

ISOLAMENTO DE *Bacillus* sp. E GÊNEROS CORRELATOS DE ECOSISTEMAS ANTÁRTICOS E POTENCIAL DE PROSPECÇÃO PARA DESCOBERTA DE ANTIBIÓTICOS

WALLACE R. **SOUZA**¹; MÁRCIA M. **PARMA**²; SUIKINAI N. **SANTOS**³; LUCIANA A. **ÁVILA**⁴; VIVIAN H. **PELLIZARI**⁵; ITAMAR S. **MELO**⁶

Nº 11421

RESUMO

O Continente Antártico possui condições extremas que favorecem a adaptação a temperaturas muito baixas, e as bactérias são os organismos mais adaptados. Bactérias do gênero *Bacillus* sp. são conhecidas por desenvolverem estruturas de resistência (endósporos) e produzirem uma grande diversidade de antibióticos. Visando isolar espécies de *Bacillus* e avaliar o potencial para produção de substâncias antimicrobianas, amostras de vários ecossistemas antárticos foram utilizados. Um total de 64 linhagens bacterianas foram isoladas, das quais 43,75% corresponderam ao gênero *Bacillus*, 35,94% *Brevibacillus*, 14,06% *Paenibacillus*, 4,69% *Sporosarcina*. Dentre estas linhagens, 10,94% apresentaram potencial para produção de antibióticos contra *Bacillus cereus*, com a concentração inibitória mínima (CIM) entre 62,5 a 250 µg/ml e *Staphylococcus aureus*, com CIM entre 150 a 500 µg/ml. Os metabólitos obtidos em BD foram mais ativos quando comparados aos obtidos em CN e a maior atividade antimicrobiana foi apresentada por biomoléculas de *Bacillus amyloliquefaciens*. Os resultados sugerem que o estresse ambiental que tais bactérias estão submetidas pode induzir o desenvolvimento de mecanismos de resistência e adaptação como a produção de esporos e de antibióticos, considerando-as fontes promissoras de metabólitos de interesse biotecnológicos.

¹ Bolsista EMBRAPA: Graduação em Eng. Ambiental, FAJ, Jaguariúna-SP, wallacesouza91@gmail.com

² Colaboradora: Analista, EMBRAPA Meio Ambiente, Jaguariúna-SP.

³ Colaboradora: Doutoranda, ESALQ/USP, Piracicaba-SP.

⁴ Colaboradora: Doutoranda, USP, São Paulo-SP

⁵ Colaboradora: Pesquisadora Instituto de Ocenografia – USP, São Paulo-SP

⁶ Orientador: Pesquisador, EMBRAPA Meio Ambiente, Jaguariúna-SP

ABSTRACT

The Antarctic continent with extreme conditions, present conditions for adaptations to very low temperature, and the bacteria are the organisms more adapted. Bacteria belonging to *Bacillus* sp. are known to develop resistance structures (endospores) as well as produce a wide variety of antibiotics. In order to isolate *Bacillus* sp. and assess their potential for antimicrobial substances production, samples from several Antarctic ecosystems were used. A total of 64 bacterial strains were isolated, of which 43.75% corresponded to the genus *Bacillus*, 35,94% *Brevibacillus*, 14,06% *Paenibacillus* and 4,69% *Sporosarcina*. Among these strains, 10.94% showed potential for the production of antibiotics against *Bacillus cereus*, with minimum inhibitory concentration (MIC) between 62,5 to 250 µg/ml and *Staphylococcus aureus*, with MIC between 150 to 500 µg/ml. The metabolites obtained from BD were more active when compared to those obtained in BD and the highest antimicrobial activity was presented by biomolecules from *Bacillus amyloliquefaciens*. The results suggest that the environmental stress that these bacteria are subjected to can induce the development of resistance mechanisms and adaptation as the production of spores and antibiotics, considering them as promising sources of biotechnological interest metabolites.

INTRODUÇÃO

A Antártica é considerada um dos ambientes mais extremos da Terra por apresentar condições extremas de clima, temperatura, escassez de nutrientes, os quais modulam as comunidades bióticas presentes neste ambiente.

Os ecossistemas da Antártica são constituídos principalmente de uma especificidade de fauna, flora e uma biomassa microbiana responsável pela transição do fluxo biológico de carbono, nutrientes e energia. Alguns exemplos destes ecossistemas são os solos minerais, o gelo de geleiras e o gelo marinho, as rochas, solos permanentemente congelados (*permafrost*), ambientes marinhos, entre outros. O estudo de tal biodiversidade representa grande importância para a pesquisa e conhecimento de possíveis mecanismos evolutivos e adaptativos destas comunidades neste ambiente (COWAN e TOW, 2004; VINCENT, 2000; DUARTE, 2010).

Os estudos de micro-organismos que sobrevivem em ambientes extremos (extremófilos) como a Antártica, tornam-se foco de interesse na área da biotecnologia para busca de biomoléculas de valor científico. Dentre os resultados de estudos realizados com estes micro-organismos, têm-se o uso de bactérias psicrofílicas

(crescimento ótimo abaixo de 15°C) que podem ser utilizadas por indústrias alimentícias na conservação de alimentos a baixas temperaturas (CHATTOPADHYAY, 2006); bactérias magnetotáticas (MTB - que apresentam inclusões com íons de ferro em seu citoplasma) podem ser utilizadas como ferramentas para nanotecnologia, assim como em biorremediação no processo de bioabsorção de metais pesados de efluentes industriais (BLAKEMORE e KERKER 1975; SONG et al., 2007); linhagens fúngicas e bacterianas produtoras de compostos com atividades antimicrobiana contra patógenos humanos, alimentícios e agrícola (GIUDICE et al., 2007; O'BRIEN et al., 2004;)

Dentre os principais grupos de bactérias produtoras de antibióticos, estão as actinobactérias e os *Bacillus*. Deste último grupo, tem sido identificado nos últimos anos mais de 795 antibióticos, destacando-se as iturinas e surfactinas. (BERDY, 2005)

Dentro desse enfoque, este trabalho teve como objetivo, isolar espécies de *Bacillus* obtidos de diferentes ecossistemas antárticos e avaliar o potencial de produção de antibióticos contra bactérias resistentes.

MATERIAL E MÉTODOS

Área da coleta

As coletas foram realizadas na Baía do Almirantado, Ilha Rei George – Península Antártica (62°09'S, 58°28'W), e as amostras e suas especificações estão apresentadas na Tabela 1. As coletas foram realizadas por ocasião das expedições do Programa Antártico Brasileiro (PROANTAR/CNPq) durante a Operação Antártica XXVIII (verão 2009/2010).

Tabela 1: Tipo e origem das amostras coletadas.

Amostras	Locais de coleta	Amostras	Locais de coleta
Água de degelo	ECF		PP
	LA	Rochas	ECF
Água	LMP		YP
	LV		RBA
	PA	Rochas aderidas a líquens	PP
Solo	PA	Rizosfera de <i>Deschampsia antarctica</i>	ECF
Solo sob geleira	GGs	Água do mar	ECF

ECF(Estação Comandante Ferraz), LA (Lago Arctowski), LMP (Lago Machu Picchu), LV (Lago Vanda), PA (Pinguineira Arctowski), GGS (Geleira Glaciar Steinhouse), PP (Punta del Plaza), YP (Yellow Point), RBA (Refúgio B. amarelo).

Isolamento de linhagens bacterianas

Adicionou-se à 50ml de meio de esporulação 2xSG (16g de caldo nutritivo; 0,5g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 2g de KCl; 0,24g de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$; 0,17g de MnSO_4 ; 0,3g de FeSO_4 ; 1,0g de glucose e 1000ml de água destilada), 1g das amostras de solo e rochas, e 1ml das amostras de água, incubando-as por 48h sob agitação de 200 rpm à 37°C. As células vegetativas foram mortas adicionando clorofórmio (1% v/v), agitou e deixou-se por 24 h à temperatura ambiente. Posteriormente, foram plaqueadas 0,1 ml da suspensão em meio nutriente ágar (5 g de peptona, 3 g de extrato de carne, 16 g de ágar e 1000 ml de água destilada) e incubadas à 18°C por até 15 dias. As colônias bacterianas foram purificadas e isoladas (MOHAMED et al., 2006).

Identificação taxonômica dos isolados bacterianos por análise de perfil de ácidos graxos da membrana celular (FAME)

As linhagens bacterianas foram crescidas em meio TSBA por 24 hs, e após esse período foi feita a extração seguindo as etapas de saponificação, metilação, extração e lavagem, de acordo com Sasser (1990). As amostras foram injetadas em cromatógrafo gasoso (Agilent 6850) e comparadas à biblioteca TSBA6. Foram considerados índices de similaridades superiores à 0,4.

Seleção de bactérias com potencial para produção de antibióticos

Para o ensaio de antagonismo “*in vitro*” foram usadas 6 linhagens de bactérias Gram-positivas (*Bacillus cereus* – CCMA-360, *B. megaterium* – CCMA-100, *B. thuringiensis* – CCMA-411, *B. subtilis* – CCMA-124, *Enterococcus casseliflavus* e *Staphylococcus aureus* – CCMA-190) e 6 bactérias Gram-negativas (*Agrobacterium tumefaciens*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* – LMA-1, *P. fluorescens*, *Salmonella typhi*, *Serratia marcescens*), cedidos pela coleção de cultura do Laboratório de Microbiologia Ambiental da EMBRAPA Meio Ambiente.

As linhagens bacterianas foram crescidas em meio de cultivo nutriente ágar, por 96 h a 18°C. As bactérias-teste foram estriadas paralelamente e incubadas à 27°C por 24 h. A avaliação da atividade antibacteriana dos isolados foi realizada por meio da observação da inibição das bactérias-teste (distância entre o isolado e a bactéria teste).

Obtenção de extratos orgânicos dos micro-organismos isolados

Os isolados bacterianos foram cultivados em dois caldos de cultivo (Caldo batata dextrose e caldo nutriente) para avaliar a melhor produção de metabólitos secundários. Em frascos de Erlenmeyer com 250 mL de caldo de cultivo BD e CN incubou em “Shaker” à 18 °C, 180 rpm, por 96 horas. Após o crescimento microbiano, foi realizada a filtração com membrana de celulose de 0,45 µm e o pH foi ajustado para 3. Realizou-se a extração líquido-líquido do sobrenadante, com 100 mL de acetato de etila em funil de separação na proporção 1/1. Esse processo foi repetido por três vezes. Adicionou sulfato de sódio anidro, a fase orgânica reunida na concentração de 5%. Após a filtragem e evaporação dos solventes em rotaevaporador, os extratos obtidos foram submetidos aos ensaios antimicrobianos.

Ensaio de antibiose por difusão em disco

A atividade antimicrobiana foi realizada pela técnica de difusão em disco de acordo com a metodologia de Kirby-Bauer (1960), com adaptações. Em discos de papel estéreis foram impregnados 5 µL da suspensão dos extratos brutos ressuspensos em DMSO. A leitura foi realizada com o auxílio de um halômetro utilizando fonte de luz refletida para iluminar a placa invertida sobre um fundo preto e opaco dos halos de inibição.

Concentração inibitória mínima – CIM

A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada pelo método de diluição descrito pela norma técnica da NCCLS, 2004. Diferentes concentrações de extrato bruto de acetato de etila foram testados. O crescimento microbiano foi determinado pela revelação com 50 µL pelo sal de tetrazolium (1-cloreto 2,3,5 trifeniltetrazolium). A CIM foi definida como menor concentração dos extratos bruto que resultou na completa inibição visível. Como controle positivo foi utilizado cloranfenicol e todos os experimentos foram realizados em triplicatas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um total de 64 linhagens bacterianas foram isoladas, sendo, 46,88% de amostras de rochas, 25% de água, 17,18% de solo, 9,38% de água do mar e 1,56% a rizosfera de *D. antarctica*. Assim, de acordo com as técnicas de isolamento utilizadas neste trabalho, a maior abundância de linhagens isoladas e pertencente ao grupo dos *Bacillus* são das amostras de rochas, como observado na Figura 1. Isso pode estar

associado aos microhabitats, que são pequenas fendas onde ficam depositados nutrientes oriundos de água de chuva, ventos, neve, formando as comunidades criptoendolíticas (NIENOW et al., 1988).

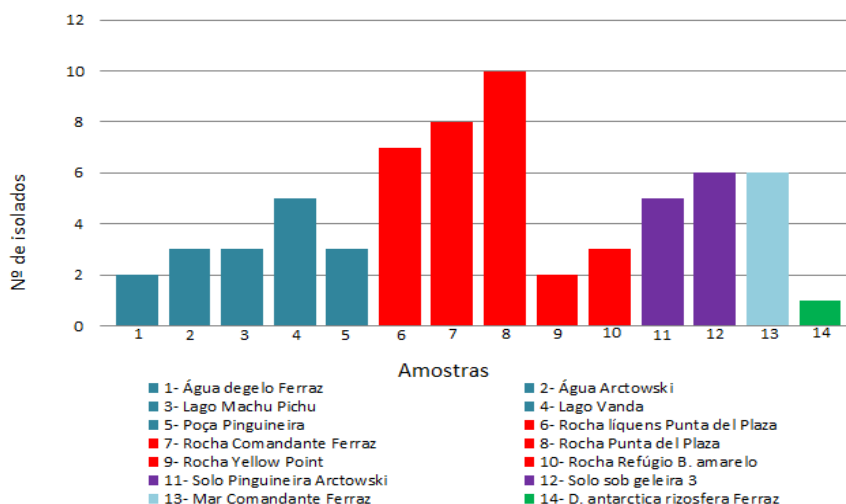


FIGURA 1. Relação das linhagens bacterianas isoladas de acordo com as amostras ambientais (Azul – amostras de água, Vermelho – amostras de rochas, Roxo – amostras de solo, Azul claro – amostras de água marinha e Verde – amostras de rizosfera)

Por meio da identificação pela análise de perfil de ácidos graxos (FAME), foi possível verificar que dos isolados, 43,75% corresponderam ao gênero *Bacillus*, 35,94% *Brevibacillus*, 14,06% *Paenibacillus*, 4,69% *Sporosarcina* e 1,56% não foram identificados pelo método aqui utilizado. Além disso, observou-se o isolamento de apenas um tipo de bactéria (*Bacillus viscosus*) da rizosfera de *D. antarctica*, corroborando com os dados de Teixeira et al., (2010) que, trabalhando com pirosequenciamento de rizosfera da mesma planta, demonstrou-se predominância do filo Firmicutes, entretanto, a ordem dos Bacillales foi encontrada em menor frequência. Bactérias pertencentes ao filo dos Firmicutes são caracterizadas por apresentarem a produção de estruturas de resistências como esporos e endósporos (NICHOLSON et al. 2000).

Os resultados do teste de antagonismo, possibilitaram a seleção de 7 linhagens bacterianas (10,94% do total de isolados) que apresentaram alguma atividade antagônica às bactérias-teste. Apesar dessas 7 linhagens terem apresentado atividade tanto para bactérias Gram-negativas quanto para Gram-positivas, os extratos obtidos apresentavam halos de inibição apenas contra duas bactérias Gram-positivas: *B. cereus* e *S. aureus*.

O cultivo bacteriano em dois meios mostrou que o meio BD apresentou os melhores resultados, com halos de inibição de até 38 mm de diâmetro, enquanto que

no meio CN apenas uma linhagem apresentou halo. Na Tabela 2 estão apresentados os resultados do ensaio de difusão em disco e suas respectivas CIM, além de identificação pela técnica comparativa de perfil de ácidos graxos.

TABELA 2: Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos das linhagens bacterianas obtidas de ambientes da Antártica e suas respectivas identificações.

ISOLADOS	IDENTIFICAÇÃO (FAME)	ORIGEM	Diâmetros das zonas de inibição (mm)				CIM (µg/ml)	
			<i>B. cereus</i>		<i>S. aureus</i>		<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>
			BD	CN	BD	CN		
Ant 11-13	<i>B. subtilis</i>	RCF	9	R	38	R	250	125
Ant 19-4	<i>Paenibacillus lentimorbus</i>	RRBA	14	R	15	16	125	250
Ant 19-5	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	RRBA	8	R	14	R	62,5	250
Ant 20-9	<i>Paenibacillus macerans</i>	SSGGS	15	R	19	R	125	125
Ant 21-9	<i>Paenibacillus lentimorbus</i>	AMCF	13	R	21	R	250	250
Ant 21-15	<i>Paenibacillus lentimorbus</i>	AMCF	8	R	36	R	250	250
Ant 21-25	<i>Bacillus spp.</i>	AMCF	13	R	16	R	125	500

RCF (Rocha Comandante Ferraz), RRBA (Rocha Refúgio B. amarelo), SSGGS (Solo sob geleira Glaciar Steinhouse), AMCF (Água marinha Comandante Ferraz); BD- caldo de batata dextrose; CN- caldo nutriente; R- resistente.

Os resultados obtidos por meio da concentração inibitória mínima e apresentados na tabela 2 demonstram valores de CIM entre 62,5 a 500 µg/ml.

A menor CIM foi alcançada pelo extrato da linhagem Ant19-5 (62,5 µg/ml), identificada como *B. amyloliquefaciens*. YOSHIDA et al. (2001), realizaram estudos de atividade antimicrobiana com linhagens de *B. amyloliquefaciens*, isoladas de folhas de amoreira, e observaram atividade contra outros fitopatógenos como *Clavibacter michiganensi*, classificada como Gram-positiva. Espécies de bactérias do gênero *Bacillus* são conhecidas por produzirem uma série de antibióticos como a surfactina, iturina e fengicina além de serem usadas no controle biológico em ensaios “*in vivo*” (ARGUELLES-ARIAS, 2009; BERGY, 2005). Diante dos resultados alcançados, observou-se que micro-organismos que habitam ambientes extremos como a Antártica, podem servir como potenciais para busca de novos metabólitos de importância biotecnológica.

CONCLUSÃO

O estresse ambiental que tais bactérias estão submetidas pode induzir o desenvolvimento de mecanismos de resistência e adaptação como a produção de esporos e de antibióticos, considerando-as fontes promissoras de metabólitos de interesse biotecnológico.

AGRADECIMENTOS

A EMBRAPA Meio Ambiente (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária), pelo apoio com a bolsa de iniciação científica, pelo suporte e estrutura para realização dos experimentos.

REFERÊNCIAS

- ARGUELLES-ARIAS, A. et al., *Bacillus amyloliquefaciens* GA1 as a source of potent antibiotics and other secondary metabolites for biocontrol of plant pathogens. **Microbial Cell Factories**, v. 8, n. 1, 2009.
- BERDY, J. Bioactive microbial metabolites. **The Journal of Antibiotics**, v. 58, n. 1, p. 1-26, jan. 2005.
- BLAKEMORE, R. P. Magnetotactic bacteria. **Science**, v. 190, n. 4212, p. 377-379, oct. 1975.
- CHATTOPADHYAY, M. K. Mechanism of bacterial adaptation to low temperature. **Journal Bioscience – Indian Academy of Sciences**, v. 31, n.1, p. 157–165, mar. 2006.
- COWAN, D. A.; TOW, L. A. Endangered Antarctic Environments. **Annual Reviews of Microbiology**, v.58, p.649-690, 2004.
- DUARTE, R. T. D. **Micro-organismos em ambientes criogênicos: gelo glacial, solos expostos por recuo de geleiras e permafrost polares**. 2010. 201 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- GIUDICE, A. L.; BRUNI, V.; MICHAUD, L. Characterization of Antarctic psychrotrophic bacteria with antibacterial activities against terrestrial microorganism. **Journal of Basic microbiology**, v. 47, n. 6, p. 496-505, dec. 2007.
- KIRBY, W.M.M.; PERRY, D. M.; BAUER, A. W. Treatment of Staphylococcal Sepsis with Vancomycin. Report thirty-three cases. **New England Journal of Medicine**, Jan, v. 262, n. 2, p. 49-55, jan.1960.
- MOHAMED, E. A. H. et al., Diversity of *Bacillus* genotypes in soil samples from Elomayed biosphere reserve in Egypt. **Journal of Culture Collections**, v. 5, n. 1, p. 78-84, 2006.
- NCCLS – **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Fourteenth Informational Supplement**. M100-S14, Wayne, Pa. NCCLS, 2004.
- NICHOLSON, W. L. et al., Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 64, n. 3, p. 548-572, sep. 2000.
- NIENOW, J. A.; MCKAY, C. P.; FRIEDMANN, E. I. The cryptoendolithic microbial environment in the Ross desert of Antarctica: Light in the photosynthetically active region. **Microbial Ecology**, v. 16, n. 3, p. 271-289, 1988.
- O'BRIEN, A. et al., Antarctic bacteria inhibit growth of food-borne microorganisms at low temperatures. **FEMS Microbial Ecology**, v. 48, n. 2, p. 157-167, may. 2004.
- SONG, H. et al., Biosorption Equilibrium and Kinetics of Au(III) and Cu(II) on Magnetotactic Bacteria. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, v. 15, n. 6, p. 847-854, dec. 2007.
- TEIXEIRA, L. C. R. S. et al., Bacterial diversity in rhizosphere soil from Antarctic vascular plants of Admiralty Bay, maritime Antarctica. **The ISME Journal**, v. 4, p. 989-1001, apr. 2010.
- SASSER, M. Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids. **Tech Note 101 MIDI**. Newark, D.E., 1990.
- VINCENT, W. F. Evolutionary origins of Antarctic microbiota: invasion, selection and endemism. **Antarctic Science**, v. 12, p. 374-385, 2000.
- YOSHIDA, S. et al., Antimicrobial activity of culture filtrate of *Bacillus amyloliquefaciens* RC-2 isolated from Mulberry leaves. **Biological Control**, v. 91, n. 2, p. 181-187, feb. 2001.