



Prospecção e avaliação da resistência a antimicrobianos e tolerância a metais de microrganismos isolados de solo de caverna da Serra de Carajás – PA

Mayara Maria de Souza (PIBIC/PICV/Unioeste), Debora Marina Bandeira, Fabiana Gisele da Silva Pinto (Orientador), e-mail: mayara.souza3@unioeste.br

Universidade Estadual do Oeste do Paraná/Centro de Ciências Biológicas e da Saúde/Cascavel, PR.

Área/subárea: Ciências Biológicas/Microbiologia

Palavras-chave: comunidades microbianas, cavernas, biotecnologia ambiental.

Resumo

As comunidades microbianas presentes em cavidades, especialmente em ambientes de litologia ferrífera, permanecem em grande parte desconhecidas. O isolamento e caracterização da microbiota cavernícola são essenciais para a identificação de novas espécies e a obtenção de substâncias de relevância biotecnológica, tais como compostos antimicrobianos e microrganismos capazes de biorremediar metais pesados. O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana e a tolerância a metais de bactérias isoladas do solo das cavernas GEM-1423 e GEM-1462 localizadas no Parque Nacional dos Campos Ferruginosos, na Serra de Carajás, Pará, Brasil. As bactérias foram isoladas de solo nas diferentes zonas das cavernas (fótica, penumbra e afótica) e submetidas a testes de suscetibilidade a antimicrobianos por meio da técnica de disco-difusão e avaliação da tolerância a metais pela determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM). Quanto ao perfil de resistência, as bactérias apresentaram elevada resistência aos antimicrobianos Trimetoprima, Ampicilina e Amoxicilina. Todas as bactérias apresentaram tolerância aos metais Fe, Mn, Pb, Mg e K. Estes dados são fundamentais para compreender o potencial dessas comunidades microbianas em ambientes de litologia ferrífera com implicações significativas para a biotecnologia ambiental e conservação de ecossistemas subterrâneos.

Introdução

A pesquisa da microbiota de cavernas tem se mostrado vital para a exploração da biodiversidade subterrânea, porém o conhecimento atual sobre a distribuição da diversidade de microrganismos e suas funcionalidades em ambientes de cavernas naturais no Brasil é incipiente, especialmente no que diz respeito a cavernas



ferruginosas (Parker *et al.*, 2022). Esses microrganismos desempenham papéis fundamentais nos ecossistemas cavernícolas, apresentando características únicas de resistência a antimicrobianos e tolerância a metais. Estas peculiaridades não apenas fornecem informações sobre a coevolução desses microrganismos com seu ambiente, mas também destaca seu potencial biotecnológico. A compreensão do perfil de resistência a antimicrobianos e tolerância a metais desses isolados é essencial não apenas para a pesquisa científica, mas também para diversas aplicações práticas, como o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos, tecnologias de biorremediação e bioprospecção, e em diferentes setores da indústria.

Material e Métodos

Coleta das Amostras

O local de estudo foi a Serra da Bocaina, localizada no Parque Nacional dos Campos Ferruginosos, no município de Canaã dos Carajás, Pará. As cavernas GEM-1423 (6°18'49.27"S, 49°53'35.06"O) e GEM-1462 (6°18'59.18"S, 49°53'41.71"O) foram escolhidas considerando as características de relevância, litotologia, morfologia, hidrologia, presença ou ausência de matéria orgânica, e presença de solo. A coleta ocorreu sob a licença do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO) nº 79255-1. As amostras foram coletadas na camada superficial da caverna, nos primeiros 10 cm. As cavernas foram classificadas em zonas, de acordo com Trajano & Bichuette (2006), coletando-se de 100g de solo de três pontos em cada zona, totalizando 9 pontos de amostragem. A coleta das amostras ocorreu em duas estações: seca e chuvosa que compreendem os meses de setembro e março.

Isolamento, Preservação de Microrganismos e caracterização morfológica

No laboratório de Microbiologia e Biotecnologia (LAMIBI) da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), as amostras de solo foram peneiradas, homogeneizadas e retiradas subamostras (10 g) e enriquecidas em frascos de vidro contendo 90 mL de meio salino mineral, com 0,81g de NaCl em 90 mL de água destilada. As amostras foram incubadas em agitador orbital (150 rpm) a 28°C, por 24 horas. Após esse período, foi realizada diluições seriadas, sendo retiradas alíquotas de 100 µL das diluições de 10^{-2} a 10^{-3} e semeadas na superfície do meio Luria Bertani (LB), com o auxílio da alça de Drigalski. As placas foram incubadas a 28°C durante 24 a 72 horas. As cepas microbianas isoladas foram conservadas em meio Ágar Estoque e a -80 °C até a realização dos demais ensaios. Os isolados foram observados em microscópio óptico com aumento de 100 X e caracterizados com base em sua morfologia e coloração de Gram.

Avaliação de resistência a antimicrobianos



O perfil de resistência antimicrobiana foi avaliado de acordo com as recomendações do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (CLSI, 2018). Os antimicrobianos testados foram: Amoxicilina (10 µg), Ácido Nalidíxico (30 µg), Ampicilina (10 µg), Ciprofloxacina (5 µg), Cloranfenicol (30 µg), Estreptomicina (10 µg), Imipenem (10 µg), Gentamicina (10 µg), Norfloxacin (10 µg), Trimetoprima (5 µg), Sulfazotrim (25 µg) e Tetraciclina (30 µg). Os resultados obtidos foram comparados com os dados da tabela padrão do documento M100-S17 do CLSI (2018).

Avaliação de Tolerância à Metais

O teste de tolerância à metais pesados foi realizado a partir da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração bactericida mínima (CBM) segundo metodologia de Wiegand *et al.* (2018). A CIM foi realizada em placa para cultivo de células de 96 poços contendo 135 µL de caldo Triptona de Soja (TSB). Foram avaliados os metais cobre (Cu), cromo (Cr), chumbo (Pb), ferro (Fe), magnésio (Mg), manganês (Mn), potássio (K) e zinco (Zn) nas concentrações de 2,000, 1,000, 500, 250, 125, 62,5, 31,2 e 15,6 ppm. O inóculo de 15 µL da suspensão bacteriana foi aplicado em cada poço, ajustado a partir da escala 0,5 de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL). As placas foram incubadas a 30°C por 24 horas. Após o período de incubação, foi adicionado nos poços 10 µL da solução reveladora resazurina e incubado na estufa por mais 2 horas. A leitura do teste de CIM foi visualizada a partir da mudança de coloração da solução reveladora, considerando o resultado positivo a alteração da coloração de azul para rosa.

Resultados e Discussão

Observou-se que 80% das bactérias analisadas demonstraram resistência a pelo menos dois antimicrobianos (Figura 1), apresentando um padrão de resistência semelhante ao observado por Çandiroğlu & Güngör (2020) na caverna Parsik da Turquia. Ambas as cavernas do nosso estudo apresentaram elevada resistência à Trimetoprima, semelhante ao observado por Bhullar *et al.* (2012) em 60% das bactérias isoladas de caverna da Lechuguilla, e em isolados de cavernas de Ônix dos Estados Unidos (Lavoie, 2017). Além disso, as bactérias também apresentaram elevada resistência a Ampicilina e a Amoxicilina, ambos pertencentes à classe das penicilinas, corroborando as descobertas de Bhullar *et al.* (2012) e Turrini *et al.* (2020), que também identificaram elevado perfil de resistência das bactérias a estes antimicrobianos.

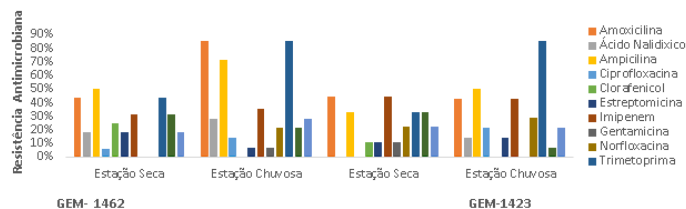


Figura 1. Perfis de resistência antimicrobiana dos isolados nas estações seca e chuvosa das cavernas ferríferas GEM-1462 e GEM-1423 do Pará, Brasil.

Quanto aos testes de tolerância a metais, observou-se que todas as cepas isoladas demonstraram elevada tolerância nas concentrações testadas dos metais: Fe, Mn, Pb, Mg e K (Figuras 2 e 3) e baixa tolerância a Cr e Cu. A resistência a esses metais provavelmente está relacionada com a litologia da região (Souza & Morassuti, 2018), sendo que os sedimentos encontrados em cavidades subterrâneas ferríferas são depósitos ricos em metais e funcionam como uma pressão de seleção para os microrganismos autóctones das cavernas, que podem se utilizar de variadas rotas metabólicas para ciclagem de metais pesados (Xu *et al.*, 2013).

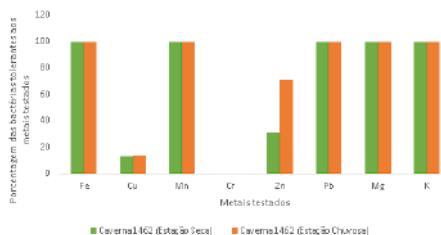


Figura 2. Porcentagem de bactérias tolerantes a metais nas estações seca e chuvosa da caverna GEM-1423

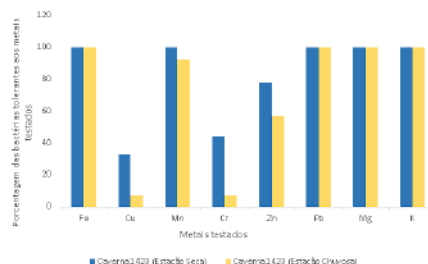


Figura 3. Porcentagem de bactérias tolerantes a metais nas estações seca e chuvosa da caverna GEM-1462.

Conclusões

As bactérias isoladas das cavernas ferríferas revelaram elevada resistência aos antimicrobianos Trimetoprima, Ampicilina e Amoxicilina, em ambas as estações do ano. Também apresentaram elevada tolerância a Fe, Mn, Pb, Mg e K. Estes resultados não só expandem nosso entendimento sobre a ecologia desses microrganismos, mas também apontam para perspectivas promissoras no campo da biotecnologia ambiental.

Agradecimentos

A Universidade Estadual do Oeste do Paraná, ao Laboratório de Microbiologia e Biotecnologia, A Vale S.A./ ICMBio/ IABS.



Referências

Bhullar, K., Waglechner, N., Pawlowski, A., Koteva, K., Banks, E. D., Johnston, M. D. & Wright, G. D. (2012). Antibiotic resistance is prevalent in an isolated cave microbiome. *Plos One* **7**, e34953.

Çandiroğlu, B., & Güngör, N. D. (2020). The Biotechnological Potentials of Bacteria Isolated from Parsik Cave, Turkey: Measuring the enzyme profiles, antibiotic resistance and antimicrobial activity in bacteria. *Johnson Matthey Technology Review* **64**, 466-479.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute (2018). *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing – Twenty-Eighth Edition: M100*. CLSI, Wayne, PA, USA.

Lavoie, K., Ruhumbika, T., Bawa, A., Whitney, A., & De Ondarza, J. (2017). High levels of antibiotic resistance but no antibiotic production detected along a gypsum gradient in great Onyx Cave, KY, USA. *Diversity* **9**, 42.

Parker, C. W., Senko, J. M., Auler, A. S., Sasowsky, I. D., Schulz, F., Woyke, T., & Barton, H. A. (2022). Enhanced terrestrial Fe (II) mobilization identified through a novel mechanism of microbially driven cave formation in Fe (III)-rich rocks. *Scientific Reports* **12**, 17062.

Silva, E. I. P., Jayasingha, P., Senanayake, S., Dandeniya, A., & Munasinghe, D. H. (2021). Microbiological study in a gneissic cave from Sri Lanka, with special focus on potential antimicrobial activities. *International Journal of Speleology* **50**(1), 4.

Souza, A. K. R., & Morassuti, C. Y. (2018). Poluição do ambiente por metais pesados e utilização de vegetais como bioindicadores. *Acta Biomedica Brasiliensia* **9**, 95-106.

Trajano, E. & Bichuette, M. (2006). *Biologia subterrânea: introdução*. Redespeleo: São Paulo.

Turrini, P., Tescari, M., Visaggio, D., Pirolo, M., Lugli, G. A., Ventura, M., Frangipani, E. & Visca, P. (2020). The microbial community of a biofilm lining the wall of a pristine cave in Western New Guinea. *Microbiological Research* **241**, 126584.

Wiegand, I., Hilpert, K., & Hancock, R. E. (2008). Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature Protocols* **3**, 163-175.

Xu, L., Xu, X. W., Meng, F. X., Huo, Y. Y., Oren, A., Yang, J. Y., & Wang, C. S. (2013). *Halomonas zincidurans* sp. nov., a heavy-metal-tolerant bacterium isolated from the deep-sea environment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **63**, 4230-4236.