

ANÁLISE DA COMUNIDADE DE ACTINOMYCETALES NO SEDIMENTO E ÁGUA DE GOTEJAMENTO DE CAVERNAS, PARIPIRANGA (BA)

ACTINOMYCETALES COMMUNITY ANALYSIS IN SEDIMENT AND DRIP WATER FROM CAVES, PARIPIRANGA (BA)

Eric de Lima Silva Marques (1), João Carlos Teixeira Dias (1), Eduardo Gross (1),
Jorge Luiz Lopes da Silva (2), Carlos Priminho Pirovani (1) & Rachel Passos Rezende (1)

(1) Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC).

(2) Universidade Federal de Alagoas (UFAL).

Contatos: eric.marques@bol.com.br; marques.ericls@gmail.com; rezende.rachel@gmail.com.

Resumo

As comunidades microbianas que habitam cavernas são pouco conhecidas, principalmente em estudos com técnicas moleculares no sedimento e na água de gotejamento. Dentre os microrganismos que podem habitar cavernas, as Actinomycetales são uma ordem de Bactérias da Divisão Actinobacteria com grande versatilidade metabólica o que pode indicar a presença desse grupo no ambiente pouco conhecido e isolado da caverna. Assim, esse trabalho teve como objetivo comparar a diversidade de Actinomycetales em amostras de sedimento e água de gotejamento de duas cavernas utilizando a técnica de DGGE (Eletroforese em Gel Com Gradiente Desnaturante). O DGGE gerou diferentes perfis para as comunidades microbianas do sedimento e da água de gotejamento. A comparação desses perfis por meio de métodos de análise multivariada separou as amostras por caverna, exceto as de água de gotejamento e de sedimento saturado com água de gotejamento que agruparam independente da caverna. Dessa forma, a comunidade microbiana do sedimento pode sofrer influência da comunidade da água de gotejamento e a mudança da caverna influencia a comunidade do sedimento, porém não parece influenciar a da água de gotejamento.

Palavras-Chave: Cavernas; DGGE; Microrganismos.

Abstract

Microbial communities that inhabit caves are little known, especially in studies using molecular techniques in the sediment and drip water. Among microorganisms that can inhabit caves, the order Actinomycetales, members of the bacterial division Actinobacteria, present great metabolic versatility. that could indicate the presence of this group in isolated and little known cave environment. This work aimed to compare the Actinomycetales diversity among sediment and drip water samples from two caves using DGGE (Denaturing Gel Gradient Electrophoresis). DGGE generates different profiles among microbial communities from sediment and drip water. Profiles comparisons using multivariate analysis separate samples from cave, except dripping water and sediment saturated with dripping water samples that clustered unattached of the cave. Thus, microbial community from sediment is susceptible to be influenced by drip water community and the change of the cave influence the microbial community from sediment, but does not influence the drip water community.

Key-words: Cave; DGGE; Microorganisms.

1. INTRODUÇÃO

As cavernas propiciam um ambiente isolado para os microrganismos, afótico, comumente com baixos níveis de matéria orgânica e uma temperatura relativamente constante (Barton & Northup 2007; Barton & Jurado, 2007; Pouson & White, 1969). Nesse ambiente há um predomínio de comunidades microbianas baseadas na quimiolitotrofia com intensas interações ecológicas para sobreviverem em um ambiente oligotrófico (BARTON & JURADO, 2007). Podendo sustentar uma complexa teia

alimentar composta por artrópodes e peixes que se alimentam direta ou indiretamente dos microrganismos de comunidades quimioautotróficas (HOSE & PISAROWICZ, 1999). Porém o conhecimento sobre microrganismos em cavernas é restrito a algumas cavernas e tipos de amostras, tendo poucas informações na literatura sobre biogeoquímica desses microrganismos (BARTON & LUISZNER, 2005; BARTON *et al.*, 2007; CHEN *et al.*, 2009).

A Divisão Actinobacteria é formada por bactérias Gram positivas com grande versatilidade metabólica e amplamente distribuída no mundo (Williams *et al.*, 1984). Dentro dessa Divisão destaca-se a ordem Actinomycetes, grupo muito prospectado devido ao seu potencial biotecnológico. Atualmente esse grupo é uma das principais fontes de biomoléculas para a indústria e medicina. Essa ordem tem sido avaliada com grande potencial para se obter antimicrobianos em cavernas (CHEEPTAM *et al.*, 2013) e com potencial participação em ciclos biogeoquímicos na caverna e na formação e degradação de espeleotemas (GROTH & SAIZ-JIMENEZ, 1999; GROTH *et al.*, 1999; CUEZVA *et al.*, 2012).

Estudos de diversidade microbiana utilizando técnicas dependentes de cultivo tem várias limitações devido ao baixo número de espécies de microrganismos isolados em meios de cultivo tradicionais, inferior a 5% (Amann *et al.*, 1995). A DGGE (Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante) é uma técnica independente de cultivo que permite a comparação de comunidades microbianas em diferentes amostras por meio da migração diferencial de fragmentos de DNA de mesmo tamanho amplificado por PCR (Reação de Polimerase em Cadeia) com um grampo GC acoplado em um dos primers (Muyzer *et al.*, 1993). A migração ocorre em gel de poliacrilamida com gradiente dos agentes desnaturantes do DNA (uréia e formamida) sendo a variação da migração dependente do gradiente utilizado e do conteúdo de guanina e citosina de cada fragmento de DNA (MUYZER *et al.*, 1993; MUYZER & SMALLA, 1998). Essa é uma técnica muito utilizada na análise e comparação da diversidade microbiana, incluindo cavernas (PORTILLO *et al.*, 2008; 2009a; 2009b; 2009c; SCHABEREITER-GURTNER *et al.*, 2002).

O presente trabalho teve como objetivo comparar a diversidade de Actinomycetales em amostras de sedimento e água de gotejamento de duas cavernas utilizando a técnica de DGGE.

2. METODOLOGIA

Quatro amostras de sedimento foram coletas na Gruta do Bom Pastor (GBP, 10°39'05.99" S e 37°55'26.87"O) e Furna do Fim do Morro do Parafuso (FFMP, 10°38'25.89" S e 37°52'04.13"O) localizadas no município de Paripiranga-BA (Figura 1). Duas amostras de sedimento na penúltima câmara (GBP2 e FFMP2) e duas na última câmara (GBP3 e FFMP3) das cavidades citadas. Cada amostra foi coletada a partir de amostragem

composta de sedimento em cinco pontos de coleta com distância de 2 m entre os pontos obtendo um total aproximado de 200 g de amostra. Na última câmara da GBP e na penúltima câmara da FFMP foram coletadas 100 mL de água de gotejamento (identificada com o número 1). Ao sair das grutas, as amostras de sedimento e água de gotejamento foram acondicionadas em isopor com gelo seco até ao laboratório.



Figura 1 – Mapa da Bahia com localização do município de Paripiranga-BA destacado em vermelho.

O DNA de cada amostra foi extraído com o PowerSoil® DNA Isolation Kit (MoBio) de acordo com protocolo do fabricante e, posteriormente, foi quantificado em espectrofotômetro.

A análise da comunidade de Actinomycetales foi realizada por meio de PCR-DGGE onde, primeiro, 50 ng do DNA foi utilizado para a primeira reação de PCR com os primers F243 (5'-GGA TGA GCC CGC GGC CTA-3') e R1358 (5'-CGG TGT GTA CAA GGC CCG GGA ACG-3') (Heuer *et al.*, 1997) e posteriormente uma alíquota dessa reação foi utilizada para uma segunda PCR com primers F984 (5'-AAC GCG AAG AAC CTT AC-3') e R1358 (Heuer *et al.*, 1997) com um grampo GC (5'-CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG G-3') (Muyzer *et al.*, 1993) na extremidade 5' do primer F984. As condições de PCR e concentrações foram as mesmas nas duas reações. O DNA foi amplificado com 0.2 mM de cada primer, 0.2 mM de dNTP, 0.03 U/μL de Taq DNA polymerase (Promega), 50 ng de DNA, 3 mM de MgCl₂ e 1X de

tampão. E as condições da PCR foram: 94°C por 5 min seguido de 35 ciclos a 94°C por 60 s, 60°C por 90 s e 72°C por 60 s; a extensão final foi a 72°C por 5 min.

O DGGE foi feito em gel com 8% de acrilamida:bisacrilamida (37,5:1) com gradiente desnaturante de 30 a 60%. A corrida foi realizada em tampão TAE 1X (40 mM/L de tris base, 20 mM/L de acetato de sódio e 1 mM/L de EDTA pH 8,0) a temperatura constante de 60°C e a voltagem constante de 70 V por 16 horas. O gel foi corado com nitrato de prata e digitalizado em scanner. Foi criada manualmente uma matriz binária de dados de presença e ausência de bandas utilizada na Análise de Componentes Principais (PCA).

3. DISCUSSÃO E RESULTADOS

A PCR-DGGE para a ordem Actinomycetales foi possível apenas com a realização do Nested – PCR onde no primeiro PCR foi utilizado um primer específico para essa ordem (F243) e o segundo PCR foi realizado com primers universais para bactérias

com o grampo GC. Essa é uma técnica independente de cultivo que permite acessar, potencialmente, todas as Actinomycetales presentes na amostra e assim não se restringe apenas aos membros cultiváveis em um determinado meio de cultura, tendo uma visão mais ampla da comunidade microbiana.

Os perfis visualizados na figura 2A mostram a comunidade de Actinomycetales em cada amostra, onde cada banda representa uma Unidade Taxonômica Operacional (OTU). Nesse aspecto fica visível a semelhança entre as duas amostras de água de gotejamento que compartilham 4 OTUs entre si. Na figura 2B é mostrada a Análise de Componentes Principais (PCA) baseada na matriz de dados de presença e ausência de bandas do gel de DGGE. Nela observa-se que os perfis de DGGE das amostras de água de gotejamento (GBP1 e FFMP1) e da amostra GBP3 agruparam indicando similaridade entre elas, o mesmo sendo observado para as amostras de sedimento da FFMP (FFMP2 e FFMP3). Enquanto a GBP2 foi a amostra que apresentou menor similaridade com as demais.

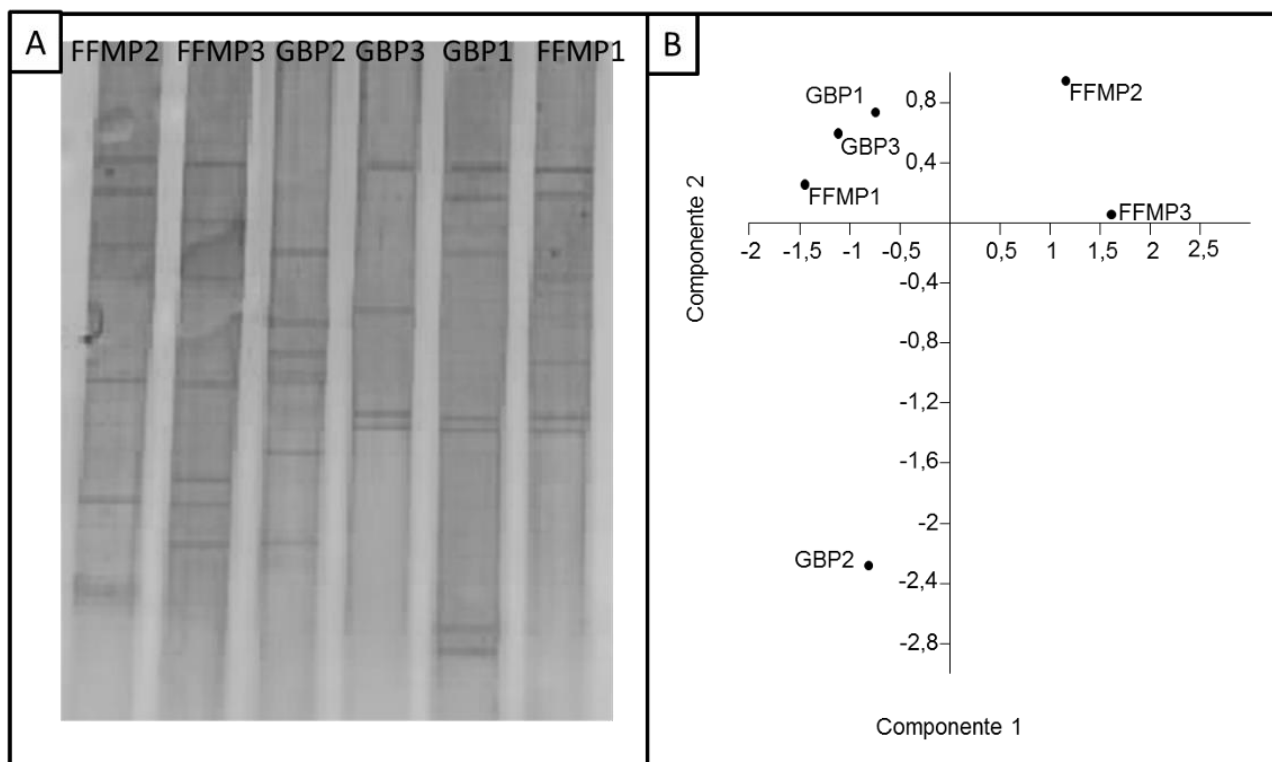


Figura 2 – Perfil de DGGE (A) e análise de componentes principais (B) das amostras de sedimento (2 e 3) e de água de gotejamento (1) da Furna do Fim do Morro do Parafuso (FFMP) e da Gruta do Bom Pastor (GBP).

GBP3 foi a única amostra de sedimento que estava saturada com água de gotejamento e no perfil de DGGE e PCA (Figura 2) observa-se a maior similaridade entre as comunidades de Actinomycetales dessa amostra com as de água de

gotejamento (GBP1 e FFMP1). A influência da água de gotejamento na comunidade de GBP3 pode ser explicada pelo transporte de matéria orgânica principalmente hidrocarbonetos resultantes da degradação da lignina de plantas da superfície e

lipídeos (SAIZ-JIMENEZ & HERMOSIN, 1999; LI *et al.*, 2011) que geralmente ocorre por percolação, e, também, pelo sedimento poder agir como reservatório de microrganismos (ADETUTU *et al.*, 2012) que podem ter sido transportados de espeleotemas para o sedimento. Hidrocarbonetos oriundos da degradação da lignina e lipídeos, apesar de não serem metabolizados por todos os microrganismos, podem indicar uma comunidade microbiana que utiliza prioritariamente esses compostos como fonte de matéria orgânica, sendo, portanto, predominantemente heterotrófica, e que apresenta potencial para descoberta de novas lipases e microrganismos capazes de degradar compostos aromáticos, que é um dos principais subprodutos da degradação da lignina e que foi observado no interior da caverna de Altamira, Espanha (SAIZ-JIMENEZ & HERMOSIN, 1999).

A variação entre a comunidade microbiana da água de gotejamento (FFMP1 GBP1) e do sedimento (FFMP2, FFMP3 e GBP2) pode indicar uma alteração entre comunidade microbiana predominantemente heterotrófica para uma comunidade predominantemente quimioautotrófica. Essas variações também podem demonstrar que cavernas podem ter vários microambientes

potenciais para prospecção de novos microrganismos e biomoléculas de interesse biotecnológico. Sendo favorecido pelo isolamento da caverna, tendo em vista que essas comunidades podem estar isoladas do contato com seres não troglóbios e apresentam pressões evolutivas diferentes do ambiente externo (SARBU *et al.*, 1996; NORTHUP & LAVOIE, 2001; BARTON & JURADO, 2007).

4. CONCLUSÕES

As comunidades de Actinomycetales apresentaram variações entre as amostras de água de gotejamento e sedimento nas duas cavernas, sendo a água de gotejamento e a caverna amostrada, respectivamente o primeiro e segundo fator determinante da variação da comunidade microbiana.

AGRADECIMENTOS

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) pela bolsa concedida e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento do projeto.

BIBLIOGRAFIA

- ADETUTU, E.; THORPE, K.; SHAHSAVARI, E.; BOURNE, S.; CAO, X.; FARD, R. M. N.; KIRBY, G.; BALL, A. S. Bacterial community survey of sediments at Naracoorte Caves, Australia. **International Journal of Speleology**, v. 41, n. 2, p. 137-147, 2012.
- AMANN, R. I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K. H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiological Reviews**, v. 59, p.143-169, 1995.
- BARTON, H. A.; LUISZER, F. Microbial metabolic structure in a sulfidic cave hot spring: potential mechanisms of biospeleogenesis. **Journal of Cave and Karst Studies**, v. 67, n. 1, p. 28-38, 2005.
- BARTON, H. A.; JURADO, V. What's up down there? Microbial diversity in caves. **Microbe**, v. 2, n. 3, p. 132-138, 2007.
- BARTON, H. A.; NORTHUP, D. E. Geomicrobiology in cave environments: past, current and future perspectives. **Journal of Cave and Karst Studies**, v. 69, n. 1, p. 163-178, 2007.
- BARTON, H. A.; TAYLOR, N. M.; KREATE, M. P.; SPRINGER A. C.; OEHRLE S. A.; BERTO, J. L. The Impact of Host Rock Geochemistry on Bacterial Community Structure in Oligotrophic Cave Environments. **International Journal of Speleology**, v. 36, p. 93-104, 2007.
- CHEEPHAM, N.; SADOWAY, T.; RULE, D.; WATSON, K.; MOOTE, P.; SOLIMAN, L.; AZAD, N.; DONKOR, K.; HORNE, D. Cure from the cave: volcanic cave actinomycetes and their potential in drug discovery. **International Journal of Speleology**, v. 42, n. 1, p. 35-47, 2013.

- CHEN, Y.; WU, L.; BODEN, R.; HILLEBRAND, A.; KUMARESAN, D.; MOUSSARD, H. Life without light: microbial diversity and evidence of sulfur- and ammonium-based chemolithotrophy in Movile cave. **The ISME Journal**, v. 3, p. 1093-1104, 2009.
- CUEZVA, S.; FERNANDEZ-CORTES, A.; PORCA, E.; PAŠIĆ, L.; JURADO, V.; HERNANDEZ-MARINE, M.; SERRANO-ORTIZ, P.; HERMOSIN, B.; CAÑAVÉRAS, J. C.; SANCHEZ-MORAL, S.; SAIZ-JIMENEZ, C. The biogeochemical role of Actinobacteria in Altamira Cave, Spain. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 81, n. 1, p. 281-90, 2012.
- GROTH, I.; VETTERMANN, R.; SCHUETZE, B.; SCHUMANN, P.; SAIZ-JIMENEZ, C. Actinomycetes in Karstic caves of northern Spain (Altamira and Tito Bustillo). **Journal of Microbiological Methods**, v. 36, n. 1-2, p. 115-122, 1999.
- GROTH, I.; SAIZ-JIMENEZ, C. Actinomycetes in Hypogean Environments. **Geomicrobiology Journal**, v. 16, n. 1, p. 1-8, 1999.
- HEUER, H.; KRSEK, M.; BAKER, P.; SMALLA, K. Analysis of Actinomycete Communities by Specific Amplification of Genes Encoding 16S rRNA and Gel-Electrophoretic Separation in Denaturing Gradients. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 8, p. 3233-3241, 1997.
- HOSE, L. D.; PISAROWICZ, J. A. Cueva de Villa Luz, Tabasco, Mexico: Reconnaissance study of an active sulfur spring cave and ecosystem. **Journal of Cave and Karst Studies**, v. 61, p. 13-21, 1999.
- LI, X.; WANG, C.; HUANG, J.; HU, C.; XIE, S. Seasonal variation of fatty acids from drip water in Heshang Cave, central China. **Applied Geochemistry**, v. 26, n. 3, p. 341-347, 2011.
- MUYZER, G.; DE WAAL, E. C.; UITTERLINDEN, A. G.; Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, p. 695-700, 1993.
- MUYZER, G.; SMALLA, K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 73, p. 127-141, 1998.
- NORTHUP, D. E.; LAVOIE, K. H. Geomicrobiology of Caves: A Review. **Geomicrobiology Journal**, v.18, p. 199-222, 2001.
- PORTILLO, M. C.; GONZALEZ, J. M.; SAIZ-JIMENEZ, C. Metabolically active microbial communities of yellow and grey colonizations on the walls of Altamira Cave, Spain. **Journal of Applied Microbiology**, v. 104, n. 3, p. 681-91, 2008.
- PORTILLO, M. C.; GONZALEZ, J. M. Comparing bacterial community fingerprints from white colonizations in Altamira Cave (Spain). **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, p. 1347-1352, 2009a.
- PORTILLO, M. C.; GONZALEZ, J. M. Sulfate-reducing bacteria are common members of bacterial communities in Altamira Cave (Spain). **The Science of the total environment**, v. 407, n. 3, p. 1114-22, 2009b.
- PORTILLO, M. C.; SAIZ-JIMENEZ, C.; GONZALEZ, J. M. Molecular characterization of total and metabolically active bacterial communities of “white colonizations” in the Altamira Cave, Spain. **Research in microbiology**, v. 160, n. 1, p. 41-7, 2009c.

- SCHABEREITER-GURTNER, C.; SAIZ-JIMENEZ, C.; PIÑAR, G.; LUBITZ, W.; RÖLLEKE, S. Phylogenetic 16S rRNA analysis reveals the presence of complex and partly unknown bacterial communities in Tito Bustillo cave, Spain, and on its Palaeolithic paintings. **Environmental microbiology**, v. 4, n. 7, p. 392-400, 2002.
- POULSON, T. L.; WHITE, W. B. The cave environment. **Science**, v. 165, n. 3897, p. 971-981, 1969.
- SAIZ-JIMENEZ, C.; HERMOSIN, B. Thermally assisted hydrolysis and methylation of dissolved organic matter in dripping waters from the Altamira Cave. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v.49, n. 1-2, p. 337-347, 1999.
- SARBU, S. M.; KANE, T. C.; KINKLE, B. K. A chemoautotrophically based cave ecosystem. **Science**, v.272, p. 20-22, 1996.
- WILLIAMS, S. T.; LANNING, S.; WELLINGTON, E. M. H. Ecology of actinomycetes. In: GOODFELLOW, M.; MORDARSKI, M.; WILLIAMS, S. T. (eds). **The biology of the actinomycetes**. London: Academic Press, p. 481-528, 1984.