



Ministério da Educação e do Desporto
Universidade Federal de Ouro Preto - UFOP
Instituto de Ciências Exatas e Biológicas - ICEB
Departamento de Ciências Biológicas - DECBI



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

Lara Chaves Carvalho Guerra

Ouro Preto

Minas Gerais - Brasil

2019



Ministério da Educação e do Desporto
Universidade Federal de Ouro Preto - UFOP
Instituto de Ciências Exatas e Biológicas - ICEB
Departamento de Ciências Biológicas - DECBI



Lara Chaves Carvalho Guerra

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

Monografia apresentada ao Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, como requisito para obtenção do título de bacharela em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Dr. Leandro Marcio Moreira

Co-orientadora: Ma. Camila Gracyelle de Carvalho Lemes

Co-orientador: Dr. Leonardo Martins Graça

Ouro Preto
Minas Gerais - Brasil

2019

G929p Guerra, Lara Chaves Carvalho.
Potencial biotecnológico de bactérias cultiváveis obtidas a partir da Gruta Martimiano II, Parque Estadual do Ibitipoca - MG [manuscrito] / Lara Chaves Carvalho Guerra. - 2019.

66f.: il.: color; grafs; tabs; mapas.

Orientador: Prof. Dr. Leandro Marcio Moreira.

Monografia (Graduação). Universidade Federal de Ouro Preto. Instituto de Ciências Exatas e Biológicas. Departamento de Ciências Biológicas.

1. Fertilizantes. 2. Cavernas - Minas Gerais. 3. Agentes antiinfecciosos. 4. Biotecnologia. I. Moreira, Leandro Marcio. II. Universidade Federal de Ouro Preto. III. Título.

CDU: 606

Universidade Federal de Ouro Preto

Instituto de Ciências Exatas e Biológicas
Departamento de Ciências Biológicas



Ata da Banca Examinadora de Defesa de Monografia Intitulada:

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

Aos vinte e três dias do mês de agosto de 2019, as 14:00 horas, no auditório Raquel Machado, ICEB- UFOP, reuniu-se a Comissão examinadora da Monografia da aluna Lara Chaves Carvalho Guerra. A defesa pública de monografia iniciou-se pela apresentação oral feita pela candidata e, em seguida, argüição pelos membros da banca. Ao final, os membros da banca examinadora reuniram-se e declararam a candidata APROVADA, com a nota 9,5.

Membros da Banca Examinadora

Prof Dr. Leandro Márcio Moreira
Orientador (Dep. Ciências Biológicas- ICEB-UFOP)

Profa Dra Patrícia de Abreu Moreira
Examinadora (Dep. De Biodiversidade, Evolução e Meio Ambiente)

Dra. Natália Rocha Barboza
Examinadora (NUPEB/UFOP)

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais por me ensinarem a amar a natureza, já que foi este sentimento que me faz querer ser bióloga desde os 6 anos de idade, pelo apoio em todas as etapas da minha vida e pelo amor incondicional.

Aos meus irmãos, Sereno, Rama, Mateus, Ariel e Ana, por estarem sempre presentes e por todo auxílio durante a graduação e a vida.

Aos meus amigos, que estiveram presentes nos melhores e piores momentos. Em especial, as mulheres incríveis que tive oportunidade de conviver por esses anos e que inspiram a minha vida.

À turma 15.2 de Ciências Biológicas, foi uma honra a convivência durante a graduação e a partir de agora pelo resto da vida.

Ao Paulo, pelo auxílio, amor e companheirismo.

Às minhas companheiras de casa, Ana e Big, pela convivência, amor e apoio incondicional.

Ao Pr. Dr. Leandro Marcio Moreira, que com muita paciência e sabedoria me orientou nesta pesquisa, por me acolher no laboratório e por ser um exemplo como professor e como orientador.

À minha co-orientadora, Ma. Camila Gracyelle de Carvalho Lemes por me aceitar como pupila, me ensinar com muita paciência as etapas laboratoriais e por orientar todas as etapas desta pesquisa, a gratidão que sinto é imensurável.

Ao Dr. Leonardo Martins Graça, pela acolhida e pelo auxílio com as partes geológicas deste trabalho.

Ao LabGIBA e ao Lab DNA repair, por todos os momentos de convivência que fizeram o dia a dia ser mais leve e feliz, pelos incentivos, apoio e contribuições.

À Sociedade Excursionista e Espeleológica, entidade que me mostrou as belezas e peculiaridades do mundo subterrâneo e me ensinou a amá-lo, obrigada por todo o suporte durante a realização desta pesquisa.

À UFOP pelo ensino de qualidade e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo fomento.

À banca por serem pesquisadoras que admiro, por aceitarem o meu convite e pelas considerações que serão valiosas para este trabalho.

À oportunidade de estudar em uma universidade pública. Nas universidades nós fazemos pesquisas e não balburdia, a educação é um investimento no futuro do país. Pude realizar o sonho de me tornar bióloga e espero que mais jovens possam ter acesso a esse ensino de qualidade e assim, realizem os seus sonhos.

“O fascínio que as cavernas inspiram, pela beleza dos seus salões ornamentados com cortinas, púlpitos, abóbadas enfeitadas com estalagmites e estalactites, "onde não se ouve senão o silêncio, nada se vê senão as trevas", sempre foi fonte de admiração, mistério, medo, magia, encantamento e desafio para os curiosos mais ousados. ”

Eliany Salaroli La Salvia

RESUMO

A Gruta Martimiano II é a maior caverna quartzítica do Brasil. Apresenta 4170 metros de projeção horizontal 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, e quando existentes, em sua maioria, são feitos em cavernas carbonáticas, o que aumenta a importância da realização de estudos sobre a microbiota em outras litologias, como por exemplo as cavernas quartzíticas. Os objetivos deste trabalho foram bioprospectar e analisar o potencial biotecnológico de bactérias associadas a piso, teto e parede da Gruta Martimiano II. O mapa topográfico da gruta foi produzido e a caracterização espeleológica das áreas de coleta foi realizada. 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, preservadas e os testes bioquímicos foram realizados. 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 14 impediu o crescimento dos patógenos e foi caracterizado como móvel e Gram-negativo. 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.

ABSTRACT

The Gruta Martimiano II is the largest quartzite cave in Brazil, which 4170 meters of horizontal length and is located at the Parque Estadual do Ibitipoca – Minas Gerais. The unique environmental conditions and the low energy contribution of the cavities act as selective pressures on the organisms that inhabit them. The microbiota has great ecological and biotechnological importance, since cultivable microorganisms are widely used as resources in agriculture, pharmaceutical industry and bioprocesses. However, there are few studies on the caves microbiome and its biotechnological potential, and when found, most are made in carbonate caves, which increases the importance of studies on the microbiota of other lithologies, for example quartzite caves. This research aimed at bioprospect and analyze the biotechnological potential of bacteria associated with the floor, ceiling and wall of the Martimiano II cave. The topographic map of the cave was produced and the speleological characterization of the sample areas was made. A total of 12 samples from four cave areas were obtained. Mineral phases were characterized by X ray diffraction. The samples were washed and serially diluted with autoclaved faucet water. The wash solution was plated in rich medium (LB), and three days later, the colonies were isolated, preserved and the biochemical tests were done. The mineral phases characterized were the same among the samples, composed by quartz, muscovite, kaolinite and gibbsite. It was obtained 72 bacterial isolates which constitute the first bacterial isolates bank of this cave. Three isolates had the ability to fix nitrogen and one to solubilize phosphate, which are fundamental components to the development of plants. Five isolates showed possible *Klebsiella pneumonia* antagonism and the isolate 14 was able to inhibit the growth of *K. pneumoniae* and *Staphylococcus aureus*. In the indirect inhibition test 14 prevented the growth of pathogens and was characterized as mobile and Gram-negative. 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 patrimony.

Keywords: Bioprospecting. Quartzite cave. Gruta Martimiano II. Microbiota. Parque Estadual do Ibitipoca. Biotechnological potential.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mapa de localização do Parque Estadual do Ibitipoca.	15
Figura 2: Mapa de localização da Gruta MartimianoII no PEIB.....	16
Figura 3: Gruta MartimianoII. A) extenso conduto; B) salão da clarabóia; C) segunda entrada; D) conduto da fechadura.....	17
Figura 4: Espeleotemas avermelhados da Gruta MartimianoII. A) cortina; B) estalactites.	18
Figura 5: Diagrama representando principais estruturas e processos tróficos em uma caverna.	19
Figura 6: Fluxograma representando os segmentos da indústria que utilizam microrganismos em processos biotecnológicos. Em destaque os processos biotecnológicos que são os focos deste estudo.	21
Figura 7: Coleta de sedimento na Gruta Martimiano II. A) Coleta na parede do conduto; B) e C) Coleta no piso do conduto; D) Coleta no teto.	27
Figura 8: Mapa topográfico da Gruta Martimiano II.	30
Figura 9: Cortes transversais das áreas de coleta. A) Área 1; B) Área 2; C) Área 3; D) Área 4.	32
Figura 10: Gráfico de colunas do total de isolados bacterianos por área de coleta. Na coluna 1 constam os 17 isolados coletados na área 1; na coluna 2 os 18 isolados coletados na área 2; na coluna 3 o total de isolados da área 3 é de 16; a coluna 4 representa a área 4, onde foram coletados 21 isolados, a maior quantidade de isolados entre as áreas.	34
Figura 11: Ensaio de fixação de nitrogênio, mostrando resultado positivo para três isolados bacterianos (coloração esverdeada).	35
Figura 12: Ensaio de solubilização de fosfato, com formação de alo em um dos isolados microbianos, o que indica resultado positivo para o ensaio.	35
Figura 13: Ensaio de inibição do crescimento de bactérias patogênicas, a formação de halo indica a inibição do crescimento. A) e B) Placas de teste de inibição da bactéria <i>Klebsiella pneumoniae</i> ; C) e D) Placas de teste de inibição da bactéria <i>Staphylococcus aureus</i>	36

Figura 14: Ensaio de inibição do isolado 14 sobre o crescimento dos patógenos. A) Formação do halo de inibição de <i>Staphylococcus aureus</i> ; B) Formação do halo de inibição de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	37
Figura 15: Ensaio de inibição do crescimento de <i>Klebsiella pneumoniae</i> por compostos liberados pelo isolado 14. A) Placa controle com crescimento normal de <i>K. pneumoniae</i> ; B) Placa com os compostos liberados pelo isolado 14 mostrando a inibição total do crescimento de <i>K. pneumoniae</i>	38
Figura 16: Ensaio de inibição do crescimento de <i>Staphylococcus aureus</i> por compostos liberados pelo isolado 14. A) Placa controle com crescimento normal de <i>S. aureus</i> ; B) Placa com os compostos liberados pelo isolado 14 mostrando a inibição total do crescimento de <i>S. aureus</i>	38
Figura 17: Teste de motilidade do isolado 14. A) Placa controle; B) Placa inoculado com o isolado, o crescimento em toda a placa é um resultado positivo para motilidade.	39
Figura 18: Teste de coloração de Gram com o isolado 14, a coloração rosa indica que a bactéria é Gram-negativa.	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Resultados da difratometria de raio X, demonstrando as fases minerais observadas em cada amostra	31
Tabela 2: Descrição das áreas de coleta e correlação com os isolados bacterianos.....	33

LISTA DE ABREVIATURAS

μL – Microlitro

atm – atmosfera

BCRA – *British Cave Research Association*

CNC – Cadastro Nacional de Cavernas

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DRX – Difração de Raio-X

g – gramas

IEF – Instituto Estadual de Florestas

Km – quilômetro

kV - kilovolt

LB – Luria-Bertani

m – metros

mA - miliampampère

mL – mililitro

mm – milímetro

N₂ - Nitrogênio

NGS – Sequenciamento de Nova Geração

PEIB – Parque Estadual do Ibitipoca

pH – potencial Hidrogeniônico

rpm – rotações por minuto

SEE – Sociedade Excursionista e Espeleológica

SISBIO – Sistema de Atendimento à Distância do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade

SISGEN – Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado

SUMÁRIO

1. Introdução	15
1.1 Caracterização da Área de Estudo	15
1.2 Gruta Martimiano II.....	16
1.3 Ambiente Cavernícola	18
1.4 Importância da Microbiota em um Contexto Ecológico.....	19
1.5 Bioprospecção.....	20
1.7 Potencial Biotecnológico dos Microrganismos	21
2. Justificativa	23
3. Hipótese	24
4. Objetivos.....	25
4.1 Objetivo Geral	25
4.2 Objetivos Específicos	25
5. Material e métodos.....	26
5.1 Mapeamento Topográfico.....	26
5.2 Coleta do Material Microbiológico	26
5.3 Caracterização Mineralógica	27
5.4 Isolamento das Colônias Bacterianas	27
5.5 Potencial Biotecnológico	28
5.5.1 Ensaio de fixação de nitrogênio.....	28
5.5.2 Ensaio de solubilização de fosfato.....	28
5.5.3 Ensaio de inibição do crescimento bacteriano.....	28
5.5.4 Ensaio de caracterização do composto inibitório	29
5.5.5 Ensaio de caracterização quanto a motilidade	29
5.5.6 Ensaio de caracterização de Gram.....	29

6. Resultados.....	30
6.1 Mapa Topográfico	30
6.2 Caracterização Mineralógica	31
6.3 Isolados Bacterianos e Descrição das Áreas de Coleta.....	32
6.4 Potencial Biotecnológico	34
6.4.1 Fixação de nitrogênio	34
6.4.2 Solubilização de fosfato.....	35
6.4.3 Inibição do crescimento bacteriano	36
6.4.4 Caracterização do composto inibitório	37
6.4.5 Caracterização de motilidade do isolado	38
6.4.6 Caracterização de Gram.....	39
7. Discussão	40
8. Conclusão.....	44
9. Referências Bibliográficas	45
ANEXO A - Autorização para Pesquisa Científica no Estado de Minas Gerais.....	49
ANEXO B - Autorização para atividades com finalidade científica.....	51
ANEXO C - Comprovante de Cadastro de Acesso - SISGEN.....	54
APÊNDICE A – Difratomia de Raio X - Amostra Lateral 1	55
APÊNDICE B – Difratomia de Raio X – Amostra Lateral 2.....	56
APÊNDICE C – Difratomia de Raio X - Amostra Lateral 3	57
APÊNDICE D – Difratomia de Raio X - Amostra Lateral 4	58
APÊNDICE E – Difratomia de Raio X - Amostra Piso 1	59
APÊNDICE F – Difratomia de Raio X - Amostra Piso 2	60
APÊNDICE G – Difratomia de Raio X - Amostra Piso 3.....	61
APÊNDICE H – Difratomia de Raio X - Amostra Piso 4.....	62
APÊNDICE I – Difratomia de Raio X - Amostra Teto 1.....	63

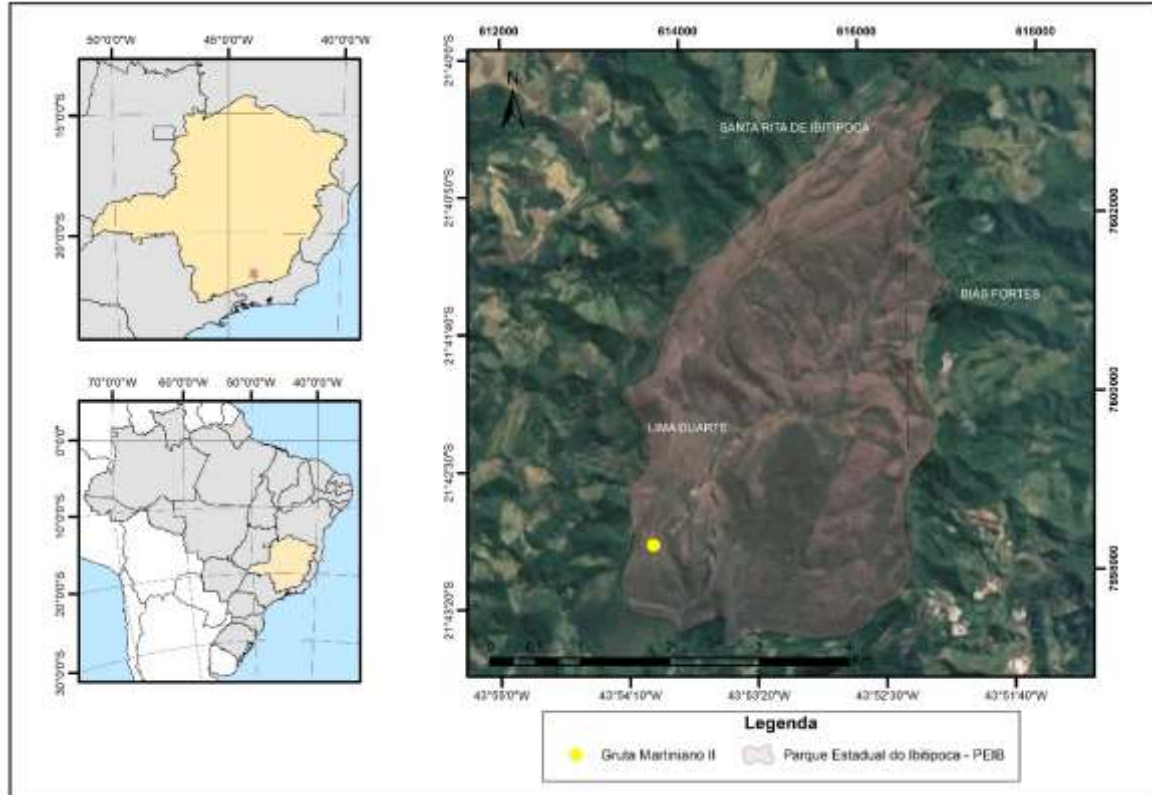
APÊNDICE J – Difractometria de Raio X - Amostra Teto 2	64
APÊNDICE K – Difractometria de Raio X - Amostra Teto 3	65
APÊNDICE L – Difractometria de Raio X - Amostra Teto 4.....	66

1. INTRODUÇÃO

1.1 Caracterização da Área de Estudo

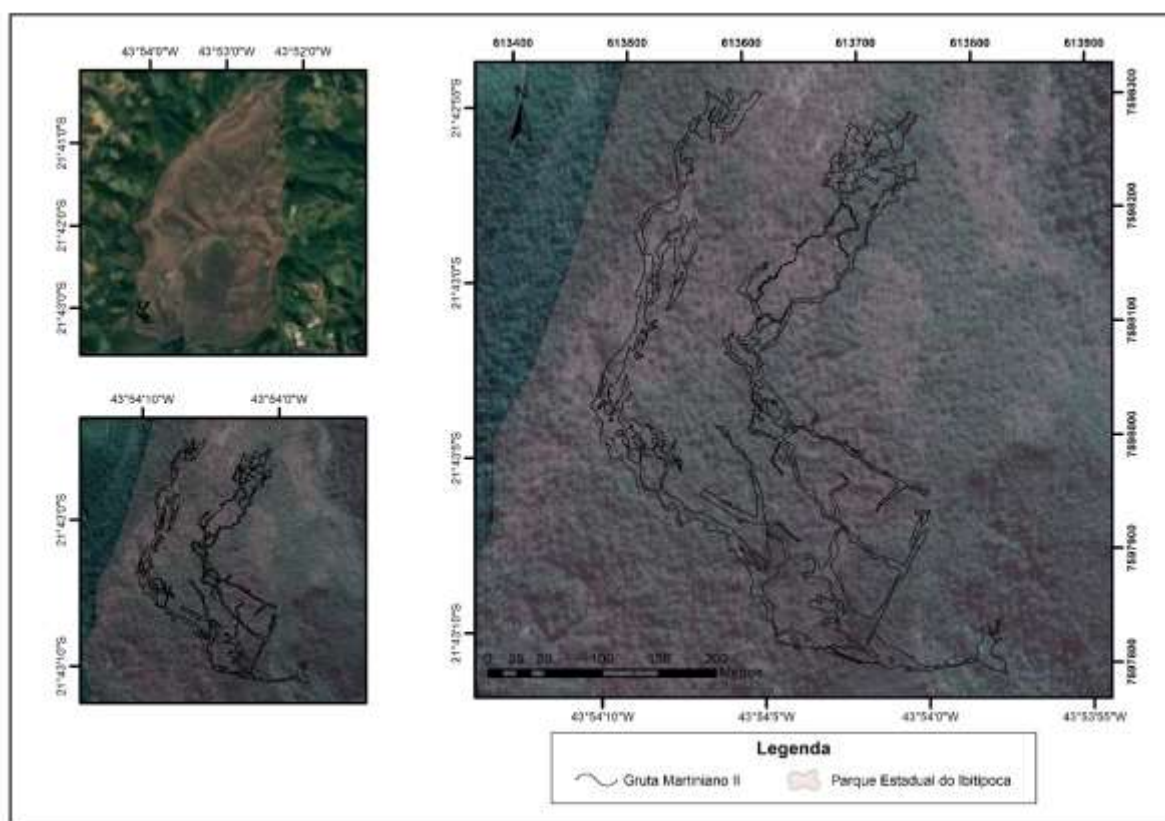
O Parque Estadual do Ibitipoca (PEIB) foi criado em 1973, por meio da lei 6.126 do Governo de Minas Gerais, abrange as cidades de Lima Duarte, Santa Rita de Ibitipoca e Bias Fortes (Figura 1), totalizando 1488 hectares de extensão (INSTITUTO ESTADUAL DE FLORESTA, 2007). Segundo o Instituto Estadual de 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) e é administrado pelo IEF, conta com diversas atrações turísticas como mirantes, quedas d'água, riachos e cavernas. A vegetação é associada aos afloramentos quartzíticos, apresentando campos rupestres de altitude e grande influência de elementos de Mata Atlântica (INSTITUTO ESTADUAL DE FLORESTA, 2007). O relevo do PEIB constitui-se de baixadas e serras que sobressaem num contexto regional, com altitudes medias de 1500 m, conhecido como Serra do Ibitipoca (CORREA-NETO & FILHO, 1997).

Figura 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) (Figura 2).

Figura 2: Mapa de localização da Gruta Martimiano II no PEIB.



1.2 Gruta Martimiano II

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 volumosos e os espeleotemas, de coloração avermelhada, chamam atenção por sua variedade e

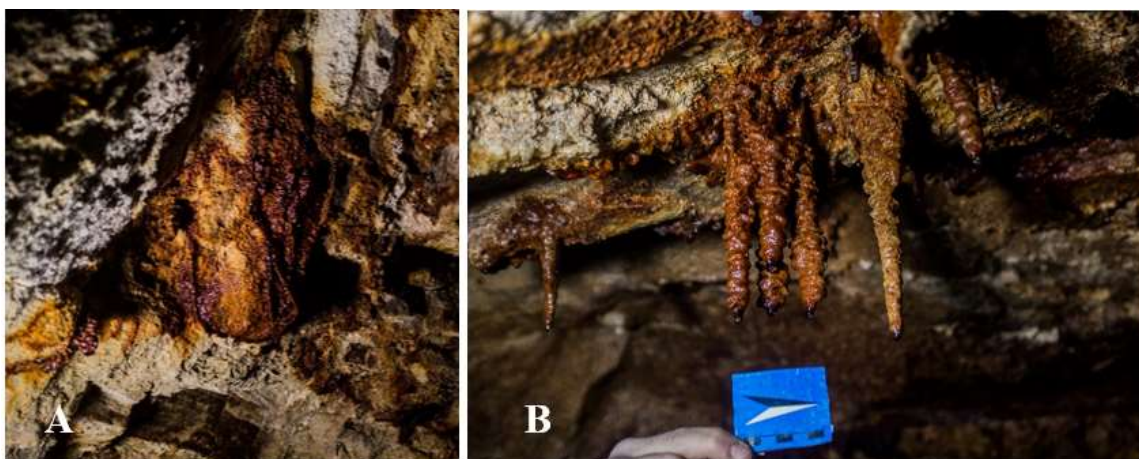
frequência (Figuras 3 e 4) (LIMA *et al.*, 2017). Nesse contexto, a Gruta Martimiano II, pode se apresentar como um importante reservatório de microbiota com função biológica específica.

Figura 3: Gruta Martimiano II. A) extenso conduto; B) salão da clarabóia; C) segunda entrada; D) conduto da fechadura.



Fotos: Gabriel Lourenço.

Figura 4: Espeleotemas avermelhados da Gruta MartimianoII. A) cortina; B) estalactites.



Fotos: Gabriel Lourenço.

1.3 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 umidade próximas a saturação e a temperatura do meio hipógeo se aproxima da média anual de temperatura do ambiente epígeo. Sendo que, os parâmetros ambientais, são de grande relevância para o estudo da biologia subterrânea, por propiciarem as especiações a este ambiente (CULVER, 1982; TRAJANO & MOREIRA, 1991; FERREIRA & POMPEU, 1997; GOMES *et al.*, 2000).

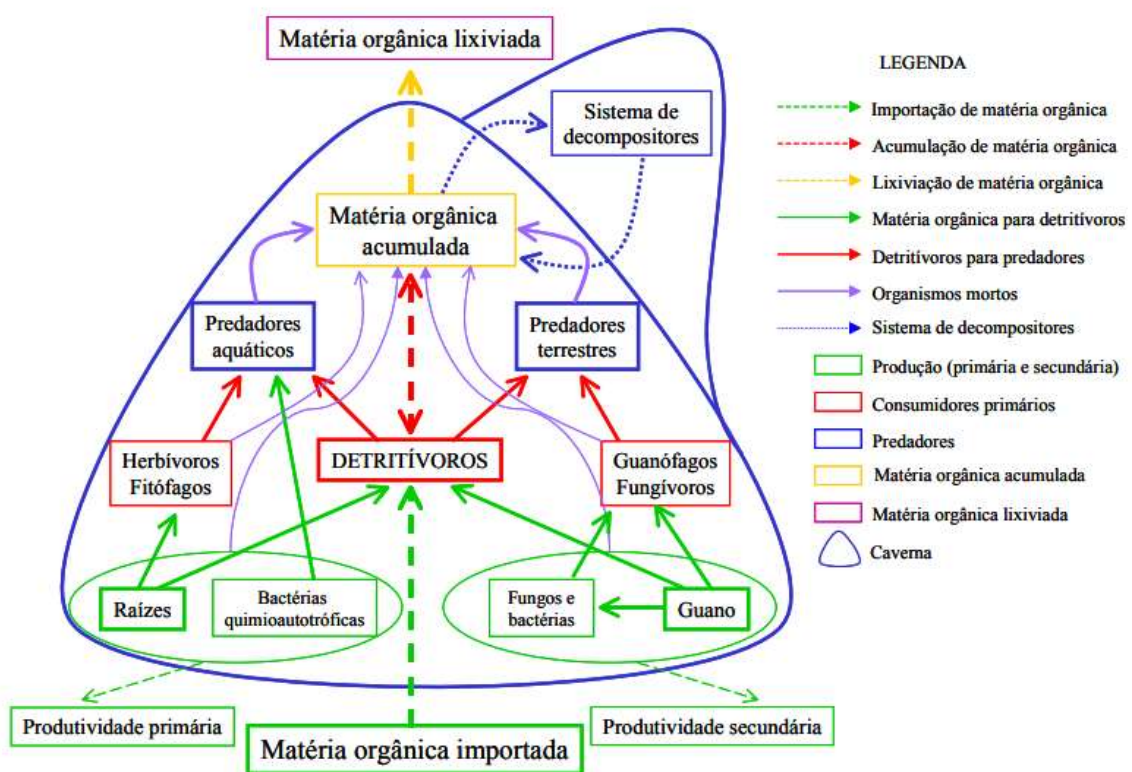
Segundo Ghosh (2017), a caverna pode ser dividida em 4 zonas de acordo, principalmente, com a incidência luminosa: 1) a zona de entrada (zona com alta incidência luminosa e onde os ambientes subterrâneos e de superfície se encontram); 2) a zona crepuscular (onde ocorre a diminuição gradual da luminosidade e plantas ainda podem crescer); 3) a zona de transição (onde não há luz, mas o ambiente ainda sofre interferência externa na temperatura e umidade); 4) a zona profunda (onde há a ausência total de luz, temperatura constante e alta umidade).

A ocorrência de organismos fotossintetizantes é limitada à zona de entrada e à zona crepuscular e impossibilitada pela ausência de luz no interior das cavernas (FERREIRA & POMPEU, 1997; HOENEN, 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.

Figura 5: Diagrama representando principais estruturas e processos tróficos em uma caverna.



Fonte: FERREIRA, 2004.

1.4 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 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).

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.

1.5 Bioprospecção

A bioprospecção abrange diversas áreas da biologia e consiste na identificação, avaliação e exploração sistemática da diversidade de vida em determinado ambiente objetivando a busca de recursos genéticos e seus derivados para fins comerciais. Para isso, os organismos são identificados e genes e enzimas de interesse são estudados para posterior aplicação biotecnológica (EMBRAPA, 2015). O Brasil abriga cerca de 13% das espécies com interesse biotecnológico existentes no mundo (LEWINSOHN & PRADO, 2006), mas o potencial biotecnológico do país ainda é pouco estudado.

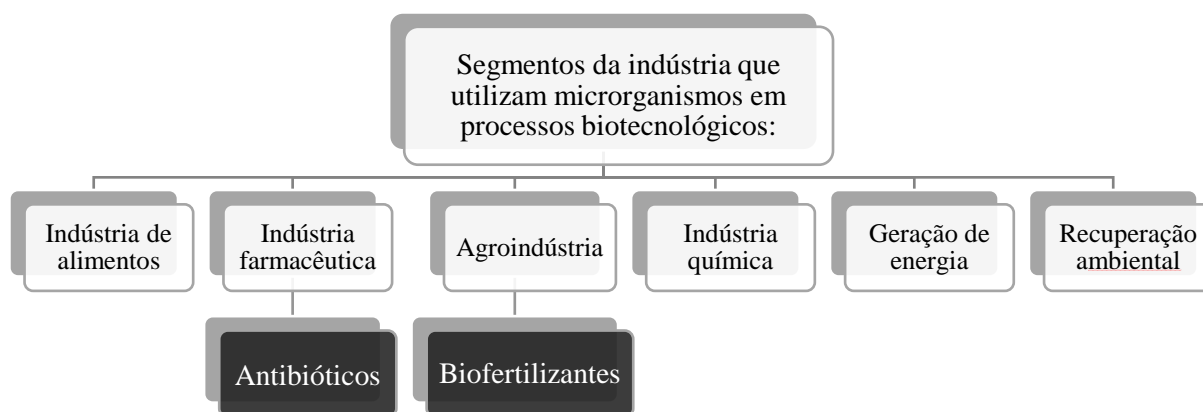
Diversos pesquisadores voltam as suas atenções para ambientes incomuns, onde uma adaptação de sua biota é esperada (FILHO, 2014). As condições ambientais únicas do ambiente cavernícola aumentam as chances de se encontrar novas espécies e novos produtos advindos dos microrganismos existentes, ressaltando a importância da bioprospecção nestes ambientes.

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).

1.7 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).

Figura 6: Fluxograma representando os segmentos da indústria que utilizam microrganismos em processos biotecnológicos. Em destaque os processos biotecnológicos que são os focos deste estudo.



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).

2. JUSTIFICATIVA

O mapa topográfico serve de base para as pesquisas realizadas no ambiente cavernícola, o que auxilia no desenvolvimento deste e de outros estudos na Gruta Martimiano II.

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 bioespeleológicos. Somado a isto, a maioria dos estudos envolvendo a microbiota cavernícola se restringem a rochas carbonáticas (BARTON *et al.*, 2007), dessa forma esta pesquisa aborda pela primeira vez a bioprospecção e o potencial biotecnológico da maior caverna em quartzito do Brasil, a Gruta Martimiano II.

São notáveis as variadas funções biotecnológicas dos microrganismos e de suas enzimas para a indústria, agricultura, farmacologia. Devido ao fato de que cerca de 99% da biodiversidade destes organismos ainda permanece desconhecida (CANHOS & MANFIO, 2001) e ao enorme avanço das técnicas de biologia molecular, os estudos de bioprospecção podem revolucionar diversos setores da indústria.

As condições ambientais únicas, o isolamento geográfico e o baixo aporte energético das cavidades, propiciam a presença de organismos adaptados a esses ambientes (BARTON *et al.*, 2007). Sendo que, dentre essas adaptações, as que envolvem o metabolismo dos microrganismos são de extremo interesse biotecnológico e para a bioprospecção. Considerando as condições ambientais únicas e a escassez de pesquisas sobre a microbiota cavernícola, os estudos bioespeleológicos são essenciais para a preservação desses ecossistemas. Além disso, esta pesquisa pode contribuir com a realização do plano de manejo espeleológico no Parque Estadual do Ibitipoca e para a conservação da Gruta Martimiano II.

3. HIPÓTESE

As bactérias cultiváveis obtidas na Gruta Martimiano II apresentam potencial biotecnológico como fertilizantes biológicos e na inibição do crescimento de bactérias patogênicas.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho foi isolar e investigar o potencial biotecnológico de bactérias cultiváveis na maior caverna em quartzito do Brasil, a Gruta Martimiano II.

4.2 Objetivos Específicos

- A. Produzir o mapa topográfico da Gruta Martimiano II;
- B. Realizar uma caracterização mineralógica das amostras coletadas;
- C. Cultivar e isolar as colônias bacterianas presentes nas amostras coletadas;
- D. Gerar o banco de isolados bacterianos de uma caverna quartzítica;
- E. Correlacionar os achados biológicos com possíveis fenômenos que possam justificar as diferenças observadas nos pontos de coleta;
- F. Testar o potencial biotecnológico para desenvolvimento de biofertilizantes;
- G. Testar o potencial biotecnológico desses microrganismos quanto a inibição do crescimento das bactérias patogênicas *Staphylococcus aureus* e *Klebsiella pneumoniae*;

5. MATERIAL E MÉTODOS

Foi realizada uma revisão bibliográfica para embasamento teórico e produção do projeto de pesquisa, as autorizações de pesquisa para o IEF, SISBIO e SISGEN foram solicitadas e aprovadas antes do início das partes práticas deste trabalho, as licenças se encontram em anexo.

5.1 Mapeamento Topográfico

Para a realização do mapeamento topográfico, utilizou-se de bússola bruta, tripé e trena a laser, adotando a metodologia *British Cave Research Association – BCRA*, no nível de precisão 4D. A caverna foi representada por desenhos técnicos em planta baixa, cortes longitudinais e cortes transversais na escala 1:200. Após o levantamento topográfico, as medidas foram conferidas e corrigidas no programa *Compass* e os croquis gerados em campo foram vetorizados no *AutoCad2018 – Versão Acadêmica* (ASSUNÇÃO, 2015).

5.2 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 (Figura 7). Após essa etapa, as amostras foram levadas para o Laboratório de Genômica e Interação Bactérias-Ambiente da Universidade Federal de Ouro Preto.

Figura 7: Coleta de sedimento na Gruta Martimiano II. A) Coleta na parede do conduto; B) e C) Coleta no piso do conduto; D) Coleta no teto.



Fotos: Gabriel Lourenço.

5.3 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 $\text{CuK } \alpha$ ($\lambda = 1,5418$ 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).

5.4 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 μL 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 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.

5.5 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:

5.5.1 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 à 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).

5.5.2 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).

5.5.3 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* à 28°C e 180 rpm, o crescimento foi observado em 2 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.

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.

5.5.4 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 à 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 à 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).

5.5.5 Ensaio de caracterização quanto a 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).

5.5.6 Ensaio de caracterização de Gram

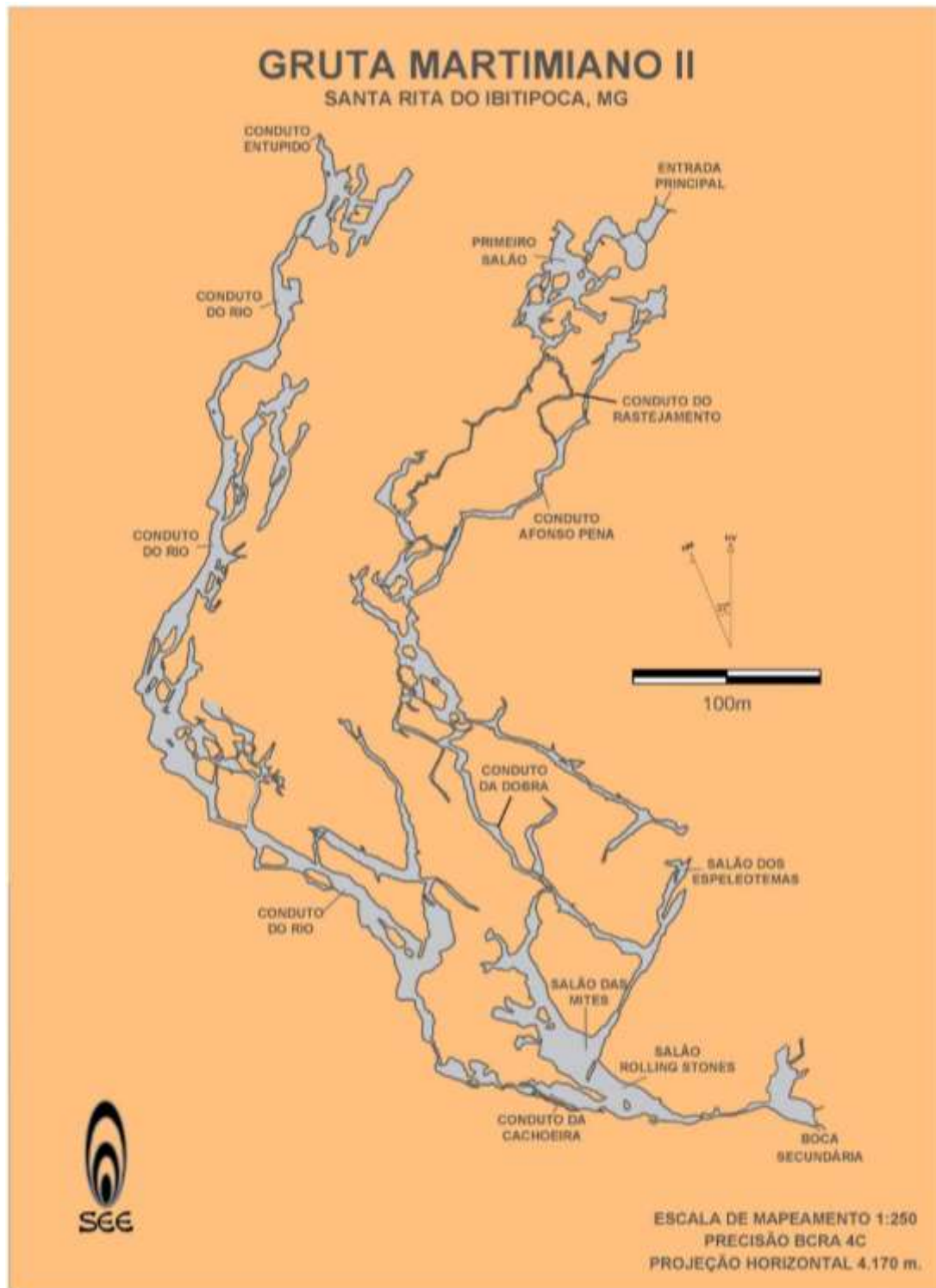
Seguindo o protocolo do Ministério da Saúde (1997), o esfregaço foi preparado transferindo 20 µL do isolado bacteriano para lâminas previamente limpas e flambadas e fixado na chama do bico de bussen. O esfregaço foi coberto com o corante cristal violeta-de-metila por 1 minuto e lavado com água destilada;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

6. RESULTADOS

6.1 Mapa Topográfico

Figura 8: Mapa topográfico da Gruta Martimiano II.



Modificado de: acervo SEE.

A Gruta Martimiano II conta com 4.170 m de projeção horizontal mapeados e 170 m de desnível, salões volumosos e muitos Espeleotemas avermelhados. O mapa topográfico produzido em conjunto com a Sociedade Excursionista e Espeleológica (SEE) está representado na figura 8.

6.2 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.

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	

6.3 Isolados Bacterianos e Descrição das Áreas de Coleta

Foram produzidos cortes transversais (Figura 9) e descrições espeleológicas (Tabela 1) 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 e Figura 10).

Figura 9: Cortes transversais das áreas de coleta. A) Área 1; B) Área 2; C) Área 3; D) Área 4.

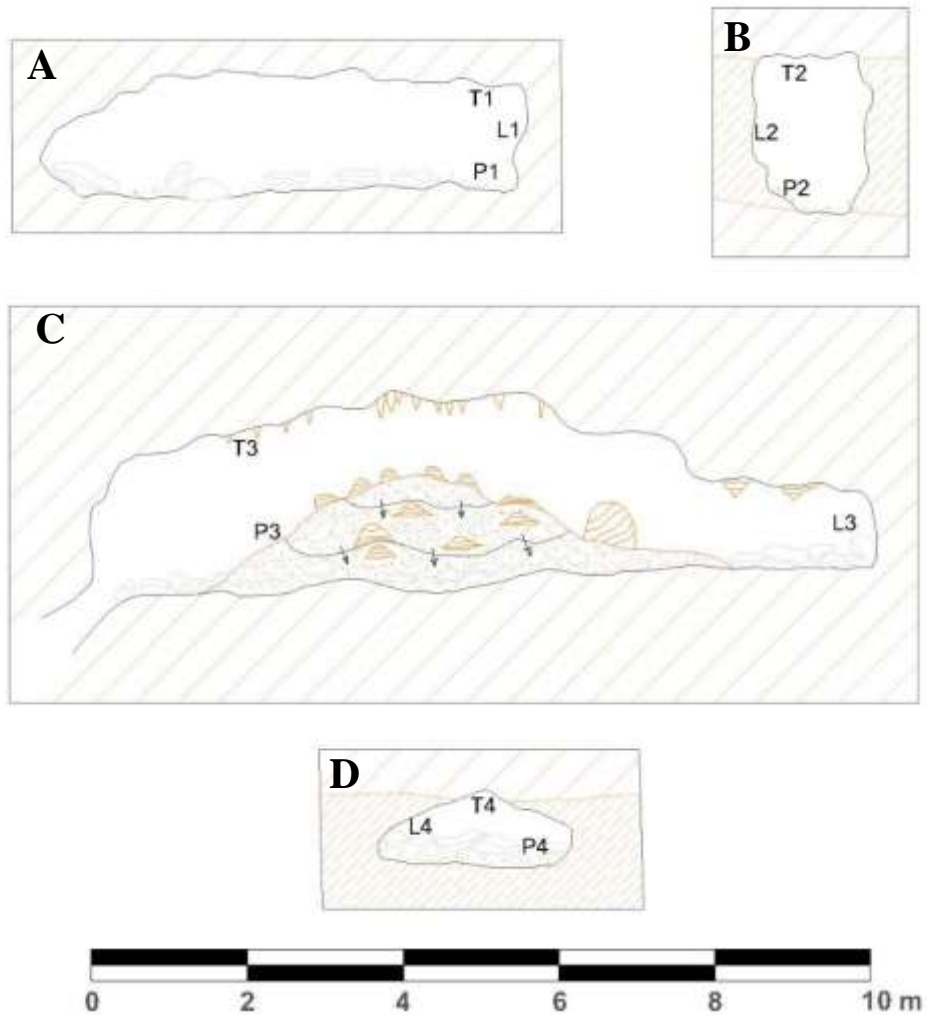
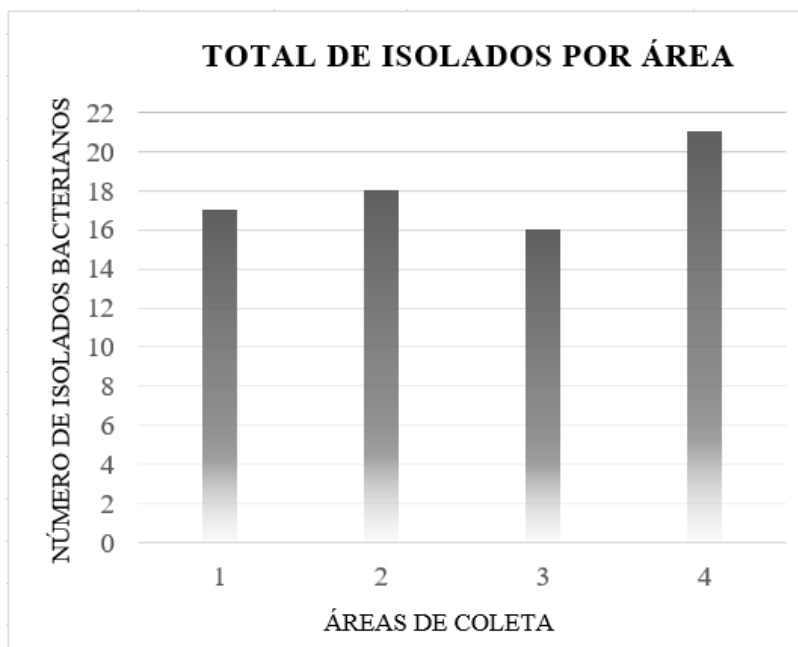


Tabela 2: Descrição das áreas de coleta e correlação com os isolados bacterianos.

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 Martiniano 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

Figura 10: Gráfico de colunas do total de isolados bacterianos por área de coleta. Na coluna 1 constam os 17 isolados coletados na área 1; na coluna 2 os 18 isolados coletados na área 2; na coluna 3 o total de isolados da área 3 é de 16; a coluna 4 representa a área 4, onde foram coletados 21 isolados, a maior quantidade de isolados entre as áreas.



Na figura 10, 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.

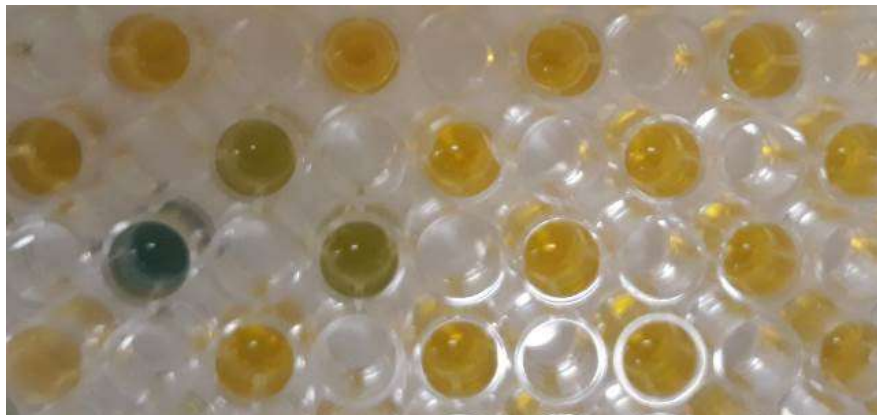
6.4 Potencial Biotecnológico

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

6.4.1 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 11). 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 11: Ensaio de fixação de nitrogênio, mostrando resultado positivo para três isolados bacterianos (coloração esverdeada).



6.4.2 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 12).

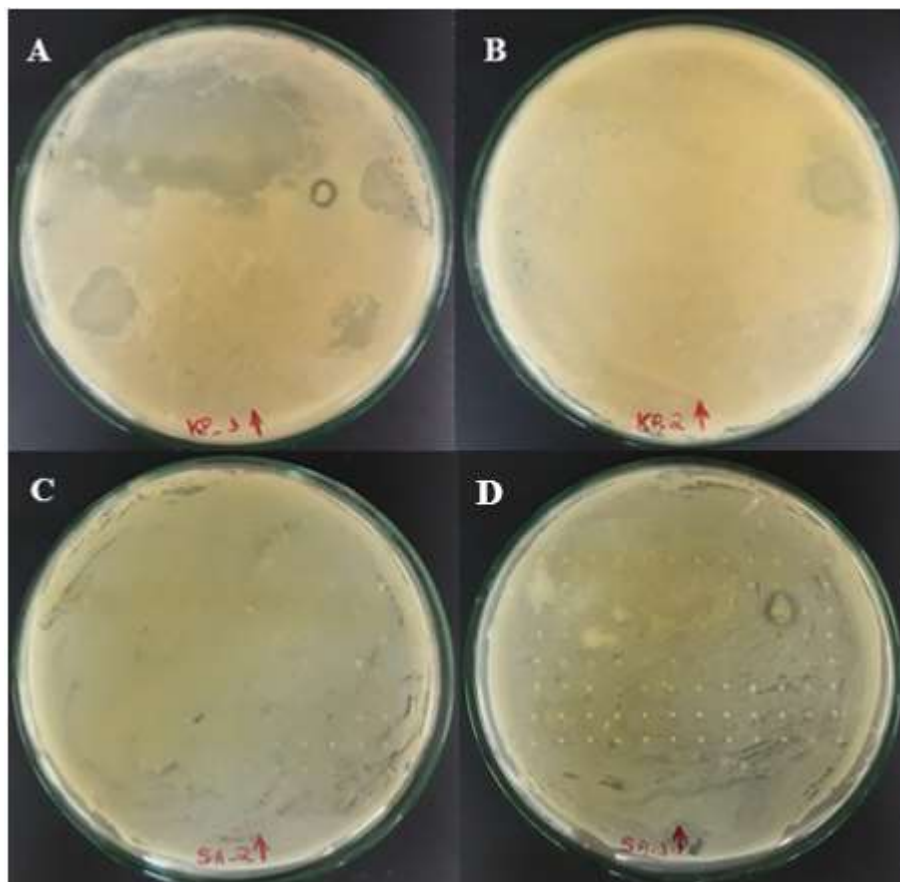
Figura 12: Ensaio de solubilização de fosfato, com formação de halo em um dos isolados microbianos, o que indica resultado positivo para o ensaio.



6.4.3 Inibição do crescimento bacteriano

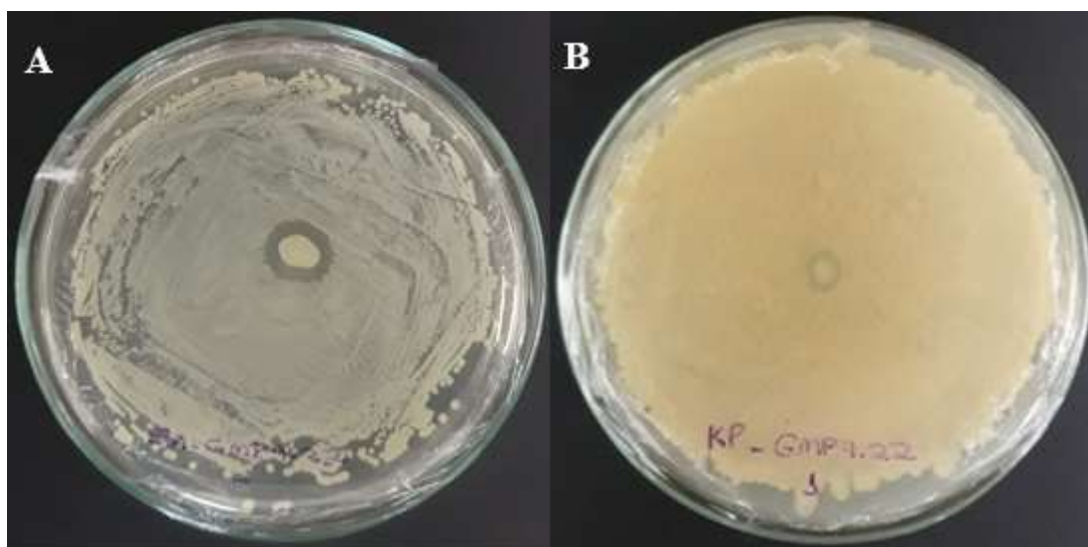
Os isolados 13, 23, 15, 43 e 49 apresentaram inibição do crescimento da bactéria patogênica *Klebsiella pneumoniae* e o isolado 14 foi capaz de inibir o crescimento de *K. pneumoniae* e *Staphylococcus aureus* (Figura 13).

Figura 13: Ensaio de inibição do crescimento de bactérias patogênicas, a formação de halo indica a inibição do crescimento. A) e B) Placas de teste de inibição da bactéria *Klebsiella pneumoniae*; C) e D) Placas de teste de inibição da bactéria *Staphylococcus aureus*.



No teste de inibição em duplicata do isolado 14 sobre o crescimento dos dois patógenos (Figura 14), 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.

Figura 14: 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*.



6.4.4 Caracterização do composto inibitório

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 15) e a inibição total do crescimento da bactéria *S. aureus* (Figura 16).

Figura 15: 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*.

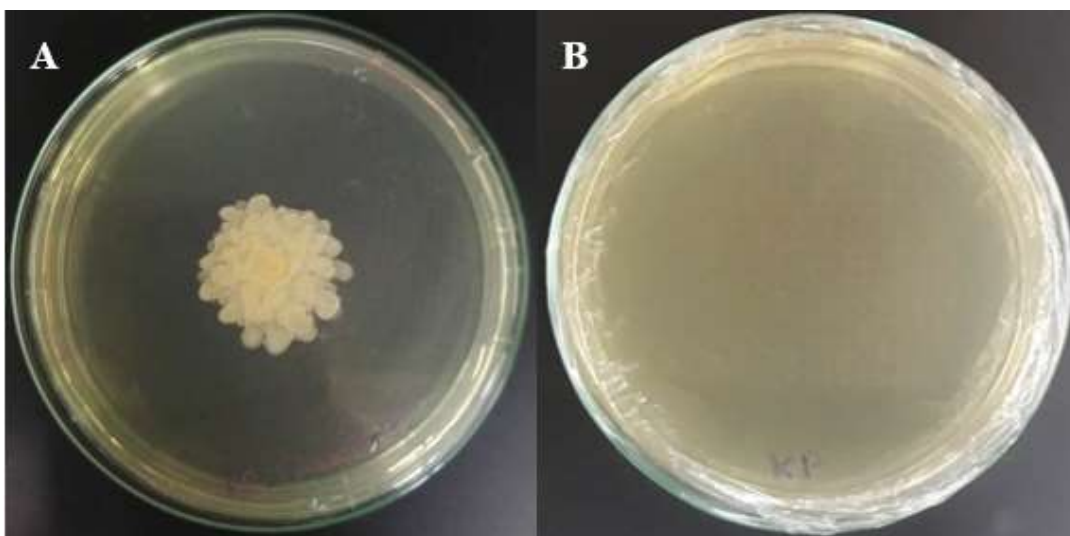
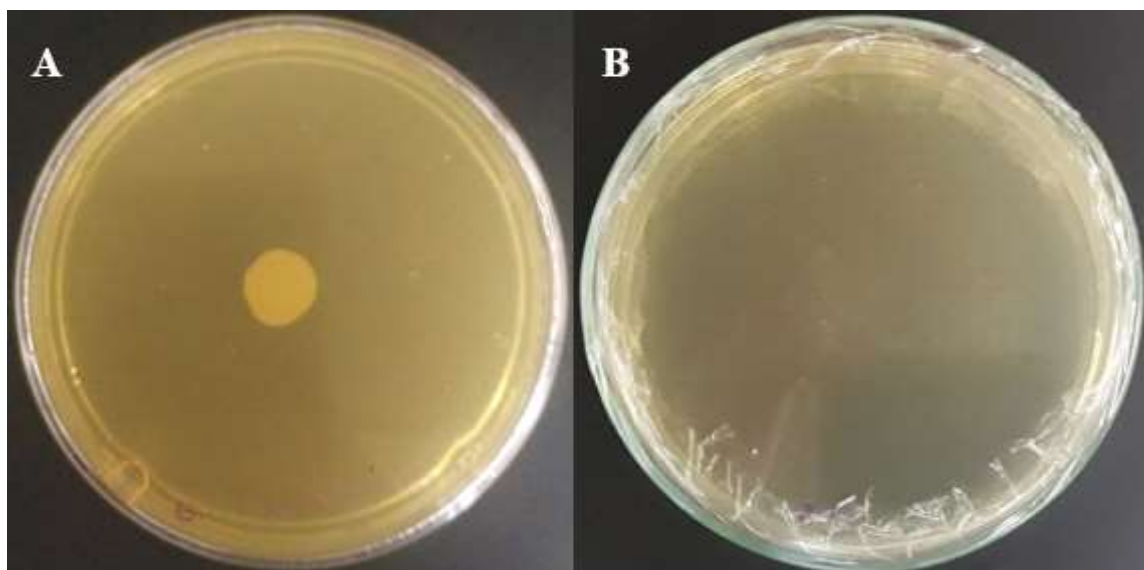


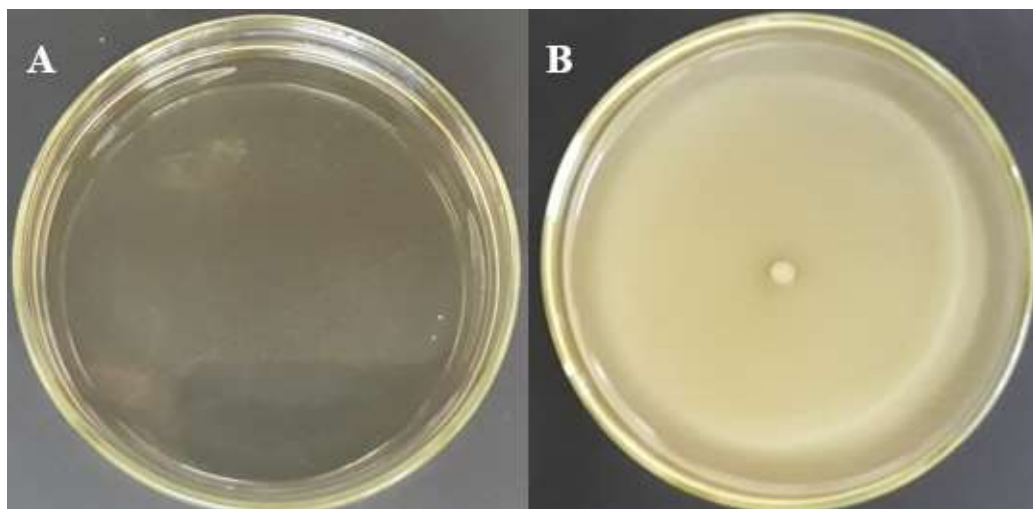
Figura 16: Ensaio de inibição do crescimento de *Staphylococcus aureus* por compostos liberados pelo isolado 14. A) Placa controle com crescimento normal de *S. aureus*; B) Placa com os compostos liberados pelo isolado 14 mostrando a inibição total do crescimento de *S. aureus*.



6.4.5 Caracterização de motilidade do isolado

No ensaio de caracterização do isolado 14 quanto a motilidade a bactéria apresentou crescimento espalhado por toda placa o que indica resultado positivo (Figura 17).

Figura 17: Teste de motilidade do isolado 14. A) Placa controle; B) Placa inoculada com o isolado, o crescimento em toda a placa é um resultado positivo para motilidade.



6.4.6 Caracterização de Gram

A coloração rosa do isolado 14 no teste de coloração de Gram o classifica como Gram-negativo (Figura 18).

Figura 18: Teste de coloração de Gram com o isolado 14, a coloração rosa indica que a bactéria é Gram-negativa.



7. DISCUSSÃO

O mapa topográfico da cavidade é de suma importância para a realização de estudos espeleológicos e para a preservação do patrimônio, uma vez que nele é representado a morfologia, as características peculiares, os espeleotemas, ocorrência paleontológica, arqueológica ou biológica, potencial turístico, entre outros (CAVALCANTI, 1996).

O mapeamento espeleológico consiste na realização da topografia de cavernas utilizando-se de métodos de levantamento topográficos que possibilitam a confecção de mapas que são considerados a identidade de uma caverna (ASSUNÇÃO, 2015). Estes mapas consistem em uma planta baixa, cortes longitudinais e cortes transversais; o que possibilita a visão da caverna em três planos de projeção diferentes (CAVALCANTI, 1996).

O mapeamento da Gruta Martimiano II serve de alicerce para demais estudos e é de suma importância para o planejamento da pesquisa, como por exemplo o trabalho de geoespeleologia ainda em desenvolvimento por Aguiar (2019, no prelo) e a publicação no livro Atlas do Brasil Subterrâneo por Lima e Neto (2019). A visão em três dimensões possibilitada pelo mapa auxilia na locomoção e identificação de áreas específicas da caverna e permite a marcação de pontos para acesso posterior. Com a conclusão do mapeamento topográfico, a Gruta Martimiano II passou a ser a maior cavidade natural do PEIB, além de ser a mais extensa caverna em quartzitos (e rochas siliciclásticas) do Brasil, aumentando assim a relevância da conservação da cavidade.

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.

Para melhor representar as áreas de coleta foram feitos cortes transversais (Figura 9, tópico 6.3) e descrições espeleológicas de cada área (Tabela 2, tópico 6.3), a fim de possibilitar uma representação morfológica e explicitar as diferenças no habitat da microbiota coletada. 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.

A bioprospecção de microrganismos e seu potencial biotecnológico pode apresentar grande importância para o desenvolvimento de uma agricultura sustentável, no que tange o 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.

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 9 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 à 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 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 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.

A técnica da coloração de Gram é baseada na composição estrutural e química da parede celular de bactérias e as diferencia em duas variedades. As bactérias Gram-positivas são capazes de reter a coloração do cristal violeta, e são observadas no microscópio na cor roxa; já as Gram-negativas não são capazes de reter a coloração roxa e são visualizadas na cor vermelha da fucsina (POPESCU, 1996; BEVERIDGE, 2001), o que é possível observar na figura 18. Devido a isso, o isolado 14 é caracterizado como Gram-negativo.

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).

8. 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.

O 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 é promissor quanto ao desenvolvimento de um novo antibiótico e como perspectivas futuras este será identificado por sequenciamento do gene 16S usando NGS (Sequenciamento de Nova Geração), dando continuidade à pesquisa. Além disso, os estudos espeleológicos contribuem para a conservação das cavernas, que se destacam por sua fauna especializada, feições exuberantes e por serviços ecossistêmicos, como os demonstrados nesta pesquisa.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, B. F. **Geoespeleologia da Gruta Martimiano II – Parque Estadual do Ibitipoca – Santa Rita de Ibitipoca – MG.** (Trabalho de Conclusão de Curso). Departamento de Geologia, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto. 2019, no prelo.
- AMINOV, Rustam I. A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future. **Frontiers in microbiology**, v. 1, p. 134, 2010.
- ASSUNÇÃO, PHS; BRAGANTE-FILHO, M. A. Atual metodologia de mapeamento de cavernas realizada pela Sociedade Excursionista e Espeleológica–SEE. In: **Congresso Brasileiro de Espeleologia**. p. 275-280, 2015.
- BARBOSA FELESTRINO, 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, Terry J. Structures of gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles. **Journal of bacteriology**, v. 181, n. 16, p. 4725-4733, 1999.
- BEVERIDGE, Terry J. Use of the Gram stain in microbiology. **Biotechnic & Histochemistry**, v. 76, n. 3, p. 111-118, 2001.
- BISSON-FILHO, Alexandre 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, Peter 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., J.S. BUTEL, & S.A. MORSE. **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, Mitchell T.; WANG, Qingfeng; HARSHEY, Rasika 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, Begum; GUNGOR, Nihal Dogruoz. 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.
- CAVALCANTI, J. A. D. Mapeamento Espeleológico. Ouro Preto: **SEE**, ed. 1,1996.
- CORRÊA-NETO, A. V.; FILHO, J. B. Espeleogênese em quartizito da Serra de Ibitipoca, Sudeste de Minas Gerais. **Anuário do Instituto de Geociências**, v. 20, n. D1, p. 75–87, 1997.
- COTTER, Paul D.; ROSS, R. Paul; HILL, Colin. 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, Massachussets and London, England. 189 pp, 1982.
- DEMAIN, A. L.; ADRIO, 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.
- EMBRAPA. Agroenergia. Bioprospecção Microbiana. **Embrapa**, 2015.
- 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.
- FILHO, S. A. ET AL. Bioprospecção e biotecnologia. **Parc.Estrat.**, v. 19, n. 38, p. 45–80, 2014.
- FRANCISCO JR, Wilmo E.; BEVILAQUA, Denise; GARCIA JR, Oswaldo. Microbiological oxidative dissolution of a complex mineral sample containing pyrite (FeS₂), pyrrhotite (Fe_{1-x}S) and molybdenite (MoS₂). **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1095-1099, 2007.
- GAYLARDE, Christine Claire; BELLINASSO, Maria de Lourdes; MANFIO, Gilson Paulo. Biorremediação. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v.34, p. 36-43, 2005.
- GHOSH, Soumya; KUISIENE, Nomedá; CHEEPHTAM, Naowarat. 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, Rasika 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.
- HOENEN S. Conhecimento atual sobre o bagre cavernícola, *Pimelodella kronei*, da Província Espeleológica do Vale do Ribeira, SP. **Espeleo-Tema**, V.18, p.31-41, 1997.
- INSTITUTO ESTADUAL DE FLORESTA. Plano de manejo do Parque Estadual do Ibitipoca. Belo Horizonte, 2007.
- JURADO, Valme 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., AHEMAD, 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, Arthur L. The biophysics of the gram-negative periplasmic space. **Critical reviews in microbiology**, v. 24, n. 1, p. 23-59, 1998.
- KOCH, Arthur L.; WOESTE, Steven. 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 Qaudrilátero Ferrífero**. 85 (Mestrado em Biotecnologia). Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto. 2018.
- LEWINSOHN, T. M.; PRADO, P. I. Síntese do Conhecimento Atual da Biodiversidade Brasileira. **Ministério do Meio Ambiente**, p. 21–109, 2006.
- LIMA, P. E. S.; et al. Caracterização geoespeleológica preliminar da Gruta Martiniano II, Santa Rita de Ibitipoca – MG. 34 **Congresso Brasileiro de Espeleologia**, 2017.
- LIMA, P.E.S.; NETO, J.M. Gruta Martiniano II. In: RUBBIOLI, E. et al. Cavernas. Atlas do Brasil Subterrâneo. 1ª edição. **Instituto Brasileiro de Desenvolvimento e Sustentabilidade**, v.1, n. 42, p. 230-233, 2019.
- LOWY, Franklin 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: **Ministerio 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, Javad et al. Biological control of *Fusarium graminearum* on wheat by antagonistic bacteria. **Songklanakar 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, Guel Erginbas 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, Erlon Lopes; MARTINS, Bruna Amaral. 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.
- POPESCU, Andreia; DOYLE, R. J. The Gram stain after more than a century. **Biotechnic & histochemistry**, v. 71, n. 3, p. 145-151, 1996.
- PRAKASH, Divya et al. Actinomycetes: a repertory of green catalysts with a potential revenue resource. **BioMed research international**, v. 2013, 2013.
- RAHAMATHULLA, M.P., B.N. HARISH, L. MATASEJE, & M.R. MULVEY. 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, Vanessa 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.

ANEXO A - AUTORIZAÇÃO PARA PESQUISA CIENTÍFICA NO ESTADO DE MINAS GERAIS



GOVERNO DO ESTADO DE MINAS GERAIS
SECRETARIA DE ESTADO DE MEIO AMBIENTE E DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL
INSTITUTO ESTADUAL DE FLORESTAS
ASSESSORIA DE PROGRAMAS E PROJETOS ESPECIAIS



AUTORIZAÇÃO PARA PESQUISA CIENTÍFICA NO ESTADO DE MINAS GERAIS

Numero da Autorização 017/2019	Data da Emissão 28/03/2019	Prazo de Validade 04/10/2019
-----------------------------------	-------------------------------	---------------------------------

INFORMAÇÕES DO RESPONSÁVEL E DO PROJETO						
Título do Projeto	*Potencial Biotecnológico de bactérias cultiváveis obtidas a partir da maior caverna em quartzito do Brasil, Gruta Martiniano II, Itaipoca - MG*					
Instituição	Universidade Federal de Ouro Preto					
Responsável	Leandro Márcio Moreira					CPF
Logradouro	Rua Conde de Bobadella					2466-0354894
Nº/KM	180	Complemento	14	Bairro/Localidade	Centro	
Município	Ouro Preto	UF	MG	CEP	35400-000	Cx. Postal
Telefone				CEP	(31) 99631-2730	
E-mail	lmorei@gmail.com					

INTEGRANTES DA EQUIPE			
Nome	Instituição	CPF/RG	Função
Lara Chaves Carvalho Guerra e	UFOP	125.476.436-42	Aluna de Graduação
Caroline Gracyelle	UFOP	084.671.751-05	Co-orientadora

INFORMAÇÕES DAS ATIVIDADES						
TIPO DE ATIVIDADE:	<input type="checkbox"/> Captura	<input checked="" type="checkbox"/> Coleta	<input checked="" type="checkbox"/> Transporte	<input type="checkbox"/> Sem Coleta/Captura		
	<input checked="" type="checkbox"/> Abiótica	<input checked="" type="checkbox"/> Microorganismos	<input type="checkbox"/> Fungo	<input type="checkbox"/> Botânica	<input type="checkbox"/> Invertebrados	
	<input type="checkbox"/> Anfíbios	<input type="checkbox"/> Répteis	<input type="checkbox"/> Aves	<input type="checkbox"/> Mamíferos	<input type="checkbox"/> Ictiofauna	
OBSERVAÇÕES:	<p>Esta autorização permite coleta/transporte de amostras de sedimentos (para amostragem de bactérias) restrito a 50 gramas de material sólido por amostra.</p> <p>Esta autorização deverá ser acompanhada da autorização do Sísbio 64943-1.</p> <p>Esta autorização não permite a coleta de material litológico a partir de espeleotemas.</p> <p>Recomenda-se que seja encaminhado ao IEF a definição da quantidade de pontos de coleta e a localização destes pontos plotados no mapa da cidade, assim, que tal definição for concluída pelos pesquisadores envolvidos na pesquisa.</p> <p>Recomenda-se que os integrantes das equipes de coleta sejam instruídos a andarem na caverna em linha, de forma que o peso do material a movimentação da equipe seja restrito a uma única fôsea. E a locomoção das equipes sempre observe a fragilidade do piso quanto à presença de espeleotemas ou de espécimes da biota local.</p> <p>As campanhas devem ser agendadas com o responsável pela UC, com antecedência mínima de 30 dias da atividade de campo.</p>					

LOCAL DA ATIVIDADE - EM UNIDADE DE CONSERVAÇÃO ESTADUAL				
Unidade de Conservação	Responsável pela UC	Contato (Telefone e e-mail)	Endereço da UC	Assinatura do Responsável pela UC
Parque Estadual de Itaipoca	João Carlos Lima de Oliveira	(32) 5381-1101 (32) 98806-3073 pedbitpoca@meioambiente.mg.gov.br joao.lima@meioambiente.mg.gov.br	Parque Estadual do Itaipoca, CX postal 17 Distrito de Conceição de Itaipoca - Lima Duarte	

Esta autorização será válida apenas com a autenticação do responsável pela(s) Unidade(s) de Conservação.

Assinatura do responsável pela Autorização	Numero do Processo SIGED/S/PRO - IEF/ASPROF
	SIGED
Antonio Augusto Melo Malard Diretor Geral do IEF MAGP 1.176-426-8	

Cidade Administrativa Tancredo Neves, Edifício Minas - Assessoria de Programas e Projetos Especiais - 1º andar - II
Rodovia João Pinheiro s/nº, 4143, Bairro Serra Verde - CEP 31030-900
Telefones: (31) 3818-1326 & 4448 4993/4994/4995/4996/4997/4998/4999/5000/5001/5002/5003/5004/5005/5006/5007/5008/5009/5010

00000125 2101 2019



LOCAL DA ATIVIDADE - FORA DE UNIDADE DE CONSERVAÇÃO ESTADUAL (apenas para material botânico)

Município(s)	Não se aplica
--------------	---------------

TRANSPORTE - DESTINO DO MATERIAL COLETADO

Instituição(es)	UFOP
Endereço(s)	Campus Moisés de Castro, s/n, Bairro Basília - Oura Preta/MG - CEP: 3540-000

Outras Observações e Ressalvas:


1. Esta autorização não exime o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as autorizações previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena, da unidade de conservação federal, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites da unidade de conservação estadual cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso;
2. O pesquisador titular deverá constatar a administração dessa unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infraestrutura da unidade de conservação, quando for o caso;
3. O Instituto Estadual de Florestas não se responsabiliza por quaisquer danos a equipamentos, acidentados ou lesões físicas ou psíquicas, estando anexo o pesquisador responsável e sua equipe ciente da vulnerabilidade da área de realização da pesquisa;
4. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior;
5. O titular da autorização e os membros de sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura adequados, sempre que possível ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou danos significativos a outros grupos e empregar esforços de coleta ou captura quando comprometer a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condições *in situ*, quando for o caso;
6. Esta autorização não permite captura/coleta/ transporte:
 - para fins comerciais, industriais ou esportivas;
 - para realização de atividades integrantes do processo de licenciamento ambiental de empreendimentos, conforme resolução do CONAMA de nº 207 de 19/12/98, salvo quando especificado;
 - de espécies ameaçadas de extinção em lista oficial federal, salvo quando constante de projeto específico autorizado pelo SISBIO;
 - de espécies ameaçadas de extinção em lista oficial estadual, salvo quando constante de projeto específico autorizado pelo IEF;
 - de fauna e flora em áreas de domínio privado, sem o consentimento expresso ou tácito do proprietário nos termos do Código Civil;
7. Esta autorização não permite transporte interestadual e internacional de material biológico;
8. Esta autorização não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre o acesso ao patrimônio genético, sobre a proteção e o acesso ao conhecimento tradicional associado e sobre a repartição de benefícios para conservação e uso sustentável da biodiversidade. Veja mais resoluções em www.mma.gov.br;
9. O titular desta autorização, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando de inadequação, omissão ou falha de descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição da área, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização suspensa ou revogada pelo IEF ou material biológico coletado apreendido nos termos da legislação em vigor;
10. O responsável poderá, durante a validade desta autorização e conforme Termo de Compromisso firmado, solicitar à Assessoria de Programas e Projetos Especiais do IEF Renovação, Cancelamento ou Conclusão, conforme instruções no site do IEF (<http://www.ief.org.br/biodiversidade/projetos-especiais>);
11. Esta autorização é válida somente para expedições *in situ* e exclusivamente no estado de Minas Gerais;
12. O pesquisador deverá estar sempre acompanhado desta autorização para apresentá-la às autoridades, quando solicitado.

Registro de coleta imprevista de material biológico

De acordo com a Portaria 130/2017, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização deverá ser anotada, *in situ*, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada ao IEF e ao responsável da UC, em até 30 dias ap. a realização de campo, por meio do envio de cópia do registro de coleta imprevista de material biológico. O transporte de material biológico em si, inclusive, deverá ser acompanhado da autorização a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destruído à instituição científica.

Unidade de Conservação	Taxon*	Qtd.	Tipo de amostra	Qtd.	Data	Justificativa

* Identificar a espécie no nível taxonômico possível.

Assinatura do responsável pela Autorização  Antônio Augusto Melo Moland Diretor Geral do IEF INSP 1.176.024-8	Número do Processo SIGED/SIPRO - IEF/ASPROP
---	---

ANEXO B - AUTORIZAÇÃO PARA ATIVIDADES COM FINALIDADE CIENTÍFICA



Ministério do Meio Ambiente - MMA
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 64843-1	Data de Emissão: 04/10/2018 10:03:50	Data da Revalidação*: 04/10/2019
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Leandro Marco Moreira	CPF: 248.643.548-04
-----------------------------	---------------------

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Preparação de materiais para o pré e pós-campo	12/2018	01/2019
2	Coleta de material microbiológico na Gruta Martiniano II	01/2019	01/2019
3	Preparo das diluições das amostras	01/2019	01/2019
4	Isolamento das colônias de bactérias	01/2019	01/2019
5	Cultivo em meio LB líquido	01/2019	01/2019
6	Preparo e armazenamento em freezer	02/2019	02/2019
7	Testes bioquímicos	02/2019	05/2019
8	Escrita e finalização do projeto	06/2019	06/2019
9	Identificação das bactérias com potencial biotecnológico	06/2019	07/2019
10	Cultivo das bactérias em meio LB	01/2019	01/2019
11	Revisão bibliográfica	06/2018	11/2018

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Nacionalidade
1	Lara Chaves Carvalho Guerra	PESQUISADORA	125.476.436-42	Brasileira

Observações e ressalvas

1	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando de viagem de legislação vigente, ou quando de investigação, ornado ou não, deve descrever de informações relevantes que sustentam a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio, nos termos da legislação brasileira em vigor.
2	As atividades de campo exercidas por pessoas naturais ou jurídicas estrangeiras, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes de cultura nativa e cultura popular, presente e passado, sob o pretexto de pesquisa e monitoria que se destinem ao estudo, a difusão ou à pesquisa, estão sujeitas à autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
3	O titular de licença ou autorização e os membros de sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar método de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em situação in situ.
4	Esta autorização NÃO garante ao pesquisador titular e os membros de sua equipe de totalidade de obter as conclusões previstas em outros instrumentos legais, bem como de consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação, estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, possuidor ou morador de área dentro das fronteiras de unidade de conservação federais cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
5	Este documento somente poderá ser utilizado para as fins previstas na Instrução Normativa ICMBio nº 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 12/2012, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou reportagens. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou docentes no âmbito do ensino superior.
6	Em caso de pesquisa em UNIDADES DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR as DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e o uso de infra-estrutura de unidade.

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Abreviês do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio de página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 0648430120181004

Página 1/3



Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 64943-1	Data da Emissão: 04/10/2018 10:03:50	Data da Revalidação*: 04/10/2019
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Leandro Marco Moreira	CPF: 248.643.548-04
-----------------------------	---------------------

Observações e ressalvas

7 Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso e componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou do conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospeção e desenvolvimento tecnológico. Ver maiores informações em www.mma.gov.br/gest

Outras ressalvas

1) Esta autorização não permite a coleta de material biológico a partir de espécimes; 2) Esta autorização não se estende ao acesso ao patrimônio genético, devendo o pesquisador se cadastrar e solicitar as atividades junto ao CGRG (Conselho de Gestão do Patrimônio Genético); 3) Esta autorização não exonera o pesquisador da necessidade de buscar autorizações previstas junto ao órgão ambiental estadual responsável;	CONP
As coordenadas das coletas deverão constar no relatório, com a atenção para que a coleta dos pontos seja realizada na maior proximidade de sua entrada principal e na maior proteção possível, atendendo para o registro do datab utilizado, do número de coletas e aos associados aos pontos coletados.	ORCAV Brasil-CP

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Descrição do local	Município-UF	Bioma	Caverna?	Tipo
1	PARQUE ESTADUAL DO IBITIPOCA	Lima Duarte-MG	Mata Atlântica	Sim	Dentro de UC Estadual

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxon	Qtd.
1	Coleta/transporte de material botânico, fungico ou microbiológico	Bacteria	-

Materiais e Métodos

#	Tipo de Método (Grupo taxonômico)	Materiais
1	Amostras biológicas (Microorganismos)	Outras amostras biológicas

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo destino
1	UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO	Laboratório

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 0648430120181004

Página 2/3



Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 84943-1	Data da Emissão: 04/10/2018 10:53:50	Data da Revalidação*: 04/10/2019
De acordo com o art. 2º da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Leandro Marcio Moreira	CPF: 248.843.548-04
------------------------------	---------------------

Registro de coleta imprevista de material biológico

De acordo com a Instrução Normativa nº 03/2014, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica e, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

Taxon*	Qtd.	Tipo de Amostra	Qtd.	Data

* Identificar o espécime do nível taxonômico possível.

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

ANEXO C - COMPROVANTE DE CADASTRO DE ACESSO - SISGEN



Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO
Comprovante de Cadastro de Acesso
Cadastro nº A0D9A95

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro: A0D9A95
Usuário: UFOP
CPF/CNPJ: 23.070.858/0001-10
Objeto do Acesso: Patrimônio Genético
Finalidade do Acesso: Pesquisa

Espécie

Unclassified bacterias

Título da Atividade: Isolamento de bactérias e potencial biotecnológico da maior caverna em quartzito do Brasil, Gruta Martiniano II, Ibitipoca - MG

Equipe

Leandro Marolo Moreira UFOP
Camila Graçoyelle de Carvalho Lemes UFOP
Lara Chaves Carvalho Guerra UFOP

Parceiras Nacionais

20.223.202/0001-00 / Sociedade Excursionista e Espeleológica

Data do Cadastro: 08/10/2018 10:34:58
Situação do Cadastro: Concluído



Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em 10:38 de 08/10/2018.



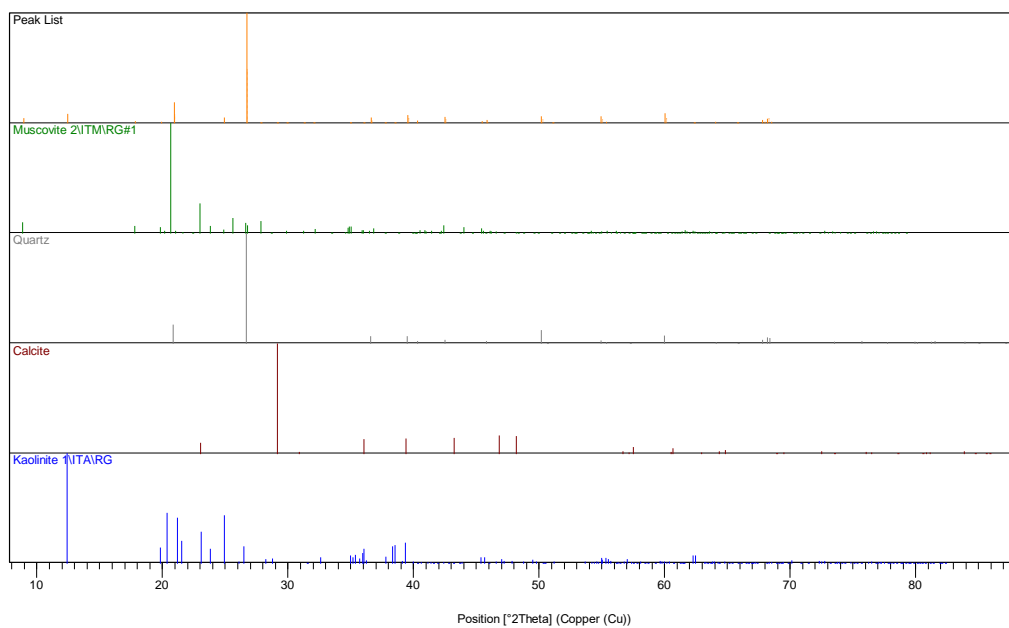
SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
ASSOCIADO - SISGEN

APÊNDICE A – DIFRATOMETRIA DE RAIOS X - AMOSTRA LATERAL 1

▪ Padrões identificados

Amostra	Pontuação	Nome do Mineral	Fator de Escala	Fórmula Química
Lateral 1	14	Muscovita	0.061	$K Al_3 Si_3 O_{10} (OH)_2$
	57	Quartzo	0.456	SiO_2
	6	Calcita	0.004	$Ca (CO_3)$
	29	Caulinita	0.066	$Al_2 (Si_2 O_5) (OH)_4$

▪ Fases identificadas

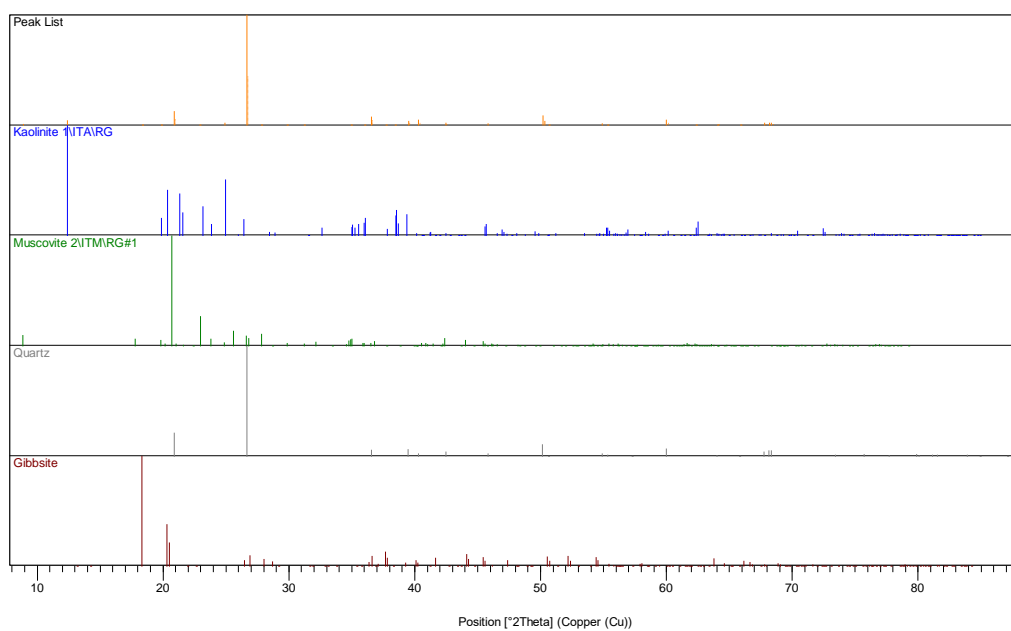


APÊNDICE B – DIFRATOMETRIA DE RAIOS X – AMOSTRA LATERAL 2

▪ Padrões identificados

Amostra	Pontuação	Nome do Mineral	Fator de Escala	Fórmula Química
Lateral 2	32	Caulinita	0.038	$\text{Al}_2\text{Si}_2\text{O}_5(\text{OH})_4$
	17	Muscovita	0.056	$\text{KAl}_3\text{Si}_3\text{O}_{10}(\text{OH})_2$
	67	Quartzo	0.673	SiO_2
	13	Gibbsita	0.012	$\text{Al}(\text{OH})_3$

▪ Fases identificadas

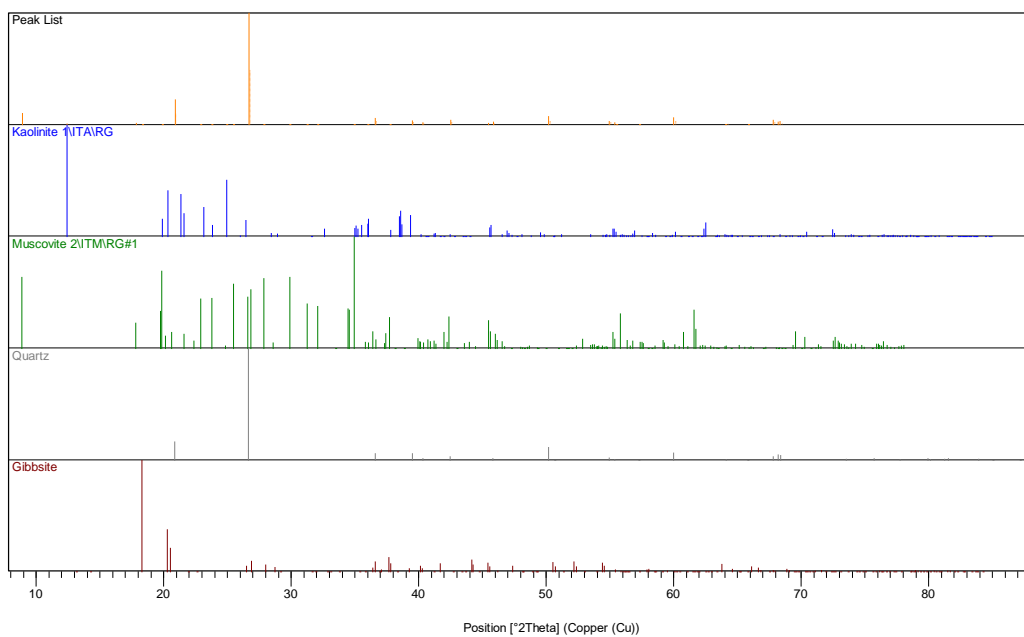


APÊNDICE C – DIFRATOMETRIA DE RAIOS X - AMOSTRA LATERAL 3

▪ Padrões identificados

Amostra	Pontuação	Nome do Mineral	Fator de Escala	Fórmula Química
Lateral 3	16	Caulinita	0.014	$\text{Al}_2\text{Si}_2\text{O}_5(\text{OH})_4$
	19	Muscovita	0.040	$\text{KAl}_3\text{Si}_3\text{O}_{10}(\text{OH})_2$
	60	Quartzo	0.439	SiO_2
	6	Gibbsita	0.018	$\text{Al}(\text{OH})_3$

▪ Fases identificadas

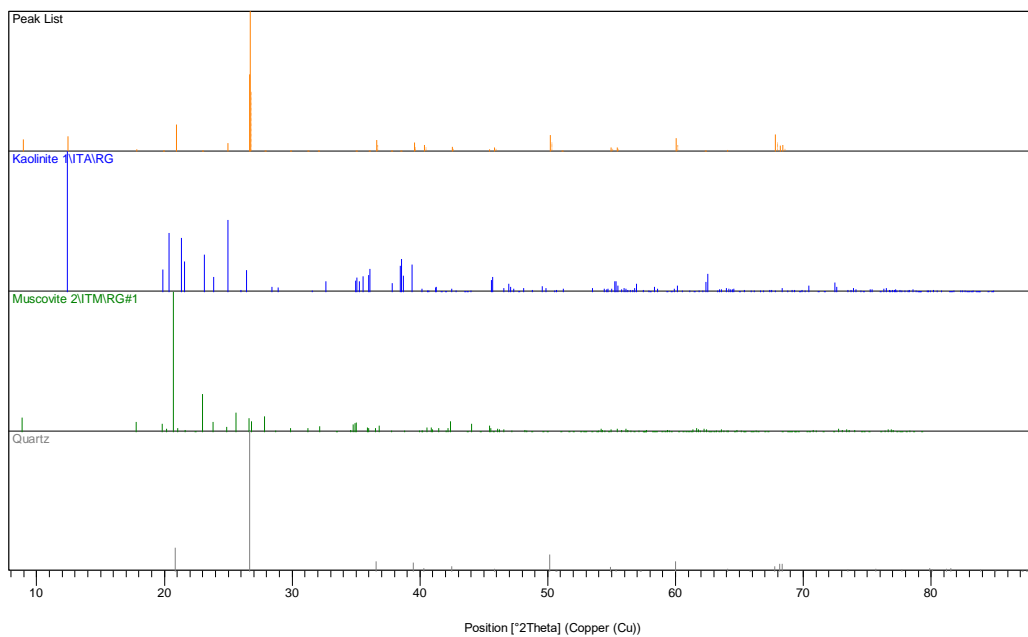


APÊNDICE D – DIFRATOMETRIA DE RAIOS X - AMOSTRA LATERAL 4

▪ Padrões identificados

Amostra	Pontuação	Nome do Mineral	Fator de Escala	Fórmula Química
Lateral 4	28	Caulinita	0.063	$\text{Al}_2\text{Si}_2\text{O}_5(\text{OH})_4$
	17	Muscovita	0.061	$\text{KAl}_3\text{Si}_3\text{O}_{10}(\text{OH})_2$
	66	Quartzo	0.369	SiO_2

▪ Fases identificadas

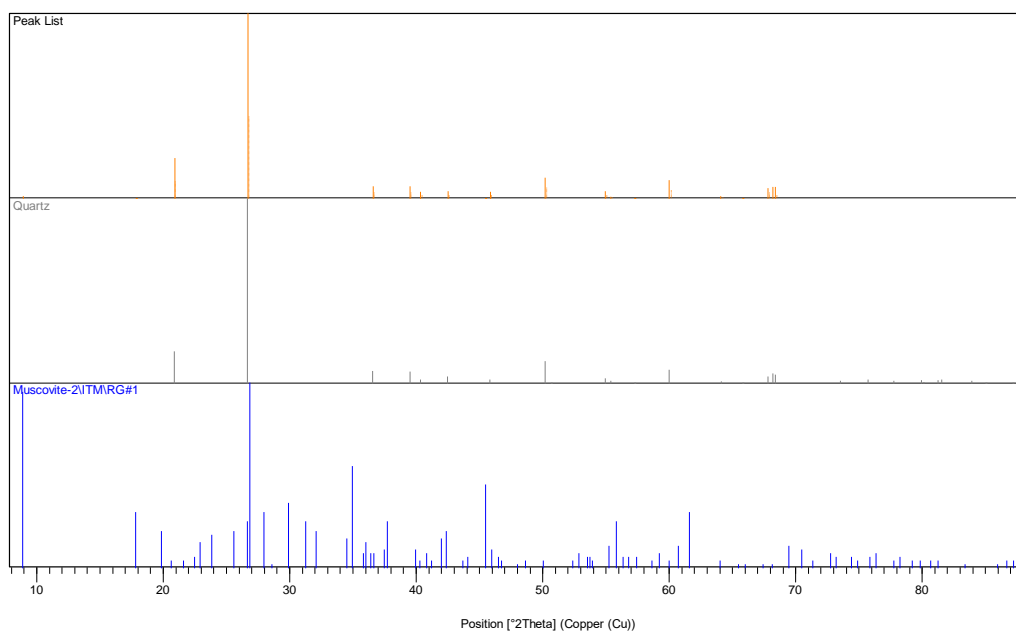


APÊNDICE E – DIFRATOMETRIA DE RAIO X - AMOSTRA PISO 1

▪ Padrões identificados

Amostra	Pontuação	Nome do Mineral	Fator de Escala	Fórmula Química
Piso 1	9	Muscovita	0.093	$K Al_2 (Si_3 Al) O_{10} (O H , F)_2$
	59	Quartzo	0.586	$Si O_2$

▪ Fases identificadas

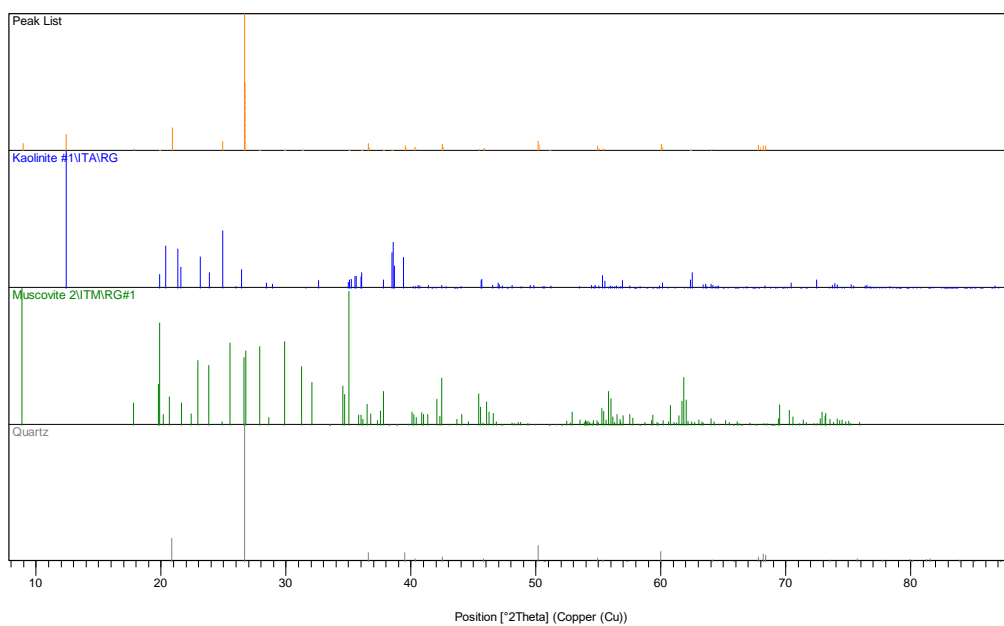


APÊNDICE F – DIFRATOMETRIA DE RAIO X - AMOSTRA PISO 2

▪ Padrões identificados

Amostra	Pontuação	Nome do Mineral	Fator de Escala	Fórmula Química
Piso 2	32	Caulinita	0.091	$Al_2 Si_2 O_5 (OH)_4$
	18	Muscovita	0.049	$K Al_3 Si_3 O_{10} (OH)_2$
	59	Quartzo	0.389	$Si O_2$

▪ Fases identificadas

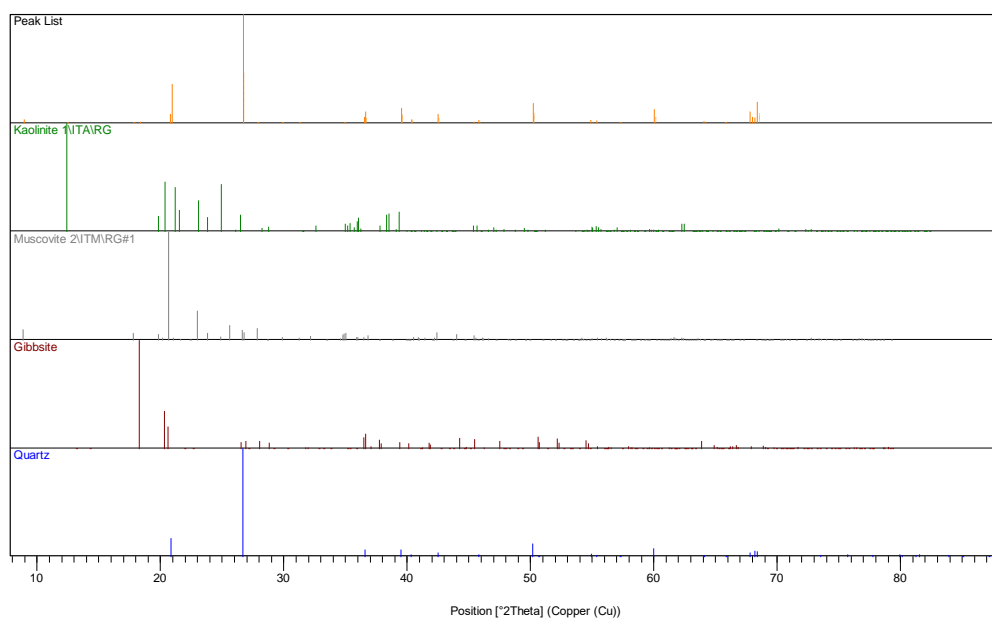


APÊNDICE G – DIFRATOMETRIA DE RAIOS X - AMOSTRA PISO 3

▪ Padrões identificados

Amostra	Pontuação	Nome do Mineral	Fator de Escala	Fórmula Química
Piso 3	5	Caulinita	0.015	$Al_2 Si_2 O_5 (OH)_4$
	9	Muscovita	0.060	$K Al_3 Si_3 O_{10} (OH)_2$
	8	Gibbsita	0,022	$Al (OH)_3$
	49	Quartzo	0.458	$Si O_2$

▪ Fases identificadas

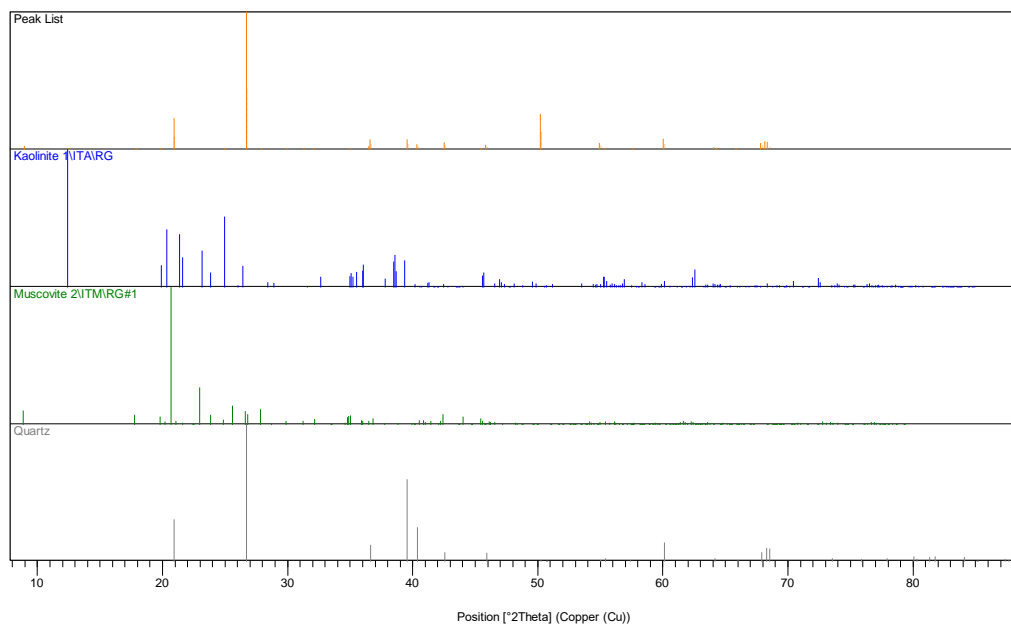


APÊNDICE H – DIFRATOMETRIA DE RAIOS X - AMOSTRA PISO 4

▪ Padrões identificados

Amostra	Pontuação	Nome do Mineral	Fator de Escala	Fórmula Química
Piso 4	9	Caulinita	0.013	$Al_2 Si_2 O_5 (OH)_4$
	13	Muscovita	0.061	$K Al_3 Si_3 O_{10} (OH)_2$
	41	Quartzo	0.693	$Si O_2$

▪ Fases identificadas

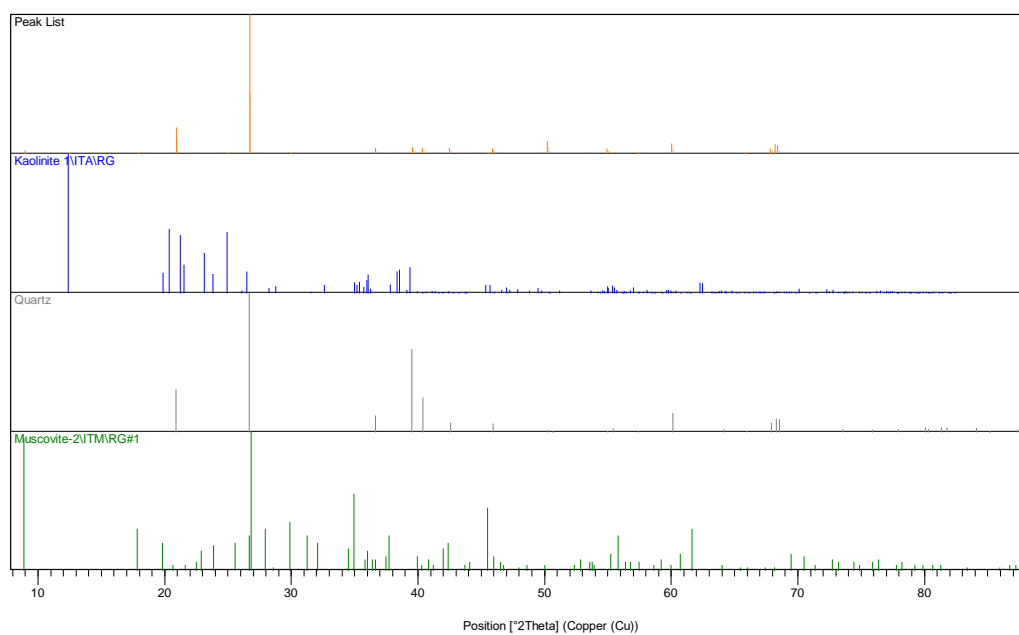


APÊNDICE I – DIFRATOMETRIA DE RAIOS X - AMOSTRA TETO 1

▪ Padrões identificados

Amostra	Pontuação	Nome do Mineral	Fator de Escala	Fórmula Química
Teto 1	7	Caulinita	0.011	$Al_2 Si_2 O_5 (OH)_4$
	8	Muscovita	0.089	$K Al_2 (Si_3 Al) O_{10} (OH, F)_2$
	44	Quartzo	0.457	$Si O_2$

▪ Fases identificadas

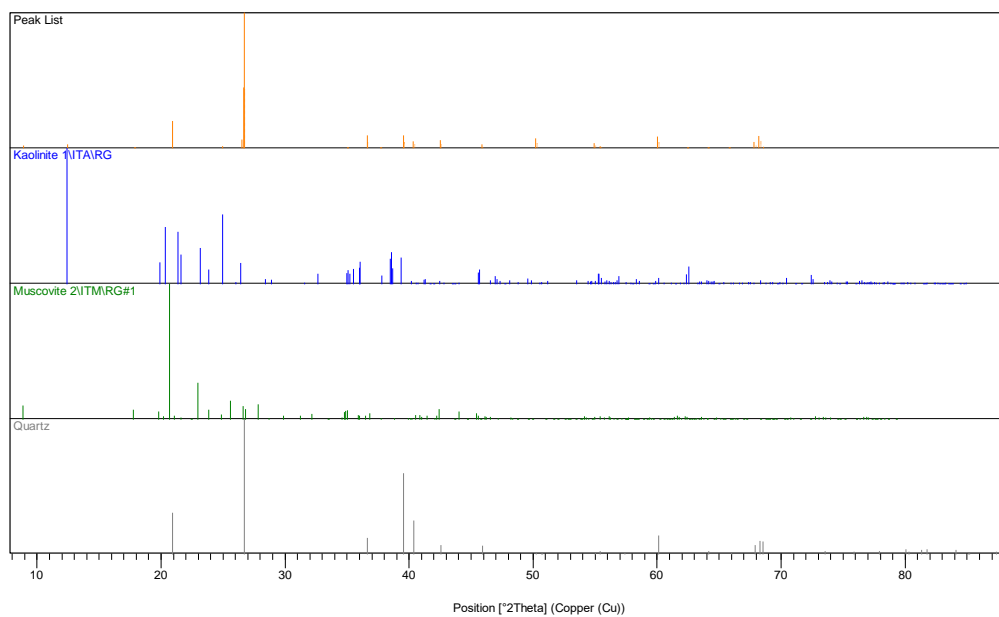


APÊNDICE J – DIFRATOMETRIA DE RAIOS X - AMOSTRA TETO 2

▪ Padrões identificados

Amostra	Pontuação	Nome do Mineral	Fator de Escala	Fórmula Química
Teto 2	12	Caulinita	0.028	$\text{Al}_2\text{Si}_2\text{O}_5(\text{OH})_4$
	10	Muscovita	0.055	$\text{KAl}_3\text{Si}_3\text{O}_{10}(\text{OH})_2$
	45	Quartzo	0.583	SiO_2

▪ Fases identificadas

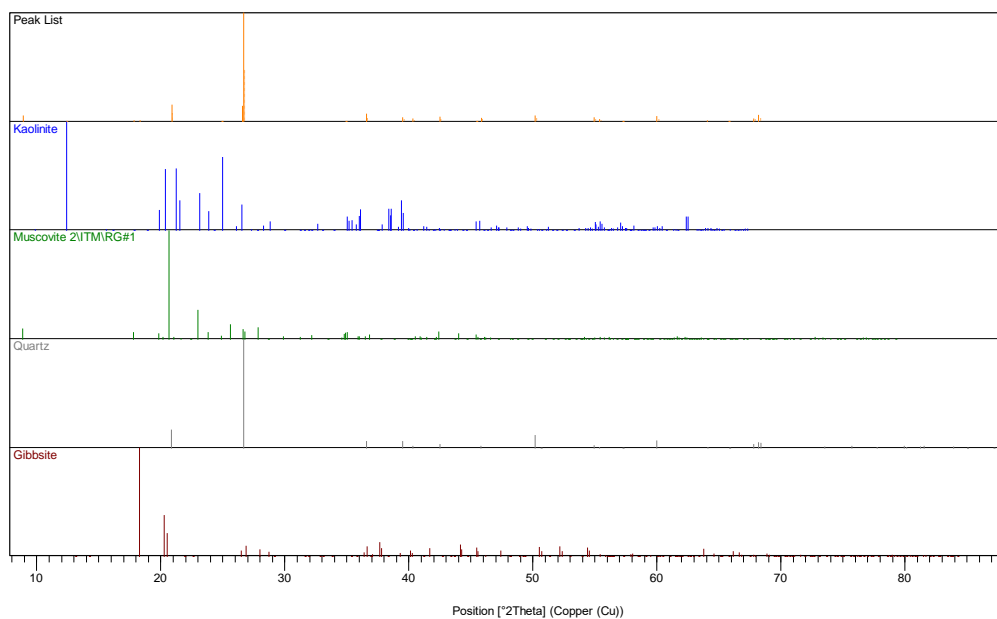


APÊNDICE K – DIFRATOMETRIA DE RAIOS X - AMOSTRA TETO 3

▪ Padrões identificados

Amostra	Pontuação	Nome do Mineral	Fator de Escala	Fórmula Química
Teto 3	4	Caulinita	0.015	$Al_2 Si_2 O_5 (OH)_4$
	6	Muscovita	0.047	$K Al_3 Si_3 O_{10} (OH)_2$
	5	Gibbsita	0,019	$Al (OH)_3$
	68	Quartzo	0.628	$Si O_2$

▪ Fases identificadas



APÊNDICE L – DIFRATOMETRIA DE RAIO X - AMOSTRA TETO 4

▪ Padrões identificados

Amostra	Pontuação	Nome do Mineral	Fator de Escala	Fórmula Química
Teto 4	13	Caulinita	0.016	$\text{Al}_2\text{Si}_2\text{O}_5(\text{OH})_4$
	16	Muscovita	0.059	$\text{KAl}_3\text{Si}_3\text{O}_{10}(\text{OH})_2$
	70	Quartzo	0.799	SiO_2

▪ Fases identificadas

