

## Atividade Antimicrobiana de Bactérias Formadoras de Endósporos Isoladas de Ambientes Impactados pela Mineração do Carvão

Marcus Adonai Castro-Silva<sup>1</sup> e Valesca Weingartner<sup>2</sup>

**Resumo:** As bactérias formadoras de endósporos compreendem microrganismos procariontes capazes de formar o endósporo, uma célula de resistência que permite a sobrevivência desses organismos em condições adversas. Estas bactérias possuem uma ampla distribuição no ambiente, resultante da facilidade de dispersão do endósporo e de sua diversidade metabólica, características que conferem a este grupo bacteriano grande potencial biotecnológico. Em virtude do surgimento de patógenos com resistência aos antibióticos em uso, a bioprospecção por novas substâncias com ação antimicrobiana constitui uma estratégia importante no combate a doenças. Neste contexto, o presente trabalho caracterizou a atividade antimicrobiana de bactérias formadoras de endósporos, provenientes de ambientes impactados por rejeitos da mineração de carvão de Santa Catarina, contra linhagens de referência distintas. Parte dos organismos foi isolada neste trabalho e parte foi obtida da Coleção de Culturas do Laboratório de Microbiologia Aplicada, UNIVALI. Das quarenta e quatro linhagens estudadas, vinte delas isoladas neste trabalho, quinze apresentaram atividade antimicrobiana, sendo que cinco contra todas as linhagens de referência. Através da análise de agrupamentos das características fenotípicas, foram observados sete grupos de similaridade. Não houve coerência entre estes grupos e os resultados da atividade antimicrobiana. Estes resultados são relevantes para a descoberta de novas moléculas bioativas.

Palavras-chave: Bactérias formadoras de endósporos. Atividade antimicrobiana. Mineração do carvão.

### 1 Introdução

A bioprospecção de organismos produtores de substâncias com atividade antimicrobiana constitui uma estratégia importante para permitir o combate contínuo de várias doenças ocasionadas por microrganismos que têm desenvolvido resistência aos compostos antimicrobianos atualmente empregados. Os microrganismos produtores destas substâncias são amplamente difundidos na natureza e compreendem tanto organismos eucariontes (fungos) como procariontes. Entre os procariontes, os actinomicetos e as bactérias formadoras de endósporos (BFEs) compreendem os organismos mais explorados para a produção destes compostos, devido à grande variedade de substâncias produzidas e ao potencial de descoberta de novas substâncias (MADIGAN et al., 2000).

As BFEs, como o próprio nome sugere, caracterizam-se como capazes de produzir o endósporo, uma célula diferenciada formada por estas bactérias, quando elas são impedidas de crescer em função de condições ambientais desfavoráveis, como exaustão de nutrientes, altas temperaturas e presença de substâncias tóxicas. Além da formação da célula de resistência, estas bactérias caracterizam-se, também, por apresentar a forma de bacilo com uma parede

celular do tipo Gram-positiva. Tanto os organismos aeróbios como os anaeróbios, facultativos e estritos, enquadram-se neste grupo de bactérias (PRIEST, 1993).

A atividade de mineração do carvão, apesar de benéfica, pode ocasionar uma série de alterações ambientais nas regiões sob sua influência. Entre essas alterações, a mais evidente é a acidificação de solos e corpos d'água, o que torna estes locais inapropriados para a maioria dos seres vivos, sendo habitados principalmente por microrganismos procariontes. Entre as BFEs, quatro gêneros foram relatados em ambientes ácidos: *Bacillus*, *Geobacillus*, *Alicyclobacillus* e *Sulfobacillus*. As linhagens isoladas compreendem espécies acidofílicas (que crescem preferencialmente em condições ácidas), neutrofílicas (que apresentam um pH ótimo de crescimento próximo ao neutro), termófilas (crescimento ótimo em torno de 50 °C) ou mesófilas (crescimento ótimo em torno de 30 °C) (LÓPEZ-ARCHILLA et al., 2001; HALLBERG; JOHNSON, 2001).

A busca de compostos com atividade antimicrobiana pela indústria farmacêutica ilustra a importância das técnicas de isolamento e triagem a partir do ambiente, na seleção de microrganismos para aplicações biotecnológicas. Amostras de natureza variada, incluindo solos de vários locais, são examinadas na procura de

<sup>1</sup> Universidade do Vale do Itajaí – Univali, Laboratório de Microbiologia Aplicada- Sala 127-Bloco 20, Campus Itajaí, Rua Uruguai, 458 – Centro, Caixa Postal 360 – CEP 88302-202, Itajaí – Santa Catarina – Brasil. E-mail: marcus.silva@univali.br

<sup>2</sup> E-mail: valesca@univali.br

novos microrganismos que produzem substâncias antimicrobianas de maior eficiência, dado que atualmente crescem os casos de resistência a estes compostos (MADIGAN et al., 2000). Neste sentido, as características peculiares dos ambientes sob influência da mineração do carvão os tornam muito interessantes do ponto de vista biotecnológico, pois constituem uma fonte de novos microrganismos ou produtos ativos.

Sendo assim, o presente estudo objetivou selecionar linhagens de BFEs provenientes de ambientes impactados pela mineração de carvão, avaliar e comparar sua atividade antimicrobiana contra seis linhagens de referência distintas, bem como caracterizar em termos fenotípicos os organismos selecionados.

## 2 Material e Métodos

### 2.1 Linhagens Estudadas

As linhagens estudadas quanto à produção de substâncias com atividade antimicrobiana foram em parte obtidas da Coleção de Culturas do Laboratório de Microbiologia Aplicada da UNIVALI, tendo sido originadas de locais impactados pela mineração do carvão (Tabela 1). Para maiores informações sobre estas estirpes e os locais de origem consultar Castro-Silva et al. (2003). Outros organismos foram isolados no início deste trabalho, como descrito a seguir.

**Tabela 1 – Linhagens de bactérias formadoras de endósporos provenientes da Coleção de Culturas do Laboratório de Microbiologia Aplicada da UNIVALI, utilizadas no presente estudo.**

Linhagem	Local de Isolamento	Amostra	pH do Local	Data
LAMA002	Capivari de Baixo	água	4	27/09/01
LAMA005	Capivari de Baixo	água	4	27/09/01
LAMA012	Capivari de Baixo	sedimento	3	27/09/01
LAMA014	Capivari de Baixo	sedimento	3	27/09/01
LAMA015	Capivari de Baixo	sedimento	3	27/09/01
LAMA018	Capivari de Baixo	sedimento	2,5	27/09/01
LAMA020	Capivari de Baixo	sedimento	3	27/09/01
LAMA021	Capivari de Baixo	água	3	27/09/01
LAMA023	Capivari de Baixo	água	2,5	27/09/01
LAMA024	Capivari de Baixo	água	2,5	27/09/01
LAMA026	Capivari de Baixo	sedimento	2,5	27/09/01
LAMA031	Capivari de Baixo	sedimento	2,5	27/09/01
LAMA032	Capivari de Baixo	sedimento	2,5	27/09/01
LAMA033	Capivari de Baixo	sedimento	2,5	27/09/01
LAMA072	Criciúma, mineradora	água	3	06/06/03
LAMA073	Criciúma, mineradora	água	3	06/06/03
LAMA050	Criciúma, mineradora	água	3	06/06/03
LAMA051	Criciúma, mineradora	água	3	06/06/03
LAMA052	Criciúma, mineradora	água	3	06/06/03
LAMA054	Criciúma, mineradora	água	3	06/06/03
LAMA055	Criciúma, mineradora	água	6,7	06/06/03
LAMA062	Criciúma, mineradora	água	6,7	06/06/03
LAMA184	Capivari de Baixo	água	2,28	31/03/03
LAMA186	Capivari de Baixo	solo	2,28	31/03/03

### 2.2 Isolamento de Bactérias Formadoras de Endósporos (BFEs)

O isolamento de BFEs foi realizado a partir de amostras de água e sedimento do rio Sangão, um rio ácido impactado pela mineração do carvão, localizado em Criciúma, Santa Catarina, sul do Brasil. Na coleta realizada no dia 06/03/04, para a obtenção das amostras

analisadas, os valores de pH corresponderam a 2,45 e 2,5. Para o isolamento de bactérias formadoras de endósporos destas amostras foi utilizado o aquecimento (65 °C, 30 minutos), para a seleção dos esporos, e a técnica de espalhamento em placas para inoculação. Inicialmente as amostras foram diluídas de forma decimal e seriadas até 10<sup>-4</sup>. Posteriormente foi realizada a seleção de esporos, como descrito

acima. Em seguida alíquotas de cada diluição foram inoculadas em duplicata, em placas de Agar TSA (Agar Trípico de Soja, Merck, pH 7,3), e as placas inoculadas foram incubadas a 30 °C por 48 horas. Também se realizou um enriquecimento das amostras em Caldo TSB (Caldo Trípico de Soja, Merck, pH 4,5). Após a incubação por 48 horas a 30 °C, alíquotas foram semeadas em placas de Petri contendo Agar TSA, e novamente incubadas de forma similar. Das placas incubadas de ambos os procedimentos, unidades formadoras de colônias (UFC) de diferentes morfologias foram selecionadas e repicadas pelo menos três vezes para o seu isolamento. As bactérias isoladas foram mantidas em laboratório em Agar Nutriente, refrigeradas a 4°C.

### 2.3 Determinação da Atividade Antimicrobiana

Para a determinação da produção de substâncias com atividade antimicrobiana, foi utilizado o ensaio descrito por Geis et al. (1983). A partir de uma cultura de 24 horas das linhagens a serem testadas em Caldo Nutriente, foram feitos inóculos pontuais em placas de Petri contendo Ágar Nutriente. As placas inoculadas foram incubadas por 24h, a fim que ocorresse o desenvolvimento das UFC. Posteriormente, estas placas foram cobertas com Ágar Nutriente semi-sólido (3,5 mL, 0,7% de Ágar) inoculado com as linhagens de referência (uma linhagem por placa) *Bacillus megaterium* ATCC14581, *Pseudomonas putida* ATCC12633, *Chromobacterium violaceum* ATCC12472, *Staphylococcus aureus* tipo selvagem (obtida do Laboratório de Microbiologia, CCS, UNIVALI), *Escherichia coli* DH5a e *Saccharomyces cerevisiae* tipo selvagem (obtida do Laboratório de Microbiologia, UNIVILLE), e incubadas por mais 24h. Após o período de incubação, as zonas de inibição do crescimento das linhagens de referência, em torno das UFC das linhagens testadas, bem como o diâmetro das UFCs, foram medidas com o auxílio de um paquímetro. A atividade foi expressa por um índice de atividade, obtido a partir da seguinte fórmula: diâmetro do halo de inibição do crescimento da linhagem de referência / diâmetro da colônia teste. Todos os testes foram realizados em triplicata.

### 2.4 Caracterização Fenotípica das Linhagens de BFEs com Atividade Antimicrobiana

As linhagens de BFEs que apresentaram atividade inibitória contra pelo menos um dos organismos indicadores utilizados foram

caracterizadas por meio de análise de suas características morfológicas, de crescimento e bioquímicas, utilizando-se os métodos descritos por Claus e Berkeley (1989). No total foram avaliadas 24 características, sendo elas: coloração de Gram, produção de catalase e citocromo oxidase, motilidade e diâmetro celular, morfologia e posição do esporo, distensão da célula durante a esporulação, produção de ácido a partir da glicose, frutose, manitol, maltose e xilose, utilização do citrato, produção de acetoina pelo teste de Voges-Proskauer, hidrólise do amido, da caseína, da uréia e da gelatina, crescimento em anaerobiose, a 20 °C e a 50 °C, e redução do nitrato. As linhagens *Bacillus sphaericus* 2362, *Bacillus subtilis* ATCC6051 e *Bacillus megaterium* ATCC14581 foram utilizadas como referência. O objetivo desta caracterização foi estabelecer se a atividade antimicrobiana nos organismos estudados é restrita a organismos similares ou fenotipicamente distintos entre si. Optou-se por não realizar a identificação dos organismos com base nestes métodos pois, em função do grande número de espécies descritas de BFEs, existe a necessidade de se empregar várias metodologias taxonômicas distintas, para obter resultados mais seguros. Para a avaliação dos dados fenotípicos, foi empregada a análise de agrupamento, na qual foram utilizados os índices de similaridade de Jaccard ( $S_J$ ), Coincidência simples ( $S_{CS}$ ) e de Sorensen ( $S_S$ ). Como regra de agrupamento foi utilizado o Método de Associação Média (UPGMA) (referência). Para esta análise, os resultados que se apresentaram variáveis para uma mesma linhagem foram excluídos.

## 3 Resultados e Discussão

### 3.1 Isolamento de Bactérias Formadoras de Endósporos (BFEs)

Para o isolamento de BFEs, foram coletadas duas amostras do rio Sangão, localizado na cidade de Criciúma, Santa Catarina. As amostras coletadas apresentaram pH ácido (2,5 e 2,45) e coloração amarela, estando estas características associadas com o despejo de efluentes ácidos ricos em ferro e outros metais, provenientes da atividade de mineração do carvão. A partir destas amostras foram isoladas vinte BFEs, sendo a maioria obtida do procedimento envolvendo um meio de cultura neutro, e apenas uma proveniente de um meio ácido (Tabela 2).

Tabela 2 – Linhagens de bactérias formadoras de endósporos isoladas no presente estudo.

Linhagem	Local de Isolamento	Meio de Isolamento	Amostra	pH do Local	Data
LAMA083	Criciúma, Rio Sangão	TSA, pH 7,0	água	2,5	06/03/04
LAMA084	Criciúma, Rio Sangão	TSA, pH 7,0	água+sedimento	2,5	06/03/04
LAMA085	Criciúma, Rio Sangão	TSA, pH 7,0	água+sedimento	2,5	06/03/04
LAMA086	Criciúma, Rio Sangão	TSA, pH 7,0	água+sedimento	2,5	06/03/04
LAMA087	Criciúma, Rio Sangão	TSA, pH 7,0	água+sedimento	2,5	06/03/04
LAMA088	Criciúma, Rio Sangão	TSA, pH 7,0	água+sedimento	2,5	06/03/04
LAMA089	Criciúma, Rio Sangão	TSA, pH 7,0	água+sedimento	2,5	06/03/04
LAMA090	Criciúma, Rio Sangão	TSA, pH 7,0	água+sedimento	2,5	06/03/04
LAMA091	Criciúma, Rio Sangão	TSA, pH 7,0	água+sedimento	2,5	06/03/04
LAMA092	Criciúma, Rio Sangão	TSA, pH 7,0	água+sedimento	2,5	06/03/04
LAMA093	Criciúma, Rio Sangão	TSA, pH 7,0	água+sedimento	2,5	06/03/04
LAMA094	Criciúma, Rio Sangão	TSA, pH 7,0	água+sedimento	2,5	06/03/04
LAMA095	Criciúma, Rio Sangão	TSA, pH 7,0	água+sedimento	2,45	06/03/04
LAMA096	Criciúma, Rio Sangão	TSA, pH 7,0	água+sedimento	2,45	06/03/04
LAMA097	Criciúma, Rio Sangão	TSA, pH 7,0	água+sedimento	2,45	06/03/04
LAMA098	Criciúma, Rio Sangão	TSA, pH 7,0	água+sedimento	2,45	06/03/04
LAMA099	Criciúma, Rio Sangão	TSA, pH 7,0	água+sedimento	2,45	06/03/04
LAMA100	Criciúma, Rio Sangão	TSA, pH 7,0	água+sedimento	2,45	06/03/04
LAMA102	Criciúma, Rio Sangão	TSA, pH 7,0	água+sedimento	2,45	06/03/04
LAMA190	Criciúma, Rio Sangão	TSA, pH 4,5	água	2,5	06/03/04

A presença de BFEs em ambientes ácidos não é inesperada, visto que a alta resistência do esporo facilita a dispersão, colonização e sobrevivência destes organismos, em todos os ambientes (PRIEST, 1993). Além disso, vários autores já relataram estes organismos em locais similares aos de origem das bactérias estudadas neste trabalho (LÓPEZ-ARCHILLA et al., 2001; HALLBERG; JOHNSON, 2001). Entretanto, por ser o esporo uma forma de vida latente, é provável que as bactérias isoladas não representem organismos ativos nos locais estudados, tendo provavelmente sido originadas de outros ambientes. Isto é evidenciado comparando-se o número de organismos isolados nos meios de cultura neutros e ácidos. Para confirmar esta hipótese, seriam necessários experimentos adicionais de quantificação de células viáveis, simultaneamente à quantificação de esporos, e estudos sobre o crescimento das bactérias isoladas em meios ácidos, por exemplo.

### 3.2 Atividade Antimicrobiana

A partir dos ensaios realizados verificou-se que quinze das quarenta e quatro linhagens estudadas apresentaram atividade antimicrobiana contra pelo menos uma das linhagens de referência utilizadas (Tabela 3). Destas quinze, cinco apresentaram atividade inibitória contra todos os organismos testados, quatro apresentaram contra quatro organismos, duas

contra três organismos e quatro linhagens contra apenas um dos seis microrganismos testados. O maior índice de atividade antimicrobiana foi da linhagem LAMA186 sobre *S. cerevisiae*, enquanto o menor índice foi o da linhagem LAMA083 sobre *C. violaceum* ATCC12472. Esta espécie foi, juntamente com *S. cerevisiae*, a menos afetada pelas BFEs estudadas, tendo sido inibidas por sete organismos cada. Por outro lado, *P. putida* ATCC12633 e *B. megaterium* ATCC14581 foram os organismos mais sensíveis à inibição, tendo sido inibidos por treze e doze organismos, respectivamente, dos quinze que apresentaram atividade antimicrobiana.

Apesar de terem sido isoladas quarenta e quatro linhagens, apenas quinze (em torno de 34% dos isolados estudados) demonstraram possuir alguma atividade antimicrobiana, o que evidencia a importância da pesquisa e do constante trabalho que é, e deve continuar sendo feito na busca destes microrganismos. Estes números são superiores aos observados por Yilmaz AL AL. (2006), que isolaram do solo 29 linhagens de *Bacillus* spp., das quais apenas cinco (em torno de 17%) apresentaram atividade antimicrobiana. Por outro lado, Aslim AL AL. (2000) observaram que 14 (46%) de trinta linhagens de *Bacillus*, obtidas de seis amostras de solo de diferentes regiões próximas a Ankara, Turquia, apresentaram atividade antimicrobiana contra pelos menos um organismo, valores estes superiores aos observados no presente trabalho. Em todos os casos, os índices de atividade

relatados no presente estudo são superiores aos relatados por estes autores, indicando um maior potencial para a produção de moléculas bioativas.

Apesar de *S. cerevisiae* ter sido o microrganismo mais inibido por uma determinada linhagem (LAMA186), foi o que demonstrou ser, juntamente com *C. violaceum*, o microrganismo menos suscetível à inibição pelas linhagens estudadas, fazendo de LAMA026, LAMA090, LAMA083, LAMA085, LAMA086, LAMA190, LAMA084 e a própria LAMA 186 achados muito importantes deste trabalho, merecendo ser mais bem estudadas posteriormente, a fim de detectar quais as características especiais que estas linhagens possuem, bem como, de que forma poderão ser elas utilizadas no controle de infecções fúngicas e por *C. violaceum*. Entretanto, estes resultados são esperados, visto que as BFEs apresentam mais atividade inibitória contra outras bactérias Gram-positivas, em relação com bactérias Gram-negativas e fungos (YILMAZ AL AL., 2006; BARBOSA AL AL., 2005; WAKAYAMA AL AL., 1984; BASHA; ULAGANATHAN, 2002).

*P. putida* ATCC12633 e *B. megaterium* ATCC14581, no entanto, demonstraram ser microrganismos com relativa facilidade de inibição pelas linhagens estudadas, propondo algo semelhante entre estas duas linhagens e as linhagens LAMA, que apresentaram atividade antimicrobiana. Estudos posteriores, porém, seriam necessários para elucidar esta questão. Apesar de incomum, outros autores também relatam atividade antimicrobiana de BFEs sobre linhagens de *Pseudomonas*, como, por exemplo, Yilmaz AL AL. (2006), que observou a inibição de *Pseudomonas fluorescens* RSKK 240 pela linhagem *Bacillus cereus* M15. Já em relação com a inibição de *B. megaterium*, isto não é uma observação incomum, e está relacionada com a produção de um tipo especial de substância chamada bacteriocina, que são moléculas ativas contra organismos similares aos que produzem. Este tipo de molécula é comumente relatado em BFEs (ASLIM AL AL., 2000; DUC AL AL., 2003).

**Tabela 3 – Índices médios de atividade antimicrobiana das linhagens estudadas. Apenas as linhagens que apresentaram atividade contra algum organismo estão mostradas.**

<b>Linhagens</b>	<b><i>Chromobacterium violaceum</i></b>	<b><i>Pseudomonas putida</i></b>	<b><i>Staphylococcus aureus</i></b>	<b><i>Escherichia coli</i></b>	<b><i>Sacharomyces cerevisiae</i></b>	<b><i>Bacillus megaterium</i></b>
LAMA 026	1,83	1,37	1,60	1,23	1,42	1,54
LAMA 023	-	0,74	-	-	-	-
LAMA097	-	1,12	-	-	-	-
LAMA096	-	-	1,91	-	-	-
LAMA098	-	2,24	1,75	1,34	-	2,23
LAMA099	-	2,41	1,54	1,44	-	2,36
LAMA092	-	2,43	2,30	-	-	2,19
LAMA090	1,20	1,24	1,46	1,29	1,23	1,25
LAMA083	0,66	1,46	1,50	1,76	1,51	1,89
LAMA084	-	1,57	-	1,57	1,10	1,35
LAMA085	2,20	1,56	1,60	1,64	1,85	1,42
LAMA086	2,01	1,29	2,52	1,51	1,65	1,53
LAMA100	-	-	-	-	-	1,36
LAMA186	1,88	1,60	-	-	3,67	1,93
LAMA190	1,78	1,77	-	-	-	1,88

### 3.3 Caracterização das Linhagens com Atividade Antimicrobiana

As linhagens com atividade antimicrobiana mostraram-se bastante diversificadas, apresentando o mesmo resultado para apenas cinco das quarenta e quatro características estudadas (coloração de Gram, produção de catalase, produção de ácido da arabinose, hidrólise da uréia e crescimento a 20°C, tabelas 4 e 5). A maioria das linhagens apresentou esporos elípticos (n = 14), foi positiva para hidrólise da caseína (n = 13) e negativa para a produção de ácido a partir do manitol (n = 14). Em relação com os outros testes, na maioria dos casos o número de organismos positivos foi similar ao de organismos negativos.

Utilizando-se a análise de agrupamentos para a avaliação das características das

linhagens com atividade antimicrobiana, foram obtidos sete grupos de organismos, sendo que três destes grupos foram compostos por apenas um organismo (Figura 1). O primeiro grupo foi composto pelas linhagens LAMA023, LAMA096, LAMA098, LAMA099 e LAMA190. O segundo compreendeu as linhagens LAMA084, LAMA090 e LAMA026. O terceiro e quarto grupos foram compostos por duas linhagens cada, sendo estas LAMA097 e LAMA100, e LAMA083 e LAMA092, respectivamente. As linhagens LAMA085, LAMA086 e LAMA186 formaram grupos de apenas um organismo. Os grupos foram formados a partir dos seguintes níveis de similaridade: 72% (S<sub>CS</sub>), 69% (S<sub>J</sub>) e 77% (S<sub>S</sub>). Para esta análise, a única característica não utilizada foi a distensão do esporo durante a esporulação.

Tabela 4 – Características morfológicas e de crescimento das linhagens estudadas que apresentaram atividade antimicrobiana.

Característica	Coloração de Gram		Diâmetro celular >1µm	Morfologia do endósporo	Posição do endósporo	Distensão da Célula	Crescimento em Anaerobiose	Crescimento a 50°C	Crescimento a 20°C
		Motilidade							
LAMA083	+	+	-	E	C/ST	+	(+)	+	+
LAMA084	+	+	+	E	C	-	+	+	+
LAMA085	+	+	+	E	C	-	-	+	+
LAMA086	+	+	+	C	ST/T	+	-	-	+
LAMA090	+	+	+	E	ST	-	-	+	+
LAMA092	+	-	+	E	C	-	+	+	+
LAMA096	+	+	+	E	C	(+)	-	+	+
LAMA097	+	+	-	E	C	(+)	+	+	+
LAMA098	+	+	-	E	C	(+)	-	+	+
LAMA099	+	+	-	E	C	(+)	-	+	+
LAMA100	+	+	-	E	ST/T	-	+	-	+
LAMA023	+	-	+	E	T/ST	-	-	+	+
LAMA026	+	-	+	E	T/ST	-	+	-	+
LAMA186	+	+	-	E	C	+	+	-	+
LAMA190	+	+	-	E	ST	(+)	-	+	+

+, resultado positivo; -, resultado negativo; (+), maioria resultado positivo; E, elíptico; C, central; T, terminal; ST, subterminal.

Considerando-se a atividade antimicrobiana, de forma geral não houve coerência clara em organismos de um mesmo

grupo obtido a partir da análise descrita acima. Isto é, os organismos de um mesmo grupo apresentaram atividade sobre organismos

diferentes, em diferentes graus e números. Entretanto, alguns padrões puderam ser observados. A linhagem com maior índice de atividade (LAMA186) compôs um dos grupos de apenas um organismo. Das cinco linhagens com atividade sobre todos os organismos, duas (LAMA085 e LAMA086) formaram grupos de apenas um organismo, e duas fizeram parte do mesmo grupo (LAMA090 e LAMA026, segundo grupo). Os organismos do terceiro grupo

apresentaram atividade sobre apenas um organismo. Finalmente, as linhagens LAMA098 e LAMA099 apresentaram atividade sobre os mesmos organismos, com valores muito similares. Curiosamente, na análise de agrupamentos estes dois organismos foram os mais similares entre si, com valores de similaridade superiores a 0,90 para todos os índices utilizados.

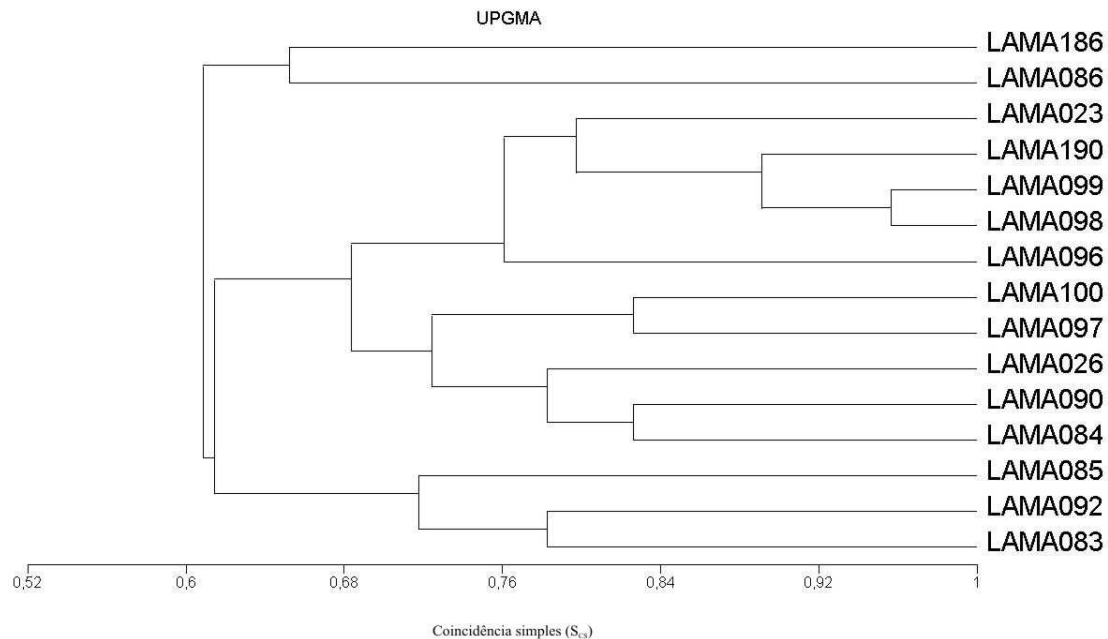
Tabela 5 – Características bioquímicas das linhagens estudadas que apresentaram atividade antimicrobiana.

Característica	Ácido da Arabinose	Ácido da Frutose	Ácido da Glicose	Ácido da Maltose	Ácido da Xilose	Ácido do Manitol	Utilização do Citrato	Teste de VP	Hidrólise do Amido	Hidrólise da Caseína	Hidrólise da Gelatina	Hidrólise da Uréia	Redução do Nitrato
LAMA083	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-
LAMA084	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+
LAMA085	-	(+)	+	(+)	+	-	-	-	-	+	-	-	-
LAMA086	-	-	-	-	-	-	-	+	-	(+)	-	-	-
LAMA090	-	-	+	-	(+)	-	+	-	+	+	+	-	+
LAMA092	-	+	-	-	(+)	-	+	+	-	+	-	-	-
LAMA096	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+
LAMA097	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+
LAMA098	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+
LAMA099	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+
LAMA100	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+
LAMA023	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+
LAMA026	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+
LAMA186	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
LAMA190	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+

+, resultado positivo; -, resultado negativo; (+), maioria resultado positivo.

Os grupos identificados acima, considerando os valores de similaridade, podem representar organismos de uma mesma espécie. Entretanto, em estudos que empregaram técnicas similares de taxonomia numérica, o número de caracteres utilizados é muito maior (superior a 50 na maioria dos casos; BRUNEL et al., 1994; MARTEINSSON et al., 1996). Além disso, algumas espécies de BFEs são indistinguíveis entre si em termos fenotípicos como, por exemplo, as espécies de *Bacillus* do grupo "*Bacillus cereus*" (*B. cereus*, *B. anthracis*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides* e *B. weistephanesis*), (LECHNER et al., 1998). Logo, não é possível afirmar com certeza que os organismos de um mesmo grupo pertencem a uma mesma espécie, e isto pode em parte explicar as variações de grupos observadas na atividade antimicrobiana.

Os resultados acima indicam que as BFEs com atividade antimicrobiana apresentam grande diversificação. Isto é condizente com trabalhos feitos por outros autores, e com estudos mais aprofundados nos quais substâncias específicas foram identificadas a partir de uma grande variedade de espécies de BFEs, principalmente dos gêneros *Bacillus* e *Paenbacillus* (MARTIN et al., 2003; BARBOSA et al., 2005; YILMAZ et al., 2006). Além disso, existe a possibilidade de existirem variações entre organismos muito similares, em relação com a atividade antimicrobiana. Muitos dos compostos responsáveis por esta atividade são metabólitos secundários, e uma característica freqüentemente apontada destas moléculas é a grande variedade existente (MADIGAN et al., 2000).



**Figura 1 – Dendrograma apresentando a relação entre os organismos, baseado nas características fenotípicas. O dendrograma foi construído utilizando-se o índice de similaridade de coincidência simples ( $S_{cs}$ ), e o método de associação média (UPGMA) como regra de agrupamento. Os outros índices de similaridade utilizados apresentaram resultados similares, por isso não estão mostrados.**

#### 4 Conclusão

Apesar de este trabalho se restringir à seleção e caracterização de organismos com atividade antimicrobiana, os resultados encontrados assumem grande relevância se considerada a possibilidade de descoberta de novas moléculas. Esta descoberta, como demonstrado neste trabalho, não se limita a ecossistemas não impactados, podendo ser feita

em ambientes extremamente alterados pelo homem, como os impactados pela mineração do carvão, o que fornece uma nova perspectiva para o manejo destes locais. Para isto, estudos são necessários para elucidar os mecanismos responsáveis pelas atividades observadas, buscando-se a purificação e posterior caracterização das moléculas produzidas e secretadas pelos organismos selecionados.

#### 5 Antimicrobial Activity of Endospore-Forming Bacteria Isolated From Coal Mining Impacted Environments

**Abstract:** *The endospore-forming bacteria include prokaryotic microorganisms able to form the endospore, a resistance cell that allows the survival of these organisms in adverse conditions. These bacteria are wide distributed in the environment, resulting from the easiness of dispersion of the endospore, and of its metabolic diversity, characteristics that ensure to this bacterial group a great biotechnological potential. Because of the appearance of pathogens with resistance to the antibiotics in use, the search for new substances with antimicrobial action constitutes an important strategy in the combat of diseases. In this context, the present work evaluated the antimicrobial activity of endospore-forming bacteria, isolated from environments that were damaged by coal mining in Santa Catarina, against distinct reference strains. Some organisms were isolated during this work, and some were obtained from the culture collection of the Laboratório de Microbiologia Aplicada, UNIVALI. Fifteen of the forty-four studied strains showed antimicrobial activity, being five against all reference strains. Twenty bacteria from these forty-four were isolated in this work. Using cluster analysis we were able to identify seven similarity groups. These groups were not consistent in terms of antimicrobial activity. These results are relevant for the discovery of new bioactive molecules.*

Key-words: endospore-forming bacteria, antimicrobial activity, coal mining



## 6 Referências

- ASLIM, B.; SAÚLAM, N.; BEYATLI, Y. Determination of some properties of *Bacillus* isolated from soil. **Turkish Journal of Biology**, v. 26, p. 41-48, 2000.
- BARBOSA, T. M.; SERRA, C. R.; LA RAGIONE, R. M.; WOODWARD, M. J.; HENRIQUES, A. O. Screening for *Bacillus* Isolates in the Broiler Gastrointestinal Tract. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 2, p. 968-978, 2005.
- BASHA, S., ULAGANATHAN, K. Antagonism of *Bacillus* species (strain BC121) towards *Curvularia lunata*. **Current Science**, v. 82, n. 12, p. 1457-1463, 2002.
- BRUNEL, B.; PERISSOL, C.; FERNANDEZ, M.; BOEUFGRAS, J.M.; LE PETIT, J. Occurrence of *Bacillus* species on evergreen oak leaves. **Microbiology Ecology**, v. 14, p. 331-342, 1994.
- CASTRO-SILVA, M. A.; LIMA, A. O. S.; GERCHENSKI, A. V.; JAQUES, D. B.; RODRIGUES, A. L.; SOUZA, P. L.; RÖRIG, L. R. Heavy metal resistance of microorganisms isolated from coal mining environments of Santa Catarina. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, p. 45-47, 2003.
- CLAUS, D.; BERKELEY, R. C. Genus *Bacillus*. In: SNEATH, P. H. A.; MAIR, N. S.; SHARPE, M. E. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol. 2**. Maryland: Williams & Wilkins. p. 1105-1139. 1989.
- DUC, L. H.; HONG, H. A.; BARBOSA, T. M.; HENRIQUES, A. O.; CUTTING, S. M. Characterization of *Bacillus* probiotics available for human use. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 4, p. 2161-2171, 2004.
- GEIS, A.; SINGH, J.; TEUBER, M. Potential of lactic streptococci to produce bacteriocin. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 45, n. 1, p. 205-211, 1983.
- HALLBERG, K. B.; JOHNSON, D. B. Biodiversity of acidophilic prokaryotes. **Advances in Applied Microbiology**, v. 49, p. 37-84, 2001.
- LECHNER, S.; MAYR, R.; FRANCIS, K. P.; PRUß, B. M.; KAPLAN, T.; WIEßNER-GUNKEL, E.; STEWART, G. S. A. B.; SCHERER, S. *Bacillus weihenstephanensis* sp. nov. is a new psychrotolerant species of the *Bacillus cereus* group. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 48, p. 1373-1382, 1998.
- LÓPEZ-ARCHILLA, A. I.; MARIN, I.; AMILS, R. Microbial community composition and ecology of an acidic aquatic environment: the Tinto River, Spain. **Microbial Ecology**, v. 41, p. 20-35, 2001.
- MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Brock Biology of Microorganisms**. New Jersey: Prentice Hall. 2000.
- MARTEINSSON, V.T.; BIRRIEN, J-L.; JEANTHON C.; PRIEUR, D. Numerical taxonomic study of thermophilic *Bacillus* isolated from three geographically separated deep-sea hydrothermal vents. **Microbial Ecology**, v. 21, p. 255-266, 1996.
- MARTIN, N. I.; HU, H.; MOAKES, M. M.; CHUREY, J. J.; WHITTAL, R.; WOROBO, R.W.; VEDERAS, J. C. Isolation, structural characterization, and properties of mattacin (polymixn M), a cyclic peptide antibiotic produced by *Paenibacillus kobensis* M. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, p. 13124-13132, 2003.
- PRIEST, F. G. Systematics and ecology of *Bacillus*. In: SONENSHEIN, A. L.; HOCH, J. A.; LOSICK, R. ***Bacillus subtilis* and other Gram-positive bacteria: Biochemistry, Physiology, and Molecular Genetics**. Washington: ASM Press. 1993. 1020 p.
- REVA, O. N.; SOROKULOVA, I. B.; SMIRNOV, V. V. Simplified technique for identification of the aerobic spore-forming bacteria by phenotype. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 1361-1371, 2001.
- WAKAYAMA, S.; ISHIKAWA, F.; OISHI, K. Mycocerein, a novel antifungal peptide antibiotic produced by *Bacillus cereus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 26. p.939-940, 1984.
- YILMAZ, M.; SORAN, H.; BEYATLI, Y. Antimicrobial activities of some *Bacillus* spp. strains isolated from soil. **Microbiological Research**, v. 161, n. 2, p. 127-131, 2006.