



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU EM CONSERVAÇÃO E
MANEJO DE RECURSOS NATURAIS – NÍVEL MESTRADO

BRENDA ALMEIDA LIMA

DIVERSIDADE TAXONÔMICA E POTENCIAL ENZIMÁTICO MICROBIANO DE
SOLOS DE CAVERNAS FERRÍFERAS DO PARQUE NACIONAL DOS CAMPOS
FERRUGINOSOS, SERRA DE CARAJÁS-PA, BRASIL

CASCAVEL-PR
2023

BRENDA ALMEIDA LIMA

DIVERSIDADE TAXONÔMICA E POTENCIAL ENZIMÁTICO MICROBIANO DE
SOLOS DE CAVERNAS FERRÍFERAS DO PARQUE NACIONAL DOS CAMPOS
FERRUGINOSOS, SERRA DE CARAJÁS-PA, BRASIL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Conservação e Manejo de Recursos Naturais – Nível Mestrado, do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Conservação e Manejo de Recursos Naturais

Área de Concentração: Ciências Ambientais

Orientador: Prof. Dr^a. Fabiana Gisele da Silva Pinto
(UNIOESTE)

Coorientador: Prof. Dr. José Augusto Pires
Bittencourt (ITV/DS)

CASCAVEL-PR

2023

FOLHA DE APROVAÇÃO

BRENDA ALMEIDA LIMA

DIVERSIDADE TAXONÔMICA E POTENCIAL ENZIMÁTICO MICROBIANO DE SOLOS DE CAVERNAS FERRÍFERAS DO PARQUE NACIONAL DOS CAMPOS FERRUGINOSOS, SERRA DE CARAJÁS-PA, BRASIL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação stricto sensu em Conservação e Manejo de Recursos Naturais-Nível de Mestrado, do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Conservação e Manejo de Recursos Naturais, pela comissão Examinadora composta pelos membros:

Prof. Dr^a. Fabiana Gisele da Silva Pinto

Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE)

Orientadora/ Presidente da Banca EGQ

Prof. Dr. José Augusto Pires Bitencourt

Instituto Tecnológico Vale (ITV/DS)

Coorientador

Prof. Dr^a. Gisele Arruda
Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE)
Examinador interno

Prof. Dr. Rafael Azevedo Baraúna
Universidade Federal do Pará (UFPA)
Examinador externo

Cascavel-PR, 07 de julho de 2023

Local da defesa: Videoconferência pela plataforma Teams.

“Eu queria aproveitar esse momento, para dizer a todas as meninas por aí, que sonham em ter as ciências como profissão, que sigam em frente. É o melhor trabalho do mundo. E se alguém disser para vocês que não conseguem, não escutem.”

Dr^a. Amy Farrah Fowler
The Big Bang Theory

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e o universo pela vida, realizações, força e determinação para conseguir chegar a etapa final deste trabalho.

A minha família, em especial minha mãe Karla Mirella e irmãos (Myllena Almeida, Eryck Almeida e Matheus Rafael), pelo amor incondicional, fé e confiança depositada ao longo da minha vida.

Aos meus avós Herminio Carlos e Zenilda Rodrigues e, por seu infinito amor e bondade e serem o alicerce da nossa família, estando ao nosso lado em todos os momentos, seja fisicamente ou pelas orações.

A família Barbosa Ferreira (Dionel Barbosa, Ivanice Ferreira e Dionel Júnior), pelo apoio incondicional, carinho, incentivo e paciência, estando sempre dispostos a ensinar sobre a vida em sua magnitude e plenitude. O início e conclusão deste trabalho devo a vocês.

A Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), por proporcionar-me o ingresso no Programa de Pós-Graduação em Conservação e Manejo de Recursos Naturais, em especial a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida ao longo do mestrado.

A Assessoria Pedagógica da UNIOESTE, em especial a Dr^a Ana Paula Leonel, Dr^a Elenita Manchope, Dr^a Lucia Ruiz e a psicóloga Jane Angelita, pelo trabalho brilhante e auxílio prestado, principalmente nas etapas finais da dissertação. Obrigado por segurarem a minha mão e caminharmos juntas para a finalização deste ciclo.

Ao orientador Prof. Dr. José Augusto P. Bitencourt, que dedicou muito do seu tempo me orientando, embora tivesse outros interesses a resolver. Obrigado pelos ensinamentos, atenção e dedicação ao longo da realização desta dissertação. Espero um dia ter um terço de sua paciência e sabedoria.

Ao Msc. Rafael Scherer, por todos os ensinamentos nas atividades de campo e na vida. Agradeço por acreditar em meu potencial e trabalho desde a minha graduação e agora no mestrado. Obrigado por sempre exigir o meu melhor para que eu pudesse alavancar a minha trajetória acadêmica e profissional.

Ao Prof. Dr. Luiz Fernandes, pelos auxílios, discussões e fraternas orientações no decorrer da jornada de produção do conhecimento deste trabalho, principalmente no que tange as análises estatísticas.

A Laranna Prestes, pelo incentivo constante desde a finalização da graduação e preparação para o ingresso no programa de mestrado. Agradeço a amizade e puxões de orelha para que a “Menina Unifesspa”, “Menina das Cavernas”, “Mulher bactéria”, conseguisse alcançar voos maiores que vieram e virão.

As minhas amigas que o Paraná me deu, Beatriz Lopes, Giuvania da Silva e Sandra Sales, pelo acolhimento, risadas e força, para que a distância de casa se tornasse mínima. Obrigado por terem sido a minha família.

As minhas melhores amigas Giovanna Araújo e Melissa Cristini, pela amizade, preocupação, risadas, videochamadas e mensagens de apoio para que eu pudesse concluir mais essa etapa da minha vida e que sempre torceram pelas minhas conquistas.

A Ana Leticia Bittencourt e Regianne Kelly, pela bondade, escuta, amizade e acolhimento independentemente da distância geográfica. Obrigado por acreditarem na minha pesquisa e me fazer levantar e continuar caminhando, quando os que diziam ser “bons” tentavam me derrubar. A amizade e lealdade de vocês foram essenciais para que eu pudesse me reerguer nas mais diversas situações, para eu concluir o mestrado.

Aos meus amigos Carleandro Paixão, Marcos Carvalho, Marcus Miranda, Maryanne Normitta, Sinara Albuquerque, Paulo Jesus e Wisa Rios, pelo convívio, companheirismo e apoio demonstrado que ultrapassam as dimensões formativas da vida e também acadêmica.

SUMÁRIO

Introdução	12
Material e Métodos	13
<i>Local de estudo e coleta das amostras</i>	13
<i>Análise física do solo</i>	16
<i>Preparo das amostras</i>	16
<i>Análise Granulométrica e Textural</i>	16
<i>Análise química do solo</i>	17
<i>Determinação de pH em Cloreto de Cálcio (CaCl₂)</i>	17
<i>Determinação de P e K do solo</i>	17
<i>Determinação de teores totais de metais no solo</i>	17
<i>Isolamento, cultivo e conservação dos microrganismos</i>	17
<i>Extração e Sequenciamento de DNA</i>	18
<i>Sequenciamento do gene 16S rDNA</i>	18
<i>Tratamento e Montagem das Sequências</i>	19
<i>Avaliação da atividade enzimática</i>	19
<i>Produção de celulase (CMC)</i>	19
<i>Produção de lipase</i>	19
<i>Produção de protease</i>	19
<i>Produção de urease</i>	20
<i>Solubilização de fosfato (NBRIP)</i>	20
<i>Solubilização de potássio (K)</i>	20
<i>Determinação da atividade enzimática</i>	20
<i>Análises Estatísticas</i>	20
Resultados e Discussão	21
<i>Análise granulométrica e textural</i>	21
<i>Determinação de metais pesados nos solos</i>	25
<i>Composição taxonômica baseada no gene 16S rDNA da comunidade bacteriana de cavernas ferríferas</i>	31
<i>Perfis enzimáticos dos isolados</i>	40
Conclusão	50
Referências	51
ANEXO A- Instrução para submissão na Revista Subterranean Biology	70

RESUMO

As cavernas hospedadas em minério de ferro são habitats únicos e extremos, que abrigam uma grande diversidade de microrganismos ainda pouco conhecida. Assim, estudos sobre a diversidade taxonômica, funcional e potencial biotecnológico são de suma importância para ampliar os conhecimentos sobre a microbiota associada às cavernas ferríferas de Carajás. O objetivo deste estudo foi prospectar a microbiota cultivável a fim de identificar a diversidade microbiana e o potencial enzimático associado as cepas bacterianas e caracterizar os solos quanto aos aspectos físicos e químicos de cavernas ferríferas do Parque Nacional dos Campos Ferruginosos, no estado do Pará, Brasil. Foram coletadas amostras de solos da camada superficial das cavernas GEM-1423 e GEM-1462 em três pontos nas diferentes zonas (fótica, penumbra e afótica). Os solos amostrados foram caracterizados quanto a estrutura granular e textural. A determinação de teores totais de metais foi realizada por digestão nitro-perclórica e quantificados em espectrometria de absorção atômica. Para a seleção das bactérias alvo, subamostras foram diluídas em solução de cloreto de sódio estéril e incubada em agitador orbital *overnight* por 24 horas. Após o período de incubação, as soluções foram diluídas de 10^{-2} a 10^{-3} e inoculadas na superfície do meio Luria Bertani (LB). Para a identificação dos isolados bacterianos foi extraído o DNA e sequenciado o gene 16S rDNA com a plataforma Illumina. A análise funcional dos isolados foi avaliada pelas atividades celulolítica, lipolítica, proteolítica, ureolítica, solubilização de fosfato e potássio. Todas as análises foram realizadas em triplicata e analisadas estatisticamente pelo software R. Os metais quantificados apresentaram significância nas cavernas e afetam a atividade enzimática correlacionados com os principais gêneros abundantes identificados. Foram isoladas 29 cepas bacterianas, sendo 18 bactérias da caverna GEM-1423 e 11 bactérias da caverna GEM-1462. Os principais filos identificados foram *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Planctomycetes* e *Acidobacteria*. Os diferentes domínios de gêneros associados aos principais filos, destacaram *Bacillus*, *Blastopirellula*, *Lactobacillus*, *Serratia* e um táxon não cultivável como os mais abundantes nas cepas bacterianas isoladas. Todas as bactérias apresentaram atividade enzimática para duas a cinco fontes de carbono testadas e os índices enzimáticos produzidos foram significativos. Os resultados deste estudo serão úteis para o plano de manejo do Parque Nacional dos Campos Ferruginosos, visando contribuir para a conservação das cavernas ferríferas de Carajás, e principalmente para a elucidação da sistemática das comunidades bacterianas e futuras aplicações biotecnológicas.

Palavras-chaves: Cavernas ferríferas, Solos, Diversidade microbiana, Potencial biotecnológico, Enzimas, Teores Totais de Metais

ABSTRACT

The caves hosted in iron ore are unique and extreme habitats, which are home to a great diversity of microorganisms that are still little known. Thus, studies on the taxonomic, functional diversity and biotechnological potential are of paramount importance to expand knowledge about the microbiota associated with the iron caves of Carajás. The objective of this study was to prospect the cultivable microbiota in order to identify the microbial diversity and the enzymatic potential associated with the bacterial strains and to characterize the soils regarding the physical and chemical aspects of iron caves in the Parque Nacional dos Campos Ferruginosos, in the state of Pará, Brazil. Soil samples were collected from the surface layer of caves GEM-1423 and GEM-1462 at three points in different zones (photic, penumbra and aphotic). The sampled soils were characterized in terms of granular and textural structure. The determination of total metal contents was performed by nitro-perchloric digestion and quantified in atomic absorption spectrometry. For selection of target bacteria, subsamples were diluted in sterile sodium chloride solution and incubated in an orbital shaker overnight for 24 hours. After the incubation period, the solutions were diluted from 10^{-2} to 10^{-3} and inoculated on the surface of the Luria Bertani medium (LB). For the identification of bacterial isolates, DNA was extracted and the 16S rDNA gene was sequenced using the Illumina platform. The functional analysis of the isolates was evaluated by cellulolytic, lipolytic, proteolytic, ureolytic activities, phosphate and potassium solubilization. All analyzes were performed in triplicate and statistically analyzed using the R software. The quantified metals were significant in the caves and affect enzymatic activity correlated with the main identified abundant genera. 29 bacterial strains were isolated, 18 bacteria from GEM-1423 cave and 11 bacteria from GEM-1462 cave. The main phyla identified were *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Planctomycetes* and *Acidobacteria*. The different domains of genera associated with the main phyla highlighted *Bacillus*, *Blastopirellula*, *Lactobacillus*, *Serratia* and a non-cultivable taxon as the most abundant in isolated bacterial strains. All bacteria showed enzymatic activity for two to five carbon sources tested and the enzymatic indices produced were significant. The results of this study will be useful for the management plan of the Campos Ferruginosos National Park, aiming to contribute to the conservation of the Carajás iron caves, and mainly to elucidate the systematics of bacterial communities and future biotechnological applications.

Keywords: Iron caves, Soils, Microbial diversity, Biotechnological potential, Enzymes, Total metal contents

CAPÍTULO 1: Subterranean Biology

Diversidade taxonômica e potencial enzimático microbiano de solos de cavernas ferríferas do Parque Nacional dos Campos Ferruginosos, Serra de Carajás-PA, Brasil

Brenda Almeida Lima^{1,2}, Rafael dos Santos Scherer², José Augusto Pires Bitencourt³, Luiz Fernandes Silva Dionisio⁴, Aline Snak⁵, Affonso Celso Gonçalves Jr.^{1,5}, Fabiana Gisele da Silva Pinto¹

1 Laboratório de Microbiologia e Biotecnologia, LAMIBI, Programa de Pós-Graduação em Conservação e Manejo de Recursos Naturais, Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), Rua Universitária 1619, Universitário, Cascavel-Paraná, Brasil

2 Grupo Espeleológico de Marabá, GEM, Marabá-Pará, Brasil

3 Instituto Tecnológico Vale (ITV), Rua Boa Ventura da Silva 955, Nazaré, Belém-Pará, Brasil

4 Fundação Amazônia de Amparo a Estudos e Pesquisa (FAPESPA), Avenida Gentil Bitencourt 1868, São Brás, Belém-Pará, Brasil

5 Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Energia na Agricultura, Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), Rua Universitária 1619, Universitário, Cascavel-Paraná, Brasil

Corresponding author: Brenda Almeida Lima (brenda.almlima@gmail.com)

Resumo

As cavernas hospedadas em minério de ferro são habitats únicos e extremos, que abrigam uma grande diversidade de microrganismos ainda pouco conhecida. Assim, estudos sobre a diversidade taxonômica, funcional e potencial biotecnológico são de suma importância para ampliar os conhecimentos sobre a microbiota associada às cavernas ferríferas de Carajás. O objetivo deste estudo foi prospectar a microbiota cultivável a fim de identificar a diversidade microbiana e o potencial enzimático associado as cepas bacterianas e caracterizar os solos quanto aos aspectos físicos e químicos de cavernas ferríferas do Parque Nacional dos Campos Ferruginosos, no estado do Pará, Brasil. Foram coletadas amostras de solos da camada superficial das cavernas GEM-1423 e GEM-1462 em três pontos nas diferentes zonas (fótica, penumbra e afótica). Os solos amostrados foram caracterizados quanto a estrutura granular e textural. A determinação de teores totais de metais foi realizada por digestão nitro-perclórica e quantificados em espectrometria de absorção atômica. Para a seleção das bactérias alvo, subamostras foram diluídas em solução de cloreto de sódio estéril e incubada em agitador orbital overnight por 24 horas. Após o período de incubação, as soluções foram diluídas de 10^{-2} a 10^{-3} e inoculadas na superfície do meio Luria Bertani (LB). Para a identificação dos isolados bacterianos foi extraído o DNA e sequenciado o gene 16S rDNA com a plataforma Illumina. A análise funcional dos isolados foi avaliada pelas atividades celulolítica, lipolítica, proteolítica, ureolítica, solubilização de fosfato e potássio. Todas as análises foram realizadas em triplicata e analisadas estatisticamente pelo software R. Os metais quantificados apresentaram significância nas cavernas e afetam a atividade enzimática correlacionados com os principais gêneros abundantes identificados. Foram isoladas 29 cepas bacterianas, sendo 18 bactérias da caverna GEM-1423 e 11 bactérias da caverna GEM-1462. Os principais filos identificados foram *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Plactomycetes* e *Acidobacteria*. Os diferentes domínios de gêneros associados aos principais filos, destacaram *Bacillus*, *Blastopirellula*, *Lactobacillus*, *Serratia* e um táxon não cultivável como os mais abundantes nas cepas bacterianas isoladas. Todas as bactérias apresentaram atividade enzimática para duas a cinco fontes de carbono testadas e os índices enzimáticos produzidos foram significativos. Os resultados deste estudo serão úteis para o plano de manejo do Parque Nacional dos Campos Ferruginosos, visando contribuir para a conservação das cavernas ferríferas de Carajás, e principalmente para a elucidação da sistemática das comunidades bacterianas e futuras aplicações biotecnológicas.

Palavras-chave: Cavernas ferríferas, Solos, Diversidade microbiana, Potencial biotecnológico, Enzimas, Teores Totais de Metais

Introdução

As cavidades naturais subterrâneas diferenciam-se substancialmente dos ambientes de superfície por apresentar características únicas como ausência de luz, matéria orgânica escassa ou irregular (Gabriel e Northup 2013), menor variação de temperatura, maior umidade (Castaño-Sánchez et al. 2020), oligotrofia, altas concentrações de mineiras e metais (Kosznik-Kwaśnicka et al. 2022). É notável a importância ecológica das cavidades subterrâneas, pois podem ser verdadeiros *hotspots* de nutrientes (nitrogênio, fósforo e enxofre) oriundos do guano dos morcegos e da entrada e saída da matéria orgânica (Schaefer et al. 2016). O acúmulo desses nutrientes em algumas partes das cavernas torna-se nichos ecológicos altamente especializados, principalmente para os microrganismos (Barton 2006).

Estudos baseados em métodos dependentes e independentes de cultivo microbiano têm contribuído para a compreensão da abundância, distribuição e origem do habitat, bem como das fontes de fluidos formacionais epigênicos e/ou hipogênicos em ambientes cavernícolas (Engel 2015). Para superar as limitações dos métodos dependentes de cultivo o *metabarcoding* tem sido empregado para pesquisar microrganismos de cavernas (Pflender et al. 2018; Thompson et al. 2019; West et al. 2020; Burboyme et al. 2021; Haidau et al. 2022; Alaoui-Sosse et al. 2023).

A diversidade de grupos microbianos cavernícolas, tais como *Proteobacteria* em processos de biomineralização (D'Angeli et al. 2019); *Chloroflexi*, *Shewanella* e *Geobacter* na redução de Fe (III) em Fe (II) em caverna de formação ferrífera bandada (Parker et al. 2022); *Planctomycetes* oxidando amônia anaerobicamente (Tomczyk-Żak e Zielenkiewicz 2016); *Firmicutes* com capacidade de redução de sulfato, nitrato, ferro, manganês e atividades antimicrobianas (Engel 2019); *Actinobacteria* na produção de enzimas (Riquelme et al. 2017) e *Acidobacteria* no metabolismo de carboidratos (Kielak et al. 2016), demonstram uma grande variabilidade de perfis metabólicos microbianos no ambiente subterrâneo.

A bioprospecção de microrganismos cavernícolas com potencial biotecnológico, a partir de produtos metabólicos secundários, como as enzimas, pode ser útil em diferentes tipos de aplicações, como na indústria farmacêutica (Silva et al. 2021) e alimentícia (Sani e Krishnaraj 2017). Diferentes enzimas hidrolíticas produzidas por microrganismos cavernícolas foram descobertas, como celulasas (EC 3.2.1.4), proteases (EC 3.4) (Lima et al., 2023), lipases (EC 3.1.1.3) (Tomova et al. 2013) e ureases (EC 3.5.1.5) (Omoregie et al. 2016). A produção de extremozimas obtidas de microrganismos extremófilos, como os de cavernas, é um rico nicho a ser explorado por possuir diversos papéis ecológicos no ambiente e na sucessão (Cavichioli et al. 2011), devido as dependências interespecíficas para ciclagem de nutrientes (Reboleira et al., 2022) e a combinação de uma gama de parâmetros físicos como temperatura, pH, salinidade, estresse oxidativo, produtos químicos como ácido sulfídrico (H₂S), metano (CH₄) e metais (Fe, Cu, Zn, Cd e Pb) (Dalmaso et al. 2015).

Deste modo, os estudos baseados em 16S rDNA, é uma abordagem compacta para explorar a visão geral da impressão digital metabólica da comunidade microbiana cavernícola ferrífera, podendo revelar microrganismos de interesse biotecnológico, como as enzimas (Koning et al. 2022; Lima et al. 2023) que podem refletir a intensidade e a direção de vários processos bioquímicos no microbioma do solo, para avaliação das demandas microbianas por nutrientes e expressar a resposta e mudança do ecossistema cavernícola, principalmente para tolerar o estresse a metais em diferentes concentrações (Hamedi et al. 2019), uma vez que a presença desses metais é um fator ambiental crítico que determina a estrutura e função das comunidades microbianas (Hemme et al. 2010), como nas cavernas ferríferas (Parker et al. 2022).

O objetivo deste estudo foi realizar a prospecção da microbiota cultivável, identificar a diversidade microbiana, a fim de avaliar o potencial enzimático e caracterizar os solos quanto aos aspectos físicos e químicos de cavernas ferríferas do Parque Nacional dos Campos Ferruginosos, no estado do Pará, Brasil.

Material e Métodos

Local de estudo e coleta das amostras

O estudo foi realizado no Parque Nacional dos Campos Ferruginosos, no município de Canaã dos Carajás, localizado na região sudeste do Estado do Pará, no platô da Serra da Bocaina (Figura 1).

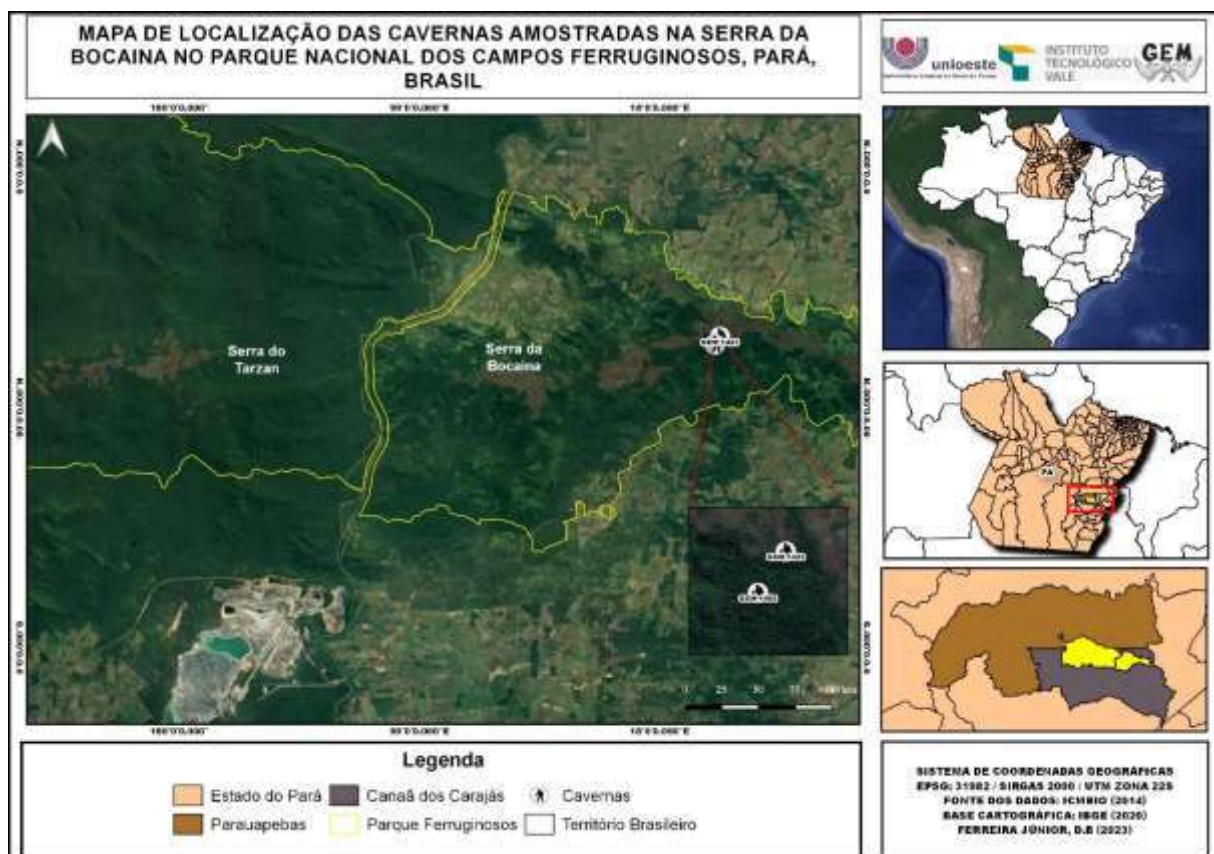


Figura 1. Mapa de localização das cavernas GEM-1423 e GEM-1462 na Serra da Bocaina no Parque Nacional dos Campos Ferruginosos, Pará, Brasil

Fonte: Ferreira Júnior, D.B, 2023

Com base em dados secundários do Relatório de Diagnóstico e Análise de Relevância de 235 cavernas da Serra da Bocaina, Canaã dos Carajás (PA) (Piló et al. 2014), selecionou-se duas cavernas de relevância máxima, de litologia jaspilito/canga GEM-1423 ($6^{\circ}18'49.27''S$, $49^{\circ}53'35.06''O$) e jaspilito GEM-1462 ($6^{\circ}18'59.18''S$, $49^{\circ}53'41.71''O$), além disso foi considerado as características de morfologia, hidrologia e substratos orgânicos (matéria orgânica, solo e guano), informações estas indicadas no mapa topográfico (Figura 2 e 3), ficha geoespeleologia e bioespeleologia coletadas em campo.

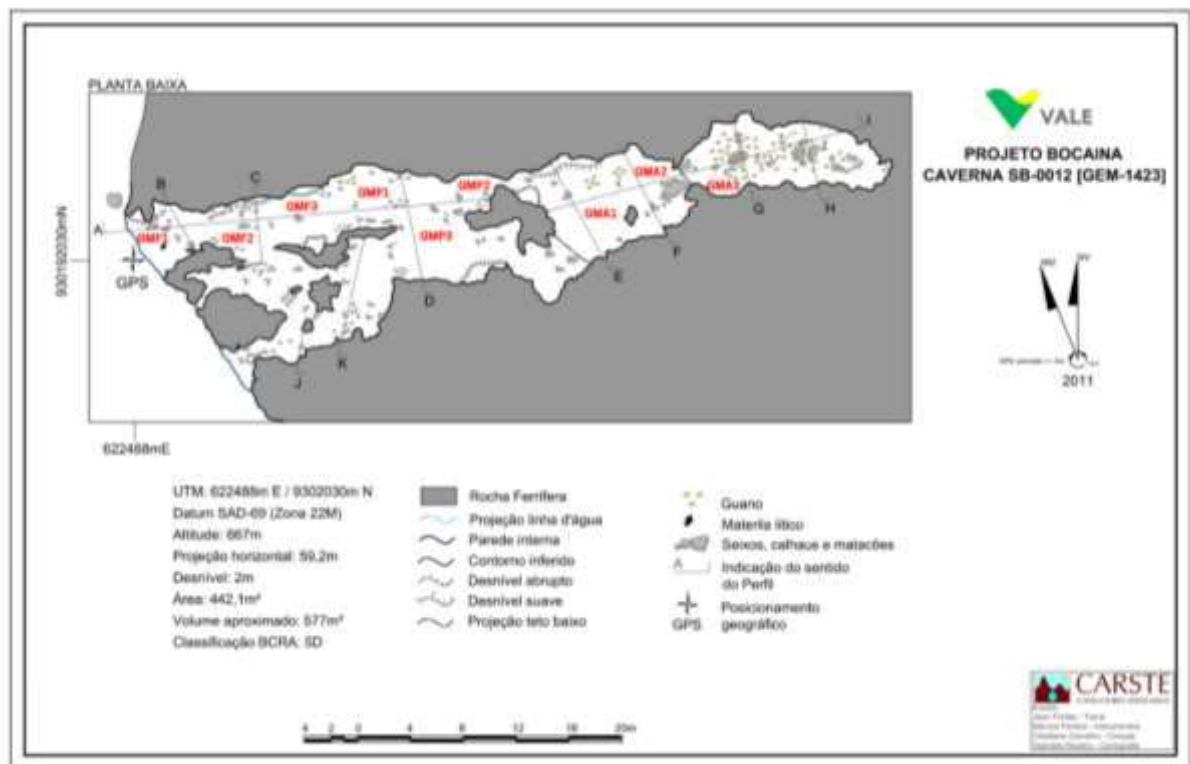


Figura 2. Mapa topográfico da caverna GEM-1423 e respectivos pontos de coleta no período seco

Fonte: Vale S.A, adaptado (2023)

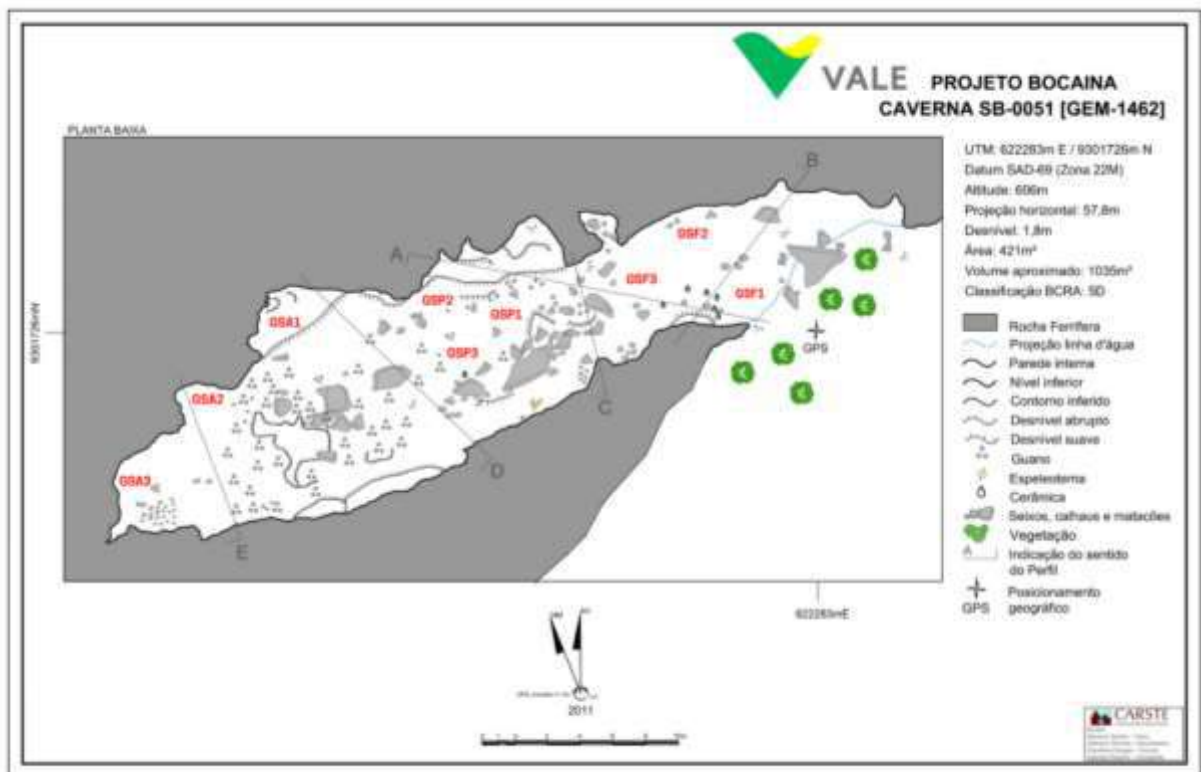


Figura 3. Mapa topográfico da caverna GEM-1462 e pontos de coleta do período seco
Fonte: Vale S.A, adaptado (2023)

A amostragem ocorreu sob a licença do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO) nº 79255-1 e SISGEN nº A13D56A. Os exemplares da amostragem na estação seca, foram obtidos na camada superficial da caverna, nos primeiros 10 cm. A caverna foi classificada em zonas, de acordo com Trajano e Bichuette (2006), sendo amostrado 100 g de solo de três pontos em cada zona, ou seja, na zona fótica (presença de luz), penumbra (luminosidade parcial) e afótica (ausência de luz), totalizando 9 pontos de amostragem para cada caverna. As amostras foram acondicionadas em sacos plásticos estéreis (ziplock) (Figura 4) e tubos falcon estéreis de 50 mL, com o auxílio da pá de jardinagem estéril, sendo limpa a cada coleta com álcool 70%, identificadas com o nome/número da caverna, número do exemplar, data da amostragem e nome do responsável, e armazenadas em caixa térmica a 4°C para posterior análise.



Figura 4. Amostragem de solos na caverna GEM-1423 e GEM-1462
Fonte: Scherer, R.S. 2022

Análise física do solo

Preparo das amostras

As amostras foram colocadas sobre folha de papel em um tabuleiro e destorroadas manualmente utilizando um rolo de madeira e peneiradas com malha de 2mm. Posteriormente, as amostras de terra fina seca ao ar (TFSA) foram secas em estufa com circulação de ar forçada, à temperatura de 40°C, e acondicionadas em recipiente apropriado e devidamente identificado (Embrapa 2017).

Análise Granulométrica e Textural

Para este ensaio foi utilizado o método da pipeta por dispersão total utilizando como a gente dispersante o hidróxido de sódio (NaOH) por 12 horas antes da agitação. Para cada ensaio foram utilizados 20 g de TSFA, 10 ml de dispersante químico NaOH a 1 mol/L e 100 mL de água destilada. A dispersão mecânica ocorreu via agitação com duração de cinco minutos em um dispersor mecânico com agitador orbital.

As amostras foram colocadas em uma mesa agitadora orbital a 50 rpm por um período de 16 horas. Posteriormente, o material agitado foi transferido para uma proveta de 1000 mL utilizando-se água e peneira de malha 0,053 mm. O material retido, correspondente a fração areia, foi transferido para a estufa para secagem a uma temperatura de 105 °C por 24 horas. Para determinação da fração argila, agitou-se manualmente por 1 minuto a solução e retirou-se com ajuda da pipeta 50 ml da suspensão retida na proveta. A fração de silte foi determinada pela diferença pelo método da pipeta.

Análise química do solo

Determinação de pH em Cloreto de Cálcio (CaCl₂)

Para a determinação do pH em CaCl₂ 10 mmol L⁻¹, foi utilizada a relação solo:solução de 1:2,5, efetuando-se a leitura na suspensão (Embrapa 2017).

Determinação de P e K do solo

A solução extratora de Mehlich1 de HCl 0,05 mol/L e H₂SO₄ 0,0125 mol/L, foi empregada para extrair P e K, a partir da solubilização desses elementos pelo efeito de pH, entre 2 e 3. Para extração do P, foram pipetados 25ml do extrato de solo e armazenados em tubo falcon. Posteriormente, foram retirados 5ml desse extrato e colocado em erlenmeyer de 125ml. Adicionou-se 10ml de solução ácida de molibdato de amônio diluída, e adicionado ± 30mg de ácido ascórbico em pó. As amostras foram colocadas em agitador horizontal circular durante um a dois minutos até o desenvolvimento da cor durante uma hora. Após esse período, foi realizado a leitura da densidade ótica no fotocolorímetro, utilizando filtro vermelho, comprimento de onda de 660nm (Embrapa 2017).

Determinação de teores totais de metais no solo

A determinação de teores totais foi realizada através da digestão nitro-perclórica e HNO₃/HClO₄, na proporção de 3:1 (AOAC 2015). Transferiu-se 500 mg de cada amostra para um tubo digestor de 125 ml. Adicionou-se 8 mL da mistura ácida, mantendo a frio por período de 3 a 4 h e colocadas no bloco digestor. Posteriormente, as amostras foram aquecidas lentamente até 120° C, mantendo até finalizar o desprendimento do dióxido de nitrogênio (NO₂), em seguida aumentou-se a temperatura para 200° C, sendo está mantida até concluir o desprendimento do vapor de ácido perclórico HClO₄ durante 3 a 4 horas no bloco digestor. Após esse período, as amostras foram esfriadas e adicionadas 25 mL de água destilada. Os metais foram determinados em espectrofotometria de absorção atômica (EEA) (Embrapa 2017; Meneghetti 2018).

Isolamento, cultivo e conservação dos microrganismos

As amostras de solo foram peneiradas assepticamente, homogeneizadas e retiradas subamostras (10 g) e enriquecidas em frascos de vidro contendo 90 mL de meio salino mineral (MSM), com 0,81g de NaCl em 90 mL de água destilada estéril. As amostras foram incubadas em agitador orbital (150 rpm) a 28°C, por 24 horas. Após esse período, foram realizadas diluições seriadas, sendo retiradas alíquotas de 100 µL das diluições de 10⁻² a 10⁻³ e semeadas na superfície do meio Luria Bertani (LB), com o auxílio da alça de Drigalski. As placas foram incubadas a 28°C no período de 24 a 72

horas. As linhagens microbianas isoladas foram criopreservadas a -80°C e meio Ágar Estoque.

Extração e Sequenciamento de DNA

A extração de DNA foi realizada a partir de 0,25 g de solo, utilizando o kit de extração de DNA QIAGEN PowerSoil® DNA Isolation Kit (QIAGEN, Hilden, German), seguindo as instruções do fabricante. A concentração de DNA foi verificada por fluorimetria, através do Qubit® 3.0 (Thermo Fisher Scientific). A qualidade foi verificada através de eletroforese em gel de agarose a 1% (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific Inc.).

Sequenciamento do gene 16S rDNA

A construção das bibliotecas foi realizada utilizando o protocolo 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation da Illumina (Illumina, San Diego, CA, USA). Para analisar a composição taxonômica das comunidades microbianas, as regiões V3 e V4 do gene ribossomal 16S foram amplificadas através da reação em cadeia da polimerase (PCR). Utilizou-se o par de iniciadores universais (*primers*): S-D-Bact-0341-b-S-17-N (5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG-3') e S-D-Bact-0785-a-A-21-N (5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATC-3') (Klindworth et al. 2013). Este par de *primers* contém sequências nucleotídicas chamadas *overhang*, que permitem a adição dos *indexes* nas etapas posteriores.

Cada reação de PCR obteve o volume final de 25µL, contendo: 2,5 µL de DNA (5 ng/µL); 5 µL do *primer* forward (0,1 µM); 5 µL do *primer* reverse (0,1 µM); 12,5 µL de 2x KAPA HiFi HotStart. As reações de amplificação foram realizadas em termociclador com uma etapa de desnaturação inicial de 95°C por 3 minutos, seguida por 25 ciclos de 95°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos, e uma extensão final de 72°C por 5 minutos. Em seguida, foi realizada a quantificação do DNA através de fluorimetria, utilizando o Kit de quantificação de DNA Qubit™ dsDNA HS (High Sensitivity) Assay (Thermo Fisher Scientific) e fluorímetro Qubit® 3.0 (Thermo Fisher Scientific).

A qualidade dos *amplicons* foi verificada quanto ao tamanho dos fragmentos, por meio de eletroforese capilar, utilizando o Bioanalyzer Agilent Technology 2100 (Panaro et al. 2000). Em seguida, os *amplicons* foram purificados utilizando o kit de esferas magnéticas Agencourt AMPure XP (Bechman Coulter, Inc., Brea, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Em seguida, adaptadores de sequências únicas (*indexes/barcodes*) foram adicionados a cada amostra através da etapa de PCR Index utilizando os *indexes* do Kit de preparação de Biblioteca Nextera XT (Illumina, San Diego, CA, USA). Logo após, a biblioteca foi novamente purificada utilizando o kit Agencourt AMPure XP e quantificada por fluorimetria, através do Qubit® 3.0 (Thermo Fisher Scientific). Posteriormente, a biblioteca foi padronizada para concentração de 2nM e o *pool* genômico e preparado de acordo com o protocolo 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation da Illumina (Illumina, San Diego, CA, USA).

Tratamento e Montagem das Sequências

A corrida de sequenciamento foi realizada na plataforma MiSeq da Illumina utilizando o kit de corrida MiSeq V3 600 ciclos. Para identificação das assinaturas moleculares das comunidades bacterianas pertencente às cavidades ferríferas, as sequências brutas serão submetidas a um *pipeline* interno para análise de dados de *metabarcoding*, que permite a personalização do banco de dados de referência para etapa de classificação taxonômica. Este *pipeline* foi desenvolvido pelo grupo de bioinformática do ITV (Oliveira et al. 2021) e tem como base o *pipeline* QIIME (*Quantitative Insights Into Microbial Ecology*) (Caporaso et al. 2010). Primeiramente, realizou-se a etapa de trimagem e filtragem por qualidade (Phred >20) utilizando Prinseq (Schmieder e Edwards 2011). As sequências *forward* e *reverse* foram montadas através do montador Pear (Zhang et al. 2014). Após a montagem, ocorreu a etapa de desreplicação na qual foram removidas todas as duplicatas, em seguida ocorreu um processo que permite a uma contagem de abundância das sequências (considerando pelo menos duas). Com intuito de melhorar a qualidade do metagenoma, todas as sequências menores que 100 pb foram filtradas. Em seguida, as sequências com similaridade >97% foram agrupadas em Unidades Taxonômicas Operacionais (UTO) utilizando o USEARCH 7 (<https://www.drive5.com/usearch/>). A taxonomia das UTOs foi realizada através da comparação com sequências disponíveis no banco de dados públicos SILVA (Quast et al. 2017).

Avaliação da atividade enzimática

Os isolados foram testados quanto às suas capacidades em produzir carboximetilcelulase, lipase, protease, urease e solubilização de fosfato (P) e potássio (K) em meios de cultura sólidos. Para isso, as colônias purificadas dos diferentes isolados e inoculadas em triplicata no centro das placas de Petri. Para detecção das atividades enzimáticas, os microrganismos isolados foram incubados a 28 °C e 30° C de 24 a 120 h, sendo o pH reajustado de acordo com a especificidade do meio.

Produção de celulase (CMC)

A produção de celulase foi avaliada utilizando o meio (g/L) contendo 10 de peptona, 10 de carboximetilcelulose (CMC), 2 de K₂HPO₄, 15 de ágar, 0,3 de MgSO₄.7H₂O, 2,5 (NH₄)₂SO₄ em pH 7 por 72 horas de incubação a 30°C (Irfan et al. 2012, modificado). Após o período de incubação foi aplicado solução reveladora de Iodeto de Potássio (KI) a 10% para observação dos halos de degradação.

Produção de lipase

Para avaliação da atividade lipolítica, foi realizado o ensaio com Polissorbato (Tween) 80, em placas de ágar contendo 10 g de peptona; 5 g de NaCl; 0,1 g de KCl; 15 de ágar, Tween 80 a 20% em 50mL; 950 mL de água destilada e incubado a 28° C por 120 h dias (Corbellini et al. 2007, modificado). A atividade enzimática foi verificada pelo indicador ácido-básico da solução vermelho de fenol a 2%.

Produção de protease

A atividade proteolítica foi verificada em meio sólido (g/L) contendo 10,0 Triptona, 5,0 Peptona, 3,0 (NH₄)₂SO₄, 2,0 K₂HPO₄, 0,2 MgSO₄, 1,0 Caseína, 15,0 ágar pH 7,0 e incubados a 28 °C durante 72 h (Luang-In et al. 2019, modificado). Após o período de

incubação, foi aplicado solução reveladora de HCl a 3,8%, a fim de verificar os halos de degradação.

Produção de urease

A hidrólise da ureia como fonte de nitrogênio foi avaliada no seguinte meio sólido (g L⁻¹ de água estéril): glicose, 20; ureia, 1,3; MgSO₄.7H₂O, 0,5; CaCl₂, 0,3; ágar, 15 e vermelho fenol, 0,12, pH 6,8 (Ghasemi et al. 2004). Os isolados foram incubados a 28° C por 24 h. A degradação da ureia foi indicada pela mudança colorimétrica do meio ácido-base de vermelho para amarelo.

Solubilização de fosfato (NBRIP)

Para o ensaio de solubilização de fosfato, o meio de cultura de fosfato do National Botanical Research Institute (NBRIP) foi utilizado continha (g/L): 10 g de glicose, 5g de Ca₃(PO₄)₂; 5 g MgCl₂.6H₂O; 0,25 g de MgSO₄.7H₂O; 0,2 g de KCl e 0,1 g de (NH₄)₂SO₄ em pH 7,0. As placas foram inoculadas e incubadas a 28° C por 120 h (Nautiyal 1999, modificado). A formação de halo após incubação dos microrganismos no meio cultura indicou habilidade em solubilizar fosfato.

Solubilização de potássio (K)

O meio de cultivo utilizado nos ensaios de potencial de solubilização de K foi o meio de Aleksandrov (g/L) composto por 5 g de glicose; 2 g de extrato de levedura; 0,005 MgSO₄; 0,08 g de FeCl₃; 2 g de CaCO₃; 15 g ágar 15 g; 1,6 g de KCl como única fonte de potássio, e indicador de Azul de Bromotimol 0,025% 5 mL em pH 7,0 (Hu et al. 2006, modificado). As placas de petri inoculadas foram incubadas a 30°C por 120 h e depois observado os halos de degradação indicando a capacidade dos microrganismos em solubilizar K.

Determinação da atividade enzimática

A determinação da atividade enzimática (Pz) foi constituída pela atividade (Pz) de cada isolado, decorrida da razão entre o diâmetro da colônia (dc) e o diâmetro da colônia mais a área de precipitação (dcp), ou seja, o diâmetro de crescimento microbiano mais a área do halo de degradação, sendo estas medidas coletadas em milímetros (mm) com o auxílio de um paquímetro. Todas as atividades foram avaliadas em triplicata, sendo obtido e realizado os seguintes cálculos de acordo com a Equação 1, onde Pz é a média das triplicatas, e os resultados foram classificados em classes, como negativos (Pz = 1, classe 1), positivos (0,64 = Pz < 1, classe 2) e fortemente positivos (Pz < 0,64, classe 3) (Cuzzi et al. 2011).

$$Pz = \frac{dc}{dp}$$

Equação 1. Determinação da média das triplicatas do crescimento microbiano e halo de degradação enzimático

Análises Estatísticas

Os índices de diversidade microbiana foram gerados a partir do pacote Vegan. A tabela de abundância de OTUs e de taxonomia utilizou-se os pacotes Phyloseq, ggplot2, microbiome, vegan, MicrobiomeSeq (Mcmurdie e Holmes 2013; Wickham

2016). A diversidade alfa da comunidade microbiana foi analisada pelo Índice de Shannon, a riqueza pelo Índice de Chao1 e a estrutura pelo Índice de Simpson. Em seguida foram aplicados uma análise de variância (ANOVA), adotando $p < 0,05$ como significativo. Posteriormente, aplicou-se o teste de Tukey, para verificar se houve diferenças significativas entres os índices avaliados.

Para a análise de redundância (RDA) foram englobados todos os dados amostrados e utilizou-se ANOVA, a fim de verificar a significância dos dados ambientais (parâmetros físicos da caverna, análise físico-química de solos e índices enzimáticos) com os 5 gêneros bacterianos mais abundantes identificados (Whang et al. 2022, modificado).

Para detectar o compartilhamento de táxons a nível de gênero, entre as cavernas nas diferentes zonas, utilizou-se os pacotes ggplot2 e MicrobiomeSeq para a construção do digrama de Venn (Heberle et al. 2015; Mulec et al. 2021).

A análise de mapa de calor utilizou a abundância relativa dos 5 principais gêneros e correlacionado com os parâmetros físicos, análise físico-química de solos e índice enzimático dos isolados bacterianos entre as cavernas amostradas e as respectivas significâncias (Biagioli et al. 2023, modificado).

Na avaliação dos índices enzimáticos (IE) e índice de solubilização (IS), os testes foram realizados em triplicata. A normalidade dos dados foi verificada utilizando o teste Shapiro-Wilk. Os dados foram submetidos à ANOVA de um fator e teste de Tukey. As atividades enzimáticas de todos os isolados bacterianos das cavernas, foram comparados pelo teste de Scott-Knott a nível de significância de $p < 0,05$ a fim de agrupar a partir das médias dos IE e IS dos isolados das cavernas (Alves-Júnior et al. 2021, modificado). Todas as análises foram realizadas usando o software estatístico RStudio v 4.2.2 (2022).

Resultados e Discussão

Análise granulométrica e textural

As análises granulométricas demonstraram uma maior participação da fração areia em todas as amostras das diferentes zonas nas cavernas GEM-1423 e GEM-1462. Destacando-se os valores aproximados de areia 63,3 e 65% nas amostras de solos da zona de entrada (fótica) das duas cavernas, é o maior valor em 82,6% na zona afótica da GEM-1462 (Figura 5). A textura da zona de entrada das duas cavernas analisadas são franco arenosa, destacando a zona afótica da caverna GEM-1462 caracterizada como areia franca (Figura 6).

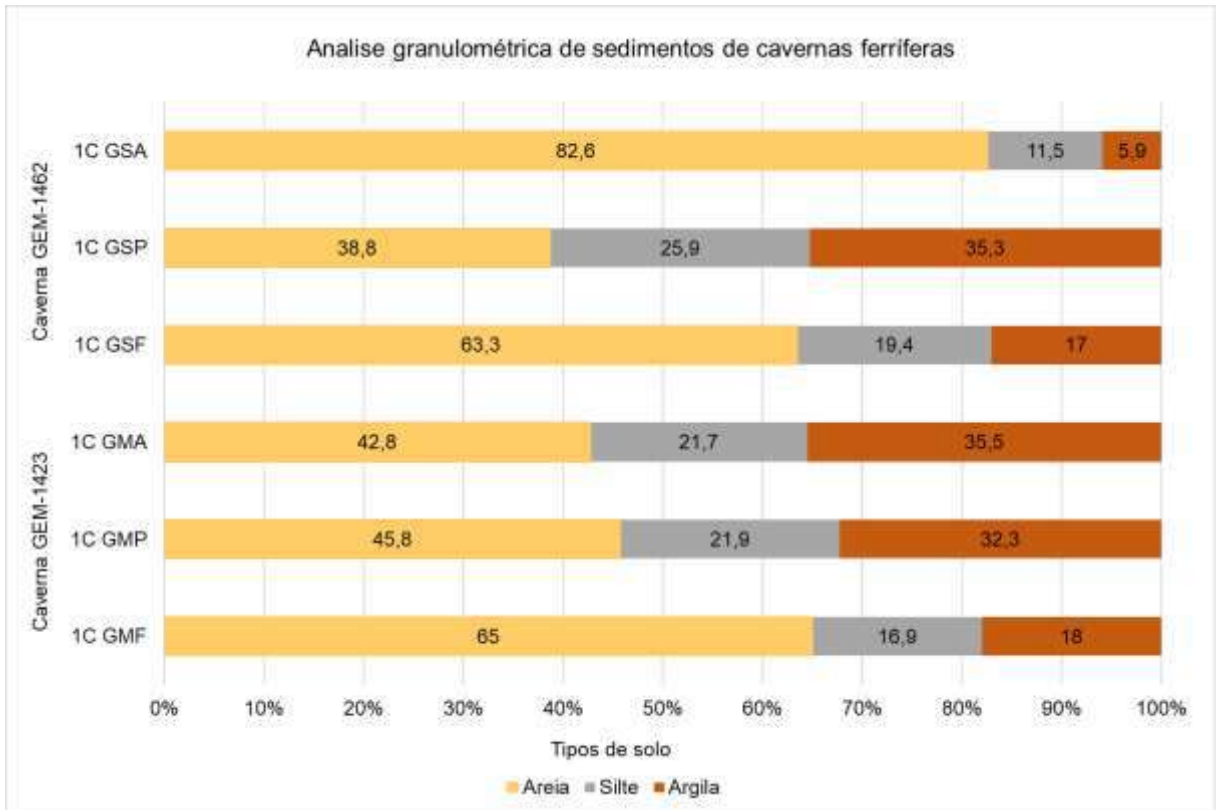


Figura 5. Mineralogia de frações de areia, silte e argila de amostras de sedimentos da zona fótica penumbra e afótica das cavernas GEM-1423 e GEM-1462

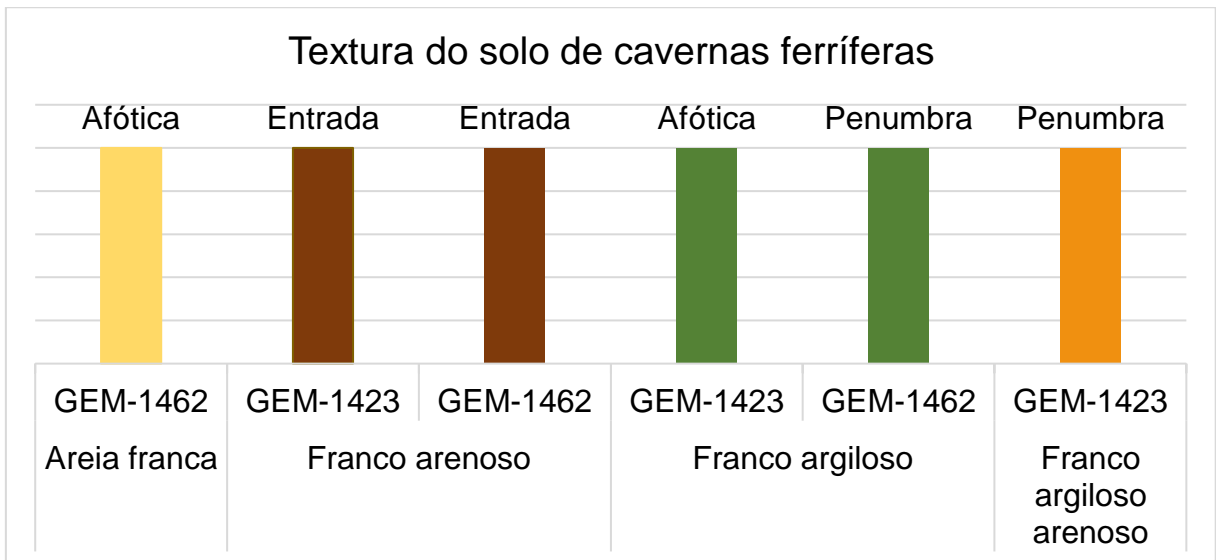


Figura 6. Classificação da textura das amostras de sedimentos das cavernas com base nas frações de areia, silte e argila

O percentual significativo de areia em todas as amostras das cavernas estudadas, principalmente da zona de entrada demonstra que esta zona é um meio onde possui cobertura vegetal nativa e que pode alterar padrões físico-químicos do solo de meios

subterrâneos superficiais e este ser lixiviado para a zona afótica da cavidade subterrânea. O aporte orgânico do ambiente cavernícola, advém da decomposição de matéria orgânica vegetal da superfície, e pelo fato do horizonte B do solo servir como uma espécie de filtro para partículas minerais e orgânicas (Ledesma et al. 2020), e participação da sílica na composição das rochas ferruginosas ser mais expressiva que nas demais litologias, o que pode explicar, em parte, um valor elevado da fração de areia relacionado ao quartzo (Lindenmayer et al. 2001; Spier et al. 2007).

Além disso, as texturas franco arenosa e areia franca evidencia o quanto os solos dessas duas zonas são jovens, mas também pode estar mascarando a existência de granulometrias inferiores a areias no sistema pedológico. Parte das amostras classificadas como areias possivelmente são agregados de argilas e siltes que não foram desagregados no processo de dispersão (pseudo-partículas), sobretudo por serem cimentados por Fe (Machado 2018).

As Formações Ferríferas Bandadas (FFB) como os jaspilitos das cavernas analisadas, são caracterizadas por apresentarem coberturas associadas a alto conteúdo de areia, como determinado em todas as amostras das duas cavernas estudadas e comparado com os valores encontrados de silte e argila (Figura 5). A abundância das concreções ferruginosas (canga) nas zonas fótica e afótica, pode ter contribuído significativamente, devido estar intimamente relacionadas as classes texturais nessas zonas, e pela presença da canga no topo do platô, onde estão inseridas as duas cavernas amostradas, podendo esta ser interpretada como um reflexo do avançado grau de alteração dos itabiritos, bem como a proteção dos níveis subjacentes contra a erosão é atribuída à resistência mecânica oferecida por ela (Monteiro et al. 2014).

A concentração de silte é maior na zona de penumbra (21,9%) e (25,9%) na caverna GEM-1423 e GEM-1462 respectivamente, estando estas relacionadas com a gênese e declividade de cada caverna, onde a gênese de solos autóctones sobre as couraças ferruginosas tende a apresentar um desenvolvimento incipiente, mesmo em áreas com pequena declividade (Carvalho Filho 2008). A caverna GEM-1423 apresentou desnível de 2 m e a GEM-1462 de 1,8 m, podendo assim explicar que o elevado declive que estes solos estão submetidos exerce um papel preponderante no transporte de sedimentos ao longo da caverna, devido à densidade de partículas do solo ser fortemente influenciada pelo material de origem ferruginosa (Machado 2018), e que a origem do minério friável é decorrente do enriquecimento residual de hematita, ocasionado pela lixiviação progressiva da sílica (Costa 2006; Sobrinho 2012).

As duas cavernas analisadas possuem média acrescida do desvio padrão (311,9 m²), e são consideradas como alta área de projeção horizontal da cavidade em relação às demais cavidades que se distribuem na mesma unidade espeleológica, conforme definido no § 3o do art. 14 da Instrução Normativa 2 de 2017 do IBAMA (Piló et al. 2014). A pobreza de silte na zona afótica da GEM-1462, pode ser explicada pela declividade da zona de penumbra para a zona afótica, e a intensa dissolução e lixiviação do silte, através da percolação e gotejamento da água na caverna na zona afótica, sendo está uma característica herdada do material de origem.

As zonas de penumbra das cavernas estudadas apresentaram textura franco argilosa, destacando-se a caverna GEM-1423 que possui classe textural franco argilosa arenosa. Côrrea (2011) obteve o mesmo resultado ao realizar a análise

granulométrica de solos da Serra do Tarzan, platô este que compreende o Parque Nacional dos Campos Ferruginosos, e observou a grande participação na fração argila nessa textura franco argilosa-arenosa, devendo-se especialmente pelo conteúdo significativo de gibbsita, e na substituição do Fe pelo Al na goethita. Segundo Schaefer e colaboradores (2016) a mineralogia dos solos da Serra Sul de Carajás apresenta como constituintes dominantes na fração argila a hematita, goethita e a maghemita, sendo que as características desses minerais em óxidos de Fe refletem nas variações na constituição da canga, da qual são formados os solos.

Os valores de argila para a caverna GEM-1423 foram significativos, onde pode-se observar que a uma crescente concentração de argila das amostras desde a zona de entrada (18%), penumbra (35,2%) e zona afótica (35,5%). Essa crescente concentração de argila pode ter ocorrido, por conta da sazonalidade e carreado a argila da zona de entrada e ter está se depositado na zona afótica da caverna. De acordo com Schaefer et al. (2015) a dinâmica de formação das cangas é um processo contínuo e fortemente condicionado pelas variações climáticas da fase seca e fase úmida (chuvosa), promovendo a seleção de partículas mais finas (siltes e argilas) se concentrarem na superfície pela triagem biológica. Nas duas cavidades amostradas a características da rocha é friável e porosa, em decorrência da percolação de água em seu interior. Esse processo provoca a remoção da sílica e, conseqüentemente, a hidratação da hematita na forma de goethita e enriquecimento relativo em Fe (Tortaro et al. 2019). A dissolução inicial da sílica e, posteriormente, de parte da goethita, os canalículos irão se ampliar condicionados por feições locais específicas para cada caverna.

Na caverna GEM-1462, os valores de argila encontrados foram baixos quando comparados os valores de argila da caverna GEM-1423. O percentual de argila encontrado na zona de penumbra (35,3%) da caverna GEM-1462 é semelhante aos valores da zona afótica da caverna GEM-1423, porém as amostras da zona afótica da caverna GEM-1462 apresentaram baixa porcentagem de argila, demonstrando que os solos ao fundo da caverna são solos intemperizados e ricos em óxidos e hidróxidos de Fe e Al, devido que a rocha-matriz nessa zona é pouco densa e alterada. Segundo Corrêa (2011), o conteúdo de argila pode ser baixo nos ambientes ferruginosos, devido ao indicativo de desequilíbrio entre a precipitação/formação de minerais e dissolução das cangas ferríferas.

A maior parte dos solos da Serra Sul de Carajás são caracterizados como plinita, sendo a sua formação constituída de mistura de material de argila com grãos de quartzo e de outros minerais, pobre em carbono e rica em Fe, ou Fe e Al, que sob vários ciclos de umedecimento e secagem, consolidam-se irreversivelmente (Corrêa 2011). Porém, solos com alto teor de Fe possuem grande quantidade de partículas agrupadas nas frações finas, com mais de 50% dos perfis nas classes texturais argilosa ou franco siltosa (Machado 2018). Entretanto, autores destacam que as análises texturais em solos com alto teor de ferro possuem grandes limitações metodológicas na dispersão das partículas, podendo mascarar os valores de argila e superestimarem os de silte e areia (Donagemma, et al 2003; Carvalho Filho 2008).

Determinação de metais pesados nos solos

De forma geral, os valores de pH encontrados em todas as amostras de solo demonstram acidez elevada, sendo caracterizados como solos extremamente ácidos ($\text{pH} < 4,18$). Os solos da Serra de Carajás, especialmente as cangas, são extremamente ácidos e pobre em nutrientes (Nunes et al. 2015; Viana et al. 2016).

A acidez elevada desses solos pode implicar em menor atividade microbiana, afetando a mineralização de matéria orgânica e a disponibilização de nutrientes. Além disso, impactam sobre a disponibilidade de fósforo (P) (Embrapa 2021), como demonstrado na Tabela 2 que os valores de P foram menores na zona de entrada, podendo estar relacionado com a matéria orgânica e percolação da água em ambas as cavidades.

Schaefer et al. (2006) mostrou que as formações das cavidades subterrâneas e solos associados a Serra Sul de Carajás, mostram valores elevados de P e Capacidade de Troca Catiônica (CTC), pela ciclagem de nutrientes através da abundância da fauna subterrânea (térmitas) e deposição do guano. Os maiores teores de P foram de 7.680 e 13.380 mg/kg^{-1} respectivamente da zona de penumbra e afótica da GEM-1462, seguido da zona de penumbra da caverna GEM-1423 de 250 mg/kg^{-1} . Infere-se que as maiores concentrações de P pode estar relacionado nas zonas onde os morcegos estavam empoleirados, logo a concentração de guano no piso era muito maior do que na zona de entrada das cavernas analisadas, como demonstrado no índice de atividade microbiana de solubilização de fosfato (Figura 14).

Os depósitos de guano formam a base do ecossistema cavernícola (IUCN, 2014), e possuem propriedades distintas, de acordo com a localidade do ambiente, tempo de deposição (Ghedin 2021), e principalmente o hábito alimentar dos morcegos que afeta diretamente na composição física e química do guano (Ferreira 2019). A sazonalidade da região Amazônica, pode afetar na hidratação e desidratação dos depósitos de guano, causando a solidificação deste (Scherer 2017), principalmente nas cavernas ferríferas, em virtude de a canga ser mais permeável, porosa, e capaz de acumular água por um longo período (Carmo e Jacobi 2016).

Piló et al (2014) verificou que um dos maiores depósitos de guano e colônias numerosas de morcegos em cavernas ferríferas da Serra da Bocaina, encontra-se na caverna GEM-1423, assim como alta riqueza de espécies e alta diversidade de substratos orgânicos. A alteração significativa em relação às concentrações de alguns atributos químicos do solo neste estudo, pode ter sido influenciada pela temperatura elevada e essencialmente pela forte sazonalidade na Serra de Carajás (Mota et al. 2015).

As duas cavidades amostradas possuem presença de água de percolação ou condensação com influência acentuada sobre os atributos da cavidade de acordo com a Instrução Normativa 2 do IBAMA de 2017. A caverna GEM-1423 possui lago subterrâneo intermitente com influência significativa sobre os atributos da cavidade. Nas cavernas da Serra da Bocaina, foram identificados pelo menos 12 tipos de espeleotemas, sendo a caverna GEM-1423 possui 10 dos 12 tipos dos espeleotemas encontrados por Piló e colaboradores (2014), destacando-se as crostas fosfáticas em relação ao P, onde os depósitos de água podem estar lixiviando este mineral para as zonas de penumbra e afótica da caverna, e os microrganismos solubilizando

(disponibilizando) a partir da produção de ácidos orgânicos e redução do pH da água para 4 nas paredes e pisos da cavidade auxiliando na formação de espeleotemas fosfáticos. Sokol et al. (2022) verificou que a deposição ativa do guano e o início de sua degradação por bactérias produzem soluções ácidas (pH entre 3 e 4) equilibradas com vários fosfatos portadores de Al e/ou Fe³⁺ em espeleotemas (folhelhos).

A caverna GEM-1462 é reconhecida pela importância acentuada sob enfoque local e regional pela presença de populações residentes de quirópteros com função ecológica importante e sedimentação clástica/química com valor científico, assim como os substratos orgânicos que apresentaram alta diversidade. Essa cavidade registrou populações maiores de 100 indivíduos em uma estação, considerando que pode haver variação sazonal relacionada com o uso de recursos e habitats do entorno (Piló et al. 2014). A maioria das cavernas tropicais não possui sazonalidade de deposição de guano e as colônias de morcegos podem migrar entre cavernas ou entre diferentes locais em uma mesma caverna (Bahia e Ferreira 2005). Essa característica de irregularidade, pode ter influenciado na decomposição ou idade do guano, sendo este dependente dos fatores físicos e ambientais (Banskar et al. 2015; Leon et al. 2018), e diante disso, apresentar altas concentrações de P na zona afótica, onde se concentra a maior quantidade de espécies de morcegos na caverna GEM-1462.

A deposição de guano tem influência significativa na adição de bases trocáveis como K, Na, Ca, Mg além de Cu, Mn, e Zn nos solos, concentrando mais nutrientes no interior das cavernas de Serra Norte e Serra Sul da Flona Carajás. (Andrade, 2019). Os valores anômalos encontrados de Ca (2.460 e 4.210 mg/kg⁻¹) na zona afótica da caverna GEM-1462, pode estar relacionado a alta atividade microbiana, principalmente pela ocorrência dos depósitos de guano no piso, e acarretar o enriquecimento da matéria orgânica nessa zona.

A composição do guano inclui elementos orgânicos usuais: C-H-O-N, com P, S e secundários como K, Na, Cl, Ca, Mg, Fe, Al e Si (Wurster et al. 2015; Misra et al. 2019). Os íons de Ca, podem estar sendo lixiviados da zona de entrada até a zona afótica, por conta da ocorrência da intensa alteração e hidratação da rocha, ou seja, as cavernas estão inseridas em rochas muito alteradas. Bernard et al. (2022) verificou que as águas percoladas em *bat caves* ferríferas da Flona Carajás são ácidas, onde o pH chegou a 1,5 com a presença de fosfato, ferro, cálcio, nitrato e sulfato. A produção das soluções ácidas, pode ser da decomposição do guano com possível atividade microbiana, produzindo assim várias formas de corrosão nas paredes e pisos, resultando na ampliação das cavidades subterrâneas.

Geralmente, a acidez média (valores abaixo de 5,9) a elevada (valores menores que 5) em solos na Amazônia, conduz a indisponibilidade de nutrientes essenciais, como N, P, K, Ca, Mg, S, B e Mo, da mesma forma que promovem alta disponibilidade de Al, de Mn e de Fe (Segovia et al. 2020). Em contrapartida neste estudo, os valores de Ca não foram influenciados pelo pH. Na zona afótica da caverna GEM-1423 o Ca chegou a 7 mg/kg⁻¹ e o pH em 3,79, pH este superior ao encontrado na zona de penumbra e afótica da caverna GEM-1462, em que os teores de Ca foram maiores nos solos amostrados.

A análise físico-químico demonstrou altos teores de Mn na zona de entrada (1176,18 mg/kg⁻¹) e na zona afótica (2991,61 mg/kg⁻¹) da caverna GEM-1462, quando

comparado com a caverna GEM-1423, em que o maior índice encontrado na zona de penumbra ($301,22 \text{ mg/kg}^{-1}$) e zona afótica ($375,57 \text{ mg/kg}^{-1}$). Os depósitos de guano dos morcegos nos solos das zonas afótica e penumbra, pode estar atuando como fonte de carbono e assim impulsionar energia para a atividade microbiana, bem como este um precursor para o solo em frações de matéria orgânica. Segundo Zhang et al. (2014), a biodisponibilidade de manganês nos solos depende de algumas de suas características como pH, teor de matéria orgânica e potencial redox. Nos solos e sedimentos, o processo de oxidação do manganês está intimamente associado a atividade microbiana (Martins 2003).

O guano possui elementos químicos altamente variáveis destacando-se N, Ca, Mg, K, Al, Fe e S (Abidemi 2011). Dentre os elementos químicos que se destacam na composição dos solos amostrados, o Mg possui maior concentração nas amostras de solo da zona de entrada (1650 mg/kg^{-1}) e zona afótica (2720 mg/kg^{-1}) da caverna GEM-1462. Na zona de entrada da caverna GEM-1423 há um decréscimo de Mg que pode ser ocasionado pelo contato da entrada da caverna diretamente com a Floresta Ombrófila Densa, e nos períodos chuvosos ocorrer uma lixiviação deste elemento para as outras zonas como observado da zona de penumbra para a zona afótica. Piló et al. (2014) coletou 14 amostras de diferentes substratos das cavernas da Serra da Bocaina, e verificou uma lixiviação de Mg, Ca e Si na formação de feições de pequeno porte e com mineralogia pertencente aos grupos dos óxidos/hidróxidos em ferricrete.

O guano é utilizado como fertilizante, devido este ser rico em nitrogênio, fosfato e potássio (NPK) (Dimkic et al. 2021). Os valores de K encontrados neste estudo, foram altos na zona afótica de ambas as cavernas analisadas, podendo estar relacionados com os depósitos de guano nesta zona. Destaca-se a caverna GEM-1462, possui litologia em jaspilito alternando as bandas de hematita e jaspe, onde a concentração de K nessa rocha é superior devido a formação ferrífera e canga. Macambira e Schrank (2002), através da análise de 62 amostras de jaspilito de Serra Norte, revelaram teores médios de óxido de K a 0,02% nas bandas do jaspilito e concluíram que há muito mais sílica intercalado com camadas de óxidos de ferro.

Os teores de elementos-traço como Zn, Ni e Pb estão abaixo dos VRQ's de solos da Resolução CONAMA 420/2009. Os valores de Zn, são superiores aos encontrados nos solos de Carajás por Corrêa (2011) e que reflete da pobreza desse mineral no jaspilito. Neste estudo, os valores foram mais altos na zona afótica da caverna GEM-1462 que sua litologia é jaspilito, porém os valores foram elevados onde há presença de guano, indicando associação do Zn com o guano.

Leon et al. (2018) analisou duas amostras de guano em uma caverna na Filipina, e estas apresentaram altas concentrações de P, Ca, S, Zn e Cr, onde os microrganismos presentes no guano estariam realizando vários processos biogeoquímicos, como ciclagem de nutrientes orgânicos e inorgânicos, acarretando mudanças no pH e teores nutricionais, determinando uma influência no aumento significativo do crescimento e diversidade bacteriana.

Os elementos-traços como Zn e Pb diminuem para o topo do perfil de alteração intempérica em cavernas de Serra Norte em Carajás, demonstrando que estes são elementos móveis diante dos processos intempéricos (Abreu et al. 2019). Além disso, há diferenças marcantes no teor dos elementos determinados, evidenciando o claro

processo de evolução do intemperismo. Como hipótese, sugerimos que o Pb é relativamente imóvel nos solos das cavernas na Serra da Bocaina, pois este pode estar absorvendo fortemente as partículas do solo, como argilas, siltes e até mesmo os óxidos de Fe, Mn e compostos orgânicos. Michopoulos et al. (2005) verificou que o Pb é efetivamente retido nos solos, muitas vezes devido à forte ligação com a matéria orgânica presente nas substâncias húmicas.

Nos solos amazônicos a uma grande variedade de depósitos minerais, como ferro (Fe), manganês (Mn), alumínio (Al), cobre (Cu), zinco (Zn), níquel (Ni), cromo (Cr) (Segovia et al., 2020). Os valores de Cu em 15 das 16 amostras de solos analisadas, foram superiores aos Valores de Referência (200 mg/kg) para a Qualidade dos solos de acordo com a Resolução CONAMA 420/2009. Destaca-se as amostras da zona de entrada com 1446, 57 mg/kg⁻¹ e afótica com 2812,48 mg/kg⁻¹ de Cu da caverna GEM-1462 com os maiores teores encontrados.

Os teores de Cu são incrementados pela deposição de guano nas cavidades, e sua redistribuição nas encostas. Muitos elementos traço estão presentes em concentrações significativas nos jaspilitos, contribuindo para o acúmulo no solo e consequente aumento em relação a rocha, como é o caso do Cu, Ni, Pb e Zn (Corrêa 2011). Os valores mais significativos de Cu (Tabela 4) podem estar condicionados pela Bacia Hidrológica do Rio Itacaiúnas, devido à existência de duas zonas afetadas por intenso hidrotermalismo e mineralizadas denominadas de Cinturões Norte e Sul do Cobre (Teixeira e Lindenmayer 2010; Brito et al. 2010; Moreto et al. 2015). Nestes cinturões estão localizados grandes depósitos de cobre do tipo Óxidos de Ferro-Cobre-Ouro de classe mundial que se localizam principalmente na Bacia de Carajás (Araújo, 2021).

Os teores de Fe extraível em todos os solos analisados foram elevados, destacando-se zona afótica da caverna GEM-1423, em que Fe foi determinado em 238.050,00 mg/kg⁻¹. Os solos analisados, são caracterizados como solos perférricos e estão associados a litologias igualmente ricas em Fe (canga e jaspilito) (Corrêa et al. 2016; Schaefer et al. 2016). No Brasil, duas regiões se destacam pela grande ocorrência destes solos, o Quadrilátero Ferrífero com itabiritos e itabiritos dolomíticos e a Serra dos Carajás com os Jaspilitos (Machado 2018). Encaixado na camada de jaspilito, ocorrem corpos de minério de ferro de alto teor, que são gerados por enriquecimento da rocha ferrífera, através de reações e processos químicos, envolvendo fluidos hidrotermais (Lobato et al. 2005). A mobilização de Fe é intensa em todos os solos, devido à variação sazonal do lençol freático que permite a oxi-redução do ferro em diferentes escalas (Andrade et al. 2019). Os valores elevados de Fe e acidez, não afetou a disponibilidade desse micronutrientes catiônicos, evidenciado que os solos são distróficos nas duas cavernas amostradas, corroborando com os outros estudos de solos em Carajás (Corrêa et al. 2016; Schaefer et al. 2015; Schaefer et al. 2016, Andrade et al. 2019).

O Cd foi o único metal que não foi determinado, devido este se encontrar abaixo do limite de quantificação (Tabela 2). Andrade (2019) analisou diferentes amostras de solos de cavidade subterrâneas da Flona Carajás, onde os solos do interior da caverna S11D em Serra Sul apresentou entre 0.3 e 0.31 mg/dm³, destacando-se a amostra da entrada da cavidade em que Cd foi de 1,46 mg/dm³, somente uma única amostra da entrada e interior da cavidade que ficou <LQ.

Deste modo, o Cd encontrado no estudo de Andrade (2019) é inferior ao LQ utilizado neste estudo. O referido LQ é alto e superior ao VRQ's de Cd (3 mg/kg) para solos da Resolução CONAMA 420/2009, podendo assim ter contribuído para a não quantificação de Cd em todas as amostras, como observado por Andrade (2019). Para que a quantificação da disponibilidade de um micronutriente ou de um elemento-traço no solo seja correta é fundamental a seleção de um extrator adequado. A solução extratora Mehlich-1 utilizada neste estudo, tem sido empregada com relativo sucesso em solos ácidos e com baixos teores de matéria orgânica para extração de diversos nutrientes, dentre eles o Fe (Bortolon et al. 2009; Bortolon e Gianello 2010; Soares et al. 2012).

O conhecimento sobre os teores naturais de micronutrientes e elementos-traço em diferentes solos amazônicos, como o ambiente cavernícola, pode evitar que níveis irrealistas de determinação e de remediação sejam impostos em áreas de entorno das cavidades. As peculiaridades dos solos amazônicos, e principalmente dos solos da Amazônia Oriental que compreende o Estado do Pará, carece de valores de referência para qualidade de solos acerca de metais pesados. Assim sendo, se faz necessário estudos que possibilitem estabelecer valores orientadores da qualidade do solo, pois atualmente os valores estabelecidos pelo CONAMA nº 420/2009 não se aplica e não podem ser generalizados para a tomada de decisão quanto a presença dessas substâncias nos solos amostrados, e principalmente com as particularidades das unidades de conservação. Portanto, há uma urgência de estudos que possibilitem dispor de valores de referência para áreas naturais e que possam ser utilizados como valores de referência para a região amazônica, especialmente o Estado do Pará, onde o impacto ambiental por metais pode ser proveniente de atividades de mineração (Ribeiro et al. 2019).

Caverna	Zonas	Amostra	Cd	Ca*	Pb	Cu	Fe	P*	Mg*	Mn	Ni	K*	Zn	pH
			mg/kg											
GEM- 1423	Entrada	GMF1	<LQ	64	11,43	512,9	162.240	20	330	207,82	21,05	3.600	84,99	4,18
		GMF2	<LQ	58	6,97	311,42	137.100	10	320	113,83	22,81	3.500	68,17	
		GMF3	<LQ	57	5,83	248,86	133.530	10	310	137,16	18,14	3.900	65,97	
	Penumbra	GMP1	<LQ	67	5,52	307,18	171.920	250	410	187,63	17,63	4.800	98,87	3,23
		GMP2	<LQ	79	7,83	314,58	160.090	50	430	159,63	18,31	4.100	86,72	
		GMP3	<LQ	59	8,69	363,01	172.610	60	490	232,45	20,4	5.700	110,34	
	Afótica	GMA1	<LQ	74	6,57	346,3	237.160	10	450	301,22	21,11	6.500	102,64	3,79
		GMA2	<LQ	68	2,37	137,05	201.110	30	260	115,97	16,49	5.400	45,48	
		GMA3	<LQ	7	5,05	454,3	238.050	10	350	315,57	24,33	14.300	93,03	
GEM- 1462	Entrada	GSF1	<LQ	52	4,66	1446,6	124.400	130	800	1176,2	23,47	6.300	36,16	3,98
		GSF2	<LQ	150	4,65	843,94	137.070	50	1.650	1072,7	42,3	5.300	105,65	
		GSF3	<LQ	60	5,48	572,56	163.190	90	960	627,09	27,58	7.000	84,8	
	Penumbra	GSP1	<LQ	110	1,87	457,46	105.850	220	480	328,39	55,96	6.700	52,56	3,18
		GSP3	<LQ	160	3,41	315,14	74.940	130	370	219,54	26,25	5.700	27,16	
	Afótica	GSA1	<LQ	4.210	1,82	612,13	51.890	7.680	2.720	1776,8	16,71	11.300	194,12	3,42
GSA2		<LQ	2.460	2,85	2812,5	32.120	13.380	1.540	2991,6	12,95	19.600	168,47		

LQ (limite de quantificação) mg/kg: Cd = 5,0; Ca = 10,0; Pb = 0,5; Cu = 10,0; Fe = 100,0; P = 0,5; Mg = 5,0; Mn = 10,0; Ni = 5,0; Zn = 5,0

VRQ's Resolução CONAMA nº 420/2009 mg/kg: Cd= 3; Pb= 180; Cu= 200; Fe= -; Mn= -; Ni= 70; Zn= 450

* Minerais que não se aplica a resolução CONAMA nº 420/2009

Tabela 1. Teores de metais encontrados nas diferentes amostras de cada zona da caverna GEM-1423 e GEM-1462

Composição taxonômica baseada no gene 16S rDNA da comunidade bacteriana de cavernas ferríferas

O presente estudo empregou a abordagem de criação de perfis de 16S rRNA baseada em cultivo, elucidando o primeiro perfil preliminar de comunidade bacteriana cultivável de solos de cavernas ferríferas do Parque Nacional dos Campos Ferruginosos na Serra de Carajás (Pará, Brasil).

Foram isoladas 18 bactérias da Caverna GEM-1423. O maior número de isolados foram da zona de penumbra (8), seguido da zona de entrada e zona afótica que apresentaram a mesma quantidade de isolados (5). Na caverna GEM-1462 foram isoladas 11 bactérias, sendo a maior quantidade de bactérias isoladas da zona de entrada (6), seguida da zona de penumbra (3) e zona afótica (2).

Caverna	Zona	Amostra	Isolado	Código	
GEM- 1423	Zona Fótica	GMF1	GMF101	C1	
			GMF102	C2	
		GMF2	GMF201	C3	
			GMF202	C4	
		GMF3	GMF301	C5	
		GMP1	GMP101	C6	
			GMP102	C7	
		GMP2	GMP201	C8	
			GMP301	C9	
		GMP3	GMP302	C10	
	GMP303		C11		
	Zona Afótica	GMA1	GMA102	C15	
			GMA103	C16	
		GMA2	GMA201	C18	
			GMA301	C19	
		GMA3	GMA302	C20	
			Zona de Penumbra	GSF1	GSF101
		GSF102			C22
		GSF2		GSF201	C23
				GSF202	C24
GSF3		GSF301		C25	
	GSF302	C26			
GEM- 1462	Zona de Penumbra	GSP1	GSP101	C27	
		GSP3	GSP301	C30	
			GSP302	C31	
	Zona Afótica	GSA1	GSA101	C32	
		GSA2	GSA201	C33	

Tabela 2. Isolados bacterianos por zonas das cavernas GEM-1423 e GEM-1462

A ausência parcial (zona de penumbra) ou total de luz (zona afótica) em áreas mais distantes da entrada (zona fótica) e a limitação de recursos contribuem para a singularidade do ambiente cavernícola, resultando em características microbianas, como a ausência de organismos fototróficos (Paula et al. 2020). O baixo número de isolados encontrados na zona afótica das cavernas analisadas, pode estar relacionado a impossibilidade do processo de fotossíntese microbiana, selecionando assim os microrganismos com diferentes mecanismos para a obtenção de energia, a partir da utilização compostos inorgânicos como hidrogênio, nitrito, sulfeto ou ferro disponíveis nas cavernas ferríferas (Oliveira et al. 2021).

A contagem de microrganismos do solo em placas de Petri neste estudo demonstrou apenas uma parte da comunidade real existente no ambiente cavernícola ferrífero. A utilização do *metabarcoding* (Figura de 7 e 8) demonstrou que esta ferramenta é fundamental para o conhecimento e revelar um maior número de táxons. Porém, quando se trabalha com um número grande de amostras, a técnica de diluição em placa de Petri torna-se um instrumento de grande utilidade. As condições de cultivo utilizado neste trabalho, demonstrou que os fatores estudados isoladamente ou associados influenciaram no crescimento e na diversidade bacteriana total, principalmente quanto aos isolados da zona de afótica que não possuem capacidade fotossintética em que o número de isolados foram menores nas duas cavernas analisadas.

Apesar da alta abundância e diversidade, as informações sobre a ecologia e biotecnologia sobre os filós identificados em cavernas são escassos, podendo ser atribuídas em grande parte às dificuldades em cultivar a maioria dos filós bacterianas e sua cobertura pobre em coleções de culturas bacterianas (Da Rocha et al. 2009; Navarrete et al. 2013). Além das dificuldades das condições de cultivo, os fatores ambientais como pH e nutrientes podem conduzir a dinâmica das comunidades microbianas (Fierer et al. 2007; Lauber et al. 2009).

O advento das novas ferramentas para o estudo e caracterização de microbiomas facilitou muito as investigações da estrutura e funcionalidade da comunidade microbiana cavernícola (Wu et al. 2015). O sequenciamento pela plataforma Illumina dos isolados bacterianos das cavernas GEM-1423 e GEM-1462 gerou cerca de 5.747.072 pb de dados para análise. A composição taxonômica dos 29 isolados, apresentou 19 filós bacterianos distintos e categorizou em cinco filós principais, *Actinobacteria*, *Firmicutes* e *Proteobacteria* foram identificados em 28 dos isolados, seguido de *Planctomyctes* (27) e *Acidobacteria* (25). Os filós menos abundantes foram BRC1 (2), *Dependetiae* (1) e *Halanaerobiota* (1).

Turrini et al. (2020) verificou no sequenciamento do gene 16S rRNA de amostras de uma caverna em Nova Guiné, que *Proteobacteria* (49,6%) e *Actinobacteria* (40,4%) são os filós predominantes. Os filós menos prevalentes foram *Acidobacteria* (1,8%) e *Firmicutes* (1,7%). Para Zhu et al. (2019) as *Proteobacteria* (41,1%), seguido

de *Actinobacteria* (37,6%) e *Firmicutes* (10,4%) foram mais abundantes no ambiente cavernícola.

Embora a diversidade de microrganismos difira pelo método utilizado (dependente ou independente de cultura), pela área de amostragem e tipo de amostra (parede, solo e superfície do espeleotema), os principais filos relatados em estudos sobre a diversidade microbiana em cavernas são *Proteobacteria* e *Actinobacteria* (Tomczyk-Żak e Zielenkiewicz 2016). Além destes, a frequência de presença dos filos *Firmicutes*, *Acidobacteria*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi* e *Planctomycetes* em cavernas é considerável (Youssef e Elshahed 2008; Jurado et al. 2010; Lee et al. 2012; Barton 2015; Wiseschart et al. 2018), e que corroboram com este estudo.

O conhecimento atual sobre a distribuição da diversidade de microrganismos e suas funcionalidades em ambientes de cavernas naturais no Brasil é incipiente, especialmente no que diz respeito a cavernas ferruginosas (Hershey e Barton, 2018; Lemes et al., 2018; Parker et al., 2018; Parker et al., 2022). Além disso, as bactérias de cavernas precisam de uma estratégia cooperativa para crescer e sobreviver; portanto, alguns isolados podem ter sido perdidos com passagens seriais necessárias para o isolamento de culturas puras (Turrini et al. 2020).

Investigações posteriores revelaram diferentes domínios de gêneros e suas respectivas abundâncias relativas, destacando-se *Bacillus*, *Blastopirellula*, *Lactobacillus*, *Serratia* e um táxon não cultivável.

O gênero *Bacillus* dentro de *Firmicutes* são frequentemente encontrados em cavernas nos espeleotemas (Mudgil et al. 2018), sedimentos (Feng et al. 2016) e ar (Dominguez-Moñino et al. 2018). Várias espécies de *Bacillus* estão envolvidas em processos de biomineralização (Koning et al. 2022) e bioprecipitação (Daskalakis et al., 2015) de carbonato de cálcio em cavernas.

O isolamento de *Blastopirellula* (*Planctomycetes*), pode levar a exploração e compreensão da diversidade potencial mais ampla, dada a existência de membros desse grupo que utilizam anaerobicamente o enxofre e oxidam amônio. A evidência é de que óxidos de ferro e manganês são utilizados como aceptores de elétrons para o planctomiceto anammox *Candidatus Kuenenia stuttgartiensis* (Strous et al. 2006). O único registro desse gênero em cavernas, especialmente brasileiras, foi evidenciado por Lemes et al. (2021) como um dos gêneros mais abundantes em cavernas ferruginosas do Quadrilátero Ferrífero.

Blastopirellula sp são quimioheterotróficos, embora as vezes oligotróficos. Os membros desse gênero possuem papel central na degradação de heteropolissacarídeos de plantas e algas, incluindo exopolissacarídeos produzidos por outras bactérias (Fuerts 2017), capacidade de degradar quitina e fixar nitrogênio (Sreya et al. 2023).

A alta abundância de alguns táxons microbianos humanos comuns, como *Lactobacillus*, são na grande maioria bactérias probióticas exploradas comercialmente por espécies não formadoras de esporos (Elshaghabe et al. 2017). *Lactobacillus* estão associados principalmente aos hábitos de forrageamento dos morcegos, o que sugere que estas podem ser prevalentes no guano, como encontrado em cavernas da

Itália (Biagioli et al. 2023). Newman et al. (2018) observaram que 3 espécies (*Lactococcus garvieae*, *Enterobacter asburiae* e *Lactococcus lactis*) foram prevalentes em guano superficial de uma caverna nos Estados Unidos.

Os membros do gênero *Serratia* podem ser encontrados no solo, ar, água, plantas, insetos e outros animais. *Serratia* sp. são importantes porque são patógenos oportunistas que podem causar doenças graves, às vezes fatais, em humanos (Raffi 2014). Zada (2017) observou que *Serratia* sp isolada de caverna, possui capacidade de produção de antibióticos, provocar alterações físicas e químicas nas peças de polietileno de baixa densidade (PEBD) e degradação de PEBD foi aumentada em meios aumentados com cálcio.

Análises moleculares têm revelado uma dominância inesperada de grupos bacterianos não cultivados em cavernas (Zepeda-Mendoza et al. 2016; Morse et al. 2021; Haidau et al. 2022), como demonstrado neste estudo. Paula et al. (2021) verificou que táxons de bactérias não cultiváveis representaram 24,22% em nível de gênero de uma caverna carbonática em Goiás no Brasil. Para Barton et al. (2004) muitas das espécies microbianas identificadas estão suficientemente adaptados ao estilo de vida oligotrófico do ambiente cavernícola, portanto, permanecem resistentes usando técnicas de cultivo padrão. Deste modo faz-se necessário estudos utilizando métodos independentes de cultura afim de conhecer a diversidade microbiana em diferentes litologias e amostras como paredes, espeleotemas, guano e sedimentos.

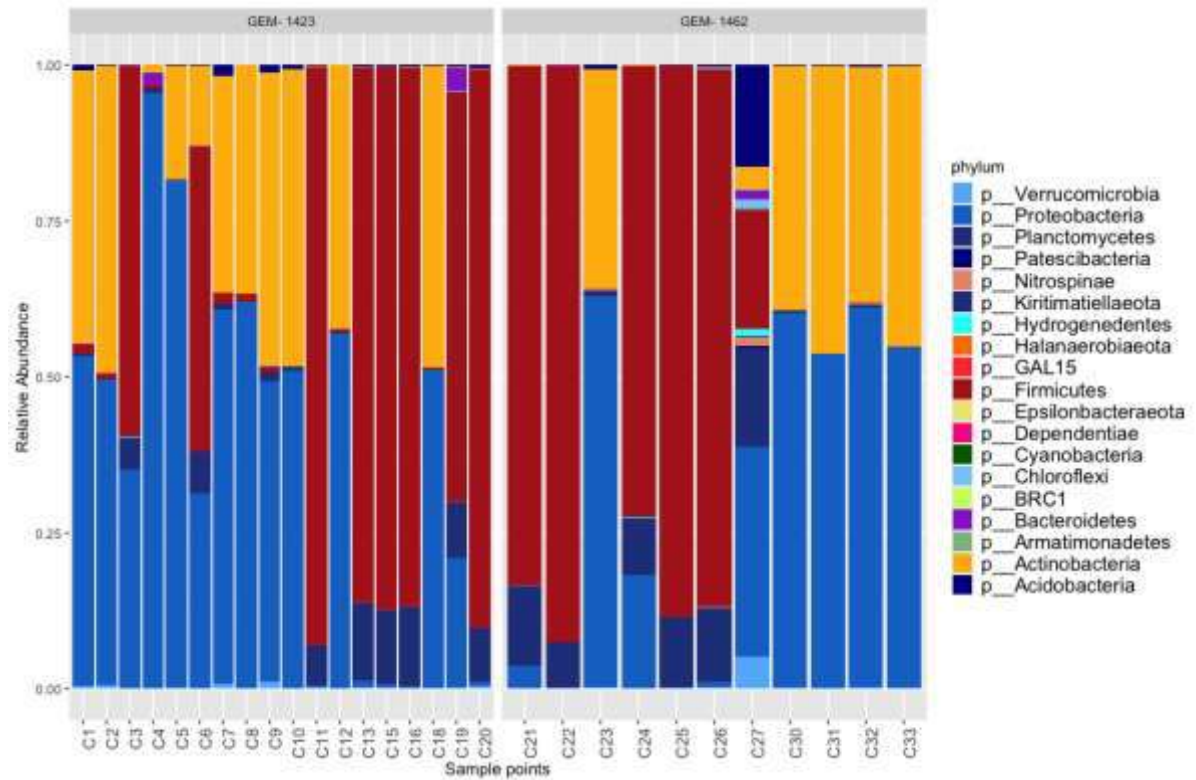


Figura 7. Abundância relativa dos isolados em filos bacterianos em todas as zonas de amostragens da caverna GEM-1423 e GEM-1462

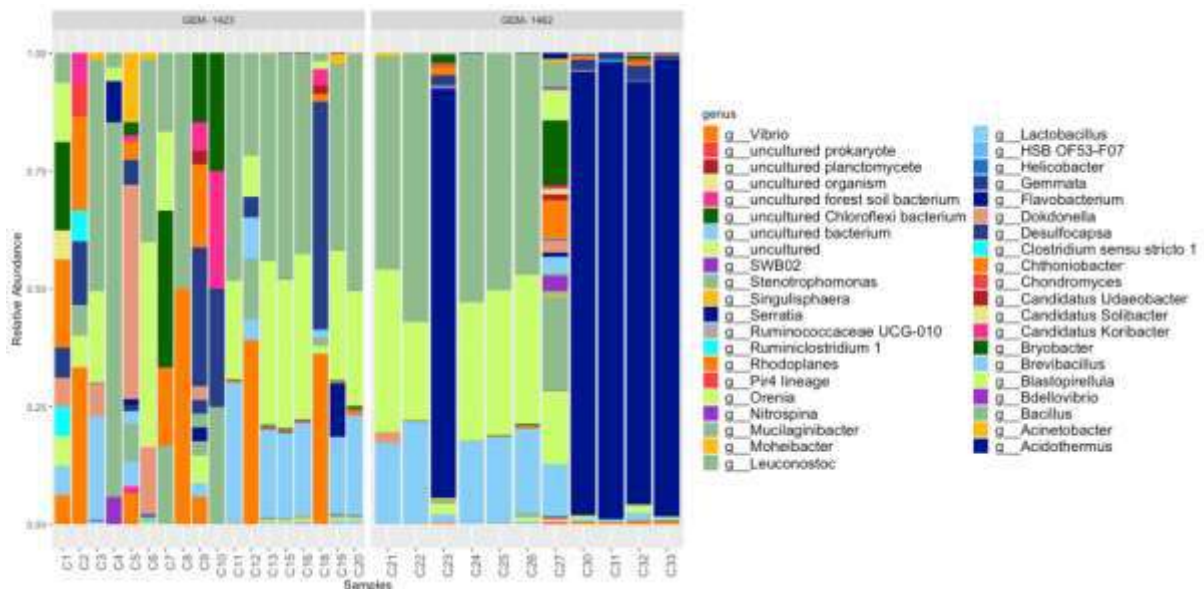


Figura 8. Distribuição taxonômica em gênero dos isolados bacterianos em todas as zonas de amostragem da caverna GEM-1423 e GEM-1462

Os índices de alfa diversidade, Chao1, Shannon e Simpson (Figura 9) não apontaram diferenças significativas na composição de gêneros entre as cavernas. Estas podem ser explicadas pelo grande número (160) de gêneros compartilhados entre elas, e que estes representam 85% dos gêneros identificados (Figura 10), inferindo um “microbioma central”.

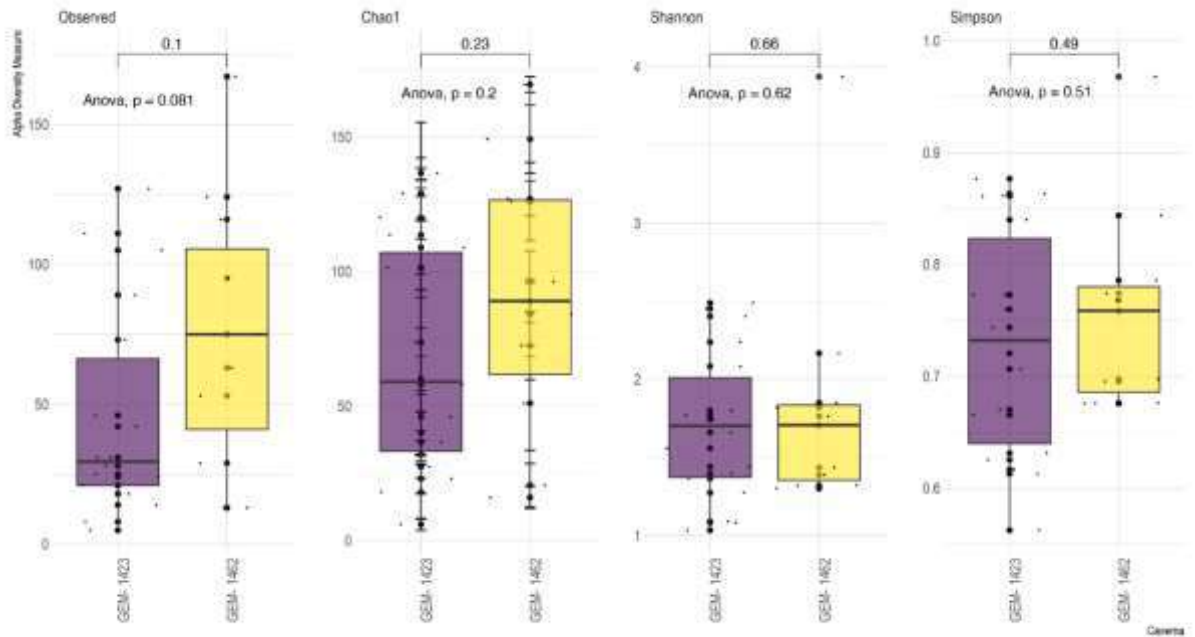


Figura 9. Índices de diversidade alfa (Chao1, Shannon e Simpson) dos isolados bacterianos das cavernas amostradas

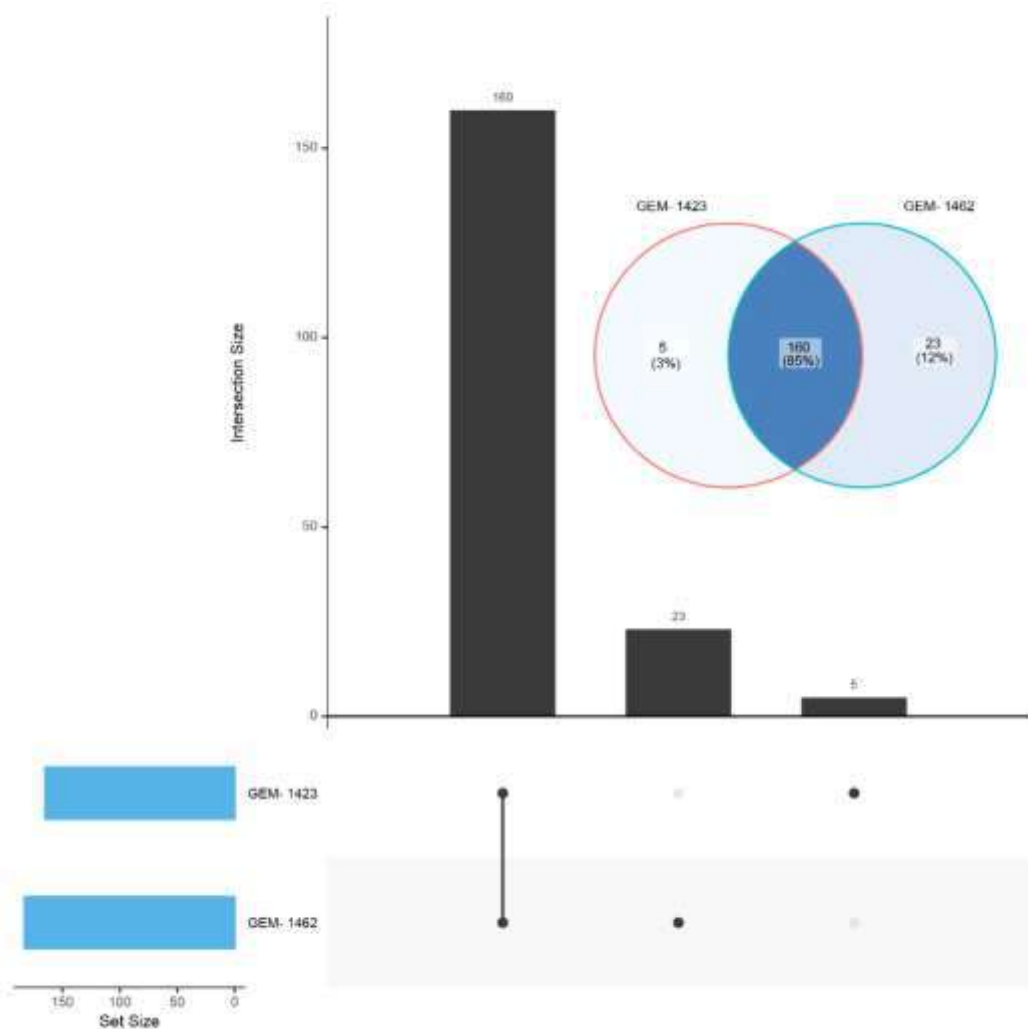


Figura 9. Diagrama de Venn das cepas bacterianas isoladas exclusivas e compartilhadas encontradas entre as diferentes zonas das cavernas amostradas

A montagem de comunidades bacterianas demonstrou uma predominância de seleção homogênea em diferentes zonas de amostragem (Figura 9), indicando uma homogeneidade espacial nas condições ambientais e a convergência em comunidades bacterianas (Dini-Andreote et al. 2015). Wang et al (2022) observou que o perfil da comunidade bacteriana de amostras de rochas da parede de uma caverna dolomítica da China, possui uma predominância homogênea em toda a caverna com uma contribuição de 71,43% a 92,86%. A uniformidade dos gêneros encontrados pode estar refletindo uma maior estabilidade dos ambientes cavernícolas incidindo nas comunidades microbianas menos variáveis entre as zonas das cavernas (Reboleira et al. 2022).

De acordo com Yun et al. (2016), a uniformidade significativa de grupos bacterianos em cavernas, indica a ocorrência de processos de transporte bacteriano através da percolação de água, como por meio de gotejamento, e estas auxiliarem na formação de espeleotemas. Para Michail et al. (2021) o fluxo de água, seja da chuva ou de volumes estagnados maiores do ambiente do solo superior, carrega as bactérias em direção ao teto das cavernas e o gotejamento auxilia a deposição dos grupos bacterianos nas paredes e pisos das cavidades subterrâneas.

Os táxons bacterianos distintos foram maiores na caverna GEM-1462 que em GEM-1423. Táxons bacterianos diferencialmente abundantes em cavernas tendem a ser especialistas, como encontrados em cavidades subterrâneas na China (Yun et al. 2016), Tailândia (Wiserchart et al. 2019) e Nova Guiné (Turrini et al. 2020).

A análise de redundância (RDA) demonstrou significância ($p < 0.001$) das variáveis ambientais (Figura 11), onde todas as enzimas analisadas (celulase, lipase, SLF, SLP, urease), assim como Ca, P, Mg e Ni foram significativos para RDA1. Ni e pH foram significativos para RDA1 e RDA 2. Diferentes nutrientes podem atuar como pressões de seleção para vários grupos de táxons bacterianos, o que implica que não há uma única variável ambiental importante que conduza a estrutura de toda a comunidade, mas uma combinação de múltiplos fatores influenciando diferentes componentes da comunidade (Reboleira et al. 2022).

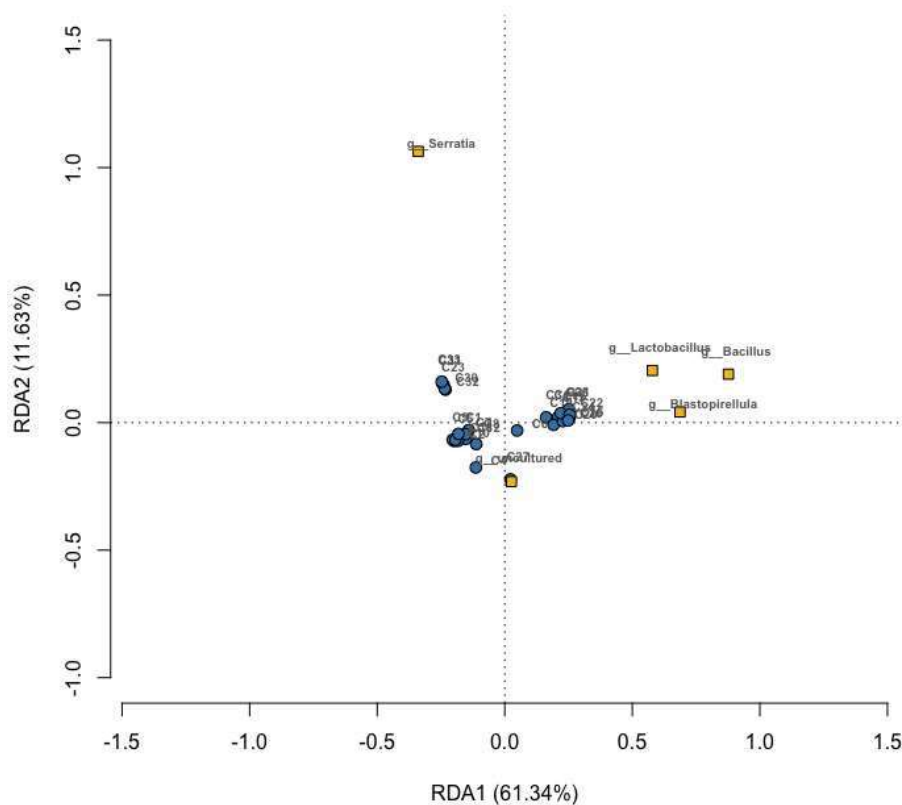


Figura 11. Análise de redundância (RDA) baseada nos dados de gênero bacteriano correlacionando com os índices enzimáticos e determinação de micronutrientes e metais

Variações de pH podem moldar grupos bacterianos dominantes em diferentes tipos de solos (Rousk et al. 2010; Bartram et al. 2014). A acidificação do solo diminui as abundâncias microbianas nos solos (Wu et al., 2006; Xu et al. 2015), logo impactado a diminuição da diversidade microbiana (Zhalnina et al. 2015), como demonstrado em nosso estudo. Yun et al. (2016) verificou os parâmetros ambientais (pH, carbono

orgânico total e potássio) se correlacionam com a variabilidade da comunidade bacteriana em todo o ecossistema da Caverna Heshang na China.

Deste modo, inferimos que os metais que apresentaram significância (Figura 12) e alta acidez (Tabela 1) dos solos cavernícolas ferruginosos, podem estar afetando a distribuição dos microrganismos nas cavernas avaliadas (Figura 10), logo impactando na produção de compostos bioativos como as enzimas (Figura 12).

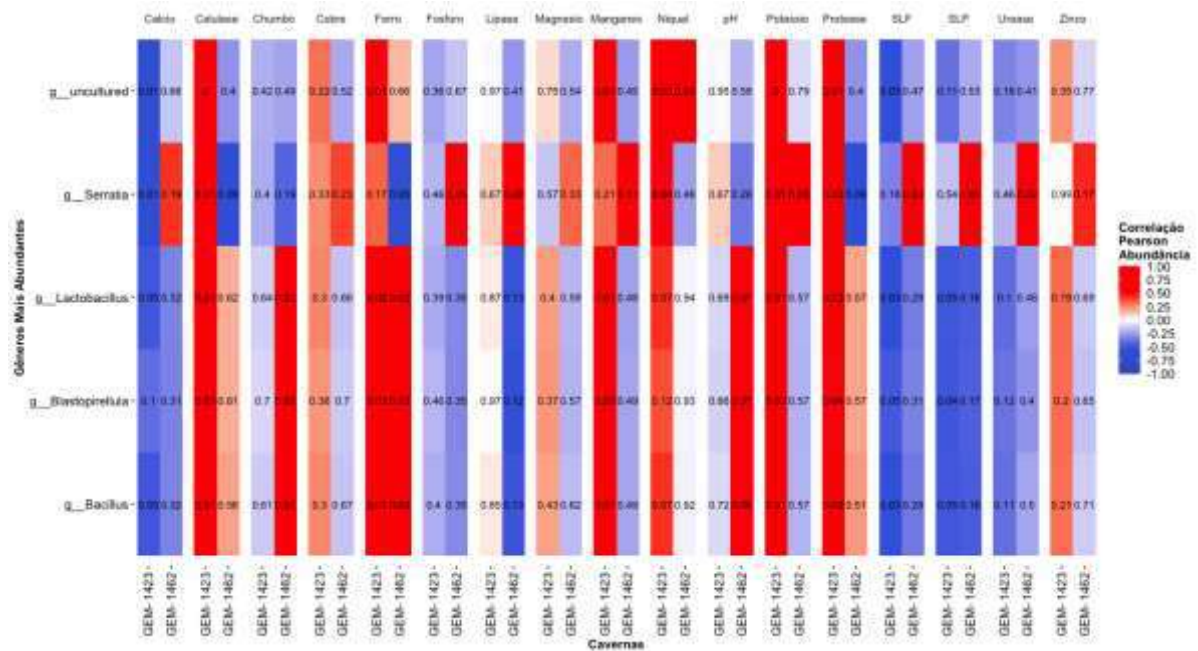


Figura 12. Mapa de calor mostrando as abundâncias relativas dos parâmetros ambientais aos principais gêneros bacterianos em cada caverna amostrada. A cor vermelha representa a maior significância do gênero relacionado a metais e enzimas. A cor azul demonstra nenhuma significância dos metais e enzimas em relação aos principais gêneros identificados

Os metais, principalmente os pesados Ar, Cd, Pb e Hg têm efeitos negativos nas funções biológicas do solo, incluindo atividade enzimática do solo (Khan et al. 2010; Pan e Yu 2011), abundância microbiana (Chen et al. 2014), atividade microbiana (Chodak et al. 2013; Chen et al 2015) e estrutura da comunidade microbiana (Khan et al. 2010; Frey e Rieder 2013). Estudos tem demonstrado que ambientes com alta concentração de polimetais pode resultar na diminuição de *Actinobacteria* (Xu et al. 2019), sendo *Proteobacteria*, *Firmicutes* e *Acidobacteria* as mais afetadas pelos altos teores de metais pesados (Frey e Rieder 2013; Deng et al. 2015; Jiang et al. 2019).

Em geral, os gêneros principais encontrados na caverna GEM-1423 e GEM-1462, demonstram um grau de especificidade (Figura 12), para metais, destacando-se Cu, Fe, Mg, Ni e K. As altas concentrações de Cu, Fe, Mg e Ni (Tabela 2), pode induzir um estresse tóxico e afetar seriamente a abundância, estrutura e diversidade microbiana de solos (Zhao et al. 2019), alterando as funções do ecossistema (Bai et al. 2020). Metais pesados afetam uma variedade de genes funcionais, logo alteram as funções ecológicas de solos e respectivas atividades funcionais (Yin et al. 2015; Liu

et al. 2018), resultando em uma redução na diversidade microbiana e alterando expressivamente a estrutura das comunidades microbianas do solo (Liu et al. 2020).

Sugerimos que os microrganismos de solos de cavernas ferríferas, podem ser tolerantes a metais pesados e com possível capacidade de remover esses metais ou converter em formas menos tóxicas, para assim conseguirem sobreviver em condições desfavoráveis deste ambiente.

Potássio é significativo em todos os gêneros da caverna GEM-1423 (Figura 12), destacando-se o maior índice de solubilização de K são dos isolados desta caverna (Figura 13), e maior atividade enzimática (89,65%) produzida pelas cepas isoladas. Comunidades bacterianas cavernícolas em rochas intemperizadas são correlacionadas positivamente em RDA com K^+ (Yun et al. 2016).

K^+ e pH em água e sedimentos de caverna quando correlacionados com *Bacillus* sp., podem desempenhar papel dominante e importante na liberação de potássio no ambiente durante as mudanças de pH dentro do sistema cárstico (Hu et al. 2006; Mendes et al. 2014). De acordo com a Figura 10, potássio é significativo na caverna GEM-1423, mas não para pH, antagonicamente a GEM-1462.

A maior proporção e significância de atividade enzimática foi de celulase e protease (Figura 12). Alguns trabalhos relatam que padrões de diversidade funcional podem fornecer informações importantes sobre que a riqueza taxonômica bacteriana (Lamanna et al. 2014; Louca et al. 2018). Diversos estudos têm apresentado perspectivas centradas em táxons, onde os traços fenotípicos bacterianos são influenciados pelos parâmetros ambientais como pH e temperatura, alterando assim a capacidade metabólica na produção de enzimas (Goberna e Verdú et al 2016; Barberán et al. 2017).

Perfis enzimáticos dos isolados

Quanto aos ensaios enzimáticos observou-se que dos 29 microrganismos isolados nas cavernas, 26 isolados (89,65%) apresentaram capacidade de solubilizar K (Figura 13), 20 (68,96%) para solubilizar fosfato (PO_4^{3-}) (Figura 14), 19 para urease (65,51%) (Figura 15), 16 (55,17%) para lipase (Figura 16) e 11 (37,93%) para protease (Figura 17) e celulase (Figura 18). Todas as bactérias apresentaram atividade enzimática para duas a cinco fontes de carbono testadas. Todos os índices enzimáticos produzidos foram significativos ($p < 0,001$). Nenhum microrganismo das cavernas avaliadas apresentou índice enzimático para todas as seis atividades funcionais testadas.

Na caverna GEM-1423, dos 18 (62,07%) microrganismos isolados, apenas dois (6,9%) apresentaram capacidade de degradar cinco das seis enzimas analisadas. O isolado GMP303 (zona de penumbra) produz cinco atividades enzimáticas, com o menor índice de capacidade de solubilização de PO_4^{3-} , e sem atividade ureolítica. Já o isolado GMA302 (zona afótica) é um dos maiores produtores de celulase (12,77 mm), com elevada atividade lipolítica (4,58 mm) e proteolítica (25,04 mm), mas não apresenta atividade de solubilização de PO_4^{3-} (Figura 14).

Na caverna GEM-1462 foram isolados 11 (37,93%) microrganismos, apenas três microrganismos da zona fótica, apresentaram a capacidade de produzir cinco enzimas, e 7 (24,13%) microrganismos apresentaram potencial para degradar quatro, das seis fontes avaliadas. Os isolados GSF101, GSF202 e GSF303 demonstraram potencial enzimático para celulase, lipase, solubilização de PO_4^{3-} , solubilização de K e urease, porém apresentaram os menores índices enzimáticos para atividade proteolítica (Figura 17). O isolado GSP101 produziu apenas duas atividades hidrolíticas (lipase e solubilização de K) e apresentou o menor índice enzimático para lipase 1,28 mm (Figura 16). Os isolados cultivados em meio Aleksandrov, demonstraram que 89,65% das cepas de bactérias cavernícolas ferríferas foram capazes de solubilizar potássio, sendo está a maior atividade enzimática produzida pelos isolados. Embora nutrientes como N, S e P sejam limitantes em ambientes subterrâneos (Rossi et al. 2006), o guano presente nestes ambientes é conhecido por ser rico em carbono, nitrogênio, fósforo e potássio (De Leon et al. 2018), com concentrações que atendem aos critérios de composição de 5% de NPK definidos pela FAO (2006).

Os isolados da zona de penumbra da caverna GEM-1423 e da zona de entrada da caverna GEM-1462 apresentaram os maiores índices de solubilização de K, conforme demonstrado na Figura 13. O isolado GMP102 apresentou o maior índice, com 6,36 mm de solubilização de K, enquanto GMF101 e GMF301 apresentaram índices próximos de solubilização de K de 4,57 e 4,56 mm, respectivamente. Bactérias solubilizadoras de K são também conhecidas como bactérias de silicatos e podem decompor minerais de aluminossilicato e apatita no solo (Chen et al. 2021). Além disso, Scherer (2017) analisou a mineralogia dos espeleotemas de cavernas ferríferas da Flona Carajás e registrou 17 minerais, incluindo óxidos-hidróxidos de Fe, fosfatos, sulfatos e silicatos.

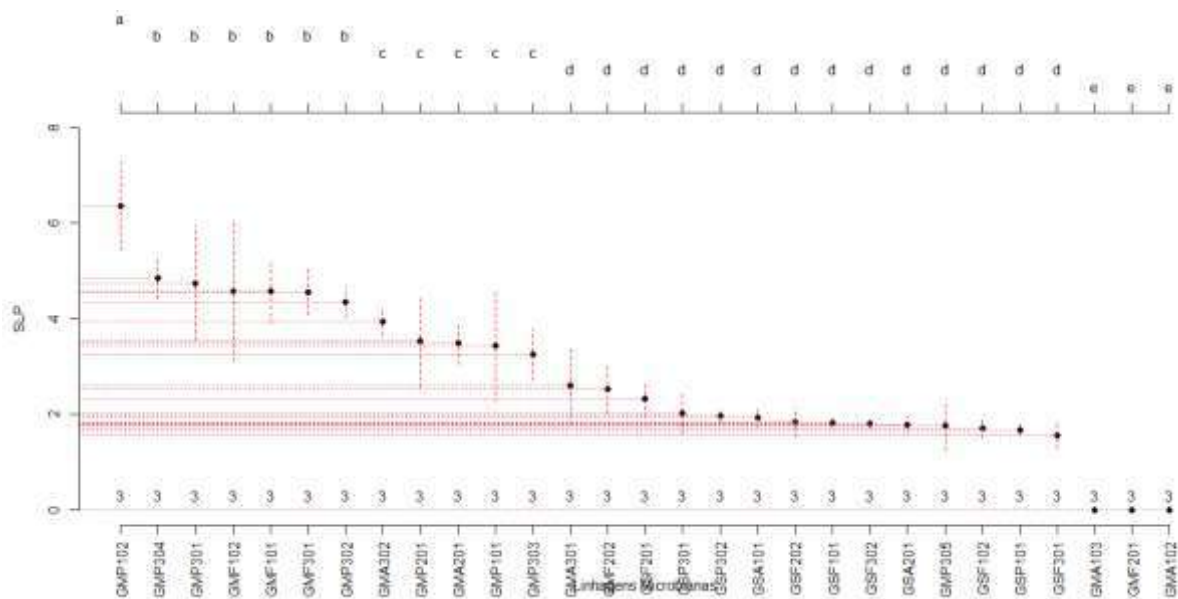


Figura 13. Atividade de solubilização de K dos isolados bacterianos das cavernas amostradas. Foram formados 5 grupos de acordo com os respectivos índices enzimáticos de K. O grupo A é formado somente por GMP102 que produziu a maior

solubilização de K, e o grupo E dos isolados que não apresentaram atividade de solubilização de K.

Com base nos resultados obtidos, podemos inferir que a capacidade dos isolados em solubilizar o potássio (K) pode estar relacionada à presença de silicatos nos espeleotemas das cavernas ferríferas. Estas cavernas são permeáveis à água, permitindo que ela carregue o K para as diferentes zonas da caverna e o deposite nos solos através do gotejamento e da deposição de guano de morcegos. As bactérias solubilizadoras de K, tornam este elemento insolúvel em solúvel no solo, para que este seja facilmente absorvido pelas plantas, podem melhorar as propriedades físicas e químicas do solo. Elas também secretam hormônios que estimulam o crescimento das plantas, aumentando assim a biomassa vegetal (Zhang e Kong 2014).

Os resultados dos índices enzimáticos de solubilização de K, principalmente dos isolados encontrados na zona de entrada da caverna GEM-1462, demonstra que mesmo que abertura da entrada da cavidade seja superior à da caverna GEM-1423, e o contato maior com o ambiente externo, não houve interferência nos maiores índices enzimáticos observados neste estudo. É importante destacar que a lixiviação da matéria orgânica, como raízes e serrapilheira, pode ter ocorrido nos substratos orgânicos presentes na caverna GEM-1462, o que pode ter influenciado nos índices enzimáticos de K dos isolados da zona afótica (Figura 13).

A utilização de bactérias solubilizadoras de K, como as bactérias cavernícolas ferríferas, pode ser uma estratégia promissora para aumentar o teor de K solúvel no solo e, conseqüentemente, melhorar o rendimento das plantas. Este é o primeiro estudo a relatar a atividade solubilizadora de K em isolados bacterianos de cavernas, especialmente em litologias ferríferas e da região de Carajás.

Os dois isolados GMP102 e GM201 da zona de penumbra da caverna GEM-1423 apresentaram os maiores índices enzimáticos de solubilização de P, com valores de 3,80 mm e 2,47 mm, respectivamente. Acredita-se que a liberação de enzimas fosfatase e ácidos orgânicos por microrganismos cavernícolas reduza o pH do solo, aumentando as atividades de quelação e liberando o P retido no solo na forma de ortofosfato solúvel e disponível para as plantas (Billah et al. 2019).

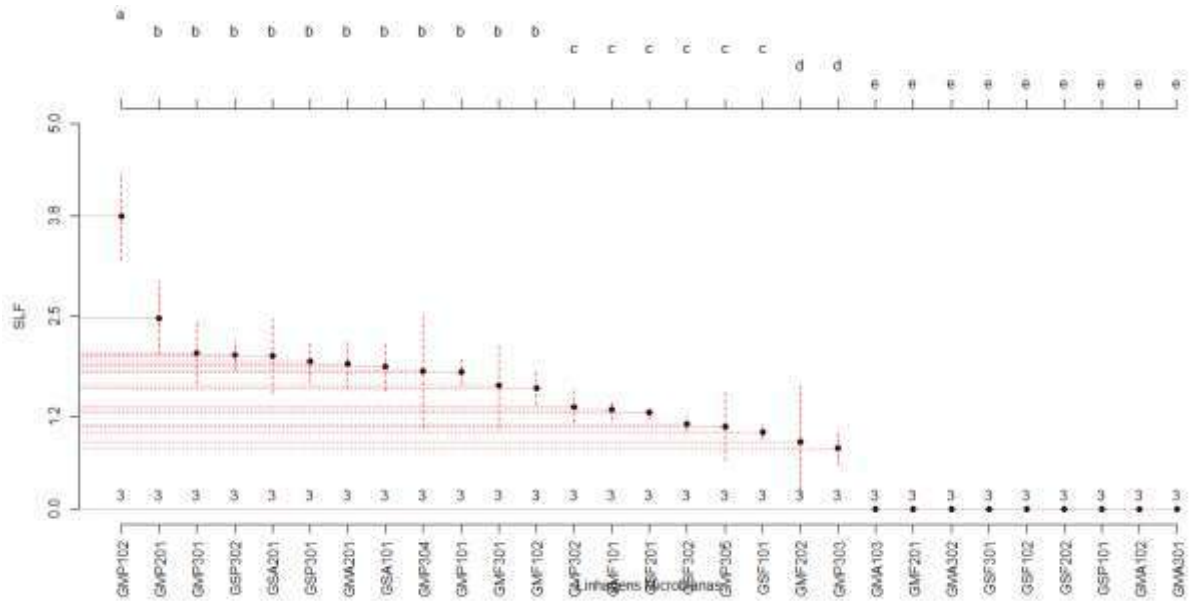


Figura 14. Atividade de solubilização de fosfato dos isolados bacterianos cavernícolas. Foram formados 5 grupos de acordo com os respectivos índices enzimáticos de K. O grupo A é formado somente por GMP102 que produziu a maior solubilização de K, e o grupo E dos isolados que não apresentaram atividade de solubilização de K.

Essa capacidade de solubilização de fosfato dos microrganismos isolados neste estudo é significativa e sugere que o P pode se acumular com o tempo na forma de fosfato inorgânico insolúvel retido no solo (Marra et al. 2012). A predominância de fosfato de Fe, Al e Ca, determinada por fracionamento químico, contribui para a estabilidade do fosfato inorgânico insolúvel. Os minerais goethita, magnetita, caulinita e gibsita, encontrados em espeleotemas fosfáticos de cavernas ferríferas, contribuem para a adsorção de P, e que o guano também pode ter papel na formação desses depósitos (Albuquerque 2017; Scherer 2017), afetando positivamente a fertilidade geral do solo (Grantina-levina e levinsh 2015; De Leon et al. 2018).

Foi realizado um estudo semelhante ao deste artigo, avaliando a capacidade de solubilização de fosfato de bactérias isoladas de uma caverna quartzítica brasileira e os autores observaram que apenas um único isolado bacteriano apresentou atividade de solubilização de fosfato (Guerra et al. 2022). Em outra pesquisa, Lemes et al. (2021) analisaram 563 isolados de diferentes amostras de cavernas ferruginosas no Quadrilátero Ferrífero de Minas Gerais e identificaram que 14 isolados bacterianos foram promissores para solubilização de fosfato. Esses resultados corroboram com o presente estudo, sugerindo que os isolados bacterianos de cavernas ferríferas são fontes promissoras para futuras aplicações biotecnológicas como biofertilizantes e bioinoculantes fosfatados.

De acordo com Pogson et al. (2011), os fosfatos são os únicos compostos estáveis em ambientes ácidos, o que pode explicar a presença de microrganismos solubilizadores de fosfato em regiões quentes e úmidas, como é o caso das cavernas ferríferas estudadas, que estão localizadas no domínio fitogeográfico amazônico (Li et al. 2022).

As ureases são metaloenzimas dependentes de Ni que catalisam a hidrólise da ureia em amônia e gás carbônico. Bactérias produtoras de urease são capazes de induzir a precipitação de calcita através da liberação de íons carbonato e aumento do pH (Cui et al. 2022). Alguns estudos têm demonstrado a capacidade de bactérias de cavernas em induzir a precipitação de carbonato de cálcio (CaCO_3) auxiliando na formação de espeleotemas, como estalactites e estalagmites (Daskalakis et al. 2015; TomczykŻak e Zielenkiewicz 2016, Jan et al. 2022; Koning et al. 2022).

Em nosso estudo, identificamos maior número de isolados produtores de urease em 24 horas apresentando a maior atividade ureolítica de 13.91 mm (Figura 15), quando comparado com o estudo de Koning et al (2022), que isolou somente 4 isolados produtores de urease após 24 horas. a partir de espeleotemas da caverna Cortina de Ferro no Canadá. Omerigie et al. (2016, 2018) selecionaram sete bactérias com base na rápida produção de urease quando testado em ágar base de ureia. Este ensaio de urease qualitativo é muito utilizado para isolamento e diferenciação de microrganismos ureolíticos (Elmanama e Alhour 2013; Hammad et al. 2013). Oliveira et al (2006) utilizou meio ágar a base de ureia, e verificou que o isolado de rizóbio nativo da Amazônia Central, INPA R-988 produziu a maior atividade ureolítica de 8,77 mm. Diferentemente no nosso estudo de solos cavernícolas da Amazônia Oriental, a maior atividade ureolítica foi de 13.91 mm (GMP201), seguido de 8,80 mm (GMA201) (Figura 15).

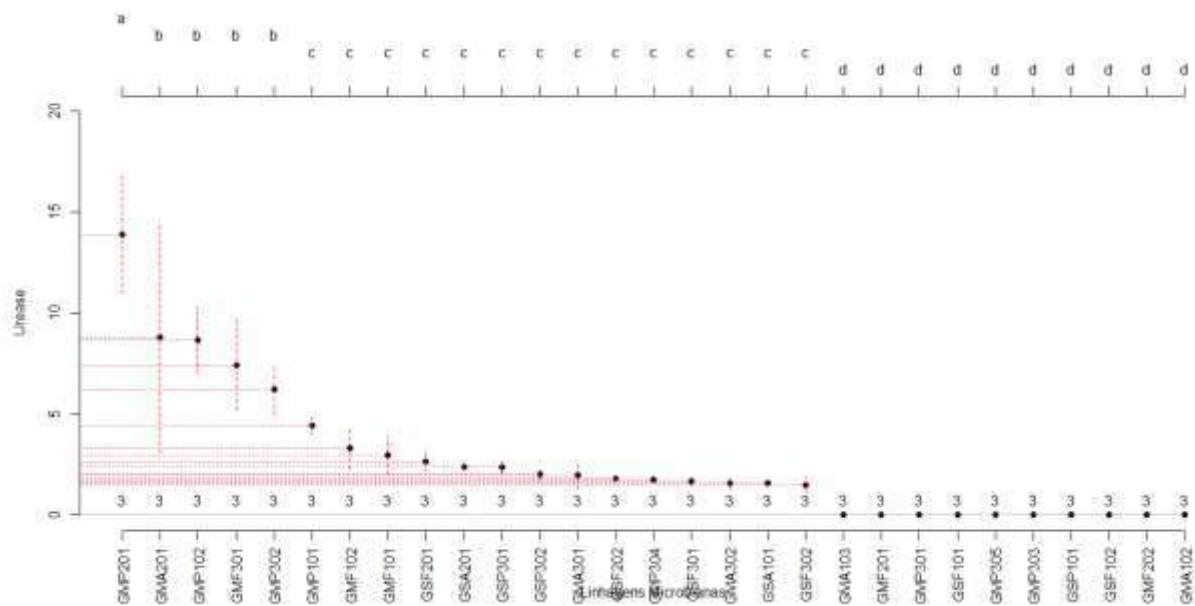


Figura 15. Produção de urease dos isolados bacterianos cavernícolas. Foram formados 4 grupos distintos. O grupo A é representado somente por GMP102. O grupo C possui o maior número de isolados (14) produtores de urease com índice enzimático entre 5 e 2 mm. Os representantes do grupo D não possui atividade ureolítica.

As cepas bacterianas maiores produtoras de urease (Figura 15) encontram-se nas zonas afóticas (ausência de luminosidade) das cavernas, onde os maiores depósitos de guano estão presentes. Esses isolados potenciais podem estar quebrando o guano

e degradando a uréia dos morcegos para produzir ácidos fortes, como sulfúrico e fosfórico, bem como ácido nítrico e outros ácidos orgânicos. Esses processos contribuem para aumentar a acidez na base dos depósitos de guano, com um pH baixo de 2-4 (Martini, 2000; Forti, 2001).

Além disso, outras bactérias produtoras de urease neste estudo podem estar desempenhando um papel na precipitação de carbonato, interagindo com o ferro encontrado em todas as áreas amostradas das cavernas (Tabela 1), contribuindo para a formação de depósitos secundários, como a siderita (FeCO_3). Em contraste com outro estudo realizado em quatro cavernas na Serra Norte em Carajás, Figueira (2018) observou que o ambiente químico não favoreceu a formação de FeCO_3 , pois não havia cálcio suficiente para formar esse mineral. Porém em nosso estudo as quantidades de cálcio são superiores ao encontrado por este autor (Tabela 1).

A via metabólica comum para a precipitação induzida de carbonato microbiológico é a via da ureólise, onde bactérias catalisam a uréia encontrada no ambiente, produzindo carbonato como subproduto por meio da enzima urease. Nesse caso, o carbonato é secretado fora da célula, onde interage com os íons de cálcio adsorvidos à célula por vias químicas (Banks et al. 2010; Chou et al. 2011; Castro-Alonso et al. 2019). Nosso estudo sugere que as bactérias ureolíticas isoladas de cavernas ferríferas, podem ser utilizadas em processos biotecnológicos, visto que a ureólise é o método mais amplamente relatado no processo precipitação de carbono induzido microbiologicamente (PCIM) para aplicações de engenharia geotécnica, devido que este é facilmente controlável e auxilia na indução de altos teores de CaCO_3 precipitado no período desejado (Dhami et al. 2013, Schwantes-Cezario et al. 2022).

A atividade lipolítica foi verificada em 55,17% dos isolados das cavernas ferríferas. Os isolados que apresentaram os maiores índices são da zona fótica e afótica da caverna GEM-1423. GMF201 produziu o maior índice de lipase de 20,33 mm, seguido de GMA102 com 9,13 mm (Figura 16). As lipases são enzimas pertencentes à família das hidrolases que tem como função biológica primordial catalisar a hidrólise de óleos e gorduras liberando ácidos graxos, diacilgliceróis, monoacilgliceróis e glicerol (Kanmani et al. 2015). Algumas reações orgânicas das lipases incluem acidólise, hidrólise, epoxidação, esterificação, alcoólise, aminação e transesterificação (Quayson et al. 2020).

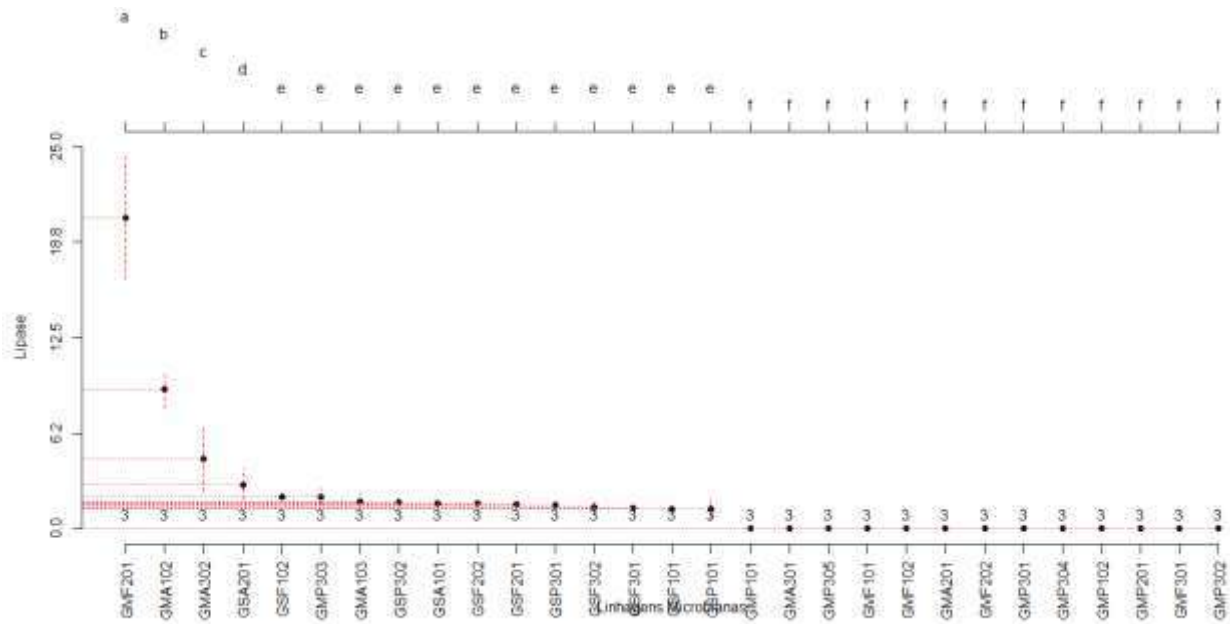


Figura 16. Índices enzimáticos de atividade lipolítica dos isolados bacterianos cavernícolas. Os isolados GMF201, GMA102, GMA302 e GSA201 respectivamente dos grupos A, B, C e D foram os maiores produtores de isolados com o índice enzimático entre 6 e 20 mm. Os isolados do grupo F não produziram nenhuma atividade enzimática lipolítica.

Na literatura há relato da identificação de 49 bactérias na caverna Gumki na Índia, sendo que 37 apresentaram elevada atividade enzimática lipolítica, cerca de 2,68 (Rautela et al. 2017). Em nosso estudo verificou-se um índice ainda maior de 20,33 mm. Tomoval et al. (2013) realizou uma pesquisa sobre actinobactérias em cavernas de Magura, na Bulgária e descobriu que 87% dessas bactérias produziam a enzima lipase. Esse resultado demonstra que microrganismos cavernícolas são capazes de sobreviver em ambientes extremos produzindo enzimas como a lipase, que são capazes de funcionar nessas condições adversas. Além disso, esses microrganismos são capazes de formar biofilmes em cavernas como uma estratégia importante para se adaptarem e sobreviverem em ambientes ácidos e altas concentrações de metais.

Afzal et al. (2021) observaram que a produção de lipase por microrganismos cavernícolas no Paquistão, não é estável em pH 4, mas a estabilidade foi observada em três cepas de *B. subtilis* (AF-3), AF-6 e AF-23 em pH 10, 7,8 e 6, respectivamente. A produção de enzimas pelos microrganismos é influenciada pelas condições ambientais, como temperatura, pH e presença de indutores ou repressores.

Hamedi et al. (2019) utilizaram Tween-80 para avaliar a atividade de esterase e rodamina-azeite para atividade de lipase em actinobactérias de cavernas. Eles descobriram que apenas 9,21% dos 79 isolados apresentaram atividade utilizando Tween-80 como fonte de carbono, enquanto 23,68% apresentaram atividade para rodamina-azeite. Além disso, eles descobriram que há uma relação entre a atividade enzimática e as fontes ambientais das cepas, pois os maiores produtores das atividades enzimáticas de esterase e lipase foram isolados de amostras ambientais ricas em matéria orgânica. Microrganismos produtores de esterase/lipase liberam

Lima et al. (2023) verificou que 9 cepas bacterianas da caverna GEM-1462 possuem alta atividade enzimática proteolítica, sendo o menor índice enzimático bacteriano de 11.58 mm da zona de entrada e 20.33 mm da zona afótica. Este estudo inferiu que a produção de protease é possivelmente derivada do guano, como a principal fonte de energia para a microbiota cavernícola, e que a maior atividade não está relacionada com a quantidade de microrganismos isolados, mas com os índices enzimáticos produzidos por essas cepas.

De acordo com Vranova et al. (2013), proteases derivadas de processos microbianos são consideradas importantes devido às diferentes propriedades cinéticas e respostas a fatores ambientais em uma gama de ecossistemas, incluindo as cavernas. Martinez et al. (2011) afirmaram que medir a atividade enzimática extracelular é uma maneira de avaliar as respostas microbianas à disponibilidade de nutrientes.

Os baixos níveis de nutrientes nas cavernas promovem a competição de microrganismos pela produção de quantidades de substâncias exopoliméricas, enzimas e metabólitos antimicrobianos, o que é uma das estratégias para a sobrevivência desses microrganismos (Slattery et al. 2001). As bactérias cavernícolas e as enzimas produzidas por elas, podem desempenhar um papel importante nos processos de reciclagem, decomposição e mineralização de uma ampla gama de polímeros orgânicos, principalmente na zona afótica, devido à predominante oligotrofia e à falta de luz para suportar a fotossíntese (Paula et al. 2021). Assim, o ecossistema cavernícola é altamente especializado, dependente principalmente de aportes de carbono alóctone, sem produção primária baseada na fotossíntese autóctone (Ravn et al. 2020).

Tomova et al (2013) verificaram que as bactérias isoladas de caverna calcária, apresentam capacidade de produzir enzimas hidrolíticas, destacando-se as proteases em que 87% dos isolados apresentaram atividade proteolítica, e que ao utilizar leite desnatado, favoreceu uma maior atividade (68%) quando comparado com a utilização do substrato gelatina (51%). Zada (2017) observou que bactérias de uma caverna do Paquistão, apresenta atividade proteolítica entre 24 a 72 horas, e que esta pode ser influenciada pelo pH, sendo a maior atividade demonstrada por *Bacillus subtilis* AB-3 em pH 7.

As proteases são enzimas complexas que podem diferir umas das outras em propriedades como especificidade do substrato, sítio ativo e mecanismo de ação. A proteólise é um processo importante no que diz respeito a ciclagem de N em muitos ecossistemas, sendo esta considerada uma etapa limitante da taxa durante a mineralização do N nos solos (Weintraub e Schimel 2005) devido à fase primária muito mais lenta de mineralização de proteínas em comparação com a mineralização de aminoácidos (Jan et al. 2009).

A sintetização da protease por microrganismos extremos, como as cavidades subterrâneas, demonstra a capacidade desses isolados serem utilizados em estudos futuros com aplicações biotecnológicas como, biocombustíveis (Barnard et al., 2010), biomineração (Vera et al., 2013) e carotenóides (Charlesworth et al., 2015).

Em ambientes extremos, como as cavernas, os microrganismos tendem a utilizar uma ampla gama de carboidratos, provavelmente como consequência da pequena quantidade de entrada de celulose, combinada com a presença de poucas espécies competidoras nesses habitats (Lynd et al. 2002). A celulose é um homopolímero de unidades D -glicose unidas por ligações β -1,4 (Romeo 2008). É a biomassa mais abundante e um dos principais componentes estruturais das plantas e uma fonte renovável de energia na biosfera (Klem et al. 2005).

O maior índice de produção de celulase (Figura 18) foi de dois isolados da zona afótica da caverna GEM-1423. GMA302 produziu 12,77 mm e GMA301 com índice enzimático de 12,51 mm. O estudo de Paula et al. (2016) corrobora em partes com este estudo, onde o grupo formado por 3 isolados que apresentam a menor produção de celulase foi GMP305 (2,37 cm) isolado da zona de penumbra, onde o mesmo índice aproximado do encontrado pelo autor que possui maior atividade celulolítica e da mesma zona deste estudo. Os menores índices de celulase foram das cepas da zona de entrada de GSF101 (2,23 mm) e GSF301 (2,17 mm).

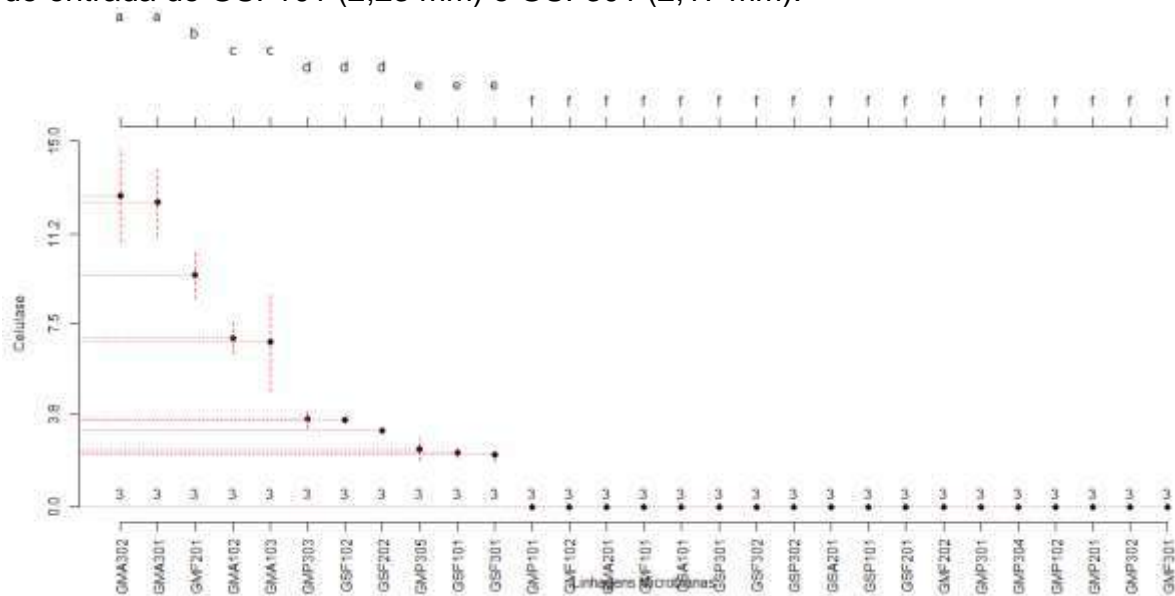


Figura 18. Índice de atividade celulolítica após 72 horas de cultivo dos isolados. Foram formados 6 grupos. A maior produção de celulase é de GMA302 (12,77 mm) do grupo A e GMA301 (12,51 mm) do grupo B. As cepas bacterianas do grupo F não apresentaram atividade celulolítica.

Lima et al. (2023) verificou que 7 cepas bacterianas da caverna GEM-1462, possui atividade celulolítica, sendo representada por dois grandes grupos, um com baixo índice de atividade e o outro alto. Dentro desses grupos, a semelhança entre atividades foi alta e a zona de isolamento das cepas microbianas não influenciou a similaridade dos dados. Em nosso estudo, mesmo com uma maior concentração de serrapilheira e raízes na entrada da caverna GEM-1462, os isolados da zona de entrada não apresentaram elevada atividade celulolítica, quando comparada com os maiores produtores de celulase que são da zona afótica. As atividades celulolíticas das cepas bacterianas isoladas dependem das fontes e quantidade de resíduos biológicos em ambientes naturais (Gopinath et al. 2012), como as cavernas.

Considerando a capacidade dos isolados bacterianos cavernícolas em produzir altos índices de celulase, como organismos extremófilos, é possível explorar o potencial dessas enzimas na produção de carboidratos, tais como trealose e ectoína. Esses compostos podem ser utilizados como estabilizadores em produtos como anticorpos e vacinas (Arguelles, 2000; Guo et al., 2000).

Conclusão

Os solos cavernícolas ferríferos de Carajás caracterizam-se pela alta acidez, e que está diminuiu as abundâncias microbianas em todas as amostras, logo impactado na significância da diversidade microbiana.

A uniformidade significativa dos gêneros bacterianos, indica a ocorrência de processos de transporte bacteriano através da percolação de água, em que o gotejamento, pode estar auxiliando na deposição dos grupos bacterianos nas paredes e pisos das cavidades subterrâneas, em virtude da canga ser mais permeável, porosa, acumulando água por um longo período.

Os metais Ca, Pb, Cu, Fe, P, Mg, Mn, Ni, K e Zn demonstraram significância em todas as atividades enzimáticas, apresentando correlação com *Bacillus*, *Blastopirellula*, *Lactobacillus*, *Serratia* e um gênero não cultivável das cavernas analisadas.

Os depósitos de guano dos morcegos nos solos das zonas de penumbra e afótica e das cavernas analisadas, podem estar atuando como fonte de carbono, devido a riqueza em carbono, nitrogênio, fosforo e potássio, e assim impulsionando energia para a atividade enzimática microbiana, visto que os maiores produtores enzimáticos foram os isolados dessas zonas.

Os índices enzimáticos elevados produzidos pelas cepas bacterianas cavernícolas revelam a diversidade e propriedades excepcionais de extremozimas com possíveis aplicabilidades biotecnológicas e até mesmo envolvida em processos de biogênese, devido à alta reprodutibilidade e desempenho com as diferentes fontes de carbono avaliadas.

Os resultados deste estudo serão úteis para o Plano de Manejo do Parque Nacional dos Campos Ferruginosos, no que tange a informações bioespeleológicas no campo da microbiologia, visto que estas são escassas, visando assim contribuir para a conservação das cavernas ferríferas de Carajás, e principalmente para a elucidação da sistemática das comunidades bacterianas e futuras aplicações biotecnológicas.

Referências

- Afzal, M et al (2021) Bacteria isolated from a limestone cave and its ability to produce industrially important enzymes. *Journal of Bacteriology and Mycology Open Access*, v. 9, n. 3, p. 104-113.
- Albuquerque, ARL et al (2017) Espeleotemas fosfáticos em cavernas ferríferas de Carajás e uma nova ocorrência de esfeniscidita. *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal do Pará, Belém, Pará.
- Alaoui-Sosse, B., Ozaki, S., Barriquand, L., De Luca, D., Cennamo, P., Valot, B., ... & Pfendler, S. (2023). Assessment of microbial communities colonizing the Azé prehistoric cave. *Journal of Cultural Heritage*, 59, 1-9.
- Alves-Júnior, M et al (2021) Functional and morphological analysis of isolates of phylloplane and rhizoplane endophytic bacteria interacting in different cocoa production systems in the Amazon. *Current Research in Microbial Sciences*, v. 2, p. 100039.
- Anandan R., Dharumadurai D., Manogaran G.P (2016) *Actinobacteria-Basics and Biotechnological Applications*. IntechOpen; London, UK:.
- Andrade, PB (2019) Solos e vegetação associados a cavidades naturais subterrâneas no geossistema ferruginoso da Serra dos Carajás-Pará. *Dissertação de Mestrado*. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais.
- AOAC (2015) *Official Methods of Analysis*. Association of Official Analytical Chemists. 18th Edition, AOAC, Arlington, 806-814.
- Araújo, ADM (2021) *Geoquímica ambiental de elementos potencialmente tóxicos (As, Cd, Cu, Cr e Ni) na Bacia Hidrográfica do Rio Itacaiúnas, província mineral de Carajás/PA. Relatório Técnico*. Instituto Tecnológico Vale, Belém, Pará.
- Araújo, H. W. C., Ceballos, B. S. O., & Campos-Takaki, G. M. (2009). Biosurfactant production by *Chromobacterium prodigiosum*. In *Current Research Topics In Applied Microbiology And Microbial Biotechnology* (pp. 676-680).
- Argüelles, JC (2000) Physiological roles of trehalose in bacteria and yeasts: a comparative analysis. *Archives of Microbiology*, v. 174, p. 217-224.
- Azevedo, FA et al (2003) *Metais: gerenciamento da toxicidade*. Editora Atheneu, São Paulo, 166 p.
- Bahia GR, Ferreira RL (2005) Influência das características físico-químicas e da matéria orgânica de depósitos recentes de guano de morcego na riqueza e diversidade de invertebrados de uma caverna calcária. *Revista Brasileira de Zoociência*, v. 7, n. 1, p. 165–180.

Bai, XT et al (2021) Relative importance of soil properties and heavy metals/metalloids to modulate microbial community and activity at a smelting site. *Journal of Soils and Sediments*, v. 21, p. 1-12.

Banks, ED et al (2010) Bacterial calcium carbonate precipitation in cave environments: a function of calcium homeostasis. *Geomicrobiology Journal*, v. 27, n. 5, p. 444-454.

Banon, S. K., Murdock, C. A., Blair, B. G., Blair, B. B., Meade, M. E., & Barger, T. W. (2010). ANALYSIS OF BACTERIAL DIVERSITY IN SOILS FROM BLOWIN SPRING CAVE (LAUDERDALE COUNTY, AL). *Journal of the Alabama Academy of Science*, 81(1).

Banskar, S et al (2016) Microbiome analysis reveals the abundance of bacterial pathogens in *Rousettus leschenaultii* guano. *Scientific Reports*, v. 6, n. 1, p. 1-13.

Barberán, A et al (2017) Hiding in plain sight: mining bacterial species records for phenotypic trait information. *MSphere*, v. 2, n. 4, p. e00237-17.

Bardgett, RD, Van Der Putten WH (2014) Belowground biodiversity and ecosystem functioning. *Nature*, v. 515, n. 7528, p. 505-511.

Barns, S. M., Cain, E. C., Sommerville, L., & Kuske, C. R. (2007). Acidobacteria phylum sequences in uranium-contaminated subsurface sediments greatly expand the known diversity within the phylum. *Applied and environmental microbiology*, 73(9), 3113-3116.

Barton, H. A. (2015). 4. Starving Artists: Bacterial Oligotrophic Heterotrophy in Caves. In *Microbial life of cave systems* (pp. 79-104). De Gruyter.

Barton, H. A., Taylor, M. R., & Pace, N. R. (2004). Molecular phylogenetic analysis of a bacterial community in an oligotrophic cave environment. *Geomicrobiology Journal*, 21(1), 11-20.

Barton, HA (2006) Introduction to cave microbiology: a review for the non-specialist. *Journal of cave and karst studies*, v. 68, n. 2, p. 43-54.

Barton, HA et al (2007) Geomicrobiology in cave environments: past, current and future perspectives. *Journal of Cave and Karst Studies*, v. 69, n. 1, p. 163-178.

Bartram, AK et al (2014) Exploring links between pH and bacterial community composition in soils from the Craibstone Experimental Farm. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 87, n. 2, p. 403-415.

Baskar, S., Baskar, R., Lee, N., Kaushik, A., & Theophilus, P. K. (2008). Precipitation of iron in microbial mats of the spring waters of Borra Caves, Vishakapatnam, India: some geomicrobiological aspects. *Environmental Geology*, 56, 237-243.

Bernard, E et al (2022) Bats as ecosystem engineers in iron ore caves in the Carajás National Forest, Brazilian Amazonia. *bioRxiv*, p. 2022.04. 19.488750.

Bharti, R. K., Srivastava, S., & Thakur, I. S. (2014). Extraction of extracellular lipids from chemoautotrophic bacteria *Serratia* sp. ISTD04 for production of biodiesel. *Bioresource technology*, 165, 201-204.

Biagioli, F et al (2023) Microbial diversity and proxy species for human impact in Italian karst caves. *Scientific Reports*, v. 13, n. 1, p. 689.

Billah, M et al (2019). Phosphorus and phosphate solubilizing bacteria: Keys for sustainable agriculture. *Geomicrobiology Journal*, v. 36, n. 10, p. 904-916.

Bortolon L, Gianello C (2010) Simultaneous multielement extraction with the Mehlich-1 solution for Southern Brazilian soils determined by ICP-OES and the effects on the nutrients recommendations to crops. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v. 34, p. 125-132.

Bortolon L, Gianello C, Schindwein JA (2009) Avaliação da disponibilidade de fósforo no solo para o milho pelos métodos Mehlich-1 e Mehlich-3. *Scientia Agraria*, v. 10, n. 4, p. 305-312.

Braga RM, Dourado MN; Araújo WL (2016) Microbial interactions: ecology in a molecular perspective. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 47, p. 86-98.

Brannen-Donnelly, K., & Engel, A. S. (2015). Bacterial diversity differences along an epigenic cave stream reveal evidence of community dynamics, succession, and stability. *Frontiers in Microbiology*, 6, 729.

Brito RSC, Silva MG, Kuyumjian RM (2010) Modelos de depósitos de cobre do Brasil e sua resposta ao intemperismo.

Burgoyne, J., Crepeau, R., Jensen, J., Smith, H., Baker, G., & Leavitt, S. D. (2021). Lampenflora in a show cave in the Great Basin is distinct from communities on naturally lit rock surfaces in nearby wild caves. *Microorganisms*, 9(6), 1188.

Caporaso JG et al (2010) QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods*, v. 7, n. 5, p. 335-336.

Carmichael, M. J., Carmichael, S. K., Santelli, C. M., Strom, A., & Bräuer, S. L. (2013). Mn (II)-oxidizing bacteria are abundant and environmentally relevant members of ferromanganese deposits in caves of the upper Tennessee River Basin. *Geomicrobiology Journal*, 30(9), 779-800.

Carvalho Filho A (2008) Solos e Ambientes do Quadrilátero Ferrífero (MG) e Aptidão Silvicultural dos Tabuleiros Costeiros, Tese de Doutorado, Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais.

Castaño-Sánchez A, Hose GC, Reboleira ASPS (2020) Ecotoxicological effects of anthropogenic stressors in subterranean organisms: A review. *Chemosphere*, v. 244, p. 125422.

Castro-Alonso, MJ et al (2019) Microbially induced calcium carbonate precipitation (MICP) and its potential in bioconcrete: microbiological and molecular concepts. *Frontiers in Materials*, v. 6, p. 126.

Chang, SJ et al (2010) Oxygen isotope, micro-textural and molecular evidence for the role of microorganisms in formation of hydroxylapatite in limestone caves, South Korea. *Chemical Geology*, v. 276, n. 3-4, p. 209-224.

Charlesworth JC, Burns BP (2015) Untapped resources: biotechnological potential of peptides and secondary metabolites in archaea. *Archaea*, v. 2015.

Cheeptham N (2013) Advances and challenges in the study of microbial diversity in caves. In: Cheeptham N, editor. *Cave Microbiomes: A Novel Resource for Drug Discovery*. Berlin: Springer. pp. 35–45.

Chen, Y et al (2022) Whole-genome sequencing and potassium-solubilizing mechanism of *Bacillus aryabhatai* SK1-7. *Frontiers in Microbiology*, p. 3687.

Chou, CW et al (2011) Biocalcification of sand through ureolysis. *Journal of Geotechnical and Geoenvironmental Engineering*, v. 137, n. 12, p. 1179-1189.

Corbellini, VA et al (2007). Comparison of lipolytic activity of *Sporothrix schenckii* strains utilizing olive oil-Rhodamine B and tween 80. *Tecno-lógica*. Santa Cruz do Sul, RS. Vol. 11, n. 1-2 (Jan./dez. 2007), p. 33-36.

Corrêa GR (2011) Pedogênese em platôs de canga ferrífera e basaltos na Serra dos Carajás-PA. Tese de Doutorado. Tese (Doutorado em solos e nutrição de plantas). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

Corrêa GR, Schaefer CEGR, Corrêa GF, Gilkes RJ, Medonça BAF, Nunes JA, Prakongkep N (2016) Caracterização dos solos derivados de rochas máficas na Serra dos Carajás. *Bol. Mus. Para. Emílio Goeldi. Nat., Belém*, v. 11, n. 1, p. 33-47.

Costa, O. Y., Raaijmakers, J. M., & Kuramae, E. E. (2018). Microbial extracellular polymeric substances: ecological function and impact on soil aggregation. *Frontiers in microbiology*, 9, 1636.

Costa, UAP (2006) Avaliação dos processos geradores do minério de Ferro da serra norte de carajás, sudeste do Pará. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Pará, Belém, Pará.

Cui, Ming-Juan et al. A quantitative, high-throughput urease activity assay for comparison and rapid screening of ureolytic bacteria. *Environmental Research*, v. 208, p. 112738, 2022.

Cuzzi, C et al (2011) Enzimas extracelulares produzidas por fungos endofíticos isolados de *Baccharis Dracunculifolia* DC (ASTERACEAE). *Global Science and Technology*, v. 4, n. 2.

D'angeli, IM et al (2019). Geomicrobiology of a seawater-influenced active sulfuric acid cave. *PLoS One*, v. 14, n. 8, p. e0220706.

Da Silva Abreu, S et al (2019) Gênese de Cavernas da Serra Norte, Carajás, Pará com base em estudos petrográficos e geoquímicos de Formações Ferríferas Bandadas. *Geologia USP. Série Científica*, v. 19, n. 2, p. 67-88.

Dalmaso GZL, Ferreira D, Vermelho AB (2015). Marine extremophiles: a source of hydrolases for biotechnological applications. *Marine drugs*, v. 13, n. 4, p. 1925-1965.

Dan W, Shi-Gong WANG, Ke-Zheng SHANG (2006) Progress in research of acid rain in China. *Journal of Arid Meteorology*, v. 24, n. 2, p. 70.

De Issaly, ISM, Stoppani, AOM (1964) Carbohydrate Metabolism in *Pasteurella multocida*. III. Incorporation of Glucose Carbon into the Cell-Wall Polysaccharide. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, v. 115, n. 3, p. 671-673.

De Mandal S, Chatterjee R, Kumar NS (2017) Dominant bacterial phyla in caves and their predicted functional roles in C and N cycle. *BMC Microbiology*, v. 17, n. 1, p. 1-9.

De Mandal, S., Panda, A. K., Bisht, S. S., & Kumar, N. S. (2015). First report of bacterial community from a bat guano using Illumina next-generation sequencing. *Genomics Data*, 4, 99-101.

De Mandal, S., Panda, A. K., Lalnunmawii, E., Bisht, S. S., & Kumar, N. S. (2015). Illumina-based analysis of bacterial community in Khuangcherapuk cave of Mizoram, Northeast India. *Genomics data*, 5, 13-14.

De Mandal, S., Sanga, Z., & Senthil Kumar, N. (2015). Metagenome sequencing reveals *Rhodococcus* dominance in Farpuk Cave, Mizoram, India, an Eastern Himalayan biodiversity hot spot region. *Genome announcements*, 3(3), e00610-15.

Dhami NK, Reddy MS, Mukherjee A (2013) Biomineralization of calcium carbonates and their engineered applications: a review. *Frontiers in Microbiology*, v. 4, p. 314.

Dimkić, I., Fira, D., Janakiev, T., Kabić, J., Stupar, M., Nenadić, M., ... & Grbić, M. L. (2021). The microbiome of bat guano: for what is this knowledge important?. *Applied microbiology and biotechnology*, 105, 1407-1419.

Dini-Andreote, F et al (2015) Disentangling mechanisms that mediate the balance between stochastic and deterministic processes in microbial succession. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 112, n. 11, p. E1326-E1332.

Do Carmo FF, Jacobi CM (2016). Diversity and plant trait-soil relationships among rock outcrops in the Brazilian Atlantic rainforest. *Plant and Soil*, v. 403, p. 7-20.

Dominguez-Moñino, I., Jurado, V., Gonzalez-Pimentel, J. L., Miller, A. Z., Hermosin, B., & Saiz-Jimenez, C. (2018). *Bacillus onubensis* sp. nov., isolated from the air of two Andalusian caves. *Systematic and applied microbiology*, 41(3), 167-172.

Donagemma, GK et al (2003) Dispersão de Latossolos em resposta à utilização de pré-tratamentos na análise textural. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v. 27, p. 765-772.

Duncan TR, Werner-Washburne M, Northup, DE (2021) Diversity of siderophore-producing bacterial cultures from carlsbad caverns national park (ccnp) caves, carlsbad, New Mexico. *Journal of cave and karst studies: the National Speleological Society Bulletin*, v. 83, n. 1, p. 29.

Elmanama AA, Alhour MT (2013) Isolation, characterization and application of calcite producing bacteria from urea rich soils. *Journal of Advanced Science and Engineering Research*, v. 3, n. 4, p. 388-399.

Elshaghabe, F. M., Rokana, N., Gulhane, R. D., Sharma, C., & Panwar, H. (2017). *Bacillus* as potential probiotics: status, concerns, and future perspectives. *Frontiers in microbiology*, 1490.

EMBRAPA. Correção da acidez do solo (2021) Disponível em: <<https://www.embrapa.br/en/agencia-de-informacao-tecnologica/cultivos/arroz/producao/sistema-de-cultivo/arroz-irrigado-na-regiao-tropical/correcao-do-solo-e-adubacao/correcao-da-acidez-do-solo>>. Acesso em 03 mar. 2023.

EMBRAPA. Embrapa Solos (2017) Manual de métodos de análise de solo / Paulo César Teixeira ... [et al.], editores técnicos. – 3. ed. rev. e ampl. – Brasília, DF : Embrapa.

Engel AS, Stern LA, Bennett Philip C (2004) Microbial contributions to cave formation: new insights into sulfuric acid speleogenesis. *Geology*, v. 32, n. 5, p. 369-372.

Engel, Annette Summers; RANDALL, Kelli Willson. Experimental evidence for microbially mediated carbonate dissolution from the saline water zone of the Edwards Aquifer, Central Texas. *Geomicrobiology Journal*, v. 28, n. 4, p. 313-327, 2011.

Engel, AS (2015) (Ed.). *Microbial life of cave systems*. De Gruyter.

Engel, AS (2019). *Microbes*. In: *Encyclopedia of caves*. Academic Press. p. 691-698.

Engel, AS et al (2004) Bacterial diversity and ecosystem function of filamentous microbial mats from aphotic (cave) sulfidic springs dominated by chemolithoautotrophic “Epsilonproteobacteria”. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 51, n. 1, p. 31-53.

FAO (2006) *Plant nutrition for food security. A guide for integrated nutrient management*. *FAO Fertilizer and Plant Nutrition Bulletin* 16: 362-368.

Felestrino ÉB et al (2017) Plant growth promoting bacteria associated with *Langsdorffia hypogaea*-rhizosphere-host biological interface: a neglected model of bacterial prospecting. *Frontiers in microbiology*, v. 8, p. 172.

Feng C et al (2022) Microdroplet-Based In Situ Characterization Of The Dynamic Evolution Of Amorphous Calcium Carbonate during Microbially Induced Calcium Carbonate Precipitation. *Environmental Science & Technology*, v. 56, n. 15, p. 11017-11026.

Feng J et al (2021) Microbial induced calcium carbonate precipitation study using *Bacillus subtilis* with application to self-healing concrete preparation and characterization. *Construction and Building Materials*, v. 280, p. 122460.

Feng, L., Liu, D., Sun, X., Wang, G., & Li, M. (2016). *Bacillus cavernae* sp. nov. isolated from cave soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(2), 801-806.

Ferreira RL (2019) Guano communities. In: *Encyclopedia of caves*. Academic Press. p. 474-484.

Fierer, N., Bradford, M. A., & Jackson, R. B. (2007). Toward an ecological classification of soil bacteria. *Ecology*, 88(6), 1354-1364.

Figueira RL (2018) Sulfatos e fosfatos em cavernas da Amazônia oriental, Brasil. Dissertação de Mestrado, Universidade de Brasília, Brasília, Distrito Federal.

Fuerst, J. A. (2017). Planctomycetes—new models for microbial cells and activities. In *Microbial resources* (pp. 1-27). Academic Press.

Gabriel CR, Northup DE (2013) Microbial ecology: caves as an extreme habitat. In: *Cave microbiomes: a novel resource for drug discovery*. Springer, New York, NY, p. 85-108.

Gade, D., Schlesner, H., Glöckner, F. O., Amann, R., Pfeiffer, S., & Thomm, M. (2004). Identification of planctomycetes with order-, genus-, and strain-specific 16S rRNA-targeted probes. *Microbial Ecology*, 47, 243-251.

Ghasemi MF, Bakhtiari MR, Fallahpour M, Noohi A, Moazami N, Amidi Z (2004) Screening of Urease Production by *Aspergillus niger* Strains. *Iran. Biomed. J.*, v. 8, n.1, p. 47-50.

Ghedin GS (2021) Padrões da comunidade de invertebrados associados a depósitos de guano de morcegos insetívoros em bat caves do semiárido brasileiro. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco.

Glöckner FO et al (2017) 25 years of serving the community with ribosomal RNA gene reference databases and tools. *Journal of Biotechnology*, v. 261, p. 169-176.

Goberna M, Verdú M (2016) Predicting microbial traits with phylogenies. *The ISME Journal*, v. 10, n. 4, p. 959-967.

Goldscheider N, Hunkeler D, Rossi P (2006) Microbial biocenoses in pristine aquifers and an assessment of investigative methods. *Hydrogeology Journal*, v. 14, p. 926-941.

Gonzalez-Pimentel JL et al (2018) Yellow coloured mats from lava tubes of La Palma (Canary Islands, Spain) are dominated by metabolically active Actinobacteria. *Scientific reports*, v. 8, n. 1, p. 1-11.

Gonzalez-Pimentel, J. L., Martin-Pozas, T., Jurado, V., Miller, A. Z., Caldeira, A. T., Fernandez-Lorenzo, O., ... & Saiz-Jimenez, C. (2021). Prokaryotic communities from a lava tube cave in La Palma Island (Spain) are involved in the biogeochemical cycle of major elements. *PeerJ*, 9, e11386.

Gopinath, SM, Shareef I, Ashalatha RS (2012) Isolation, screening and purification of cellulase from cellulase producing *Klebsiella variicola* RBER3 (KF036184. 1). *Int J Sci Res*, v. 3, p. 2319-7064.

Guerra LCC, Lemes CGC, Moreira LM (2022) Potencial Biotecnológico De Bactérias Cultiváveis Obtidas A Partir Da Gruta Martimiano Ii, Parque Estadual do Ibitipoca–MG. *Revista Brasileira de Espeleologia-RBEsp*, p. 62-86, 2022.

Guo H et al (2017) Understanding the variation of microbial community in heavy metals contaminated soil using high throughput sequencing. *Ecotoxicology and environmental safety*, v. 144, p. 300-306.

Guo N et al (2000) Trehalose expression confers desiccation tolerance on human cells. *Nature biotechnology*, v. 18, n. 2, p. 168-171.

Gupta, A., Dutta, A., Sarkar, J., Panigrahi, M. K., & Sar, P. (2018). Low-abundance members of the Firmicutes facilitate bioremediation of soil impacted by highly acidic mine drainage from the Malanjkhand copper project, India. *Frontiers in microbiology*, 9, 2882.

Haidău, C., Năstase-Bucur, R., Bulzu, P., Levei, E., Cadar, O., Mirea, I. C., ... & Moldovan, O. T. (2022). A 16S rRNA Gene-Based Metabarcoding of Phosphate-Rich Deposits in Muierilor Cave, South-Western Carpathians. *Frontiers in Microbiology*, 13.

Hamedi J, Kafshnouchi M, Ranjbaran M (2019) A study on actinobacterial diversity of Hampoeil cave and screening of their biological activities. *Saudi Journal of Biological Sciences*, v. 26, n. 7, p. 1587-1595.

Hammad, IA.; Talkhan, F. N.; Zoheir, A. E. Urease activity and induction of calcium carbonate precipitation by *Sporosarcina pasteurii* NCIMB 8841. *Journal of Applied Sciences Research*, v. 9, n. 3, p. 1525-1533, 2013.

Hashmi, Isha & Bindschedler, Saskia & Junier, Pilar. (2020). Firmicutes. In: Amaresan, N., Senthil Kumar, M., Annapurna, K., Kumar, K., Sankaranarayanan, A. (Eds.), *Beneficial Microbes in Agro-Ecology: Bacteria and Fungi*. Elsevier, Academic Press, pp. 363–396.

Heberle H et al (2015) InteractiVenn: a web-based tool for the analysis of sets through Venn diagrams. *BMC bioinformatics*, v. 16, p. 1-7.

Hemme, CL et al (2010) Metagenomic insights into evolution of a heavy metal-contaminated groundwater microbial community. *The ISME journal*, v. 4, n. 5, p. 660-672.

Hershey OS, Barton HA (2018) The microbial diversity of caves. *Cave ecology*, p. 69-90.

Hou, D et al (2020) Simultaneous removal of iron and manganese from acid mine drainage by acclimated bacteria. *Journal of hazardous materials*, v. 396, p. 122631, 2020.

Hu X, Chen J, Guo J (2006) Two phosphate-and potassium-solubilizing bacteria isolated from Tianmu Mountain, Zhejiang, China. *World journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 22, n. 9, p. 983-990.

Irfan M et al (2012) Isolation and screening of cellulolytic bacteria from soil and optimization of cellulase production and activity. *Turkish Journal of Biochemistry/Turk Biyokimya Dergisi*, v. 37, n. 3.

IUCN SSC (2014) IUCN SSC Guidelines for minimizing the negative impact to bats and other cave organisms from guano harvesting. Ver. 1.0. IUCN, Gland.

Ivanova, V., Tomova, I., Kamburov, A., Tomova, A., Vasileva-Tonkova, E., & Kambourova, M. (2013). High phylogenetic diversity of bacteria in the area of prehistoric paintings in Magura Cave, Bulgaria. *Journal of Cave & Karst Studies*, 75(3).

Jan MT et al (2009) Protein breakdown represents a major bottleneck in nitrogen cycling in grassland soils. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 41, n. 11, p. 2272-2282.

Jan SU et al (2022) Calcium carbonate precipitation by cave bacteria isolated from Kashmir Cave, Khyber Pakhtunkhwa, Pakistan. *Microscopy Research and Technique*, v. 85, n. 7, p. 2514-2525.

Jurado, V., Laiz, L., Rodriguez-Nava, V., Boiron, P., Hermosin, B., Sanchez-Moral, S., & Saiz-Jimenez, C. (2010). Pathogenic and opportunistic microorganisms in caves. *International Journal of Speleology*, 39(1), 2.

Kalivoda, E. J., Stella, N. A., Aston, M. A., Fender, J. E., Thompson, P. P., Kowalski, R. P., & Shanks, R. M. (2010). Cyclic AMP negatively regulates prodigiosin production by *Serratia marcescens*. *Research in Microbiology*, 161(2), 158-167.

Kallscheuer, N. (2018). Engineered microorganisms for the production of food additives approved by the European Union—A systematic analysis. *Frontiers in microbiology*, 9, 1746.

Kallscheuer, N., & Jogler, C. (2021). The bacterial phylum Planctomycetes as novel source for bioactive small molecules. *Biotechnology Advances*, 53, 107818.

- Kanmani P, Aravind J, Kumaresan K (2015) An insight into microbial lipases and their environmental facet. *International journal of environmental science and technology*, v. 12, p. 1147-1162.
- Kielak AM et al (2016) The ecology of Acidobacteria: moving beyond genes and genomes. *Frontiers in microbiology*, v. 7, p. 744.
- Kielak, A. M., Barreto, C. C., Kowalchuk, G. A., Van Veen, J. A., & Kuramae, E. E. (2016). The ecology of Acidobacteria: moving beyond genes and genomes. *Frontiers in microbiology*, 7, 744.
- Klein C, Ladeira A (2002). Petrography and geochemistry of the least altered banded iron-formation of the Archean Carajás Formation, northern Brazil. *Economic Geology*, v. 97, n. 3, p. 643-651.
- Klemm D et al (2005) Cellulose: fascinating biopolymer and sustainable raw material. *Angewandte chemie international edition*, v. 44, n. 22, p. 3358-3393.
- Klindworth A et al (2013). Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic acids research*, v. 41, n. 1, p. e1-e1.
- Koning K et al (2022) Biomineralization in Cave Bacteria—Popcorn and Soda Straw Crystal Formations, Morphologies, and Potential Metabolic Pathways. *Frontiers in Microbiology*, p. 2209.
- Kosznik-Kwaśnicka K et al (2022) Into the unknown: Microbial communities in caves, their role, and potential use. *Microorganisms*, v. 10, n. 2, p. 222.
- Kuenen, J. G. (2008). Anammox bacteria: from discovery to application. *Nature Reviews Microbiology*, 6(4), 320-326.
- Lamanna, C et al (2014) Functional trait space and the latitudinal diversity gradient. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 111, n. 38, p. 13745-13750.
- Lauber, C. L., Hamady, M., Knight, R., & Fierer, N. (2009). Pyrosequencing-based assessment of soil pH as a predictor of soil bacterial community structure at the continental scale. *Applied and environmental microbiology*, 75(15), 5111-5120.
- Lavoie KH et al (2017) Comparison of bacterial communities from lava cave microbial mats to overlying surface soils from Lava Beds National Monument, USA. *PloS one*, v. 12, n. 2, p. e0169339.
- Lee, L. H., Cheah, Y. K., Syakima, A. N., Shiran, M. S., Tang, Y. L., Lin, H. P., & Hong, K. (2012). Analysis of Antarctic proteobacteria by PCR fingerprinting and screening for antimicrobial secondary metabolites. *Genetics and Molecular Research*, 11(2), 1627-1641.

Lemes CGC (2018) Diversidade metagenômica e potencial biotecnológico de cavernas de canga do Quadrilátero Ferrífero. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Minas Gerais.

Lemes CGC et al (2021) Potential bioinoculants for sustainable agriculture prospected from ferruginous caves of the iron Quadrangle/Brazil. *Sustainability*, v. 13, n. 16, p. 9354.

Leon MP et al (2018) Bacterial diversity of bat guano from Cabalyorisa Cave, Mabini, Pangasinan, Philippines: A first report on the metagenome of Philippine bat guano. *PloS one*, v. 13, n. 7, p. e0200095.

Lian B, Ye C, Yuan T (2010) "Microbes on carbonate rocks and pedogenesis in karst regions." *Journal of Earth Science* 21: 293.

Lima, BA., dos Santos Scherer, R, Albino, UB, da Silva Siqueira, FF, Bitencourt, JAP, e dos Santos, SC (2023). Atividade enzimática e antimicrobiana de microrganismos isolados de uma caverna da região Amazônica. *Scientia Plena*, 19(4).

Lindenmayer ZG, Laux JH, Teixeira JBG (2008) Considerações sobre a origem das formações ferríferas da Formação Carajás, Serra dos Carajás. *Brazilian Journal of Geology*, v. 31, n. 1, p. 21-28.

Lindsay, M. R., Webb, R. I., Strous, M., Jetten, M. S., Butler, M. K., Forde, R. J., & Fuerst, J. A. (2001). Cell compartmentalisation in planctomycetes: novel types of structural organisation for the bacterial cell. *Archives of Microbiology*, 175, 413-429.

Liu B et al (2010) Denitrification gene pools, transcription and kinetics of NO, N₂O and N₂ production as affected by soil pH. *FEMS microbiology ecology*, v. 72, n. 3, p. 407-417.

Liu H et al (2020) Ecological responses of soil microbial abundance and diversity to cadmium and soil properties in farmland around an enterprise-intensive region. *Journal of hazardous materials*, v. 392, p. 122478.

Liu J et al (2018) Microbial community structure and function in sediments from e-waste contaminated rivers at Guiyu area of China. *Environmental Pollution*, v. 235, p. 171-179, 2018.

Liu Q et al (2010) Bacteria isolated from dripping water in the oligotrophic Heshang cave in Central China. *Journal of Earth Science*, v. 21, p. 325.

Liu Q et al (2022) Phylotypic diversity of bacteria associated with speleothems of a silicate cave in a Guiana Shield tepui. *Microorganisms*, v. 10, n. 7, p. 1395.

Louca S et al (2018) Function and functional redundancy in microbial systems. *Nature ecology & evolution*, v. 2, n. 6, p. 936-943.

Luang-In V et al (2019) Protease-Producing Bacteria from Soil in Nasinuan Community Forest, Mahasarakham Province, Thailand. *Biomedical and Pharmacology Journal*, v. 12, n. 2, p. 587-595.

Lynd LR et al (2002) Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiology and molecular biology reviews*, v. 66, n. 3, p. 506-577.

Macambira JB, Schrank A (2002) Químio-estratigrafia e evolução dos jaspilitos da Formação Carajás (PA). *Revista Brasileira de Geociências*, v. 32, n. 4, p. 567-578.

Machado HA et al (2018) Couraças ferruginosas e solos associados em diferentes ambientes do Quadrilátero Ferrífero. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais.

Martinez NG (2012) Extracellular Enzyme Activities in Soils and Ferromanganese Deposits from Several New Mexican Caves. 7th ESA Annual Convention.

Martini, JEJ (2000). Dissolution of quartz and silicate minerals. *Speleogenesis: Evolution of Karst Aquifers*, p. 171-174.

Mcmurdie PJ, Holmes S (2013) phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PloS one*, v. 8, n. 4, p. e61217.

Mendes LW et al (2014) Taxonomical and functional microbial community selection in soybean rhizosphere. *The ISME journal*, v. 8, n. 8, p. 1577-1587.

Meneghetti AM (2018) Manual de procedimentos de amostragem e análise química de plantas, solo e fertilizantes [Recurso eletrônico]. Curitiba: EDUTFPR. 252 p.: il. ; 23 cm.

Michail, G., Karapetsi, L., Madesis, P., Reizopoulou, A., & Vagelas, I. (2021). Metataxonomic analysis of bacteria entrapped in a stalactite's core and their possible environmental origins. *Microorganisms*, 9(12), 2411.

Michopoulos, P et al (2005) Biogeochemistry of lead in an urban forest in Athens, Greece. *Biogeochemistry*, v. 73, p. 345-357.

Misra PK, Gautam NK, Elangovan V (2019) Bat guano: a rich source of macro and microelements essential for plant growth. *Annals of Plant and Soil Research*, v. 21, n. 1, p. 82-86.

Montaner, B., Navarro, S., Piqué, M., Vilaseca, M., Martinell, M., Giralt, E., ... & Pérez-Tomás, R. (2000). Prodigiosin from the supernatant of *Serratia marcescens* induces apoptosis in haematopoietic cancer cell lines. *British Journal of Pharmacology*, 131(3), 585-593.

Monteiro HS et al (2014) (U–Th)/He geochronology of goethite and the origin and evolution of cangas. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, v. 131, p. 267-289.

Moreto CPN et al (2015) Neoproterozoic and Paleoproterozoic iron oxide-copper-gold events at the Sossego deposit, Carajás Province, Brazil: Re-Os and U-Pb geochronological evidence. *Economic Geology*, v. 110, n. 3, p. 809-835.

Morse, K. V., Richardson, D. R., Brown, T. L., Vangundy, R. D., & Cahoon, A. B. (2021). Longitudinal metabarcoding analysis of karst bacterioplankton microbiomes provide evidence of epikarst to cave transport and community succession. *PeerJ*, 9, e10757.

Mota NFO, Silva LVC, Martins FD e Viana PL (2015) Vegetação sobre Sistemas Ferruginosos da Serra dos Carajás. In: Carmo FF e Kamino LHY (orgs.) *Geossistemas Ferruginosos no Brasil*. Instituto Prístino, Belo Horizonte. Pp. 289-315.

Mudgil D et al (2018) Biomineralization potential of *Bacillus subtilis*, *Rummeliibacillus stabekisii* and *Staphylococcus epidermidis* strains in vitro isolated from Speleothems, Khasi Hill Caves, Meghalaya, India. *Geomicrobiology journal*, v. 35, n. 8, p. 675-694.

Mudgil, D., Paul, D., Baskar, S., Baskar, R., & Shouche, Y. S. (2022). Cultivable microbial diversity in speleothems using MALDI-TOF spectrometry and DNA sequencing from Krem Soitan, Krem Lawbah, Krem Mawpun, Khasi Hills, Meghalaya, India. *Archives of Microbiology*, 204(8), 495.

Mulec J, Oarga A (2014) Ecological evaluation of air and water habitats in the Great Cavern of Santo Tomás, Cuba. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, v. 85, n. 3, p. 910-917.

Mulec, Janez et al. Microbiota entrapped in recently-formed ice: Paradana Ice Cave, Slovenia. *Scientific reports*, v. 11, n. 1, p. 1-12, 2021.

Nautiyal CS (1999). An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*, v. 170, n. 1, p. 265-270.

Navarrete, A. A., Kuramae, E. E., de Hollander, M., Pijl, A. S., van Veen, J. A., & Tsai, S. M. (2013). Acidobacterial community responses to agricultural management of soybean in Amazon forest soils. *FEMS microbiology ecology*, 83(3), 607-621.

Newman, M. M., Kloepper, L. N., Duncan, M., McInroy, J. A., & Kloepper, J. W. (2018). Variation in bat guano bacterial community composition with depth. *Frontiers in Microbiology*, 9, 914.

Nunes da Rocha, U., Van Overbeek, L., & Van Elsas, J. D. (2009). Exploration of hitherto-uncultured bacteria from the rhizosphere. *FEMS microbiology ecology*, 69(3), 313-328.

Nunes JA et al (2015) Soil-vegetation relationships on a banded ironstone 'island', Carajás Plateau, Brazilian Eastern Amazonia. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 87, p. 2097-2110.

Oliveira, AMS (2021) Estrutura e diversidade taxonômica das comunidades microbianas em cavidades ferruginosas da Flona de Carajás. Dissertação de Mestrado, Instituto Tecnológico Vale, Belém, Pará.

Oliveira, AN et al (2006) Atividade enzimática de isolados de rizóbia nativos da Amazônia Central crescendo em diferentes níveis de acidez. *Food Science and Technology*, v. 26, p. 204-210.

Oliveira, RRM et al (2021) PIMBA: A pipeline for MetaBarcoding Analysis. In: *Advances in Bioinformatics and Computational Biology: 14th Brazilian Symposium on Bioinformatics, BSB 2021, Virtual Event, November 22–26, 2021, Proceedings 14*. Springer International Publishing. p. 106-116.

Omeregic AI et al (2016) Ureolytic bacteria isolated from Sarawak limestone caves show high urease enzyme activity comparable to that of *Sporosarcina pasteurii* (DSM 33). *Malaysian Journal of Microbiology*, p. 463-470.

Omeregic, AI et al (2016). Screening for urease-producing bacteria from limestone caves of sarawak. *Borneo Journal of Resource Science and Technology*, v. 6, n. 1, p. 37-45.

Omeregic, AI, Ginjom RH, Nissom PM (2018). Microbially induced carbonate precipitation via ureolysis process: a mini-review. *Transactions on Science and Technology*, v. 5, n. 4, p. 245-256, 2018.

Ortiz, M et al (2013) Profiling bacterial diversity and taxonomic composition on speleothem surfaces in Kartchner Caverns, AZ. *Microbial Ecology*, v. 65, n. 2, p. 371-383.

Panaro NJ et al (2000) Evaluation of DNA fragment sizing and quantification by the agilent 2100 bioanalyzer. *Clinical Chemistry*, v. 46, n. 11, p. 1851-1853.

Parker CW et al (2018) Fe (III) reducing microorganisms from iron ore caves demonstrate fermentative Fe (III) reduction and promote cave formation. *Geomicrobiology journal*, v. 35, n. 4, p. 311-322.

Parker CW, Senko JM, Auler AS, Sasowsky ID, Schulz F, Woyke T, Barton HA (2022) Enhanced terrestrial Fe (II) mobilization identified through a novel mechanism of microbially driven cave formation in Fe (III)-rich rocks. *Scientific Reports*, 12(1), 17062.

Pfendler, S., Karimi, B., Maron, P. A., Ciadamidaro, L., Valot, B., Bousta, F., ... & Aleya, L. (2018). Biofilm biodiversity in French and Swiss show caves using the metabarcoding approach: First data. *Science of the Total Environment*, 615, 1207-1217.

Pasarin, D., & Rovinaru, C. (2018). Sources of carotenoids and their uses as animal feed additives-a review. *Scientific Papers: Series D, Animal Science-The International Session of Scientific Communications of the Faculty of Animal Science*, 61(2).

Patel H et al (2020) Enhanced lipase production from organic solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* UKHL1 and its application in oily waste-water treatment. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 28, p. 101731.

Paula CCP de et al (2021) First Report of Halobacteria Dominance in a Tropical Cave Microbiome. *bioRxiv*, p. 2021.12. 02.470950.

Paula CCP, Bichuette ME, Selegim MHR (2020) Nutrient availability in tropical caves influences the dynamics of microbial biomass. *MicrobiologyOpen*, v. 9, n. 7, p. e1044.

Paula CCP, Montoya QV, Rodrigues A, Bichuette ME, Selegim MHR (2016) Terrestrial filamentous fungi from Gruta do Catão (São Desidério, Bahia, Northeastern Brazil) show high levels of cellulose degradation. *J Caves Karst Stud* 78(3): 208-217.

Phukon LC et al (2020) Production and characterisation of lipase for application in detergent industry from a novel *Pseudomonas helmanticensis* HS6. *Bioresource technology*, v. 309, p. 123352.

Piló, LB, Coelho A, Soares GA, Franco FP (2014). *Serra da Bocaina - Espeleologia*. Carste Consultores Associados, 178 p. Inédito.

Pipite A et al (2022) Isolation, antibacterial screening, and identification of bioactive cave dwelling bacteria in Fiji. *Frontiers in Microbiology*, v. 13.

Pogson RE, Osborne RAL, Colchester DM, Cendón DI (2011) Sulfate and phosphate speleothems at Jenolan Caves, New South Wales, Australia. *Acta Carsologica*, 40 (2): 239-254.

Quayson E et al (2020) Immobilized lipases for biodiesel production: Current and future greening opportunities. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 134, p. 110355.

Rai Baplu et al (2014) Screening, optimization and process scale up for pilot scale production of lipase by *Aspergillus niger*. *Biomed Biotechnol*, v. 2, n. 3, p. 54-59.

Rangseekeaw P, Pathom-Aree W (2019) Cave actinobacteria as producers of bioactive metabolites. *Frontiers in Microbiology*, v. 10, p. 387.

Rautela R et al (2017) Microbial diversity of Gumki cave and their potential role in enzyme production. *Environment Conservation Journal*, v. 18, n. 3, p. 115-122.

Reboleira AS et al (2022) Nutrient-limited subarctic caves harbour more diverse and complex bacterial communities than their surface soil. *Environmental Microbiome*, v. 17, n. 1, p. 1-17.

Rehamnia B et al (2022) Screening of Spore-Forming Bacteria with Probiotic Potential in Pristine Algerian Caves. *Microbiology Spectrum*, v. 10, n. 5, p. e00248-22.

Riquelme C et al (2017) Biotechnological potential of Actinobacteria from Canadian and Azorean volcanic caves. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 101, n. 2, p. 843-857.

Romeo T (Ed.) (2008). *Bacterial biofilms*. Springer Science & Business Media.

Rosière CAFJ, Baars JCS, Seoane LM, Lobato LL, Silva SRC, Souza GE (2006) Structure and iron mineralisation of the Carajás Province. *Applied Earth Science* 115(4): 126-133.

Rousk J et al (2010). Soil bacterial and fungal communities across a pH gradient in an arable soil. *The ISME journal*, v. 4, n. 10, p. 1340-1351, 2010.

Sani RK, Krishnaraj RN (Ed.) (2017) *Extremophilic enzymatic processing of lignocellulosic feedstocks to bioenergy*. Springer International Publishing.

Santana-Molina, C., Rivas-Marin, E., Rojas, A. M., & Devos, D. P. (2020). Origin and evolution of polycyclic triterpene synthesis. *Molecular Biology and Evolution*, 37(7), 1925-1941.

Sauro, F., Cappelletti, M., Ghezzi, D., Columbu, A., Hong, P. Y., Zowawi, H. M., ... & De Waele, J. (2018). Microbial diversity and biosignatures of amorphous silica deposits in orthoquartzite caves. *Scientific reports*, 8(1), 17569.

Schaefer CE et al (2015) Solos desenvolvidos sobre canga ferruginosa no Brasil: uma revisão crítica e papel ecológico de termiteiros. *Geossistemas Ferruginosos do Brasil: áreas prioritárias para conservação da diversidade geológica e biológica. Patrimônio cultural e serviços ambientais*. Belo Horizonte, 3i editora, p. 77-102.

Schaefer CEGR et al (2016) Características químicas e mineralogia de solos perférricos da Serra Sul de Carajás. *Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi-Ciências Naturais*, v. 11, n. 1, p. 57-69.

Scherer RS (2017) Ocorrência de espeleotemas fosfáticos e feições morfológicas raras em cavernas ferríferas da Serra de Carajás, no Pará. *Dissertação de Mestrado*, Instituto Tecnológico Vale, Belém, Pará.

Schmieder R, Edwards R (2011) Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. *Bioinformatics*, v. 27, n. 6, p. 863-4.

Schwantes-Cezario, N., Cremasco, L. V., Medeiros, L. P., Teixeira, G. M., Albino, U. B., Lescano, L. E. A. M., ... & Toralles, B. M. (2022). Potential of cave isolated bacteria in self-healing of cement-based materials. *Journal of Building Engineering*, 45, 103551.

Segovia JFO, Orellana JBP, Kanzaki LIB (2020) Características físico-químicas dos principais solos na Amazônia. In: *Floricultura tropical: técnicas e inovações para negócios sustentáveis na Amazônia*. Embrapa.

Sigurdson, G. T., Tang, P., & Giusti, M. M. (2017). Natural colorants: Food colorants from natural sources. *Annual review of food science and technology*, 8, 261-280.

Silva EIP et al (2021) Microbiological study in a gneissic cave from Sri Lanka, with special focus on potential antimicrobial activities. *International Journal of Speleology*, v. 50, n. 1, p. 4.

Soares R et al (2012) Comparação de métodos convencional e alternativo para determinação de sódio, potássio e fósforo em extratos de solos obtidos com solução de Mehlich-1. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v. 36, p. 105-112.

Sobrinho FC (2012) Contribuição ao estudo da gênese de minério de ferro na mina N4E, Carajás. Trabalho de Conclusão de Curso, Universidade Federal do Pará, Marabá, Pará. 95 p.

Sokol EV et al (2022) Phosphate Record in Pleistocene-Holocene Sediments from Denisova Cave: Formation Mechanisms and Archaeological Implications. *Minerals*, v. 12, n. 5, p. 553.

Song XD et al (2018). The influence of the conversion of grassland to cropland on changes in soil organic carbon and total nitrogen stocks in the Songnen Plain of Northeast China. *Catena*, v. 171, p. 588-601.

Spier CA et al (2007) Geochemistry and genesis of the banded iron formations of the Cauê Formation, Quadrilátero Ferrífero, Minas Gerais, Brazil. *Precambrian Research*, v. 152, n. 3-4, p. 170-206.

Sreya, P. K., Gaurav, K., Ahmed, S., Sasikala, C., & Ramana, C. V. (2023). *Blastopirellula sediminis* sp. nov. a new member of Pirellulaceae isolated from the Andaman and Nicobar Islands. *Antonie van Leeuwenhoek*, 1-13.

Steele, HL, Streit WR (2005) Metagenomics: advances in ecology and biotechnology. *FEMS Microbiology Letters*, v. 247, n. 2, p. 105-111.

Strous, M., Pelletier, E., Mangenot, S., Rattei, T., Lehner, A., Taylor, M. W., ... & Le Paslier, D. (2006). Deciphering the evolution and metabolism of an anammox bacterium from a community genome. *Nature*, 440(7085), 790-794.

Tang J et al (2019) Diagnosis of soil contamination using microbiological indices: A review on heavy metal pollution. *Journal of Environmental Management*, v. 242, p. 121-130.

Teixeira JBG, Lindenmayer ZG (2010) Depósitos de óxidos de ferro-cobre-ouro de Carajás. In: Modelos de depósitos de cobre do Brasil e sua resposta ao intemperismo. Brasília: CPRM. 190 p. Cap. 2, p. 15-48.

Thompson B et al (2019) Metabarcoding comparison of prokaryotic microbiomes from appalachian karst caves to surface soils in southwest Virginia, USA. *Journal of Cave & Karst Studies*, v. 81, n. 4.

Tiemann LK, Billings AS (2011) Indirect effects of nitrogen amendments on organic substrate quality increase enzymatic activity driving decomposition in a mesic grassland. *Ecosystems*, v. 14, n. 2, p. 234-247.

Tomczyk-Żak K, Zielenkiewicz U (2016) Microbial diversity in caves. *Geomicrobiology Journal*, v. 33, n. 1, p. 20-38.

Tomova I et al (2013) Diversity and biosynthetic potential of culturable aerobic heterotrophic bacteria isolated from Magura Cave, Bulgaria. *International Journal of Speleology*, v. 42, n. 1, p. 8.

Totaro JHR et al (2019) Resgate de rochas e espeleotemas em cavernas do complexo Abóboras (Etapa 1), Rio Acima, Minas Gerais, Brasil. In: ZAMPAULO, R. A. (org.) Congresso Brasileiro de Espeleologia, 35, 2019. Bonito. Anais... Campinas: SBE. p.91-98.

Trajano E, Bichuette ME. *Biologia subterrânea: introdução*. 2006. Redespeleo: São Paulo.

Turrini P et al (2020) The microbial community of a biofilm lining the wall of a pristine cave in Western New Guinea. *Microbiological research*, v. 241, p. 126584.

Vera M, Schippers A, Sand W (2013) Progress in bioleaching: fundamentals and mechanisms of bacterial metal sulfide oxidation—part A. *Applied microbiology and biotechnology*, v. 97, p. 7529-7541.

Viana, AMG (2016) Aspectos mineralógicos e geoquímicos do tipo crosta em cavernas ferríferas/lateríticas da Serra Norte, Carajás, Pará. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Pará, Belém, Pará.

Wang Y et al (2022) The characterization of microbiome and interactions on weathered rocks in a subsurface karst cave, Central China. *Frontiers in Microbiology*, v. 13, 2022.

Weintraub MN, Schimel JP (2005) Seasonal protein dynamics in Alaskan arctic tundra soils. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 37, n. 8, p. 1469-1475.

West, K. M., Richards, Z. T., Harvey, E. S., Susac, R., Grealy, A., & Bunce, M. (2020). Under the karst: detecting hidden subterranean assemblages using eDNA metabarcoding in the caves of Christmas Island, Australia. *Scientific Reports*, 10(1), 21479.

Whang, K. S., Lee, J. C., Lee, H. R., Han, S. I., & Chung, S. H. (2014). *Terriglobus tenax* sp. nov., an exopolysaccharide-producing acidobacterium isolated from rhizosphere soil of a medicinal plant. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 64(Pt_2), 431-437.

Wickham H, Chang W, Wickham MH (2016) Package 'ggplot2'. Create elegant data visualisations using the grammar of graphics. Version, v. 2, n. 1, p. 1-189.

Wiseschart A et al (2019) Shotgun metagenomic sequencing from Manao-Pee cave, Thailand, reveals insight into the microbial community structure and its metabolic potential. *BMC microbiology*, v. 19, n. 1, p. 1-14.

Wu Y et al (2015) Profiling bacterial diversity in a limestone cave of the western Loess Plateau of China. *Frontiers in Microbiology*, v. 6, p. 1-10.

Wurster CM et al (2015) The biogeochemistry of insectivorous cave guano: a case study from insular Southeast Asia. *Biogeochemistry*, v. 124, p. 163-175.

Xu HG et al (2015) Effects of simulated acid rain on microbial characteristics in a lateritic red soil. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 22, p. 18260-18266.

Yin H et al (2015) An integrated insight into the response of sedimentary microbial communities to heavy metal contamination. *Scientific reports*, v. 5, n. 1, p. 1-12.

Youssef, N. H., & Elshahed, M. S. (2009). Diversity rankings among bacterial lineages in soil. *The ISME journal*, 3(3), 305-313.

Yun Y et al (2016) The relationship between pH and bacterial communities in a single karst ecosystem and its implication for soil acidification. *Frontiers in Microbiology*, v. 7, p. 1955.

Zada S et al (2021) Cave microbes as a potential source of drugs development in the modern era. *Microbial ecology*, p. 1-14.

Zada, S. (2017). Characterization of Bacterial isolates from Kashmir cave, Pakistan, and their Potential Applications (Doctoral dissertation, Quaid-i-Azam University Islamabad, Pakistan).

Zeng XY et al (2020) Structural and functional responses of bacterial and fungal communities to multiple heavy metal exposure in arid loess. *Science of The Total Environment*, v. 723, p. 138081.

Zepeda Mendoza, M. L., Lundberg, J., Ivarsson, M., Campos, P., Nylander, J. A., Sallstedt, T., & Dalen, L. (2016). Metagenomic analysis from the interior of a speleothem in Tjuv-Ante's cave, northern Sweden. *PLoS One*, 11(3), e0151577.

Zhalnina K et al (2015) Soil pH determines microbial diversity and composition in the park grass experiment. *Microbial ecology*, v. 69, p. 395-406.

Zhang C, Kong F (2014) Isolation and identification of potassium-solubilizing bacteria from tobacco rhizospheric soil and their effect on tobacco plants. *Applied Soil Ecology*, v. 82, p. 18-25.

Zhao X et al (2019) Study on the influence of soil microbial community on the long-term heavy metal pollution of different land use types and depth layers in mine. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 170, p. 218-226.