1	Entry zone/ Twilight zone	Martiniano II Cave entrance, conduit with development in coarse sacaroidal quartzite, with plant litter deposited on the floor resulting in higher concentration of organic matter	Floor Ceiling Wall	4 6 7	17
2	Deep Zone	Conduit with ceiling and wall developing in fine feldspathic quartzite, with presence of runoff marking percolation of water near the collection site and low organic matter input.	Floor Ceiling Wall	5 5 8	18
3	Deep Zone	Red speleothems hall, developed in coarse sacaroidal quartzite, with constant water percolation	Floor Ceiling Wall	12 3 1	16
4	Deep Zone	Conduit with ceiling and floor development in coarse sacaroidal quartzite and wall in fine feldspathic quartzite, near water flow, with presence of organic matter carried by the stream.	Floor Ceiling Wall	10 6 5	21
TOTAL NUMBER OF ISOLATES					72

Na Tabela 2, é possível observar que a área 4 apresentou maior número de colônias isoladas, tal fato pode ser explicado pela proximidade da área a uma drenagem ativa, por onde ocorre o carreamento de matéria orgânica e outros elementos do ambiente externo para dentro da caverna. Sendo que, segundo (Gilbert *et al* 1994), os cursos d'água são um dos principais transportadores de recursos alimentares do ambiente epígeo para o ambiente hipógeo.

*In Table 2, it is possible to observe that area 4 presented the highest number of isolated colonies. This fact can be explained by the proximity of the area to an active drainage, through which organic matter and other elements from the external environment are carried into the cave. According to (Gilbert *et al* 1994), water courses are one of the main transporters of food resources from the epigeal to the hypogeal environment.*

Potencial Biotecnológico

Neste tópico são apresentados os resultados dos ensaios bioquímicos realizados para o desenvolvimento de novos biofertilizantes e antibióticos.

- Fixação de nitrogênio

No ensaio de fixação de nitrogênio, três isolados bacterianos foram capazes de realizar o processo de fixação de nitrogênio, como é possível observar pela mudança de coloração no meio de cultivo (Figura 3). O isolado 24, coletado no teto da entrada da caverna, área 1; o isolado 18, coletado no piso da área 4; e o isolado 25, coletado no teto da área 1.

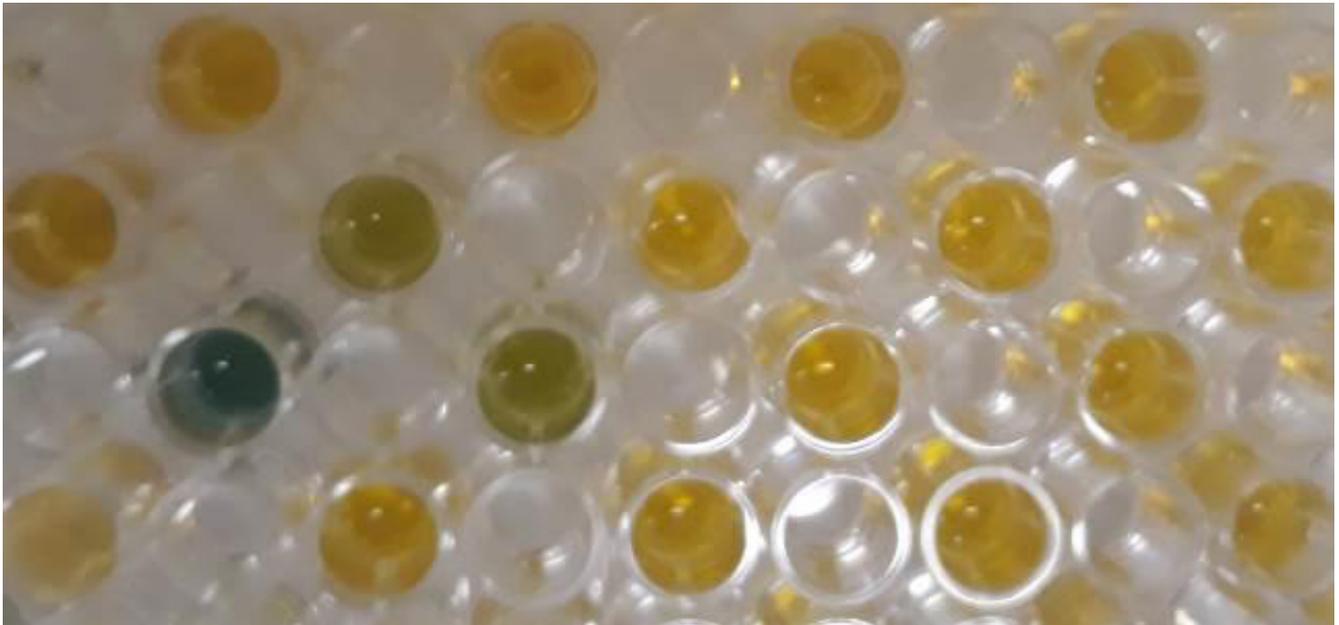


Figura 3 – Ensaio de fixação de nitrogênio, mostrando resultado positivo para três isolados bacterianos (coloração esverdeada).

- Solubilização de fosfato

No ensaio de solubilização de fosfato, o isolado bacteriano 52, coletado na parede da área 4, foi o único que apresentou a capacidade de solubilizar fosfato (Figura 4).

Biotechnological Potential

In this topic the results of the biochemical tests performed for the development of new biofertilizers and antibiotics are presented.

- Nitrogen Fixation

In the nitrogen fixation assay three bacterial isolates were able to perform the nitrogen fixation process, as it is possible to observe by the change of coloration in the culture medium (Figure 3). Isolate 24, collected on the ceiling of the cave entrance in area 1; isolate 18, collected on the floor of area 4; and isolate 25, collected on the ceiling of area 1.

Figure 3 – Nitrogen fixation assay, showing positive results for three bacterial isolates (greenish coloration).

- Phosphate solubilization

In the phosphate solubilization assay, bacterial isolate 52, collected from area 4 wall, was the only one that showed the ability to solubilize phosphate (Figure 4).

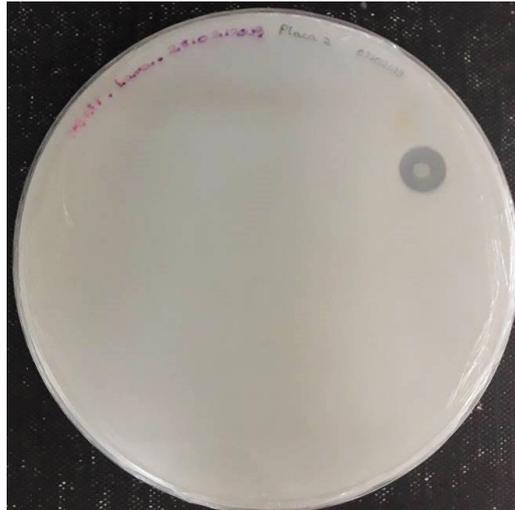


Figura 4 - Ensaio de solubilização de fosfato, com formação de halo em um dos isolados microbianos, o que indica resultado positivo para o ensaio.

Figure 4 - Phosphate solubilization assay, with halo formation in one of the microbial isolates, indicating a positive result.

- Inibição do crescimento bacteriano

Os isolados 13, 23, 15, 43 e 49 apresentaram inibição do crescimento da bactéria patogênica *Klebsiella pneumoniae* e o isolado 14 foi capaz de inibir o crescimento de *K. pneumoniae* e *Staphylococcus aureus*.

No teste de inibição em duplicata do isolado 14 sobre o crescimento dos dois patógenos (Figura 5), os halos de inibição foram medidos, sendo que para *S. aureus* os halos de inibição foram de 2,24 mm e 3,95 mm e para *K. pneumoniae* os halos medidos foram de 0,31 mm e 0,63 mm.

- Bacterial growth inhibition

Isolates 13, 23, 15, 43 and 49 showed growth inhibition of the pathogenic bacteria *Klebsiella pneumoniae* and isolate 14 was able to inhibit the growth of *K. pneumoniae* and *Staphylococcus aureus*.

In the isolate 14 duplicate inhibition test of the growth of the two pathogens (Figure 5), the inhibition halos were measured. For *S. aureus* the inhibition halos were 2.24 mm and 3.95 mm and for *K. pneumoniae* the measured halos were 0.31 mm and 0.63 mm.

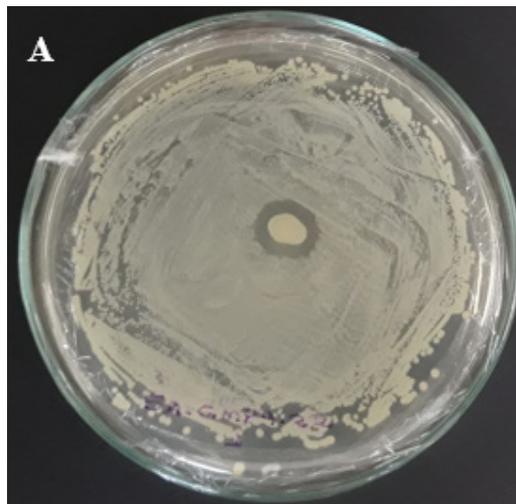
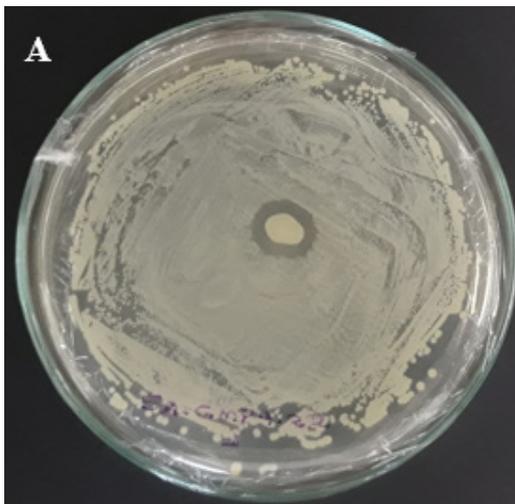


Figura 5 - Ensaio de inibição do isolado 14 sobre o crescimento dos patógenos. A) Formação do halo de inibição de *Staphylococcus aureus*; B) Formação do halo de inibição de *Klebsiella pneumoniae*.

Figure 5 - Isolate 14 pathogens growth inhibition assay. A) *Staphylococcus aureus* inhibition halo formation; B) *Klebsiella pneumoniae* inhibition halo formation.

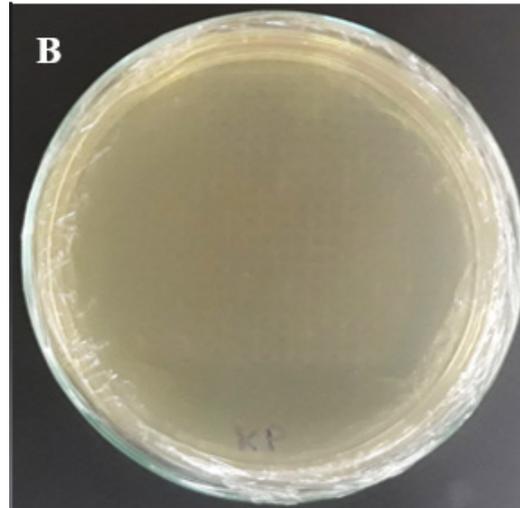
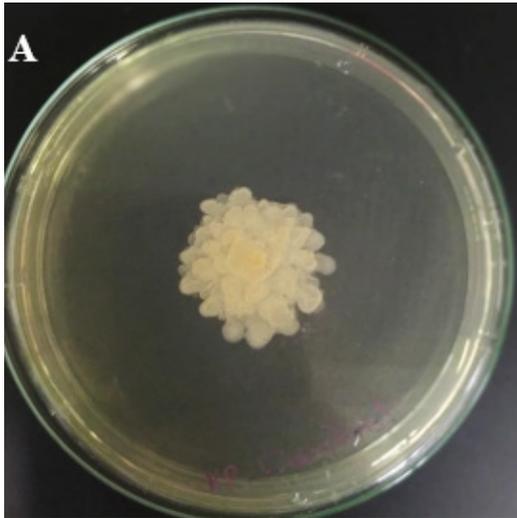


Figura 6 – Ensaio de inibição do crescimento de *Klebsiella pneumoniae* por compostos liberados pelo isolado 14. A) Placa controle com crescimento normal de *K. pneumoniae*; B) Placa com os compostos liberados pelo isolado 14 mostrando a inibição total do crescimento de *K. pneumoniae*.

Figure 6 – *Klebsiella pneumoniae* growth inhibition assay with compounds released from isolate 14. A) Control plate with normal *K. pneumoniae* growth; B) Plate with the compounds released by isolate 14 showing total inhibition of *K. pneumoniae* growth

- Caracterização do composto inibitório

- Characterization of the inhibitory compound

No teste de inibição em que os patógenos foram inoculados sobre as placas onde previamente o isolado 14 cresceu sobre celofane semipermeável, ocorreu a inibição total do crescimento de *K. pneumoniae* (Figura 6) e a inibição total do crescimento da bactéria *S. aureus* (Figura 7).

In the inhibition test in which the pathogens were inoculated onto the plates where isolate 14 had previously grown on semipermeable cellophane, there was complete inhibition of *K. pneumoniae* growth (Figure 6) and complete inhibition of *S. aureus* growth (Figure 7).

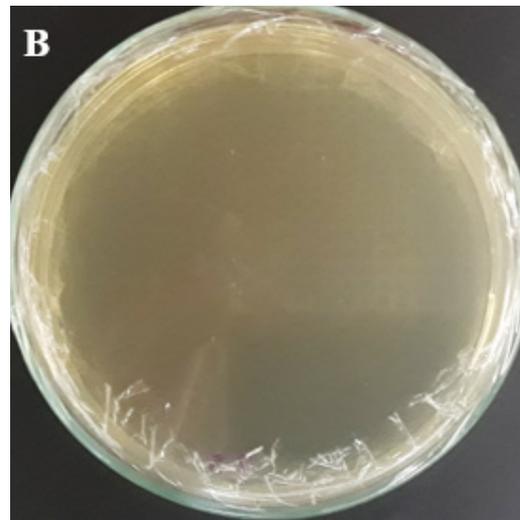
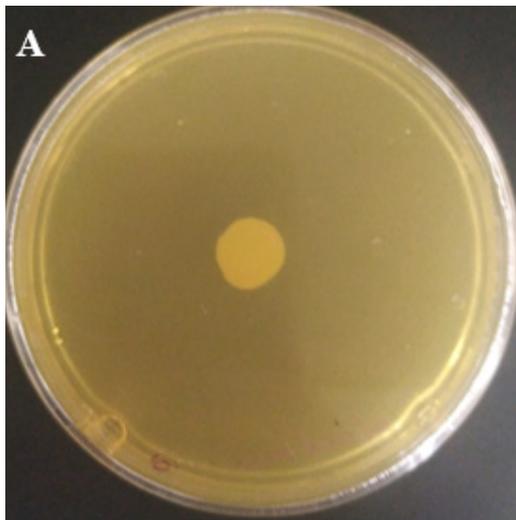


Figura 7 – Ensaio de inibição do crescimento de *Staphylococcus aureus* por compostos liberados pelo isolado 14. A) Placa controle com crescimento normal de *S. aureus*; B) Placa com os compostos liberados pelo isolado 14 mostrando a inibição total do crescimento de *S. aureus*.

Figure 7 – *S. aureus* growth inhibition assay with compounds released from isolate 14. A) Control plate with normal *S. aureus* growth; B) Plate with the compounds released by isolate 14 showing total inhibition of *S. aureus* growth

- Caracterização de motilidade do isolado

No ensaio de caracterização do isolado 14 quanto à motilidade, a bactéria apresentou crescimento espalhado por toda placa, o que indica resultado positivo.

- Caracterização de Gram

A coloração rosa do isolado 14 no teste de coloração de Gram o classifica como Gram-negativo.

- Indetificação do isolado 14

O isolado 14 foi identificado como um *Peribacillus*.

DISCUSSÃO

Lima (2017) aponta que o desenvolvimento da gruta acontece devido a uma variação litológica, a caracterização mineral foi realizada para investigar uma possível diferença na composição mineral dos diferentes pontos amostrais. Embora tal variação litológica seja observada, as análises realizadas não apresentaram diferenciação suficiente entre a composição mineralógica das amostras, o que impossibilitou correlacioná-las com a diversidade dos isolados bacterianos.

No entanto, os dados obtidos registram paridade com as descrições feitas por Pinto & Grossi-Sad (1991), que, a partir de análises pelo microscópio de luz refletida, descrevem os quartzitos presentes nas Serra do Ibitipoca como constituídos de 95 % de quartzo e 5 % de muscovita. Embora a caulinita e a gibbsita não sejam citadas nas descrições dos autores, possivelmente são resultantes da alteração da muscovita, já que suas formações estão relacionadas com o intemperismo de minerais aluminosos.

Cada área apresenta peculiaridades, como incidência e ausência de luz, diferenças no aporte energético, drenagem ativa e percolação de água, o que proporciona condições variadas para a microbiota local. As colônias isoladas neste trabalho possibilitaram a criação do primeiro banco de isolados bacterianos da maior caverna em quartzito do Brasil, a Gruta Martimiano II, que ficará acessível para novas pesquisas no laboratório.

- *Isolate motility characterization*

In the motility characterization assay of isolate 14, the bacterium showed growth spread over the whole plate, indicating a positive result.

- *Gram Characterization*

The pink coloration of isolate 14 in the Gram stain test classifies it as Gram-negative.

- *Isolate 14 indetification*

*Isolate 14 was identified as a *Peribacillus*.*

DISCUSSION

Lima (2017) points out that the cave development happens due to a lithological variation. The mineral characterization was performed to investigate a possible difference in the mineral composition of the different sample points. Although such lithological variation is observed, the analyses performed did not show enough differentiation between the mineralogical composition of the samples, making it impossible to correlate them with the diversity of the bacterial isolates.

Nevertheless, the data obtained coincide with the descriptions made by Pinto & Grossi-Sad (1991), who, from analyses by reflected light microscope, describe the quartzite present in the Serra do Ibitipoca as constituted of 95% quartz and 5% muscovite. Although kaolinite and gibbsite are not mentioned in the authors' descriptions, they possibly result from the alteration of muscovite, since their formations are related to the weathering of aluminous minerals.

Each area presents peculiarities, such as incidence and absence of light, differences in energy input, active drainage and water percolation, which provide varied conditions for the local microbiota. The colonies isolated in this work enabled the creation of the first bank of bacterial isolates from the largest quartzite cave in Brazil, the Martimiano II Cave, which will be accessible for further research in the laboratory.

A bioprospecção de microrganismos e seu potencial biotecnológico pode apresentar grande importância para o desenvolvimento de uma agricultura sustentável, no que tange ao desenvolvimento de fertilizantes biológicos. Além disso, o estudo de compostos com potencial para desenvolvimento de novos antibióticos é de suma importância para os avanços da medicina, farmácia e para o progresso e bem-estar dos seres humanos.

Segundo Pajares e Bohannan (2016), a microbiota do solo desempenha um papel fundamental nos processos do ciclo do nitrogênio, que é um elemento fundamental para todos os organismos. A fixação biológica do nitrogênio consiste em um processo bioquímico de redução do nitrogênio gasoso para amônia, que pode ser absorvida pelas plantas. Três isolados bacterianos foram capazes de fixar nitrogênio, esta capacidade metabólica, indica um potencial para desenvolvimento de biofertilizantes, entretanto necessita de estudos mais específicos para viabilizar tal aplicabilidade.

O fósforo é o segundo elemento mais importante para as plantas após o nitrogênio, por ser fundamental em praticamente todos os processos metabólicos das plantas, como a respiração e a fotossíntese (Khan *et al.*, 2010). Apesar de sua abundância no solo, encontra-se indisponível para a absorção das plantas (Sharma *et al.*, 2013). Menos que 5% do teor de fósforo de solos é biodisponível para as plantas. Diante disso, estratégias para melhorar a disponibilidade e absorção de fosfato podem contribuir significativamente para o desenvolvimento das plantas (Bulgarelli, 2013). No ensaio de solubilização de fosfato, o isolado bacteriano GML4.14 pode apresentar potencial como fertilizante biológico, devido ao resultado positivo e com estudos mais específicos pode-se avaliar este potencial.

A descoberta dos antibióticos foi uma revolução para a humanidade, mas a resistência de microrganismos a antibióticos se tornou um grande problema social, e econômico, sendo que algumas bactérias já são resistentes a todos os antibióticos conhecidos, o que causa a morte de muitas pessoas (Aminov, 2010). Devido a isso, é de extrema importância a busca por novos antibióticos.

The bioprospecting of microorganisms and their biotechnological potential can be of great importance for the development of sustainable agriculture, with regard to the development of biological fertilizers. In addition, the study of compounds with potential for the development of new antibiotics is of paramount importance for the advances in medicine, pharmacy, and for humans progress and well-being.

According to Pajares and Bohannan (2016), soil microbiota play a key role in the processes of the nitrogen cycle, which is a fundamental element for all organisms. Biological nitrogen fixation consists of a biochemical process of reducing gaseous nitrogen to ammonia, which can be absorbed by plants. Three bacterial isolates were able to fix nitrogen. This metabolic capacity indicates a potential for development of biofertilizers. However, to enable such applicability, more specific studies are required.

*After nitrogen, phosphorus is the second most important element for plants because it is essential in virtually all plants metabolic processes, such as respiration and photosynthesis (Khan *et al.*, 2010). Despite its abundance, less than 5% of soils phosphorus content is bioavailable for plant uptake (Sharma *et al.*, 2013). Therefore, strategies to improve the availability and uptake of phosphate can significantly contribute to plant development (Bulgarelli, 2013). In the phosphate solubilization test, the bacterial isolate GML4.14 may have potential as a biological fertilizer, due to the positive result and with more specific studies this potential can be evaluated.*

The discovery of antibiotics was a revolution for mankind, but the resistance of microorganisms to antibiotics has become a major social and economic problem. Many people die because of bacteria that are already resistant to all known antibiotics, which makes the search for new antibiotics of utmost importance (Aminov, 2010).

K. pneumoniae belongs to the Enterobacteriaceae family, is Gram-negative and is naturally

A bactéria *K. pneumoniae* pertence à família Enterobacteriaceae, é Gram-negativa e está presente naturalmente no trato digestivo e respiratório humano e de animais (Brooks *et al.*, 2005). Quando patogênica, a *K. pneumoniae* é o agente causador de diversas doenças, como pneumonia, infecção do trato urinário, abscessos no fígado e infecções em feridas (Rahamathulla *et al.*, 2016). Este patógeno causa um grande impacto no setor da saúde e segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), é uma das nove bactérias resistentes a diversos antibióticos, juntamente com a *S. aureus* (OMS, 2014).

Por outro lado, *S. aureus* é Gram-positiva, pertence à família Micrococcaceae, e o ser humano é um reservatório natural desta bactéria (Lowy, 1998). *S. aureus* é um patógeno oportunista e pode causar infecções simples e infecções severas, como a bacteremia, septicemia e endocardite. Além disso, a multirresistência a antibióticos é alarmante para os setores da saúde (Lowy, 1998).

O resultado positivo para a inibição direta de *K. pneumoniae* pode estar vinculada com a destruição da parede celular do alvo, sendo que os mesmos não foram capazes de inibir o crescimento de uma bactéria Gram-positiva, com exceção do isolado 14.

O isolado 14 (*Peribacillus*) foi capaz de inibir o crescimento de ambos patógenos testados o que pode estar relacionado a outros mecanismos de inibição, como por exemplo o bloqueio da expressão e da tradução (Cotter *et al.*, 2013) e a inibição da divisão celular (Bisson-Filho *et al.*, 2015) em *S. aureus* e *K. pneumoniae*.

Segundo Nourozian (2006), a inibição percentual da área do crescimento do patógeno deveria ser calculada, mas o composto antimicrobiano produzido pelo isolado 14, foi capaz de impedir totalmente o crescimento de *S. aureus* e *K. pneumoniae*.

O isolado cresceu sobre o celofane e foi retirado da placa de Petri antes da inoculação dos patógenos, o que pode indicar que a inibição ocorre com a liberação de um composto secundário difusível no ambiente (Orakci *et*

present in the digestive and respiratory tracts of humans and animals (Brooks et al., 2005). Pathogenic K. pneumoniae is the causer of several diseases, such as pneumonia, urinary tract infection, liver abscesses, and wound infections (Rahamathulla et al., 2016). This pathogen causes a great impact on the health-care sector and according to the World Health Organization (WHO) is one of the 9 bacteria resistant to various antibiotics, along with S. aureus (WHO, 2014).

On the other hand, S. aureus is Gram-positive, belongs to the Micrococcaceae family, and humans are a natural reservoir of this bacterium (Lowy, 1998). S. aureus is an opportunistic pathogen and can cause simple infections and severe infections such as bacteremia, sepsis, and endocarditis. Moreover, multidrug resistance to antibiotics is alarming to health care sectors (Lowy, 1998).

The positive result for the direct inhibition of K. pneumoniae may be linked to the destruction of the target cell wall, as they were not able to inhibit the growth of a Gram-positive bacterium, with the exception of isolate 14.

Isolate 14 (Peribacillus) was able to inhibit both pathogens growth. This may be related to other inhibition mechanisms, such as blocking expression and translation (Cotter et al., 2013) and inhibiting cell division (Bisson-Filho et al., 2015) in S. aureus and K. pneumoniae.

According to Nourozian (2006), the percentage inhibition of pathogen growth area should be calculated. However, the antimicrobial compound produced by isolate 14, was able to completely prevent the S. aureus and K. pneumoniae growth.

The isolate grew on the cellophane and was removed from the Petri dish before inoculation of the pathogens, which may indicate that the inhibition occurs with the release of a secondary compound diffusible in the environment (Orakci et al., 2010). Moreover, the release of the inhibitory compound indicates that it is naturally produced, and no competitive stimulus with another microorganism is

al., 2010). Além disso, a liberação do composto inibitório indica que o mesmo é produzido naturalmente, não sendo necessário um estímulo competitivo com outro microrganismo, o que é uma característica facilitadora para o processo de desenvolvimento e para a produção em larga escala de um antibiótico.

Segundo Harshey (2003), as bactérias desenvolveram diferentes formas de locomoção em superfícies úmidas, como por exemplo o deslizamento, espasmos e a natação, sendo que a motilidade é uma vantagem adaptativa em diversos ambientes, por propiciar maior sucesso em relações antagônicas com outros microrganismos e facilitar a busca por nutrientes. Além disso, a motilidade das bactérias confere uma vantagem adicional na resistência contra antimicrobianos (BUTLER, 2010) e pode melhorar a ação antimicrobiana do isolado 14, já que as colônias possuem a capacidade de se mover no ambiente na competição com os microrganismos patogênicos.

Segundo Koch (1992), as paredes celulares de bactérias Gram-negativas são resistentes o suficiente para suportar temperaturas e PHs extremos e são elásticas. Além disso, são fortes a ponto de suportar até 3 atm de pressão de turgor (Koch, 1998). Essas características protegem o conteúdo celular e podem estar relacionados com o sucesso evolutivo dessas bactérias (Beveridge, 1999).

CONCLUSÃO

Esta pesquisa gerou o primeiro banco de isolados bacterianos da Gruta Martimiano II e abriu a perspectiva para o desenvolvimento de pesquisas voltadas para o potencial biotecnológico de bactérias desta gruta e de outras ainda não estudadas, sendo que o mapa topográfico também servirá como base para pesquisas, em diversas áreas de concentração, a serem realizadas na Gruta Martimiano II. De acordo com os resultados da difração de raio X, a composição mineralógica parece não influenciar na diversidade microbiana entre as áreas.

required, which is a facilitating feature for the development process and for the large-scale production of an antibiotic.

According to Harshey (2003), bacteria have developed different locomotion forms on wet surfaces, such as sliding, spasming, and swimming. Motility is an adaptive advantage in various environments, because it provides greater success in antagonistic relationships with other microorganisms and facilitates the search for nutrients. Moreover, the motility of bacteria confers an additional advantage in resistance against antimicrobials (Butler, 2010) and can improve the antimicrobial action of isolate 14, since the colonies have the ability to move in the environment in competition with pathogenic microorganisms.

According to Koch (1992), the cell walls of Gram-negative bacteria are elastic and are tough enough to withstand extreme temperatures and pHs. In addition, they are strong enough to withstand up to 3 atm of turgor pressure (Koch, 1998). These characteristics protect the cell contents and may be related to the evolutionary success of these bacteria (Beveridge, 1999).

CONCLUSION

This research generated the first bank of bacterial isolates from the Martimiano II Cave and opened the perspective for the development of researches focused on the biotechnological potential of cave bacteria. The topographic map will also serve as a basis for research in several concentration areas to be carried out in the Martimiano II Cave. According to the X-ray diffraction results, the mineralogical composition does not seem to influence the microbial diversity between the areas.

*The low number of isolates with biofertilizing capacity can be justified by the absence of plant roots that can penetrate the cave. On the other hand, isolate 14, *Peribacillus*, is promising for the development of a new antibiotic. Further-*

O baixo número de isolados com capacidade biofertilizante pode ser justificado pela ausência de raízes de plantas que consigam penetrar na caverna. Por outro lado, o isolado 14, *Peribacillus*, é promissor quanto ao desenvolvimento de um novo antibiótico. Além disso, este estudo pode incentivar a conservação das cavernas, que se destacam por sua fauna especializada, feições exuberantes e por serviços ecossistêmicos, como os demonstrados nesta pesquisa, dado que a descoberta de uma nova droga dentro de uma caverna pode representar uma forma de retorno econômico, oriundo da conservação desse ecossistema único.

more, this study may encourage the conservation of caves, which are noted for their specialized fauna, lush features, and ecosystem services, such as those demonstrated in this research. Given that, the discovery of a new drug inside a cave, may represent a form of economic return from the conservation of this unique ecosystem.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMINOV, R. I. A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future. *Frontiers in microbiology*, v. 1, p. 134, 2010.
- BARBOSA, F., Érica *et al.* *Alcaligenes faecalis* associated with *Mimosa calodendron* rhizosphere assist plant survival in arsenic rich soils. *Journal of soil science and plant nutrition*, v. 17, n. 4, p. 1102-1115, 2017.
- BARTON, H. A. *et al.* The impact of rock geochemistry on bacterial community structure in oligotrophic cave environments. *International Journal of Speleology*, v.36, n. 2, p. 93-104, 2007.
- BENTO, L. C. M.; TRAVASSOS, L. E. P.; RODRIGUES, S. C. Considerações sobre as cavernas quartzíticas do Parque Estadual do Ibitipoca, Minas Gerais, Brasil. *Caminhos de Geografia*, v. 16, n. 54, 2015.
- BEVERIDGE, T. J. Structures of gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles. *Journal of bacteriology*, v. 181, n. 16, p. 4725-4733, 1999.
- BISSON-FILHO, A.W. *et al.* FtsZ filament capping by MciZ, a developmental regulator of bacterial division. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 112, n. 17, p. E2130-E2138, 2015.
- BLEITH, P. *et al.* In situ X-ray diffraction characterisation of Fe₀. 5TiOPO₄ and Cu₀. 5TiOPO₄ as electrode material for sodium-ion batteries. *Electrochimica Acta*, v. 176, p. 18-21, 2015.
- BROOKS, G.F.; BUTEL, J.S.; MORSE, S.A. *Medical Microbiology*. Edition 1, Jakarta, 2005.
- BULGARELLI, D.; SCHLAEPPI, K.; SPAEPEN, S.; VER LOREN VAN THEMAAT, E. & SCHULZE-LEFERT, P. Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. *Annu Rev Plant Biol* 64, 807-838, 2013.
- BUTLER, M. T.; WANG, Q.; HARSHEY, R. M. Cell density and mobility protect swarming bacteria against antibiotics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 107, n. 8, p. 3776-3781, 2010.

- CALVO, P.; NELSON, L.; KLOPPER, J. W. Agricultural uses of plant biostimulants. *Plant and Soil*, v. 383, n. 1, p. 3-41, October 01 2014.
- CANDIROGLU, B.; GUNGOR, N. D. Cave Ecosystems: Microbiological View. *European Journal of Biology*, v. 76, n. 1, p. 36-42, 2017.
- CANHOS, V. P.; MANFIO, G. P. Recursos Microbiológicos para Biotecnologia, 2001.
- COTTER, P. D.; ROSS, R. P.; HILL, C. Bacteriocins—a viable alternative to antibiotics?. *Nature Reviews Microbiology*, v. 11, n. 2, p. 95, 2013.
- CULVER, D.C. *Cave Life. Evolution and Ecology*. Harvard University Press. Cambridge, Massachusetts and London, England. 189 pp, 1982.
- DEMAIN, A. L.; ADRIANO, J. L. Contributions of microorganisms to industrial biology. *Mol Biotechnol*, v. 38, n. 1, p. 41-55, Jan 2008.
- DOBEREINER, J.; MARRIEL, I. E.; NERY, M. Ecological distribution of *Spirillum lipoferum* Beijerinck. *Can J Microbiol*, v. 22, n. 10, p. 1464-73, Oct 1976.
- FERREIRA, R. L. *A medida da complexidade ecológica e suas aplicações na conservação e manejo de ecossistemas subterrâneos*. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2004.
- FERREIRA, R.L. & MARTINS, R.P. Guano de Morcegos: fonte de vida em cavernas. *Ciência Hoje*, V.25, n.146, p.34-40, 1999.
- FERREIRA, R.L. & POMPEU, P.S. Fatores que influenciam a riqueza e a diversidade da fauna associada a depósitos de guano na Gruta Taboa, Sete Lagoas, MG, Brasil. *O Carste*, V.9, n.2, p.30-33, 1997.
- FERREIRA, R.L. A vida subterrânea nos campos ferruginosos. *O Carste* 17(3):106-115, 2005.
- FRANCISCO JR, W.; BEVILAQUA, D.; GARCIA JR, O. Microbiological oxidative dissolution of a complex mineral sample containing pyrite (FeS₂), pyrrotite (Fe_{1-x}S) and molybdenite (MoS₂). *Química Nova*, v. 30, n. 5, p. 1095-1099, 2007.
- GAYLARDE, C.C.; BELLINASSO, M. L.; MANFIO, G. P. Biorremediação. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, v.34, p. 36-43, 2005.
- GHOSH, S.; KUISIENE, N.; CHEEPHAM, N. The cave microbiome as a source for drug discovery: Reality or pipe dream?. *Biochemical pharmacology*, v. 134, p. 18-34, 2017.
- GILBERT, J., DANIELPOL, D. L. & STANFORD, J. A. *Groundwater Ecology*. Academic Press Limited, San Diego, California. 571 pp, 1994.
- GOMES, F.T.M.C.; FERREIRA, R.L. & JACOBI, C.M. Comunidade de artrópodes de uma caverna calcária em área de mineração: composição e estrutura. *Rev. bras. de Zoociências*, V.2, n.1, p.77-96, 2000.
- HARSHEY, R. M. Bacterial motility on a surface: many ways to a common goal. *Annual Reviews in Microbiology*, v. 57, n. 1, p. 249-273, 2003.

HILL, G. T. *et al.* Methods for assessing the composition and diversity of soil microbial communities. *Applied Soil Ecology*, v. 15, n. 1, p. 25–36, 2000.

INSTITUTO ESTADUAL DE FLORESTA. *Plano de manejo do Parque Estadual do Ibitipoca*. Belo Horizonte, 2007.

JURADO, V. *et al.* *Agromyces subbeticus* sp. nov., isolated from a cave in southern Spain. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, v. 55, n. 5, p. 1897-1901, 2005.

KHAN, M. S.; ZAIDI, A.; AHMED, M.; OVES, M. & WANI, P. A. Plant growth promotion by phosphate solubilizing fungi – current perspective. *Archives of Agronomy and Soil Science* 56, 73–98, 2010.

KOCH, A. L. The biophysics of the gram-negative periplasmic space. *Critical reviews in microbiology*, v. 24, n. 1, p. 23-59, 1998.

KOCK, A. L.; WOESTE, S. Elasticity of the sacculus of *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, v. 174, n. 14, p. 4811-4819, 1992.

LEMES, C. G. C. *Diversidade metagenômica e potencial biotecnológico de cavernas de canga do Quadrilátero Ferrífero*. 85 (Mestrado em Biotecnologia). Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto. 2018.

LEMES, C.G.C. *et al.* 16S rRNA Gene Amplicon Sequencing Data of the Iron Quadrangle Ferruginous Caves (Brazil) Shows the Importance of Conserving This Singular and Threatened Geosystem. *Diversity*, v. 13, n. 10, p. 494, 2021.

LIMA, P.E.S. *et al.* Caracterização geoespeleológica preliminar da Gruta Martimiano II, Santa Rita de Ibitipoca – MG. 34 *Congresso Brasileiro de Espeleologia*, 2017.

LOWY, F. D. *Staphylococcus aureus* infections. *New England journal of medicine*, v. 339, n. 8, p. 520-532, 1998.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Técnica de Coloração de Gram. Brasília: *Ministério da Saúde, Programa Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis e AIDS*, 1997.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. *Microbiologia e Bioquímica do Solo* 2a. Lavras. ISBN 85-87692-33-x. 2006.

NAUTIYAL, C. S. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiol Lett*, v. 170, n. 1, p. 265-70, Jan 01 1999.

NOUROZIAN, J. *et al.* Biological control of *Fusarium graminearum* on wheat by antagonistic bacteria. *Songklanakarín J. Sci. Technol*, v. 28, n. Suppl 1, p. 29-38, 2006.

NUMMER, A. R. *et al.* Potencial geoturístico do Parque Estadual da Serra do Ibitipoca, Sudeste do Estado de Minas Gerais. *Anuário do Instituto de Geociências*, v. 35, n. 1, p. 112–122, 2012.

NUMMER, A.R. *Análise Estrutural e estratigráfica do grupo Andrelândia na região de Santa Rita do Ibitipoca-Lima Duarte, sul de Minas Gerais*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1991.

- ORAKCI, G.E. *et al.* Selection of antagonistic actinomycete isolates as biocontrol agents against root-rot fungi. *Fresenius Environ. Bull*, v. 19, p. 417-424, 2010.
- PAJARES, S. & BOHANNAN, B. J. M. Ecology of Nitrogen Fixing, Nitrifying, and Denitrifying Microorganisms in Tropical Forest Soils. *Front Microbiol* 7, 1045, 2016.
- PEREIRA, E. L.; MARTINS, B. A. Processos biotecnológicos na produção de bioinseticidas. *Revista da Universidade Vale do Rio Verde*, Três Corações, v. 14, n. 2, p. 714-734, ago/dez. 2016.
- PEREZ, R.C. & GROSSI, W.R. The quartzitic speleological district of the Parque Florestal Estadual do Ibitipoca, Minas Gerais, Brazil, *International Congress of Speleology*, 1987.
- PINTO, C.P.; GROSSI-SAD, J.H. Sinopse da Geologia Regional. In: Programa Levantamentos Geológicos do Brasil. Texto Explicativo da Folha SF.23.X-C-VI Lima Duarte (Pinto, C.P. org.) DNPM/CPRM, 1991.
- PRAKASH, D. *et al.* Actinomycetes: a repertory of green catalyts with a potential revenue resource. *BioMed research international*, v. 2013, 2013.
- RAHAMATHULLA, M. P.; B.N. HARISH, L.; MATASEJE,; MULVEY M.R. . Carbapenem resistance mechanisms among blood isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *Journal. Microbiol.* 10:45-53, 2016.
- SHARMA, S. B.; SAYYED, R. Z.; TRIVEDI, M. H.; GOBI, T. A. Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *Springerplus* 2, 587, 2013.
- SPERANDIO, V. *et al.* Bacteria–host communication: the language of hormones. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 100, n. 15, p. 8951-8956, 2003.
- STALEY, J. T.; REYSENBACH, A.-L. Biodiversity of Microbial Life: Foundation of Earth's Biosphere. *New York: Wiley Series in Ecological and Applied Microbiology*, 2001.
- STREIT, W. R.; SCHMITZ, R. A. Metagenomics - The key to the uncultured microbes. *Current Opinion in Microbiology*, v. 7, n. 5, p. 492–498, 2004.
- TRAJANO, E. & MOREIRA, J.R.A. Estudo da fauna de cavernas da província espeleológica arenítica Altamira-Itaituba, Pará. *Rev. Bras. Biol.*, V.51, n.1, p.13-29, 1991.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Antimicrobial resistance: global report on surveillance. *World Health Organization*, 2014.