

RELATÓRIO TÉCNICO FINAL

TCCE Nº 01/2021

**DIVERSIDADE METABARCODING E FUNCIONAL DE COMUNIDADES
MICROBIANAS DO SOLO DE CAVERNAS FERRÍFERAS DO PARQUE
NACIONAL DOS CAMPOS FERRUGINOSOS - PA.**

Abril/2024

A/C

Instituto Brasileiro de Desenvolvimento e Sustentabilidade - IABS SRTV Quadra 701, Conjunto L, Lote 38, Bloco 1, Sala 704, Parte A96, Brasília/DF, 70.340-906

Prezados(as),

Vimos por meio deste encaminhar o relatório técnico final do projeto aprovado **“DIVERSIDADE METABARCODING E FUNCIONAL DE COMUNIDADES MICROBIANAS DO SOLO DE CAVERNAS FERRÍFERAS DO PARQUE NACIONAL DOS CAMPOS FERRUGINOSOS - PA.”** referente ao Edital de Chamada Pública nº 01/2021 “Geossistemas Ferruginosos concernentes aos componentes 1 e 3 do Programa Nacional de Conservação do Patrimônio Espeleológico” no âmbito do TCCE Nº 01/2021– ICMBio a fim de comprovar a execução física-financeira dos recursos recebidos até o presente momento.

Cordialmente,



Fabiana Gisele da Silva Pinto

Fabiana Gisele da Silva Pinto

DADOS DO PROJETO	
Nome do Projeto: DIVERSIDADE METABARCODING E FUNCIONAL DE COMUNIDADES MICROBIANAS DO SOLO DE CAVERNAS FERRÍFERAS DO PARQUE NACIONAL DOS CAMPOS FERRUGINOSOS - PA	
Data de entrega: abril 2024	Periodicidade do relatório: 24 meses (março 2022 a março 2024)

Relatório Técnico Final

1. INTRODUÇÃO

No Brasil, os geossistemas ferruginosos estão inseridos nas áreas estratégicas para a conservação da biodiversidade e dos recursos naturais (JACOBI et al., 2015), sendo que estes geossistemas podem ser analisados como unidades ambientais indicadoras de diversidade biológica (*surrogates*), e serem usados como alvos de conservação (MMA, 2007). O Parque Nacional dos Campos Ferruginosos (PNCF) é uma unidade de conservação (UC) de proteção integral, com o intuito de ampliar a garantia da proteção e das exigências de compensação espeleológica, e do novo Plano de Manejo da Floresta Nacional de Carajás (FLONACA) (ICMBio, 2017). Esses ecossistemas são pouco conhecidos na América do Sul, e principalmente quanto aos estudos de ecologia de comunidades, especialmente as microbianas (ICMBio, 2017), sendo que os microrganismos constituem a maior parte da biodiversidade da caverna e desempenham papel fundamental na manutenção do ecossistema cavernícola (ORTIZ et al., 2013).

As cavernas são compostas por comunidades subterrâneas únicas de organismos e microclimas, e frequentemente, sustentam densas populações de extremófilos, abrigando assim uma grande diversidade microbiana. No entanto, o seu patrimônio geoambiental e biológico ainda é pouco conhecido, principalmente quando associado às cangas e as formações ferríferas (CARMO, 2010). Apesar da importância e de majoritariamente as cavernas serem colonizadas por microrganismos (BARTON; NORTHUP, 2007), pouco se sabe sobre a sua distribuição, dinâmica populacional e a biogeoquímica da microbiota cavernícola (GERIC et al., 2004; NORTHUP; LAVOIE, 2004).

As bactérias constituem a maior parte da biodiversidade cavernícola e desempenham papel fundamental na manutenção desse ecossistema (ORTIZ et al., 2013), dando suporte para o crescimento de vários outros microrganismos quimio-organotróficos (CAÑVERAS et al,

2001), principalmente por estarem presentes sob ambiente oligotrófico, geralmente sobrevivem modificando sua via metabólica (IVANOVA et al., 2013), ou ainda, por sintrofia que representa um caso especializado de mutualismo, em que dois ou mais microrganismos combinam as suas capacidades metabólicas para catabolizar um determinado substrato, sendo as interações sintróficas obrigatórias ou facultativas (CAVALEIRO; ALVES, 2020).

O conhecimento sobre microrganismos cavernícolas no Brasil e mais especificamente das cavernas ferríferas dos Campos Ferruginosos, a respeito de sua plasticidade metabólica e/ou potencial biotecnológico são escassos (RIQUELME et al., 2017). Neste contexto, o objetivo dessa proposta baseia-se na necessidade de estudos aprofundados visando analisar a diversidade filogenética e funcional das comunidades microbianas das cavidades ferríferas do Parque Nacional dos Campos Ferruginosos, visto que esta UC está incluída como área prioritária de investigação no Plano Estratégico e de Pesquisas e Gestão do Conhecimento do ICMBio, destacando-se a estratégia 1 e 5, para o fornecimento de informações aos tomadores de decisão acerca do valor econômico da biodiversidade, partindo dos estudos multidisciplinares em microbiologia de cavernas, implicando em processos geológicos nas cavidades, e a microbiologia ambiental na identificação de novas espécies microbianas e exploração de novas moléculas biotecnológicas de fontes cavernícolas, a fim de comunicar a origem de produtos oriundos de UC's, para a promoção da expansão e conectividade de áreas protegidas.

Um dos principais objetivos no estudo da microbiota cavernícola é estabelecer uma relação entre taxonomia, distribuição, e suas respectivas funções ecológicas (STEELE; STREIT, 2005), sendo observado comumente diferentes grupos microbianos em solos, que podem ter um importante papel ecológico em ciclos biogeoquímicos de ecossistemas cavernícolas, mediando processos de mineralização (GONZALEZ-PIMENTEL et al., 2018), produzindo compostos bioativos, como antimicrobianos, que permitem o controle biótico em outras populações (RANGSEEKAEW; PATHOM-AREE, 2019), além de serem capazes de degradar compostos orgânicos recalcitrantes (SONIA et al., 2011). Apesar da escassez de conhecimento sobre a taxonomia e plasticidade metabólica dos grupos microbianos em ecossistemas cavernícolas, é bem conhecido que estes dão uma contribuição relevante para os ciclos globais de carbono, nitrogênio e enxofre (CAVICCHIOLI, 2011; OFFRE; SPANG; SCHLEPER, 2013).

A identificação de linhagens microbianas de cavernas por muito tempo foi limitada aos métodos dependentes de cultura, e assim uma infinidade de microrganismos com necessidades nutricionais diferenciadas permanecia desconhecidos (BARTON; NORTHUP, 2007). Para superar essas limitações, estratégias baseadas em DNA independentes de cultura são usadas para pesquisar microrganismos de cavernas (CHEEPHAM, 2013), tais como, o *metabarcoding*, que usam as regiões V3 e V4 do gene 16S rDNA para identificar espécies microbianas (HANDELSMAN, 2004; WOOLEY; GODZIK; FRIEDBERG, 2010). Até o momento, esta técnica tem sido usada para pesquisar microrganismos em solos (THOMPSON et al., 2019), espeleotemas (ORTIZ et al., 2013), água (WU et al., 2015) e biofilmes (PFENDLER et al., 2018) de cavernas em diferentes ambientes temperados e extremos, sendo que diferentes filos parecem predominar no microbioma, principalmente no solo de caverna. As *Actinobacterias* são o grupo mais abundante, seguido por *Proteobacteria* (ZHU et al., 2019), *Bacteroidetes* e *Firmicutes* (YASIR, 2018; PAUN et al., 2021).

A caracterização da diversidade metabólica de amostras ambientais utilizando perfis fisiológicos em nível de comunidade por meio do sistema Biolog EcoPlate (Inc., Hayward, CA, EUA), tem sido uma ferramenta analítica promissora para determinar a capacidade de catabolismo de carbono de microrganismos durante o processo de crescimento celular em condições de placa (FEIGL ET AL, 2017), (SALOMO; MÜNCH; RÖSKE, 2009; GRZADZIEL; FURTAK; GALAZKA, 2019), e baseia-se em substratos com compostos de carbono de baixo peso molecular e podem ser realizadas a partir de culturas mistas ou isoladas de microrganismos e de amostras ambientais de solo, água e resíduos (PIERCE; WARD; DOBBS, 2014).

O ambiente cavernícola normalmente é considerado oligotrófico e apresenta características específicas que determinam a microbiota local. A comunidade microbiana presente nesse ambiente está exposta continuamente a condições hostis, sofrendo elevada pressão de seleção ambiental e podem ser uma fonte potencial para novas descobertas de compostos bioativos com potencial biotecnológico (CHEEPHAM, 2012; GHOSH; KUISIENE; CHEEPHAM, 2017).

Considerando o papel essencial dos microrganismos nos ciclos biogeoquímicos e que podem influenciar a especiação e biodisponibilidade de metais, é relevante a pesquisa para obtenção de conhecimento mais abrangente sobre a taxonomia e diversidade da comunidade

microbiana em solos com presença de metais (HAYAT et al., 2010; COSTA et al., 2015). Neste contexto, a grande escala e diversidade de metais subterrâneos e o impacto da corrosão desses metais, pode alterar substancialmente a química do solo e as comunidades microbianas (HUANG et al., 2021), sendo assim, necessário a análise do perfil fisiológico da comunidade microbiana, realizado com base na capacidade de usar diferentes fontes de carbono para caracterizar a diversidade microbiana nesses ambientes cavernícolas (FERNANDES et al., 2018).

Deste modo, foi proposto um projeto para avaliar e comparar a diversidade filogenética e funcional da comunidade microbiana, utilizando *metabarcoding* 16S rDNA (filogenética) e microplacas Biolog EcoPlate (funcional), além de isolar e selecionar microrganismos que apresentem atividades funcionais com aplicabilidade biotecnológica e avaliar a tolerância aos metais desses microrganismos isolados dos solos de cavernas ferríferas. Essas informações são fundamentais para ampliar o conhecimento sobre o patrimônio genético e a biodiversidade cavernícola de Carajás e para a elaboração de plano de manejo para a conservação dos recursos naturais espeleológicos ferríferos.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Analisar a diversidade filogenética e funcional das comunidades microbianas do solo de cavernas ferríferas no platô Serra da Bocaina do Parque Nacional dos Campos Ferruginosos, Serra de Carajás- PA.

2.2 Objetivos específicos

- Analisar a diversidade taxonômica de microrganismos do solo de cavernas ferríferas por técnicas independentes de cultura (metabarcoding);
- Avaliar a diversidade metabólica da comunidade microbiana através do perfil fisiológico e funcional utilizando Biolog Ecoplate;
- Realizar o isolamento e prospecção de microrganismos com potencial biotecnológico a partir do solo de cavernas ferríferas;

- Avaliar a tolerância aos metais pelos microrganismos isolados dos solos de cavernas ferríferas da Serra da Bocaina;
- Realizar a determinação de metais visando avaliação da disponibilidade de elementos tóxicos e/ou de interesse comercial;
- Construção do inventário e estabelecer uma coleção de culturas de linhagens microbianas em ágar estoque e criopreservada (-80 °C) das cavernas ferríferas do Pará, com objetivo de promover a conservação do patrimônio microbiano espeleológico e da sua biodiversidade

3. METODOLOGIA

3.1 Local de estudo e coleta das amostras de solo das cavernas ferríferas

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). As cavernas GEM-1423 (SB-0012) e GEM-1462 (SB-0051) foram o ponto focal do projeto (Figura 2 e 3). A coleta ocorreu sob a licença do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO) nº 79255-1 e nº 86153-1.

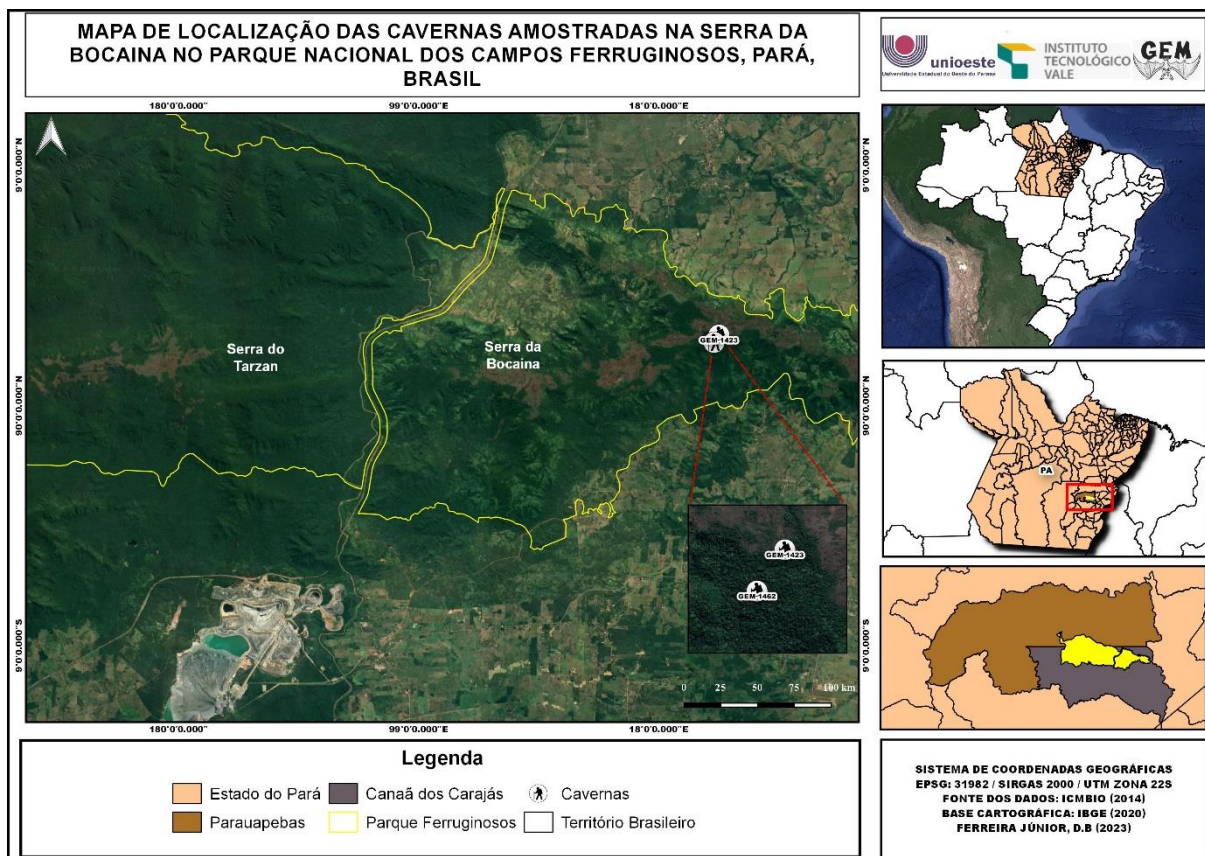


Figura 1. Mapa de localização das cavernas GEM-1423 e GEM-1462 na Serra da Bocaina no Parque Nacional dos Campos Ferruginos, Pará, Brasil. Fonte: Ferreira Júnior, D.B, 2023

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°18'49.27"S, 49°53'35.06"O) e jaspilito GEM-1462 (6°18'59.18"S, 49°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.

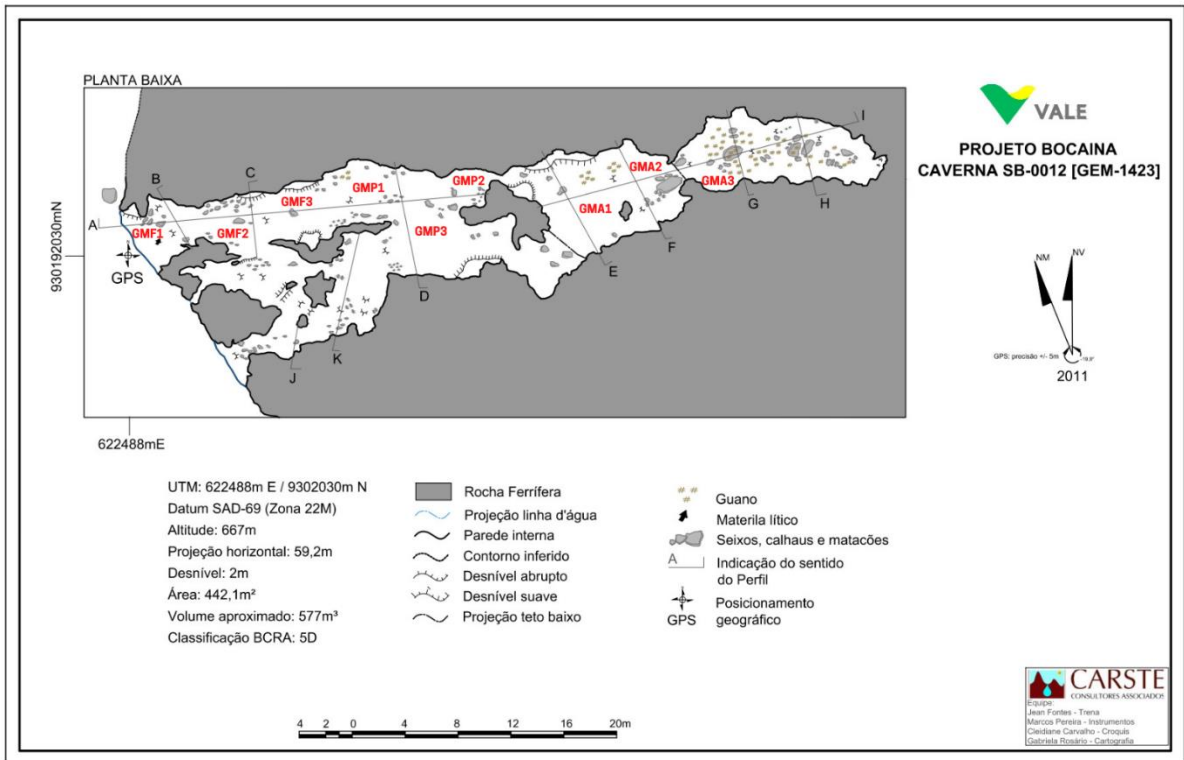


Figura 2. Mapa topográfico da caverna GEM-1423 e respectivos pontos de coleta.

Fonte: Vale S.A, adaptado (2023).

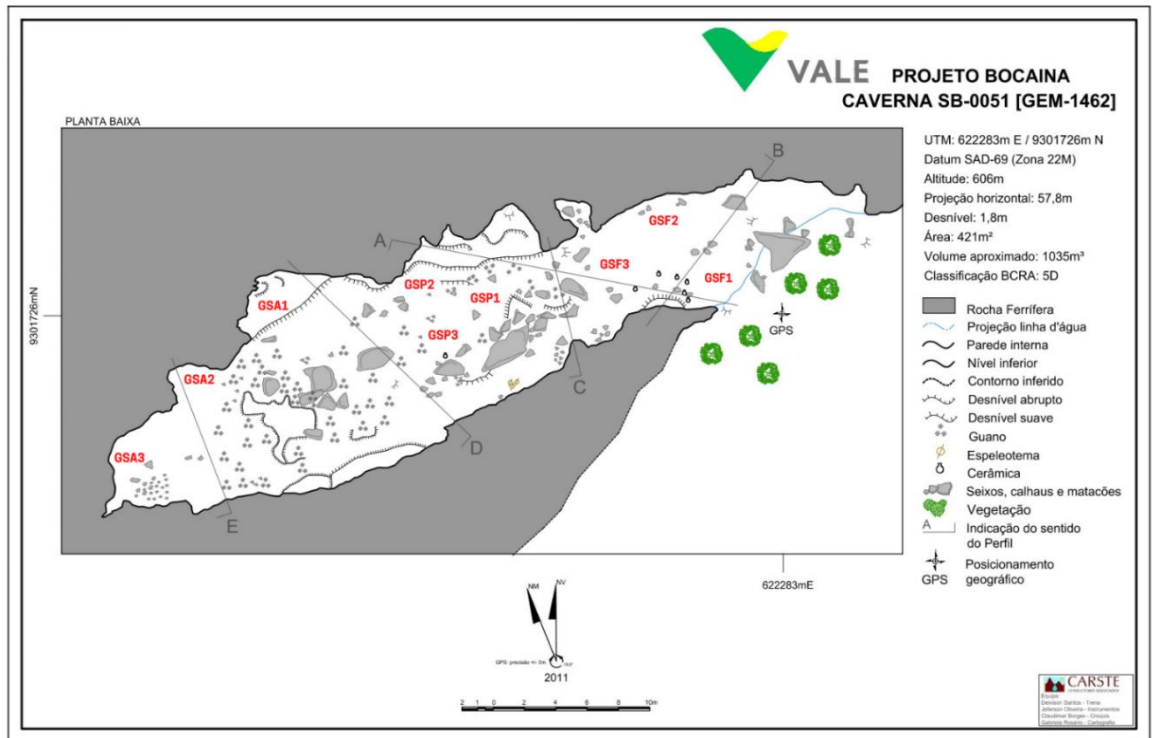


Figura 3. Mapa topográfico da caverna GEM-1462 e pontos de coleta. Fonte: Vale S.A, adaptado (2023).



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

As amostras foram coletadas na camada superficial das cavernas, nos primeiros 10 cm (Figura 4). As cavernas foram classificadas em zonas, de acordo com Trajano & Bichuette (2006), coletando-se de 100g de solo de três pontos em cada zona, ou seja, na zona afótica (ausência de luz), na disfótica (penumbra) e na zona fótica na entrada da caverna, totalizando 9 pontos de amostragem em cada caverna. As amostras foram acondicionadas em sacos plásticos estéreis (ziplock), com o auxílio da pá de jardinagem estéril, sendo desinfectada a cada coleta com álcool 70%, identificadas com o nome/número da caverna, número da amostra, data da coleta e nome do coletor responsável e armazenadas em caixa térmica a 4°C para a análise.

3.3 Isolamento e preservação de microrganismos isolados das cavernas ferríferas

No laboratório de Microbiologia e Biotecnologia (LAMIBI) da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE) as amostras de solo foram peneiradas, homogêneas, retiradas subamostras (10 g) e enriquecidas em frascos contendo 90 mL de meio salino mineral (MSM), com 0,81g de NaCl em 90 mL de água destilada. As amostras foram incubadas

em agitador orbital (150 rpm) a 28°C, por 24 horas. Após esse período, foram realizadas diluições em série, sendo retiradas alíquotas de 100 µL das diluições de 10⁻¹ a 10⁻³ e semeadas nas superfícies dos meios Luria Bertani (LB), ISP₂ (Pridham *et al.*, 1957) e Batata-Dextrose-Ágar (BDA) com o auxílio da alça de Drigalski. As placas foram incubadas à 28°C no período de 24 a 48 h. As linhagens microbianas foram divididas por caverna e zona, identificadas como IM (GEM-1423) e IS (GEM-1426) com o sufixo da zona fótica (F), penumbra (P) ou afótica (A) e número nominal crescente e, posteriormente conservadas em meio Ágar Estoque e à -80 °C.

Os isolados bacterianos foram crescidos em meio LB líquido à 28 ± 2 °C por 24h e, em seguida, foi realizada a coloração de Gram. Os isolados foram observados em microscópio óptico com aumento de 100 X e caracterizados com base em sua morfologia e coloração.

3.4 Determinação de teores totais de metais nos solos das cavernas ferríferas

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).

3.5 Avaliação de perfil de suscetibilidade ou resistência a antimicrobianos dos isolados microbianos

O perfil de resistência antimicrobiana foi avaliado de acordo com as recomendações do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (CLSI, 2018). Os antimicrobianos testados foram: Amoxicilina (10 µg), Ácido Nalidíxico (30 µg), Ampicilina (10 µg), Ciprofloxacina (5 µg), Cloranfenicol (30 µg), Estreptomicina (10 µg), Imipenem (10 µg), Gentamicina (10 µg), Norfloxacina (10 µg), Trimetoprima (5 µg), Sulfazotrim (25 µg) e Tetraciclina (30 µg). Os

resultados obtidos foram comparados com os dados da tabela padrão do documento M100-S17 do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2018).

Os isolados bacterianos selecionados foram retirados do estoque, com auxílio de alça bacteriológica estéril, e semeados no meio sólido Ágar LB por estriamento descontínuo e incubados por 24h a 30°C. Após esse período, foi realizado o inóculo com colônias isoladas foram resuspendidas em 5ml de caldo Mueller Hinton (CMH) a fim de se obter uma turvação correspondente a 0,5 da escala de McFarland. Essa avaliação foi feita por meio da técnica de disco-difusão de Kirby-Bauer (Bauer *et al.*, 1966) que consiste em após a homogeneização do inóculo, foi introduzido um suabe estéril dentro do tubo, e em seguida, este foi comprimido contra a parede do tubo para a remoção do excesso de líquido. A inoculação foi feita em forma de estrias contínuas na superfície do ágar em três direções, girando a placa em ângulo de 60° após cada estria. Antes da aplicação dos discos, as placas semeadas foram deixadas em cima da bancada por aproximadamente cinco minutos, para permitir que o excesso de umidade da superfície do ágar fosse absorvido. Os discos foram retirados do freezer uma hora antes de sua aplicação e deixados em temperatura ambiente. A aplicação destes foi feita com auxílio de uma pinça estéril para evitar contaminação. Todos os discos foram pressionados suavemente para o contato total com a superfície do ágar. Após 24h de incubação as placas foram analisadas para verificar a presença de contaminantes e a ocorrência de halos de inibição. A leitura foi realizada com auxílio de um paquímetro. Os testes foram realizados em triplicata.

3.6 Análise Diversidade Funcional

A determinação do perfil metabólico da comunidade microbiana dos solos das cavernas, foi avaliado usando Biolog EcoPlate (Biolog EcoPlate™ Inc., Hayward, CA, EUA) contendo 31 fontes de carbono sendo os substratos polímeros, carboidratos, ácido carboxílico, aminoácidos, amina/amida e fenólico. As amostras foram padronizadas de acordo com a escala 0,5 de Mc Farland em solução tampão fosfato esterilizado (PBS), e foi retirado 100 µl do inóculo em suspensão em cada poço de uma microplaca Biolog e incubado a 30°C por 7 dias. Uma suspensão de cultura pura de *Escherichia coli* (ATCC 25922) foi usada como controle positivo, enquanto Água Milli-Q foi usada como controle negativo, nos poços da microplaca correspondentes (KONER *et al.*, 2021).

3.7 Avaliação de Tolerância à Metais

O teste de tolerância à metais pesados foi realizado a partir da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração bactericida mínima (CBM), segundo metodologia de Wiegand *et al.* (2018). A CIM foi realizada em placa para cultivo de células de 96 poços contendo 135 µL de CMH. Posteriormente, foi aplicado 150 µL da solução mãe de 4.000 ppm dos metais cobre (Cu), cromo (Cr), chumbo (Pb), ferro (Fe), magnésio (Mg), manganês (Mn), potássio (K) e zinco (Zn) nos respectivos poços, usando a técnica de diluição seriada, nas concentrações de 2,000, 1,000, 500, 250, 125, 62,5, 31,2 e 15,6 ppm. O inóculo de 15 µL da suspensão bacteriana foi aplicado em cada poço, ajustado a partir da escala 0,5 de Mc Farland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL). O controle negativo foi realizado somente com CMH e CMH e solução de metal, para controle positivo utilizou-se CMH e suspensão bacteriana. A placa foi incubada a 30°C por 24h. Após o período de incubação, foi adicionado nos poços 10 µL da solução reveladora resazurina 0,02% e incubado na estufa por mais 2 horas nas mesmas condições. A leitura do teste de CIM foi visualizada a partir da mudança de coloração da solução reveladora, considerando o resultado positivo a alteração da coloração de azul para rosa.

3.8 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.).

3.9 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'- GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC-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 fluorometria, 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 (indexs/barcodes) foram adicionados a cada amostra através da etapa de PCR Index utilizando os indexs 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).

3.9 Análise estatística

A capacidade dos microrganismos de utilizar diferentes fontes de carbono em comunidades microbianas foi medida pelo desenvolvimento médio de cor do poço (AWCD) (GARLAND; MILLS, 1991), onde as leituras serão realizadas no tempo zero (T0), após 12 horas de incubação, e a cada 24 horas por 7 dias consecutivos, até obtenção de uma AWCD de 0,8–1,0 unidade de absorbância para cada placa.

Para ampliar a uniformidade para caracterizar os níveis de padrões e utilização de microrganismos por fonte de carbono (KEYLOCK, 2005; STRONG, 2016), foi utilizado o índice de diversidade de Shannon-Wiener (H'), afim de representar a razão do valor de absorvância de cada poço para os valores de absorvância total de todos os poços (KEYLOCK, 2005; SPELLERBERG, 2008). O índice de uniformidade de Shannon (E), foi utilizado para representar o número total de fontes de carbono consumidas, e do número de poços que ocorreu variação de coloração (KEYLOCK, 2005), já o índice de diversidade de Simpson (D), foi empregado para refletir a diversidade funcional metabólica das comunidades microbianas (GE et al., 2018).

As comparações entre os tipos de amostra e locais foram conduzidas por análises multidimensionais, utilizando a Análise de Coordenadas Principais (PCoA) com gráficos de dispersão e Análise de Similaridade (ANOSIM) (CLARK; GORLEY, 2015), e foram gerados usando OTU identificável e abundância com PERMANOVA estimada pelo índice de Bray-Curtis (THOMPSON et al, 2019). Posteriormente, os dados foram analisados descritivamente por meio do Diagrama de Venn de seis vias mostrando os números de OTU compartilhadas entre cada caverna e amostra de solo. O diagrama foi gerado usando InteractiVenn (HEBERLE et al., 2015).

Para caracterizar a composição das linhagens bacterianas em relação ao índice de degradação das fontes de carbono foi utilizado o escalonamento multidimensional não-métrico (NMDS) baseado em matrizes de similaridade utilizando o índice de Bray-Curtis e aplicada uma ANOSIM para verificar a possível diferença nesta composição com o intuito de determinar o efeito dos perfis metabólicos em relação aos índices das fontes de carbono e metais.

Para estimar a distância entre as linhagens de acordo com os perfis metabólicos e sensibilidade aos metais, foi aplicado a análise de agrupamentos (*Clustering Dendogram*), para isso, sendo utilizados os resultados do NMDS e ANOSIM que apresentarão efeitos significativos ($p < 0,05$ e $R^2 > 0,60$). A análise dos clusters foi por ANOVA, onde a matriz de distância entre os clusters foi medida usando o método de Ward (ANGEL et al.; 2010).

Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados expressos como média \pm desvio padrão. Todas as análises foram realizadas no software R Core Team utilizando o pacote "Vegan", para o NMDS utilizado a função "metaMDS" e para o cluster "hcluster".

3.10 Coleção de culturas de microrganismos cavernícolas

Todos os isolados microbianos foram registrados, catalogados e armazenados em ágar estoque e criopreservados a -80°C para posterior caracterização genética, taxonômica e inclusão na Coleção de Cultura de Microrganismos Multifuncionais de Interesse Ambiental e Biotecnológico (CCMMIAB – Unioeste). Essa coleção está registrada no SISGEN nº CACD8A2. A CCMMIAB também está cadastrada nas plataformas nacionais e internacionais, como:

Taxonline (<https://www.taxonline.bio.br/ccmmiab-unio>) e

SpeciesLink (<https://specieslink.net/col/CCMMIAB-Unio>),

SISBr (<https://collectory.sibbr.gov.br/collectory/public/show/co478>).

4. RESULTADOS PLANEJADOS E ALCANÇADOS

RESULTADOS PLANEJADOS E ALCANÇADOS
1. Identificação dos isolados da comunidade microbiana do solo de cavernas ferríferas via técnica metabarcoding 16S rDNA.
2. Caracterização do perfil fisiológico e funcional (metabólico) da comunidade microbiana em relação a utilização de 31 fontes de carbonos utilizando Biolog Ecoplate.
3. Avaliar a presença de rotas metabólicas alternativas na ciclagem de nutrientes e atividades funcionais com aplicabilidade biotecnológica
3. Identificar a tolerância aos metais dos microrganismos isolados dos solos de cavernas ferríferas da Serra da Bocaina.
5. Analisar a distribuição de táxons e grupos funcionais bacterianos e propor um plano de manejo ambiental visando a conservação do patrimônio biológico.
4. Coleção de culturas de linhagens microbianas em ágar estoque e criopreservada (-80 °C) das cavernas ferríferas do Pará. O depósito foi feito na Coleção de Cultura de Microrganismos Multifuncionais e de Interesse Ambiental e Biotecnológico da Unioeste (CCMMIAB-UNIO).

Os resultados planejados foram alcançados e serão apresentados e discutidos no item Resultados e Discussão.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Isolamento e caracterização dos isolados

A partir dos solos coletados nas cavernas, foram isoladas 182 amostras microbianas das duas cavernas do objeto de estudo, divididas entre estação seca e chuvosa, conforme a Tabela 1.

Tabela 1. Isolados microbianos obtidos das cavernas GEM-1462 e GEM-1423 nas estações seca e chuvosa e suas características morfológicas.

Estação Seca GEM-1462	Nº	Estação Chuvosa GEM-1462	Nº
Bacilo Gram-Positivo	28	Bacilo Gram-Positivo	24
Bacilo Gram-Negativo	22	Bacilo Gram-Negativo	10
Coco Gram-Positivo	-	Coco Gram-Positivo	7
Coco Gram-Negativo	-	Coco Gram-Negativo	1
Levedura	-	Levedura	1
Total	50	Total	43
Estação Seca GEM-1423		Estação Chuvosa GEM-1423	
Bacilo Gram-Positivo	1	Bacilo Gram-Positivo	5
Bacilo Gram-Negativo	26	Bacilo Gram-Negativo	51
Coco Gram-Positivo	4	Coco Gram-Positivo	1
Coco Gram-Negativo	1	Coco Gram-Negativo	-
Levedura	-	Levedura	-
Total	32	Total	57

Deste total de 182 microrganismos isolados das amostras de solo cavernícola, na primeira coleta, no período seco (setembro 2022), obteve-se 50 isolados da caverna GEM-1462 e 32 isolados da caverna GEM-1423. Na segunda coleta, que compreende o período chuvoso (março 2023), foram isolados 43 microrganismos na caverna GEM-1462 e 57 na caverna GEM-1423. Os isolados foram caracterizados quanto a coloração de Gram e morfologia. Após caracterização, os isolados foram repicados e armazenados em ágar estoque e submetidos a criopreservação a -80°C em ultrafreezer.

Para as análises de avaliação da resistência a antimicrobianos e atividade de tolerância a metais foram selecionadas 51 bactérias de forma aleatória, de duas cavernas distintas, sendo classificadas como 51% Gram-positivas e 49% Gram-negativas.

5.2 Determinação de metais pesados nos solos

Foram realizadas análises de determinação dos teores de metais nas diferentes amostras de cada zona da caverna GEM-1423 e GEM-1462 (Tabela 2).

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 até mesmos de remediação sejam impostos em áreas de entorno das cavidades.

Tabela 2. Teores de metais encontrados nas diferentes amostras de cada zona da caverna GEM-1423 e GEM-1462

Caverna	Estação	Zona	ID	Cu	Zn	Mn	Ni	Pb	Cd	Co	Fe	Ca	Mg	K	Na	pH
GEM-1462	Chuvosa/Março	Fótica	3	893,83	44,78	2455,39	29,64	2,34	0	48,81	193609,4	1995,2	1120	175	281,25	3,98
GEM-1462		Fótica	3	893,83	44,78	2455,39	29,64	2,34	0	48,81	193609,4	1995,2	1120	175	281,25	3,98
GEM-1423		Fótica	6	388,96	57,87	232,31	20,75	1,36	0	30,66	246048,3	1194,1	790	362,5	375	4,18
GEM-1423		Fótica	6	388,96	57,87	232,31	20,75	1,36	0	30,66	246048,3	1194,1	790	362,5	375	4,18
GEM-1423		Penumbra	5	444,35	36,6	240,78	72,46	1,69	0	30,22	237482,7	1039,8	960	112,5	312,5	4,18
GEM-1423		Penumbra	5	444,35	36,6	240,78	72,46	1,69	0	30,22	237482,7	1039,8	960	112,5	312,5	4,18
GEM-1423		Afótica	4	430,17	25,88	162,58	24,53	2,65	0	30,58	228025,6	1044,8	970	100	343,75	4,18
GEM-1423		Afótica	4	430,17	25,88	162,58	24,53	2,65	0	30,58	228025,6	1044,8	970	100	343,75	4,18
GEM-1462		Afótica	1	1085,81	155,54	700,38	57,22	3,6	0	51,2	179247,4	5612,5	1480	350	312,5	3,98
GEM-1462		Afótica	1	1085,81	155,54	700,38	57,22	3,6	0	51,2	179247,4	5612,5	1480	350	312,5	3,98
GEM-1462		Penumbra	2	680,2	16,19	7177,35	42,88	1,26	0	42,22	165790,4	1114,5	990	312,5	406,25	3,98
GEM-1462		Penumbra	2	680,2	16,19	7177,35	42,88	1,26	0	42,22	165790,4	1114,5	990	312,5	406,25	3,98
GEM-1462	Seca/Setembro	Afótica	7	1233,65	13,02	311,58	88,09	1,58	0	38,83	103134,2	3965,8	750	237,5	281,25	3,98
GEM-1462		Penumbra	9	543,1	7,85	385,27	17,91	2,32	0	19,44	100543	1199,1	760	150	281,25	3,98
GEM-1462		Penumbra	9	543,1	7,85	385,27	17,91	2,32	0	19,44	100543	1199,1	760	150	281,25	3,98
GEM-1462		Fótica	8	1811,31	14,56	4037,25	20,84	2,98	0	39,7	120908	1154,3	870	425	281,25	3,98
GEM-1462		Fótica	8	1811,31	14,56	4037,25	20,84	2,98	0	39,7	120908	1154,3	870	425	281,25	3,98
GEM-1423		Penumbra	10	339,48	36,93	151,64	22,77	2,57	0	32,03	226521,9	1099,5	950	125	312,5	4,18
GEM-1423		Penumbra	10	339,48	36,93	151,64	22,77	2,57	0	32,03	226521,9	1099,5	950	125	312,5	4,18
GEM-1423		Fótica	11	434,39	40,58	5201,7	34	2,94	0	37,02	269218,7	1024,9	950	125	375	4,18
GEM-1423		Fótica	11	434,39	40,58	5201,7	34	2,94	0	37,02	269218,7	1024,9	950	125	375	4,18
GEM-1423		Afótica	12	398,15	44,69	5630,47	20,43	2,56	0	42,49	254499,3	1019,9	920	337,5	406,25	4,18
GEM-1423		Afótica	12	398,15	44,69	5630,47	20,43	2,56	0	42,49	254499,3	1019,9	920	337,5	406,25	4,18

De forma geral, os valores de pH encontrados em todas as amostras de solo demonstram acidez elevada, sendo caracterizados como solos extremamente ácidos (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).

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 que 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 Fe 3+ 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 é 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-química 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 mg/kg-1) e zona afótica (375,57 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 a 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 há 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.

Os teores de Cu são incrementados pela deposição de guano nas cavidades, e sua redistribuição nas encostas. Muitos elementos traços estão presentes em concentrações significativas nos jaspilitos, contribuindo para o acúmulo no solo e conseqüente 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. 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 afetaram 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 abaixo do limite de quantificação (<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, carecem 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 aplicam 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).

5.3 Avaliação do perfil de suscetibilidade/resistência a antimicrobianos dos isolados das cavernas ferríferas

Foi realizada a análise do perfil de resistência a 12 antimicrobianos dos isolados cavernícolas ao longo de duas estações: seca e chuvosa (Figura 5). Dos 51 isolados selecionados, 58% são da caverna GEM-1462 e 42% da caverna GEM-1423.

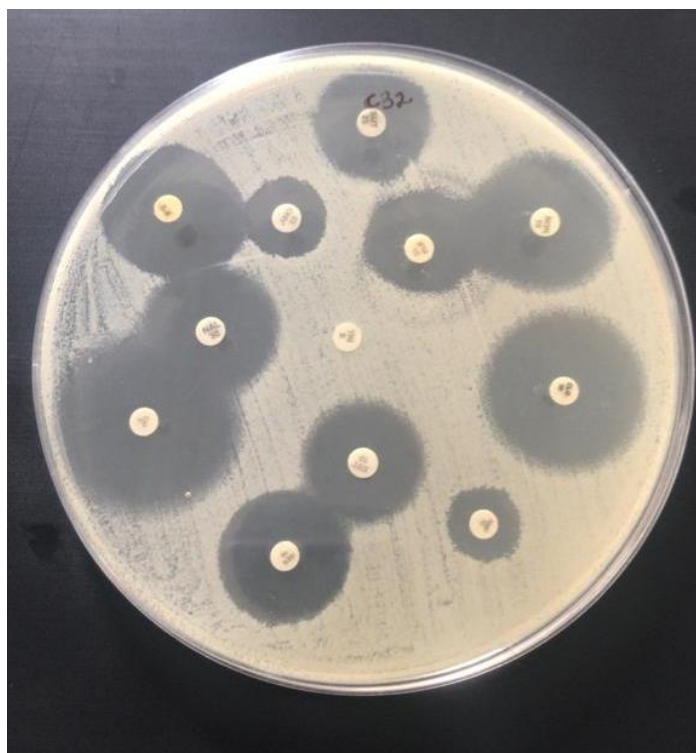


Figura 5. Teste de suscetibilidade dos isolados bacterianos isolados dos solos das cavernas ferríferas aos 12 antimicrobianos avaliados.

Foram testados um total de 16 isolados bacterianos da estação seca da caverna GEM-1462. Dentre essas, 43,7% bactérias foram resistentes a Amoxicilina e Trimetoprima e 50% foram resistentes a Ampicilina, enquanto 31,2% apresentaram resistência a Sulfazotrim e Imipenem. Essas bactérias exibiram suscetibilidade à Ciprofloxacina, Norfloxacina (quinolonas) e Gentamicina (aminoglicosídeo). Assim, observa-se resistência a múltiplos antimicrobianos, em contraste, a eficácia das classes dos antimicrobianos quinolonas e aminoglicosídeo para grande parte das bactérias (Figura 6).

Na estação chuvosa, os isolados bacterianos analisadas apresentaram elevada taxa de resistência. Quatorze bactérias foram testadas, e apresentaram resistência a Amoxicilina e Trimetoprima (85,7%) seguido da Ampicilina (71,4%) indicando a mesma tendencia de multirresistência antimicrobiana. Em contrapartida, Ciprofloxacina, Cloranfenicol e a Gentamicina mostraram-se eficazes frente a maioria dos isolados da caverna GEM-1462 durante a estação chuvosa. Sendo assim, 68,7% das bactérias da estação seca apresentaram resistência a pelo menos 2 antimicrobianos, enquanto na estação chuvosa, esse número foi maior, sendo 92,8%.

Na caverna GEM-1423 durante a estação seca, um total de 9 isolados bacterianos

foram testados e 44,4% deles apresentaram resistência tanto à Amoxicilina quanto à Imipenem, enquanto 33,3% apresentaram resistência à Trimetoprima e Ampicilina. Todas as bactérias exibiram suscetibilidade ao Ácido Nalidíxico e Ciprofloxacina.

Durante a estação chuvosa, observou-se maior percentual de resistência dos isolados quando comparados a estação seca. Das quatorze bactérias testadas, 42,8% demonstraram resistência à Amoxicilina, 50% à Ampicilina e, adicionalmente, 85,7% das bactérias apresentaram resistência à Trimetoprima. É relevante destacar que, durante a estação chuvosa na caverna GEM-1423, os isolados também foram suscetíveis ao Cloranfenicol e à Gentamicina, mantendo um padrão semelhante ao observado durante a estação seca.

De modo geral, 80% das bactérias são resistentes a pelo menos dois antimicrobianos (Figura 2), apresentando um padrão de resistência semelhante ao observado por Çandirođl & GÜngö (2020) na caverna Parsik da Turquia. Ambas as cavernas do nosso estudo apresentaram elevada resistência à Trimetoprima, semelhante ao observado por Bhullar *et al.* (2012) em 60% das bactérias isoladas de caverna da Lechuguilla, e em isolados de cavernas de Ônix dos Estados Unidos (Lavoie, 2017). Além disso, as bactérias também apresentaram elevada resistência a Ampicilina e a Amoxicilina, ambos pertencentes à classe das penicilinas, corroborando as descobertas de Bhullar *et al.* (2012) no Estado do Arizona, e Turrini *et al.* (2020) na caverna do rio Yumugi, na Nova Guiné. Na nossa pesquisa, foi observado semelhança entre os isolados de ambas as cavernas, nas duas estações quanto ao perfil de resistência aos antimicrobianos Trimetoprima, Amoxicilina e Ampicilina, colaborando com informações valiosas sobre a dinâmica das bactérias nas cavernas em diferentes condições ambientais.

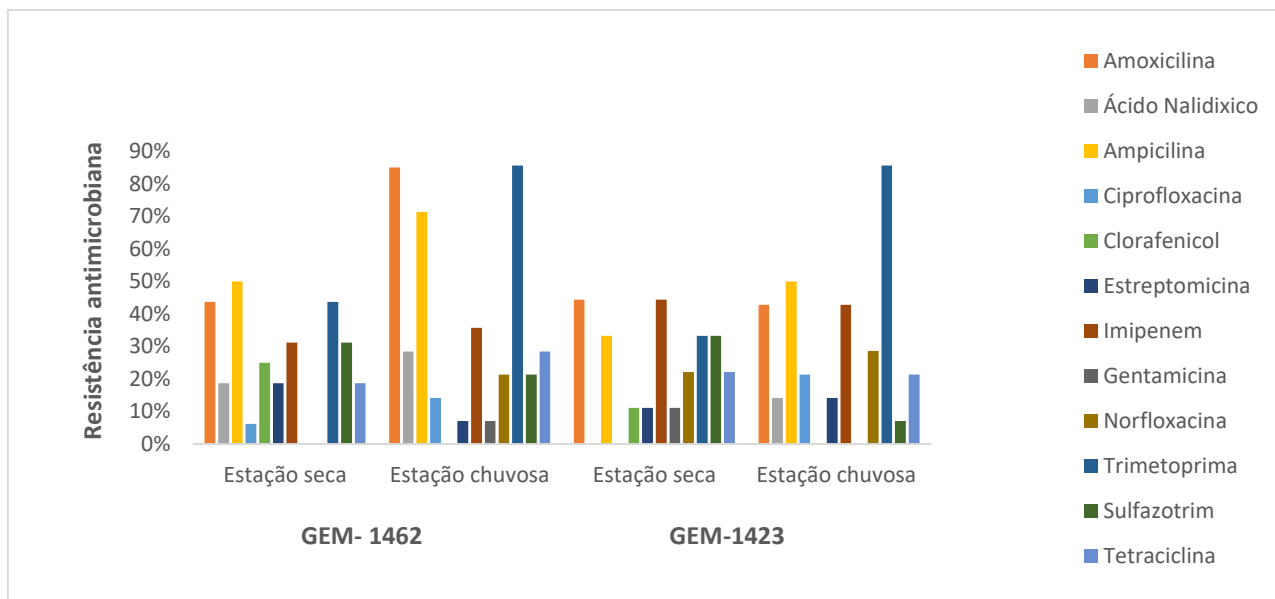


Figura 6. Perfis de resistência antimicrobiana dos isolados bacterianos nas estações seca e chuvosa das cavernas ferríferas GEM-1462 e GEM-1423 do Pará, Brasil.

Os elevados índices de resistência a antimicrobianos observados pode estar relacionado com o ambiente, visto que cavernas ferríferas têm como característica ser um ambiente muito suscetível as ações de intemperismo, alto índice de umidade além do depósito do minério. Lavoie (2017) traz como hipótese que essas características das cavernas agregam estresse adicional, resultando no aumento da produção de antimicrobianos para reduzir a competição ou aumentar a predação.

5.4 Avaliação da Tolerância aos Metais dos isolados de solo das cavernas ferríferas

O teste de tolerância a metais pesados foi conduzido através da determinação da Concentração Inibitória Mínima (Figura 7) e da Concentração Bactericida Mínima para avaliação da tolerância dos isolados bacterianos aos metais.

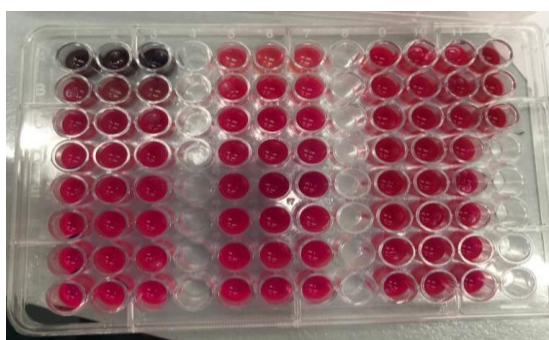


Figura 7. Concentração Inibitória Mínima dos metais Cr, Zn e Pb da Caverna GEM-1423 estação seca.

O ensaio de tolerância a metais demonstrou que todas as bactérias não apresentaram CIM para Fe, Mn, Pb, Mg e K e em relação ao Cu e Cr o crescimento da maioria das bactérias foi inibido em baixas concentrações. Na caverna GEM-1462, em ambas as estações, não houve bactérias tolerantes ao Cr (Figura 5) e na caverna GEM-1423 na estação chuvosa, poucos isolados apresentaram tolerância a esse metal (Figura 9). Portanto, a reduzida tolerância aos elementos metálicos Cu e Cr prevalece durante o período chuvoso, corroborando a hipótese de que, nesse intervalo, as cavidades subterrâneas, enquanto ambientes isolados, recebem influxo de material orgânico externo transportado pelas precipitações pluviométricas. Esse transporte pluvial implica no carreamento de comunidades microbianas autóctones de fora da caverna. Conforme observado por Ferreira *et al.* (2010), a água da chuva aparenta exercer influência significativa no aporte de material orgânico na Gruta do Roncador (RN), sendo que diversos recursos são introduzidos por meio das enxurradas decorrentes do período chuvoso.

As bactérias que normalmente residem na caverna têm desenvolvido mecanismos de tolerância a metais presentes naturalmente no ambiente, no entanto, as comunidades microbianas trazidas pelas chuvas não apresentam tais adaptações, sendo desprovidas de mecanismos de resistência específicos, tornando-se vulneráveis à toxicidade desses metais. Esse fenômeno destaca a importância dos mecanismos de adaptação e resistência das bactérias em ambientes extremos como as cavernas.

Na estação seca, ocorre maior estabilidade e isolamento no ambiente cavernícola, resultando em uma alteração na dinâmica das comunidades bacterianas. Durante esse período, é possível observar que uma parcela significativa das bactérias presentes nas cavernas demonstra maior tolerância aos metais pesados. Este fenômeno pode estar associado à adaptação prévia dessas bactérias ao ambiente seco, caracterizado como um ambiente extremófilo que exerce uma pressão seletiva sobre as bactérias. Essa pressão seletiva pode ser a razão pela qual essas bactérias apresentam maior tolerância aos metais testados.

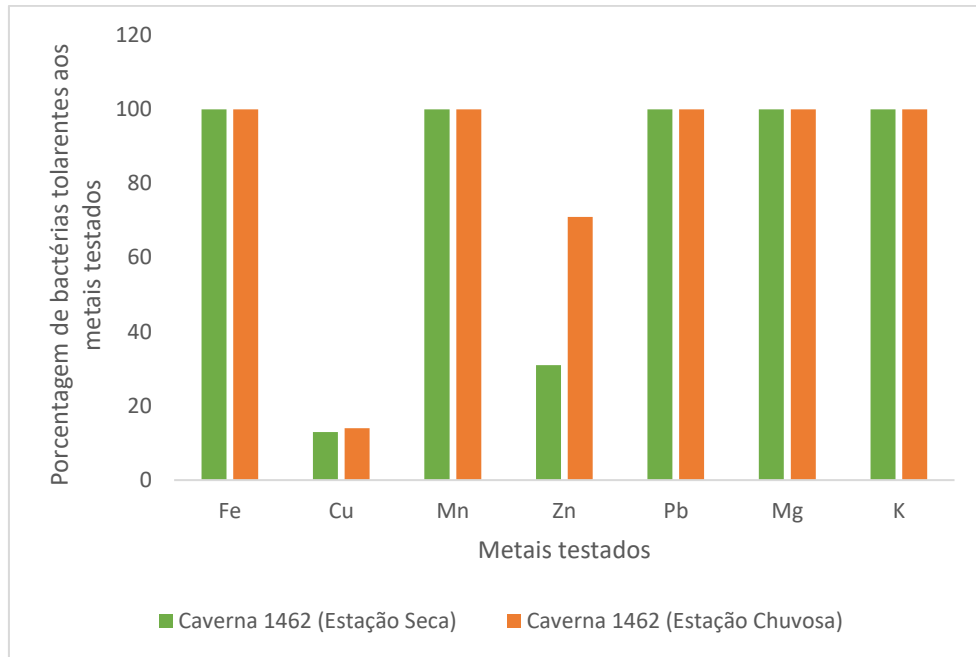


Figura 8. Porcentagem de bactérias tolerantes aos metais entre os isolados bacterianos das estações seca e chuvosa da caverna GEM-1462.

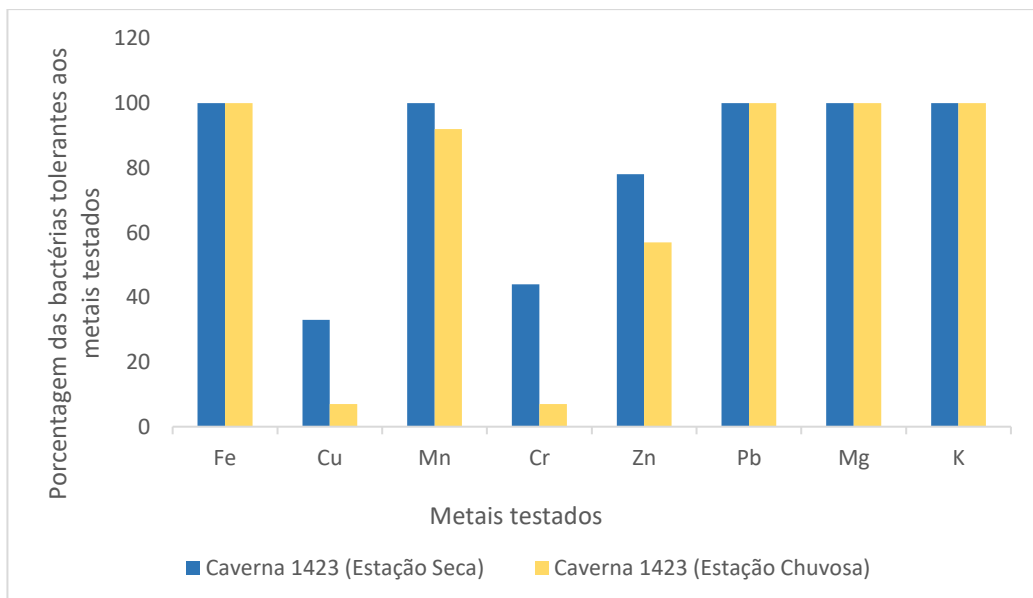


Figura 9. Porcentagem de bactérias tolerantes aos metais entre os isolados bacterianos das estações seca e chuvosa da caverna GEM-1423.

Possivelmente, a tolerância a esses metais está relacionada com a litologia da região (Souza *et al.*, 2018). As cavernas ferríferas têm como característica a variedade de depósitos minerais, como Fe, Mn, Cu, Zn e Cr (Segovia *et al.*, 2020), onde estão presentes em concentrações significativas nos jaspilitos, contribuindo para o acúmulo no solo. Além disso,

os sedimentos encontrados em cavidades subterrâneas ferríferas são depósitos ricos em metais e oferecem oportunidades para descobrir novas rotas metabólicas para ciclagem de metais pesados (Xu *et al.*, 2013).

Os elementos metálicos Fe, Mn, Cu e Zn constituem micronutrientes vantajosos para os microrganismos. Além disso, níveis elevados desses metais têm o potencial de favorecer a seleção de populações microbianas que demonstram resistência ou tolerância a esses elementos.

Considerando os mecanismos de interação das bactérias com íons metálicos e sua capacidade de tolerância aos metais, esses microrganismos podem ser utilizados em processos de biorremediação de ambientes poluídos, com alto potencial de restauração ambiental de baixo custo (Iram *et al.*, 2013). Os processos microbianos de biotransformação e bioacumulação são os que estão envolvidos na remediação de metais pesados, sendo que a bioacumulação representa o cenário mais estratégico para investimento em tecnologia de biorremediação microbiana, visto seu potencial para ser implementado em programas/ações de recuperação de áreas impactadas por metais pesados (dos Santos *et al.*, 2018).

A relação entre resistência a antimicrobianos e tolerância a diversos metais é antiga e vem ocorrendo nos ambientes há milhares de anos, de forma natural e intrínseca em áreas remotas como cavernas isoladas (Bhullar *et al.*, 2012).

Por meio da resistência cruzada, as bactérias adquirem resistência simultânea a diferentes compostos por meio de um único mecanismo. Considerando metais e antimicrobianos, a obtenção de proteínas transmembrana, que são capazes de bombear substâncias para fora da célula contra um gradiente de concentração, em conjunto com a diminuição da permeabilidade da membrana celular e o desenvolvimento de rotas metabólicas alternativas induzidas pela presença de metais, podem resultar na resistência aos antimicrobianos (Changchun *et al.*, 2020).

Estudos apontam que os mecanismos de resistência são codificados em plasmídeos, o que correlaciona a resistência bacteriana aos antimicrobianos e metais (Peixoto, *et al.* 2012). Os plasmídeos transportam genes com várias funções, e entre elas está a tolerância a metais e resistência a antimicrobianos (Sherley *et al.*, 2004) realizando a transferência horizontal de genes, além disso, carregam genes que conferem vantagem seletiva às bactérias em condições de estresse abiótico.

A correlação entre a interferência humana e os mecanismos de resistência bacteriana é extensivamente investigada em ambientes que sofrem impactos diretos, como áreas agrícolas e rios próximos a cidades. No entanto, ao direcionar nossa atenção para amostras de ambientes cavernícolas, que são locais isolados e preservados, onde a natureza segue seu curso sem intervenções externas, os mecanismos de resistência tornam-se intrínsecos aos próprios microrganismos. A ausência de pressões seletivas antropogênicas permite que essas comunidades microbianas se adaptem exclusivamente às condições naturais do ambiente, resultando na formação de mecanismos de resistência únicos e altamente especializados.

5.4 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 avaliados os solos representativos das três zonas (fótica, afótica e penumbra) das duas cavernas (GEM-1423 e GEM-1462) nas estações seca e chuvosa, além de bactérias isoladas da Caverna GEM-1423 (Figura 10 e 11).

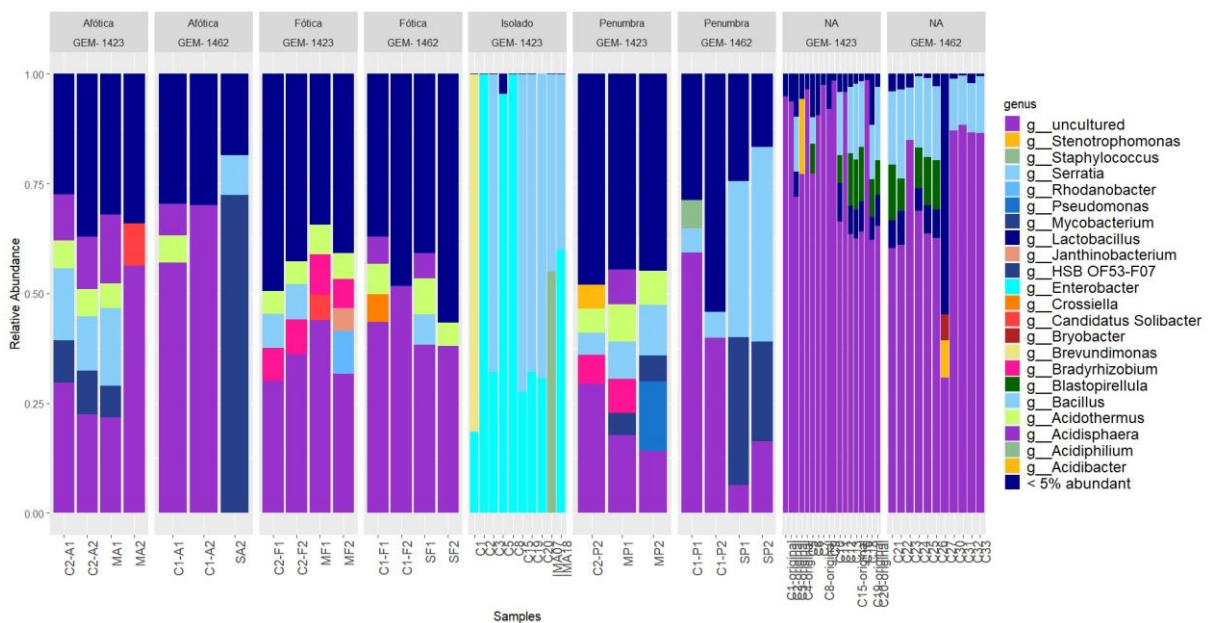


Figura 10. Distribuição taxonômica em gênero dos isolados bacterianos em todas as zonas de amostragem das cavernas GEM-1423 e GEM-1462.

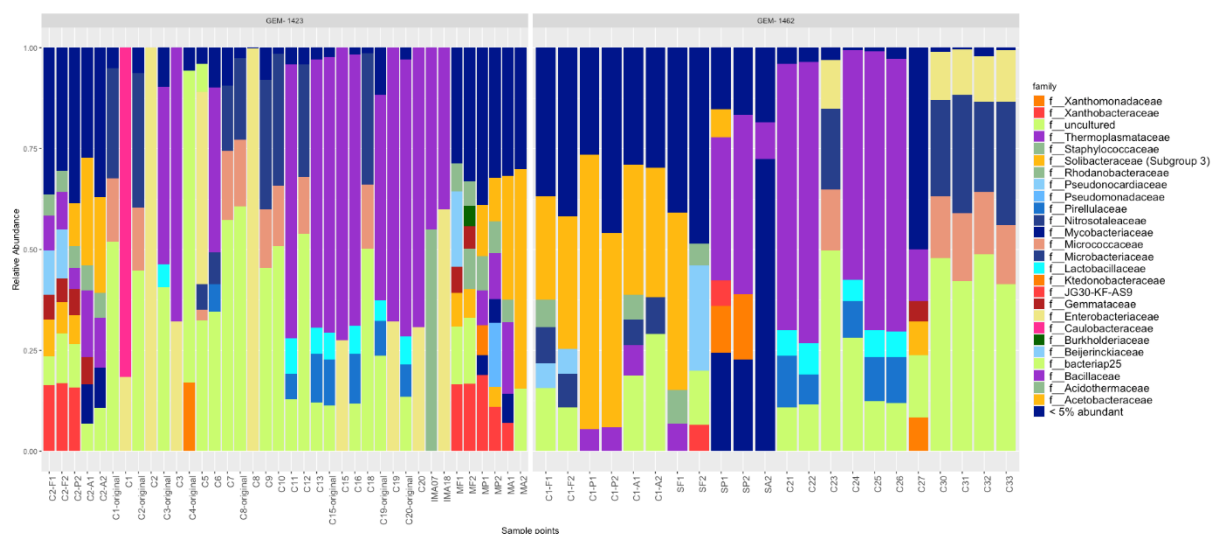


Figura 11. Distribuição taxonômica em família dos isolados bacterianos em todas as zonas de amostragem das cavernas GEM-1423 e GEM-1462.

Foram observados diferentes domínios de gêneros e suas respectivas abundâncias relativas, destacando-se *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Serratia*, *Enterobacter* e um táxon não cultivável (Figura 10).

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.

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 (Elshagabee 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.

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 de 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 6 e 7) 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, demonstraram que os fatores estudados isoladamente ou associados influenciaram no crescimento e na diversidade bacteriana total, principalmente quanto aos isolados da zona 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 filos identificados em cavernas são escassos, podendo ser atribuídas em grande parte às dificuldades em cultivar a maioria dos filos bacterianos 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 filos bacterianos distintos e categorizou em cinco filos principais, Actinobacteria, Firmicutes e Proteobacteria foram identificados em 28 dos isolados, seguido de Planctomyctes (27) e Acidobacteria (25). 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 filos predominantes. Os filos 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).

5.5 Análise Diversidade Funcional

O sistema EcoPlate, é um método que mede a intensidade de utilização de diferentes fontes de carbono pelos microrganismos e produz um padrão metabólico característico daquela comunidade. Este método auxilia o entendimento da comunidade microbiana e sua diversidade funcional. Nos estudos ambientais, análises com o sistema EcoPlate podem ser realizadas a partir de culturas mistas ou isoladas de microrganismos e de amostras ambientais de solo, água e resíduos (Pierce; Ward; Dobbs, 2014). A população de microrganismos fornece um padrão de resposta característico chamada impressão digital metabólica.

Este estudo revelou a distribuição da diversidade metabólica funcional de comunidades microbianas em diferentes zonas das cavernas GEM-1423 e GEM-1462, nas estações seca e chuvosa, pela primeira vez. Ressaltamos que a metodologia Biolog EcoPlate possui uma configuração fechada, e a resposta alcançada está dentro de um espectro esperado, ou seja, dentro das fontes estudadas pela metodologia. Nossos dados são de natureza exploratória e destacam a necessidade de compreender melhor sobre a ecologia da microbiota do solo de cavernas.

As microplacas Biolog EcoPlate contêm 96 poços, divididos em três réplicas de 31 fontes de carbono e um controle redox violeta tetrazólio (Pierce; Ward; Dobbs, 2014). As 31 fontes de carbono podem ser divididas em seis categorias de nutrientes: ácidos carboxílicos, aminas, aminoácidos, carboidratos, compostos fenólicos e polímeros (Lima; Garcia, 2011). As amostras são inoculadas diretamente sobre as microplacas, incubadas em estufa, e a cada 24 horas realiza-se a leitura de absorvância das comunidades microbianas (Gavrilescu, 2010).

5.5.1 Perfil Fisiológico De Nível De Comunidade

O estudo do perfil metabólico utilizando microplacas Biolog EcoPlate foi utilizado a fim de identificar a capacidade da população microbiana presente no solo das cavernas GEM-1423 e GEM-1462 (estações seca e chuvosa), em utilizar diferentes fontes de carbono. Este tipo de avaliação foi descrito e proposto pela primeira vez por Garland e Mills (1991) e tem sido usada

com sucesso em diferentes ambientes como solos (Leon *et al.*, 2012), lamas (Gryta; Frac; Oszust, 2014), água doce, sedimentos (Garland; Mills, 1991; Medihala *et al.*, 2012).

O índice de Diversidade Metabólica da comunidade reflete a capacidade oxidativa dos microrganismos, podendo ser utilizado como indicador de atividade microbiana. Já a Resposta Metabólica Média é calculada com base nos resultados medidos pela densidade óptica (D.O) em microestações sendo muito úteis para descrever a atividade e a diversidade da população de microrganismos. O perfil fisiológico em nível de comunidade tem se mostrado um bom indicador de refletir alterações da atividade metabólica e/ou potencial de versatilidade funcional de comunidades microbianas expostas a condições de estress, por exemplo, mudanças climáticas (Kapanen *et al.*, 2013).

5.5.2 Diversidade Metabólica da Comunidade

A diversidade metabólica da comunidade (DMC) é representada pelo número de substratos utilizados pela comunidade microbiana, e é análoga à comunidade, e soma o número de respostas positivas (poços de cor roxa) observadas após a incubação. Esses parâmetros podem ser plotados ao longo do tempo de incubação para fornecer uma cinética metabólica da comunidade microbiana cultivável.

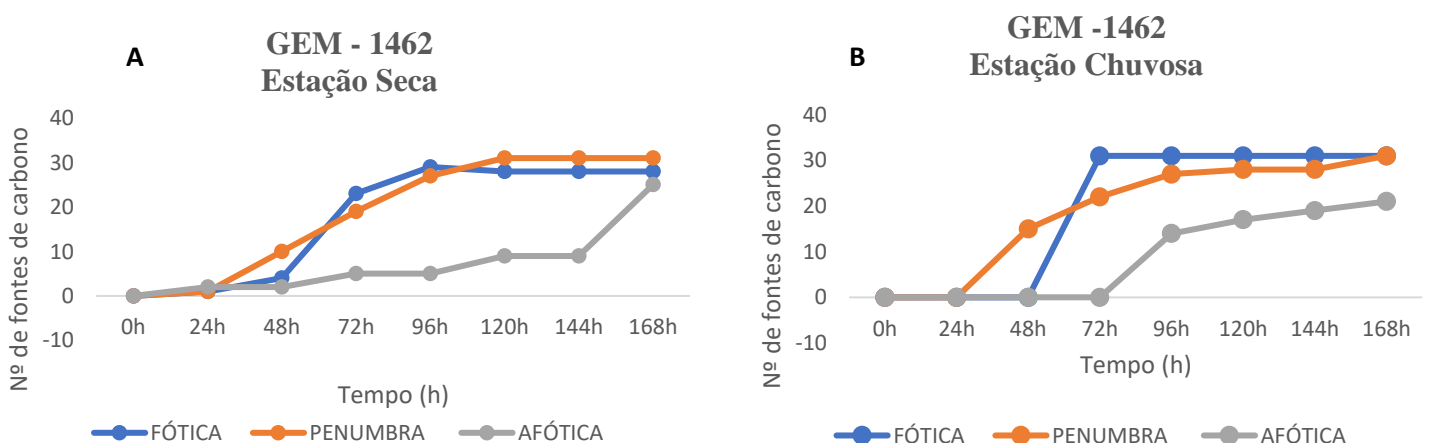


Figura 12. Diversidade metabólica da caverna GEM-1462, nas estações seca e chuvosa ao longo de 168 h.

Com os valores de DMC concluímos que os microrganismos presentes na caverna GEM-1462 a zona fótica, para a estação chuvosa (Figura 12B), apresentaram uma maior eficiência no consumo a partir das 72h de incubação. Para a estação seca a eficiência de consumo de carbono foi semelhante para as zonas fótica e penumbra (Figura 12A). O menor desempenho de consumo foi apresentado pela zona afótica ao longo das 168h avaliadas.

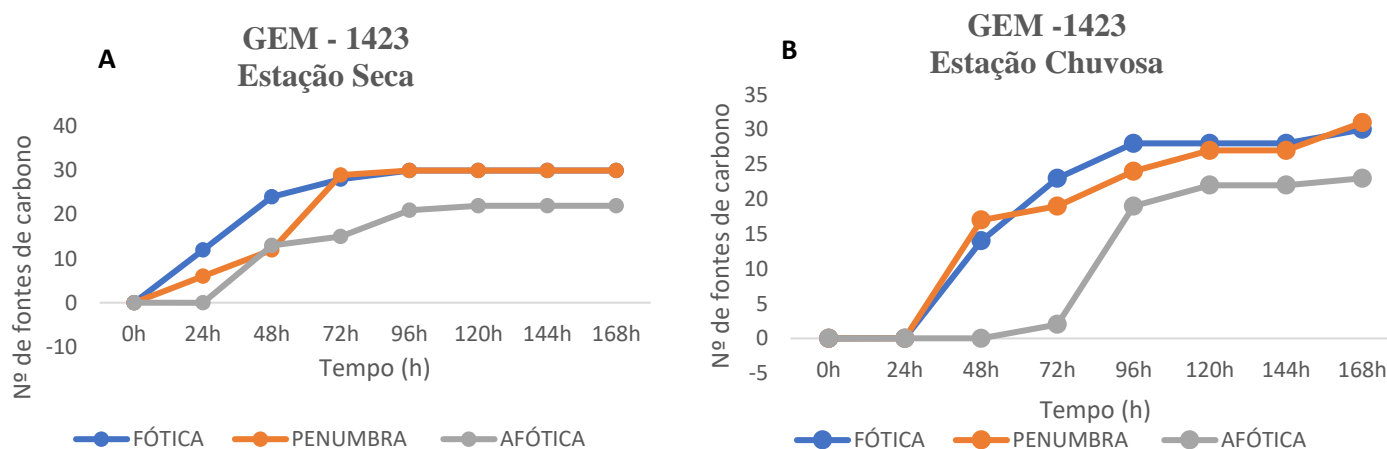


Figura 13. Diversidade metabólica da caverna GEM-1423, na estação seca e chuvosa ao longo de 168h.

Para a caverna GEM-1423, com os valores de DMC concluímos que na estação seca (figura 13A), as zonas fótica e penumbra atingiram a maior eficiência de consumo em 72h e se mantiveram estáveis e idênticas ao longo das 168h de avaliação. Para a estação chuvosa (Figura 13B), a zona fótica apresentou o maior consumo de fontes de carbono com 96h de avaliação. Assim como na GEM-1462, para a caverna GEM-1423 a zona penumbra de ambas as estações apresentaram a menor eficiência de consumo.

As comunidades microbianas das zonas de ambas as cavernas exibiram uma cinética próxima, o que se sugere que a microbiota destas amostras foram altamente ativas no uso de diferentes fontes de carbono durante o crescimento celular, exceto para a zona penumbra nas estações seca e chuvosa.

Além disso na estação chuvosa na zona de penumbra, a comunidade microbiana nesta área demonstrou que elas têm um período de fase lag mais longo, 72h, em relação as demais zonas. Já para a mesma zona na estação seca, o período de fase lag, se apresentou mais curto, 24h. A tendência de similaridade na utilização do substrato de carbono entre as cavernas na estação chuvosa, sugere que a condição climática tem efeito sobre o padrão de assimilação da fonte de carbono das comunidades microbianas. Resultados próximos a estes foram encontrados por Koner *et al.* (2021) ao avaliar a diversidade metabólica da microbiota de cavernas calcárias.

5.5.3 Resposta Metabólica Média

A resposta metabólica média (RMM) descreve a respiração média das fontes de carbono pela comunidade microbiana e fornece uma métrica única pela qual as comunidades podem ser comparadas. A RMM é calculada com a diferença média entre a D.O dos poços contendo fonte de carbono e o poço de controle.

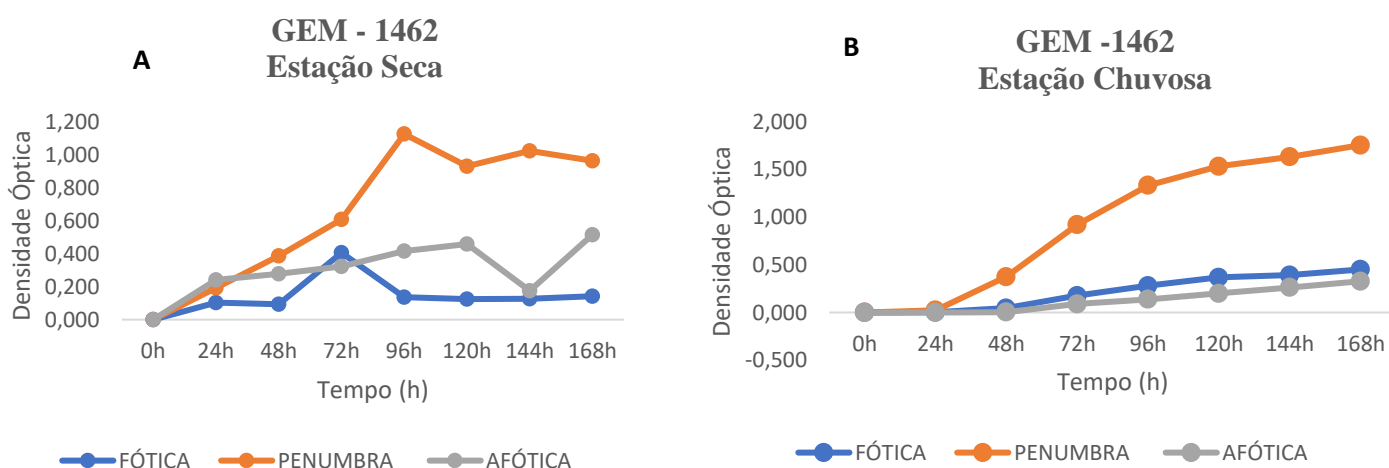


Figura 14. Resposta metabólica da caverna GEM-1462 ao longo de 168h. Dados representados com média e desvio padrão em leitura a 590 nm. Fonte: autores.

Como resultado da característica dinâmica da capacidade de utilização das fontes de carbono foi demonstrado que a quantidade de fontes de carbono utilizadas pela comunidade microbiana das amostras de solo das cavernas GEM-1462 e GEM-1423, aumentou gradualmente à medida que o tempo de incubação foi aumentada. Tendo destaque para a

zona penumbra em ambas as estações para a caverna GEM-1462. Além disso, os valores de RMM foram relativamente baixos, para as zonas afótica e fótica em ambas as estações (Figura 14 A,B).

Vários trabalhos (Zang *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2013, Huang *et al.*, 2012) apresentaram uma curva de desenvolvimento de cor médio, obtido na placa considerando a degradação de todos os substratos, desta forma não se ilustra a capacidade máxima de degradação de cada substrato. No entanto, trabalhos como de (Preston-Mafhan; Boddy; Randerson, 2002; Yu-Hing *et al.*, 2011) ilustram a média da degradação como os demais autores e ainda apresenta a cinética dos substratos que desviaram da metabolização média.

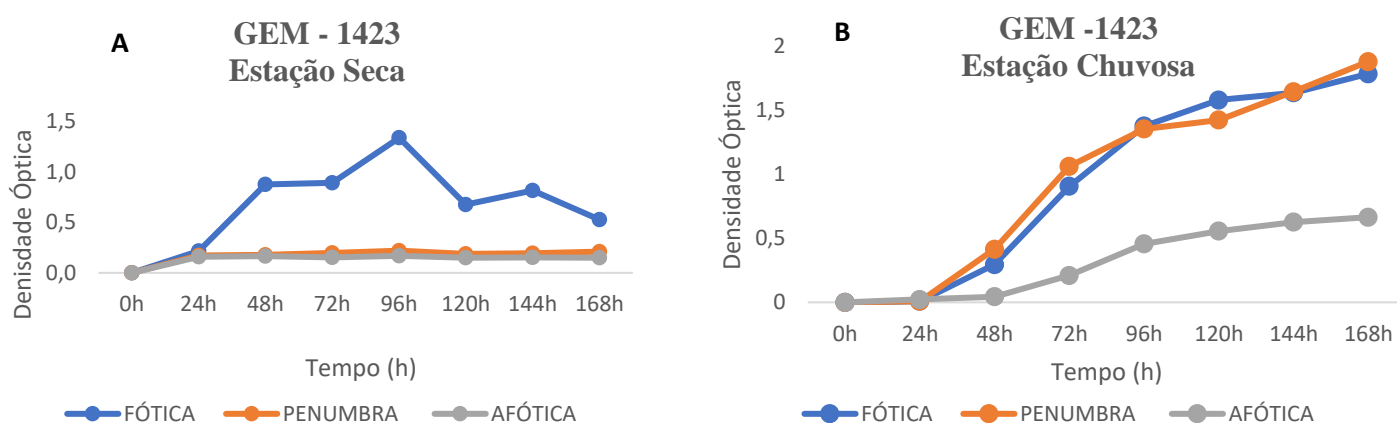


Figura 15. Resposta metabólica da caverna GEM-1423 ao longo de 168h. Dados representados com média e desvio padrão em leitura a 590 nm. **Fonte:** autores

Para a caverna GEM-1423 a maior capacidade de utilização das fontes de carbono foi demonstrada na estação chuvosa (Figura 15B), principalmente nas zonas fótica e penumbra. Enquanto na estação seca (Figura 15A) a zona fótica foi a região a qual apresentou maior consumo das fontes.

O desenvolvimento de cor para cada substrato deve seguir uma curva sigmoidal com tempo assintótico. As respostas individuais durante a degradação do substrato e a liberação do cromóforo (coloração), variam no que diz respeito ao tempo, com algumas comunidades tendo um longo atraso frente a outras. O que pode ser justificado, pelo fato de que a técnica pode favorecer microrganismos *r*-estrategistas, ou seja, aqueles que crescem rapidamente em

substratos, ao invés de microrganismos *k*-estrategistas, ou seja, espécies oligotróficas que estão em desvantagem (Lagerlöf *et al.*, 2014).

A estação chuvosa na Amazônia pode ser considerada uma grande perturbação nos ecossistemas das cavernas e pode afetar a dinâmica microbiana (Wilson *et al.*, 2011). A maioria dessas alterações pode resultar da liberação de compostos orgânicos solúveis no solo, criando condições favoráveis para o crescimento de microrganismos (Furtak *et al.*, 2020).

Em conclusão, esta análise mostrou que a estação chuvosa, provoca alterações nas zonas fótica, penumbra e afótica, conseqüentemente com o aumento da umidade do solo desencadearam um aumento na atividade metabólica nas zonas. Demostramos que a diversidade metabólica da microbiota das cavernas sobre efeito da estação chuvosa, foi distinta da estação seca, com as comunidades microbianas exibindo perfis fisiológicos distintos com base em uma variedade de fontes de carbono. Assim, fornecemos informações que reforçam a importância do estudo e reconhecimento da diversidade funcional e do funcionamento dos ecossistemas nas cavernas amazônicas.

5.5.4 Porcentagem de Similaridade Estação Seca

Em relação à similaridade entre as zonas fótica, afótica e penumbra na estação seca, as zonas fótica e penumbra de ambas as cavernas GEM-1423 e GEM-1462 obtiveram as maiores porcentagens de similaridade, 96,67% e 93,33% respectivamente (Tabela 1).

Para a caverna GEM-1423 as zonas fótica e afótica obtiveram 75,00% de similaridade, enquanto as zonas penumbra e afótica obtiveram a menor similaridade com 67,74%. Já para a caverna GEM-1462, as zonas fótica e afótica obtiveram 77,42% de similaridade, enquanto as zonas penumbra e afótica obtiveram a menor similaridade com 80,65%.

Tabela 3. Porcentagem de similaridade entre as zonas na estação seca no teste de Biolog Ecoplate

SIMILARIDADE			
Caverna GEM- 1423		Caverna GEM-1462	
ZF - ZP	96,67%	ZF - ZP	93,33%
ZF -ZA	75,00%	ZF -ZA	77,42%
ZP- ZA	67,74%	ZP- ZA	80,65%

Fonte: autores. ZF = zona fótica; ZP = zona penumbra; ZA = zona afótica.

A maior similaridade entre zonas de ambas as cavernas foi para as zonas penumbra com 96,77%, seguida pela zonas fóticas com 87,10% e zonas afóticas com a menor percentagem de similaridade, 77,42%.

Tabela 4. Percentagem de similaridade entre as zonas das cavernas GEM-1423 e GEM-1462 no teste de Biolog Ecoplate.

ENTRE AS ZONAS	
IMF -ISF	87,10%
IMP -ISP	96,77%
IMA -ISA	77,42%

Fonte: autores. IMF = zona fótica GEM-1423; IMP = zona penumbra GEM-1423; IMA = zona afótica GEM-1423. ISF = zona fótica GEM-1462; ISP = zona penumbra GEM-1462; ISA = zona afótica GEM-1462.

5.5.5 Percentagem de Similaridade Estação Chuvosa

Em relação a similaridade entre as zonas fótica, afótica e penumbra na estação chuvosa, as zonas fótica e penumbra de ambas as caverna GEM-1423 e GEM-1462 obteve-se as maiores percentagens de similaridade, 96,77% e 100% respectivamente (Tabela 5).

Para a caverna GEM-1423 as zonas fótica e afótica obteve-se a 77,42% de similaridade, enquanto as zonas penumbra e afótica obtiveram a menor similaridade com 74,19%. Já para a caverna GEM-1462, tanto para a comparação entre zona fótica e afótica, quanto para penumbra e afótica a similaridade foi de 67,74% para ambas.

Tabela 5. Percentagem de similaridade entre as zonas na estação chuvosa.

SIMILARIDADE			
Caverna GEM- 1423		Caverna GEM-1462	
ZF - ZP	96,77%	ZF – ZP	100%
ZF -ZA	77,42%	ZF - ZA	67,74%

ZP- ZA	74,19%	ZP - ZA	67,74%
--------	--------	---------	--------

Fonte: autores. ZF = zona fótica; ZP = zona penumbra; ZA = zona afótica.

A maior similaridade entre zonas de ambas as cavernas foi para as zonas penumbra, apresentando 100% de similaridade no consumo das fontes de carbono, seguida pela zonas fóticas com 96,77% e zonas afóticas com a menor porcentagem de similaridade, 80,65%.

Tabela 6. Porcentagem de similaridade entre as zonas das cavernas GEM-1423 e GEM-1462.

ENTRE AS ZONAS	
IMF -ISF	96,77%
IMP -ISP	100%
IMA -ISA	80,65%

Fonte: As autoras. IMF = zona fótica GEM-1423; IMP = zona penumbra GEM-1423; IMA = zona afótica GEM-1423. ISF = zona fótica GEM-1462; ISP = zona penumbra GEM-1462; ISA = zona afótica GEM-1462.

6. CONCLUSÕES

O estudo da microbiota de cavernas ferríferas emerge como um campo científico de extrema importância.

Foram isoladas 182 cepas, com maior disparidade na incidência de bacilos Gram positivos e Gram negativos. Os isolamentos ressaltaram a diversidade microbiana desses ambientes extremos e sua relevância para a compreensão da ecologia microbiana em ambientes subterrâneos. Foram observados diferentes domínios de gêneros e suas respectivas abundâncias relativas, destacando-se *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Serratia*, *Enterobacter* e um táxon não cultivável.

As bactérias isoladas de ambas as cavernas apresentaram elevada resistência aos antimicrobianos Trimetoprima, Ampicilina e Amoxicilina, em ambas as estações do ano. Também apresentaram elevada tolerância aos metais Fe, Mn, Pb, Mg e K. A compreensão dos mecanismos intrínsecos de resistência em ambientes cavernícolas não apenas amplia nosso conhecimento sobre a vida microbiana em condições extremas, mas também nos fornece informações para enfrentar desafios em outras áreas, pois estudos detalhados desses ecossistemas naturais, não afetados pela influência humana, são cruciais melhor entendimento da adaptação microbiana. Essa capacidade adaptativa, aliada às características únicas desses ambientes, sugere um potencial significativo para aplicações biotecnológicas, especialmente em biorremediação de áreas contaminadas por metais pesados. Estes resultados não só expandem nosso entendimento sobre a ecologia desses microrganismos, mas também apontam para perspectivas promissoras no campo da biotecnologia ambiental.

Os solos cavernícolas ferríferos de Carajás caracterizam-se pela alta acidez, e que esta diminuiu as abundâncias microbianas em todas as amostras, logo impactando 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 de a canga ser mais permeável, porosa, acumulando água por um longo período.

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.

A diversidade metabólica de ambas as cavernas e estações revelou comportamentos semelhantes no consumo da fonte de carbono, indicando uma assinatura metabólica consistente entre as áreas analisadas. No entanto, observou-se uma resposta metabólica distinta em relação às zonas de penumbra para GEM-1462, que apresentou uma maior atividade de consumo em ambas as estações. Na caverna GEM-1423, a estação chuvosa destacou-se pela resposta metabólica nas zonas fótica e penumbra, sugerindo que a água da chuva estimulou um aumento na atividade metabólica nessas áreas. Este estudo revela pela primeira vez a distribuição da diversidade metabólica funcional das comunidades microbianas das cavernas GEM-1423 e GEM-1462 durante as duas principais estações do ano na Floresta Amazônica, destacando a importância da pesquisa microbiológica nessas áreas.

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.

7. PRODUTOS PLANEJADOS E PRODUTOS ENTREGUES

Todos os produtos planejados foram entregues

PRODUTOS PLANEJADOS E PRODUTOS ENTREGUES
1. Planejado: <u>Documento com fotografias de campo e laboratoriais constando as indicações dos padrões de degradação das fontes de carbono e de tolerância de metais</u>
Entregue: Um fotolivre com registros fotográficos das atividades realizadas no projeto (atividades de campo e laboratoriais) e dos equipamentos que foram adquiridos. Anexo 1 do relatório.
2. Planejado: <u>Padronização de análises de prospecção em métodos dependentes de cultura para isolamento de microrganismos de cavidades ferríferas</u>
Entregue: os dados obtidos nestas análises foram compilados em várias publicações: - Desenvolvimento de um Projeto de Iniciação Científica (PIBIC) da Unioeste:

Prospecção e avaliação da resistência a antimicrobianos e tolerância a metais de microrganismos isolados de solo de caverna da Serra de Carajás – PA. resumo expandido **Anexo 2**

- Apresentação oral e escrita de um dos resultados do projeto PIBIC no Encontro Anual de Iniciação Científica da Unioeste. **Anexo 3**

- Publicação de um capítulo livro sobre “Perfil de resistência antimicrobiana de bactérias isoladas em cavernas ferríferas da Amazônia Oriental-Pará, Brasil”, e apresentação do resumo no 32º Congresso Brasileiro de Microbiologia. **Anexo 4**

3. Planejado: Promover a identificação via metabarcoding do maior número de linhagens microbianas de solos de cavernas ferríferas

Entregue: A identificação via metabarcoding da comunidade microbiana solo das cavernas ferríferas e os dados de quantificação de metais estão compondo um artigo científico intitulado: Exploring microbial dynamics in ferruginous caves: Taxonomic and functional diversity across seasons and cave zones e será submetido a Revista científica brevemente. **Anexo 5**

4. Planejado: Escalonamento da diversidade de metais subterrâneos e o impacto da corrosão do metal na química do solo e das comunidades microbianas

Entregues: os dados obtidos nestas análises foram compilados em várias publicações:

- Publicação de um artigo intitulado “Prospecção e avaliação da resistência antimicrobiana e da tolerância a metais de microrganismos isolados do solo de cavernas na Serra de Carajás- PA” na Revista Contribuciones Para a Las Ciencias Sociales, v. 16, n. 12, p. 30273-30290. **Anexo 6**

- Publicação de um capítulo livro sobre “Tolerância a metais de microrganismos isolados de solo de caverna ferrífera no Pará” no livro Tópicos em Espeleologia, v. 1, cap. 1, p. 6-18. **Anexo 7**

- Dissertação de Mestrado no Programa de Pós-graduação em Conservação e Manejo intitulada “DIVERSIDADE TAXONÔMICA E POTENCIAL ENZIMÁTICO MICROBIANO DE SOLOS DE CAVERNAS FERRÍFERAS DO PARQUE NACIONAL DOS CAMPOS FERRUGINOSOS, SERRA DE CARAJÁS-PA, BRASIL” **Anexo 8**

5. Planejado: Criação de um catálogo descritivo das linhagens microbianas isoladas relacionado ao perfil biotecnológico e sua aplicação em processos biológicos que apresentam menor impacto ambiental e menor consumo energético

Entregue: Publicação de um E-book, “Atlas de Microbiologia cepas padrões e bactérias de cavernas da Amazônia – PA” que descreve as linhagens microbianas isoladas e relaciona a sua caracterização morfológica, perfil biotecnológico e sua aplicação em processos biológicos. **Anexo 9**

DESTAQUE PRODUÇÃO ACADEMICA:

Os dados obtidos durante a execução do projeto geraram diferentes produtos acadêmicos:

- 1 TCC: um ATLAS de MICROBIOLOGIA
- 1 Projeto de Iniciação Científica
- 1 Dissertação de mestrado
- 2 Capítulos de livros
- 1 Artigo científico
- 1 Artigo que irá compor a Tese de Doutorado (em elaboração)

8. ANEXOS

TODOS OS ANEXOS CONSTAM DE UM PDF ÚNICO ENCAMINHADO A PARTE DESTA RELATÓRIO

Anexo 1

Registros fotográficos das atividades realizadas no projeto (atividades de campo e laboratoriais) e dos equipamentos que foram adquiridos, encontra-se no anexo deste relatório.



Anexo 2

Resumo expandido, Projeto de Iniciação Científica UNIOESTE (PIBIC)



Prospecção e avaliação da resistência a antimicrobianos e tolerância a metais de microrganismos isolados de solo de caverna da Serra de Carajás – PA.

Mayara Maria de Souza (PIBIC/PICV/Unioeste), Debora Marina Bandeira, Fabiana Gisele da Silva Pinto (Orientador), e-mail: mayara.souza3@unioeste.br

Universidade Estadual do Oeste do Paraná/Centro de Ciências Biológicas e da Saúde/Cascavel, PR.

Área/subárea: Ciências Biológicas/Microbiologia

Palavras-chave: atividade antimicrobiana, tolerância a metais, perfil de resistência

Resumo

As comunidades microbianas presentes em cavidades, especialmente em ambientes de litologia ferrífera, permanecem em grande parte desconhecidas. O isolamento e caracterização da microbiota cavernícola são essenciais para a identificação de novas espécies e a obtenção de substâncias de relevância biotecnológica, tais como compostos antimicrobianos e microrganismos capazes de tolerar metais pesados. O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana e a tolerância a metais de bactérias isoladas do solo de uma caverna localizada no Parque Nacional dos Campos Ferruginosos, na Serra de Carajás, estado do Pará. Amostras de solo foram coletadas nas diversas zonas das cavernas (fótica, penumbra e afótica) e submetidas a testes de suscetibilidade a antimicrobianos por meio da técnica de disco-difusão e avaliação da tolerância a metais pela determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM). Quanto ao perfil de resistência, as bactérias apresentaram elevada resistência aos antimicrobianos **Trimetoprima**, Ampicilina e Amoxicilina. Em relação a tolerância a metais, todas as bactérias foram tolerantes aos metais Fe, Mn, **Pb**, Mg e K. Estes dados são fundamentais para compreender o potencial dessas comunidades microbianas em ambientes de litologia ferrífera, contribuindo assim para o avanço do conhecimento científico nesse campo específico de pesquisa, com implicações significativas para a biotecnologia e conservação de ecossistemas subterrâneos.

Introdução

A pesquisa de microrganismos isolados de cavernas tem se mostrado vital para a exploração da biodiversidade subterrânea, porém 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

Anexo 3

Apresentação dos resultados no Encontro Anual de Iniciação Científica da Unioeste.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
EAICTI
9º ENCONTRO ANUAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, TECNOLÓGICA E INOVAÇÃO

MULHERES
na **CIÊNCIA**

Certificamos que o trabalho intitulado "Prospecção e avaliação da resistência a antimicrobianos e tolerância a metais de microrganismos isolados de solo de caverna da Serra de Carajás – PA." foi apresentado na modalidade de apresentação oral durante o(a) 9º EAICTI - Encontro Anual de Iniciação Científica, Tecnológica e Inovação: **Mulheres na Ciência**, promovido (a) pelo(a) Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, realizado(a) no período de 29 de novembro a 01 de dezembro de 2023, no(a) Microsoft Teams - 9º EAICTI.

Apresentador(es): **Mayara Maria de Souza**. Co-Autor(es): Mayara Maria de Souza, Debora Marina Bandeira, Fabiana Gisele da Silva Pinto.

Cascavel/PR, 06 de dezembro de 2023.


Douglas Cardoso Dragunski
Coordenador


Fabiana Regina Veloso
Pró-Reitoria de Extensão

 **unioeste**
Universidade Estadual do Oeste do Paraná

 **PARANÁ**
ESTADO DO PARANÁ
SECRETARIA DA CIÊNCIA,
TECNOLOGIA E ENSINO SUPERIOR

 **ARAUCARIA**
PARANÁ, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO

 **CNPq**

Registro: 1373 Página: 1034 Livro: 013
Emitido em 10/12/2023 às 15h23 Identificador: 1P3BU.QWKJ4.L4L6T.H5KMD.WNWGW
A autenticidade do documento poderá ser confirmada em <https://www.unioeste.br/documentos/validar>

Anexo 4

Capítulo livro sobre “Perfil de resistência antimicrobiana de bactérias isoladas em cavernas ferríferas da Amazônia Oriental-Pará, Brasil” no livro “Microbiologia e Biotecnologia Ambiental *in Foco*”.

Editora: Poisson

DOI: 10.36229/978-65-5866-371-3.CAP.01

Link: <https://poisson.com.br/2018/produto/microbiologia-e-biotecnologia-ambiental-in-foco-volume-1/>



Exposição do resumo no 32º Congresso Brasileiro de Microbiologia.



**32º CONGRESSO BRASILEIRO DE
MICROBIOLOGIA**
FOZ DO IGUAÇU / PR | 18 A 22 DE OUTUBRO DE 2023

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho intitulado **PROFILE OF MICROBIAL RESISTANCE TO ANTIMICROBIALS OF BACTERIA ISOLATED IN IRON CAVES IN THE EASTERN AMAZONIA -PA** com a autoria de: **SOUZA, M. M., SANTOS, C.V., SOUZA, L., PEDROSO, D., CARRETS, L.A., BANDEIRA, D.M, PINTO, F.G.S.** foi apresentado na forma de poster durante o 32 Congresso Brasileiro Microbiologia 2023, realizado no período de 18 de outubro de 2023 a 22 de outubro de 2023, no Rafain Palace Hotel & Convention, na Avenida Olimpio Rafagnin, 2357 - Parque Imperatriz – CEP 85862-210, na cidade de Foz do Iguaçu – estado do Parana.
Foz do Iguaçu (PR), 22 de outubro de 2023.


Prof. Dr. Luis Henrique Souza Guimarães
Presidente


Profa. Dra. Roxane Maria Fontes Piazza
1º Secretária

realização
SBM
SOCIEDADE BRASILEIRA DE MICROBIOLOGIA

Anexo 5

Artigo em elaboração. Versão mais recente encontra-se no pdf

Anexo 6

Artigo: “Prospecção e avaliação da resistência antimicrobiana e da tolerância a metais de microrganismos isolados do solo de cavernas na Serra de Carajás- PA”

Revista: Contribuciones a las Ciencias Sociales

DOI: 10.55905/revconv.16n.12-073

Link: <https://ojs.revistacontribuciones.com/ojs/index.php/clcs/article/view/3529>



Prospecting and evaluating antimicrobial resistance and metal tolerance of microorganisms isolated from cave soil in Serra de Carajás – PA

Prospecção e avaliação da resistência antimicrobiana e da tolerância a metais de microrganismos isolados do solo de cavernas na Serra de Carajás – PA

DOI: 10.55905/revconv.16n.12-073

Recebimento dos originais: 03/11/2023
Aceitação para publicação: 05/12/2023

Mayara Maria de Souza

Graduating in Biological Sciences
Institution: Universidade Estadual do Oeste do Paraná
Address: Cascavel – PR, Brasil
E-mail: mayaramaria.s@hotmail.com

Maiara Zonin

Graduating in Biological Sciences
Institution: Universidade Estadual do Oeste do Paraná
Address: Cascavel – PR, Brasil
E-mail: mayaramaria.s@hotmail.com

Luana de Souza

Graduated in Biological Sciences
Institution: Universidade Estadual do Oeste do Paraná
Address: Cascavel – PR, Brasil
E-mail: luanadesouza.98@hotmail.com

Camila Vogt dos Santos

Master in Conservation and Management of Natural Resources
Institution: Universidade Estadual do Oeste do Paraná
Address: Cascavel – PR, Brasil
E-mail: cami_vogt@hotmail.com

Debora Marina Bandeira

Master in Conservation and Management of Natural Resources
Institution: Universidade Estadual do Oeste do Paraná
Address: Cascavel – PR, Brasil
E-mail: dm-bandeira@hotmail.com

Anexo 7

Capítulo livro: “Tolerância a metais de microrganismos isolados de solo de caverna ferrífera no Pará”

Revista: Tópicos em espeleologia

DOI: 10.37423/231008309

Link: <https://app.conhecimentolivre.org/book/822/T%C3%B3picos%20em%20espeleologia>



Anexo 8

Dissertação mestrado. Última versão em pdf

Anexo 9

E-book: “ATLAS DE MICROBIOLOGIA: CEPAS PADRÕES E BACTÉRIAS DE CAVERNAS DA AMAZÔNIA (PA)” descrevendo linhagens microbianas isoladas relacionado a caracterização morfológica, perfil biotecnológico e sua aplicação em processos biológicos.

Editora: RFB

DOI: 10.46898/rfb.33c1e11f-ca55-47d6-b5b4-d42de95a27c0

Link: <https://www.rfbeditora.com/ebook-2023/33c1e11f-ca55-47d6-b5b4-d42de95a27c0>



REFERENCIAS

- Aquino, S. F., Brandt, E.M.F. & Chernicharo, C.A.L. (2013). Remoção de fármacos e desreguladores endócrinos em estações de tratamento de esgoto: revisão da literatura. *Engenharia Sanitária e Ambiental* **18**, 187-204.
- Ash, R.J., Mauck, B. & Morgan, M. (2002). Antibiotic resistance of gram-negative bacteria in rivers, United States. *Emergency Infection Disease* **8**, 713-716.
- Barros, A. L. R. (2014). Resistência a metais pesados, antimicrobianos e formação de biofilme em cepas de *Escherichia coli* isoladas de praias de São Luís, Maranhão. *Revista de Patologia Tropical* **43**, 277-289.
- 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., & Jurado, V. (2007). *What's up down there? Microbial diversity in caves*.
- 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.
- Bauer, A.W.; Kirby, E.; Sherris, E.M.; Turk, M. (1966). Antibiotic by standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*, **45**, p.493-496.
- Bhullar, K., Waglechner, N., Pawlowski, A., Koteva, K., Banks, E. D., Johnston, M. D. & Wright, G. D. (2012). Antibiotic resistance is prevalent in an isolated cave microbiome. *PloS one*, **7**, e34953.
- 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.
- Brown, M. G. & Balkill, D. L. (2009). Antibiotic resistance in bacteria isolated from the deep terrestrial subsurface. *Microbial Ecology* **57**, n. 3, 484.
- Çandiroğlu, B., & Güngör, N. D. (2020). The Biotechnological Potentials of Bacteria Isolated from Parsik Cave, Turkey: Measuring the enzyme profiles, antibiotic resistance and antimicrobial activity in bacteria. *Johnson Matthey Technology Review*, **64**, 466-479.
- Carmo, F. F. & Kamino, L. H. Y. (2015). *Geossistemas Ferruginosos do Brasil: áreas prioritárias para conservação da diversidade geológica e biológica, patrimônio cultural e serviços ambientais*. Belo Horizonte, Brazil, 3i Editora, v. 1.

Costa, P.S., Reis, M.P., Ávila, M.P., Leite, L.R., Araújo, F.M.G., Salim, A.C.M., Oliveira, G., Barbosa, F., Chartone-Souza, E. & Nascimento, A.M.A. (2015). Metagenome of a microbial community inhabiting a metal-rich tropical stream sediment. *PLoS One* **10**, e0119465.

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.

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.

dos Santos, S. C., de Castro, D. C. M., de Assunção, P. S., dos Santos, T. L., & Quintella, C. M. (2018). Mapeamento tecnológico de processos microbianos aplicados na biorremediação de metais pesados. *Cadernos de Prospecção*, **11**, 1740-1740.

Elshaghabee, 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.

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.

Fernandes, C. C., Kishi, L. T., Lopes, E. M., Omori, W. P., Souza, J. A. M. D., Alves, L. M. C. & Lemos, E. G. D. M. (2018). Bacterial communities in mining soils and surrounding areas under regeneration process in a former ore mine. *Brazilian Journal of Microbiology* **49**, 489-502.

Ferreira, R. L., Prous, X., de Oliveira Bernardi, L. F., & Souza-Silva, M. (2010). Fauna subterrânea do estado do Rio Grande do Norte: caracterização e impactos. *Revista Brasileira de Espeleologia*, **1**, 25-51.

FURTAK, K.; GRZADZIEL, J.; GALAZKA, A.; NIEDZWIECKI, J. Prevalence of unclassified bacteria in the soil bacterial community from floodplain meadows (fluvisols) under simulated flood conditions revealed by a metataxonomic approach. *Catena*, v.188 p.104448, 2020. doi: 10.1016/j.catena.2019.104448

GARLAND, J. L.; MILLS, A. L. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole-carbon source utilization. *Applied and Environmental Microbiology*, v.139, n. 2, p.169-175, 2009.

GAVRILESCU, M. Environmental biotechnology: achievements, opportunities and challenges. *Dynamic Biochemistry, Process Biotechnology and Molecular Biology*, v.4, p. 1-36, 2010.

Gaze, W. H.; Krone, S. M.; Larsson, D. G. J.; Li, X.Z.; Robinson, J. A.; Simonet, P.; Zhu, Y.G. (2013) Influence of humans on evolution and mobilization of environmental antibiotic resistome. *Emerging Infectious Diseases* **19**, e120871.

GRYTA, A.; FRAC, M.; OSZUST, K. The application of the biology ecoplate approach in ecotoxicological evaluation of dairy sewage sludge. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.174, n.4, p. 1434-1443, 2014.

- 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.
- Hayat, R., Ali, S., Amara, U., Khalid, R. & Ahmed, I. (2010). Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. *Annals of Microbiology* **60**, n. 4, 579-598.
- Huang, Y., Xu, D., Huang, L. Y., Lou, Y. T., Muhadesi, J. B., Qian, H. C., Zhou, E., Wang, B.J., Li, X., Jiang., Z., Liu, S.J, Zhang & D.W, Jiang, C. Y. (2021). Responses of soil microbiome to steel corrosion. *NPJ Biofilms and Microbiomes* **7**, n. 1,1-13.
- ICMBio. Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. (2017). *Plano de pesquisa geossistemas ferruginosos da Floresta Nacional de Carajás: temas prioritários*. Brasília.
- Iram, S., Zaman, A., Iqbal, Z., & Shabbir, R. (2013). Heavy metal tolerance of fungus isolated from soil contaminated with sewage and industrial wastewater. *Polish Journal of Environmental Studies*, **22**, 691-697.
- 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.
- KAPANEN, A.; VIKMAN, M.; RAJASARKKA, J.; VIRTALA, M.; ITAVAARA, M. Biotests for environmental quality assessment of composted sewage sludge, **Waste Management**, v. 33, p. 1451–1460, 2013.
- KONER, S. *et al.* Assessment of Carbon Substrate Catabolism Pattern and Functional Metabolic Pathway for Microbiota of Limestone Caves. **Microorganisms**. 2021.
- 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.
- LAGERLOF, J.; ADOLFFSSON, L.; BORJESSON, G.; EHLERS, K.; VINYOLE, G. P.; SUNDH, I. Land-use intensification and agroforestry in the Kenyan highland: impacts on soil microbial community composition and functional capacity. **Appl. Soil Ecol.** v. 82, p. 93–99, 2014. doi: 10.1016/j.apsoil.2014.05.015
- 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.
- Lavoie, K., Ruhumbika, T., Bawa, A., Whitney, A., & De Ondarza, J. (2017). High levels of antibiotic resistance but no antibiotic production detected along a gypsum gradient in great Onyx Cave, KY, USA. *Diversity*, **9**, n. 12, 1-10.
- 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.

Termo de compromisso



Coordenação Executiva



Gestão Operacional



LEON, C.; CAMPOS, V.; URRUTIA, R.; MONDACA, M. A. Metabolic and molecular characterization of bacterial community associated to Patagonian Chilean oligotrophic lakes of quaternary glacial origin. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.28, p.1511-1521, 2012.

LIMA, A.; GARCIA, E. Gestão de águas subterrâneas em ambientes insulares: caso de estudo da ilha do Maio (cabo Verde). **VI Congresso Planejamento e Gestão das Zonas Costeiras**, 2011.

Mcfarlane, M. J. & Twidale, C. R. Karstic features associated with tropical weathering profiles (1987). *Zeitschrift für Geomorphologie Supplementband* **64**, 73-95.

MEDIHALA, P. G.; LAWRENCE, G. D. W.; SWERHONE, D. R.; KORBER, D. R. Effect of pumping on the spatio-temporal distribution of microbial communities in a water well field. **Water Research**. V.46, n.4, p.1286-1300, 2012.

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..

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.

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, 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.

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.

Parker, C. W., Senko, J. M., Auler, A. S., Sasowsky, I. D., Schulz, F., Woyke, T., & Barton, H. A. (2022). Enhanced terrestrial Fe (II) mobilization identified through a novel mechanism of microbially driven cave formation in Fe (III)-rich rocks. *Scientific Reports*, **12**, e17062.

- 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.
- Peixoto, L. J. S., Sá, M. C. A., Gordiano, L. A., & Costa, M. M. (2012). *Aeromonas* spp.: fatores de virulência e perfis de resistência a antimicrobianos e metais pesados. *Arquivos do Instituto Biológico*, **79**, 453-461.
- PILÓ, L. B. (2014). Diagnóstico e análise de relevância das cavernas da Serra da Bocaina. Belo Horizonte: *Carste Consultores Associados*, **179**.
- Piló, L. B.; Auler, A. Geoespeleologia das cavernas em rochas ferríferas da região de Carajás, PA. In: *Congresso Brasileiro de Espeleologia*. 2009. p. 181-186.
- PIRCE, M. L.; WARD, J. E.; DOBBS, F. C. False positives in Biolog EcoPlates™ and MT2 MicroPlates™ caused by calcium. *Journal of Microbiological Methods*, v. 97, n. 1, p. 20-24, 2014.
- Portugal, D. S. C. G. (2015). Prevalência de bactérias resistentes a antimicrobianos em água natural. Dissertação de Mestrado. Universidade do Porto, Portugal.
- Pridham, T. G., Anderson, P., Foley, C., Lindenfelser, L. A., Hesseltine, C. W., & Benedict, R. G. (1957). *A selection of media for maintenance and taxonomic study of streptomycetes*.
- Sani, R. K., & Krishnaraj, R. N. (Eds.). (2017). *Extremophilic enzymatic processing of lignocellulosic feedstocks to bioenergy*. Springer International Publishing. *Springer International Publishing*.
- Segovia, J.F.O, Orellana J.B.P, Kanzaki L.I.B. (2020). Características físico-químicas dos principais solos na Amazônia. In: *Floricultura tropical: técnicas e inovações para negócios sustentáveis na Amazônia*. Embrapa.
- Sherley, M., Gordon, D.M., Collignon P.J. (2004). Evolution of multi-resistance plasmids in Australian clinical isolates of *Escherichia coli*. *Microbiology*, 150:1539-1546.
- Silva, E. I. P., Jayasingha, P., Senanayake, S., Dandeniya, A., & Munasinghe, D. H. (2021). Microbiological study in a gneissic cave from Sri Lanka, with special focus on potential antimicrobial activities. *International Journal of Speleology*, **50**, 4.
- Souza, A. K. R., & Morassuti, C. Y. (2018). Poluição do ambiente por metais pesados e utilização de vegetais como bioindicadores. *Acta Biomedica Brasiliensia*, **9**, 95-106.
- Tomczyk-Żak K, Zielenkiewicz U (2016) Microbial diversity in caves. *Geomicrobiology Journal*, v. 33, n. 1, p. 20-38.
- Trajano, E. & Bichuette, M. (2006). *Biologia subterrânea: introdução. 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.
- Turrini, P., Tescari, M., Visaggio, D., Pirolo, M., Lugli, G. A., Ventura, M., Visca, P. (2020). The microbial community of a biofilm lining the wall of a pristine cave in Western New Guinea. *Microbiological research*, **241**, 126584;



- Wiegand, I., Hilpert, K., & Hancock, R. E. (2008). Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature protocols*, **3**, 163-175.
- WILSON, J. S.; BALDWIN, D. S; REES, G. N.; WILSON, B. P. The effects of short-term inundation on carbon dynamics, microbial community structure and microbial activity in floodplain soil. **River Res. Appl**, v. 27, p.213–225, 2011. doi: 10.1002/rra.1352
- 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.
- Xu, L., Xu, X. W., Meng, F. X., Huo, Y. Y., Oren, A., Yang, J. Y., & Wang, C. S. (2013). *Halomonas zincidurans* sp. nov., a heavy-metal-tolerant bacterium isolated from the deep-sea environment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **63**, 4230-4236.
- Yan, C., Wang, F., Liu, H., Liu, H., Pu, S., Lin, F., Yuan, R. (2020). Deciphering the toxic effects of metals in gold mining area: microbial community tolerance mechanism and change of antibiotic resistance genes. *Environmental Research*, **189**, 109869.
- Yasir, M. (2018). Analysis of bacterial communities and characterization of antimicrobial strains from cave microbiota. *Brazilian Journal of Microbiology* **49**, 248-257.
- Youssef, N. H., & Elshahed, M. S. (2009). Diversity rankings among bacterial lineages in soil. *The ISME journal*, 3(3), 305-313.
- 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.

Termo de compromisso



Coordenação Executiva



Gestão Operacional

