

Mycobiota of a cave in Amazon Rainforest, Brazil

Jordane Pimentel Nóbrega (1), Julia Randow Cavalcanti (1), Joenny Maria da Silveira Lima (1), Renan do Nascimento Barbosa (1), Diego de Medeiros Bento (2), Cristina Maria de Souza-Motta (1) & Roger Fagner Ribeiro Mello (1)

(1) Departamento de Micologia Prof. Chaves Batista, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Avenida da Engenharia, s/n, Cidade Universitária, CEP: 50740-600, Recife, PE, Brazil (jordane.nobrega@ufpe.br)

(2) Cecav/ICMBio, Base Avançada no Rio Grande do Norte, CEP: 59015-350, Natal, RN, Brazil

Abstract

Caves harbor a fungal diversity that is still underestimated. Inventories related to this topic are still scarce in Brazil, especially in caves in the Amazon rainforest, which motivates the inventory of cavernicolous fungi in this biome. The collections were carried out in a ferruginous cave located in the Carajás National Forest, Pará state. The anemophilous fungi were isolated by sedimentation on plates with culture media, and the fungi associated with the sediment were isolated by serial dilution and by humid chamber technique. The fungal isolates were identified through morphological and molecular (DNA region sequencing) analyses. Thirty-eight taxa were identified, distributed in 14 genera and 3 phyla (Ascomycota, Basidiomycota and Mucoromycota). Among the anemophilous fungi, 8 genera were found, and 11 genera were identified in the sediment. Most of the species identified (94.7%) belong to the phylum Ascomycota, a pattern observed in caves worldwide. Some of the species identified in this study have not yet been reported in caves in Brazil and/or around the world, and others are species still unknown to taxonomy. These data demonstrate the potential for the existence of a yet unknown fungal diversity in these environments, and augment appeals for cave conservation, especially in the Amazon biome.

1. Introduction

A Amazônia é o bioma com a maior biodiversidade do planeta, ocupando quase metade do território brasileiro (IBGE, 2023). Com suas florestas sempre verdes e densas, o bioma abriga um número significativo de espécies da fauna e flora existentes no Brasil, tendo mais de 20.000 espécies de animais e mais de 14.000 espécies de fungos e plantas (CTFB, 2024; FLORA E FUNGA DO BRASIL, 2024). Além disso, a região possui grandes reservas minerais, com destaque para a área de Carajás, no Pará, onde se encontra uma das maiores reservas de minério de ferro do mundo. A exploração mineral tem gerado impactos ambientais significativos, incluindo a degradação da floresta (SILVA, 2014). Em resposta, foi criada a Floresta Nacional (FLONA) de Carajás, inicialmente destinada à proteção contra a continuidade da mineração, mas com o tempo passou a ter um papel fundamental na conservação da biodiversidade e no desenvolvimento de práticas de uso sustentável (ICMBIO, 2017).

A FLONA de Carajás é uma Unidade de Conservação de Uso Sustentável, pertence ao mosaico da Serra dos Carajás/PA, e é uma área de alta biodiversidade, abrigando espécies raras e/ou endêmicas, como a vegetação herbácea-arbustiva associada às áreas sobre canga. A região é também notável por suas cavernas ferruginosas, que contêm espeleotemas únicos e registros paleoambientais e arqueológicos (ICMBIO, 2017). Além disso, essas cavernas abrigam uma grande diversidade de troglóbios e possivelmente uma diversidade fúngica ainda desconhecida (ICMBIO, 2017). A mineração contínua na região exige a avaliação dos impactos sobre esses ecossistemas cavernícolas, sendo essencial o levantamento de aspectos físicos e biológicos das cavernas locais (ICMBIO, 2017).

Os fungos, organismos eucariontes que podem ser unicelulares (leveduras) ou multicelulares (filamentosos), desempenham papéis

ecológicos cruciais, especialmente na ciclagem de nutrientes como decompositores (WEBSTER & WEBER, 2007). Encontrados em praticamente todos os ambientes, os fungos são cosmopolitas (KENDRICK, 2017), e também ocorrem em cavernas, apesar das condições adversas. Nesses ambientes oligotróficos, eles participam da biomineralização, formação de espeleotemas e sedimentos, e são fontes de recursos orgânicos para outros organismos cavernícolas (NOVÁKOVÁ, 2009; GABRIEL & NORTHUP 2013). A maioria das espécies de fungos encontradas em cavernas é transportada pelo vento, água, ou outros animais que entram e saem constantemente (OGÓREK et al. 2014).

Nos últimos anos, o número de estudos sobre fungos em cavernas aumentou, especialmente em busca de fungos patogênicos, como o *Histoplasma capsulatum*. Contudo, no Brasil, ainda são limitados os estudos sobre a micobiota desses ambientes. Os poucos estudos existentes abordam registros de gêneros e espécies de fungos, além da descrição de novidades taxonômicas (ALVES et al. 2022; CONDÉ et al. 2023). Na Amazônia, a pesquisa sobre fungos cavernícolas é ainda mais rara, com um estudo realizado em uma caverna no Amazonas (CASTRILLÓN et al. 1976) e outro descrevendo espécies novas de *Penicillium* isolados em uma caverna no Pará (NÓBREGA et al. 2024). Embora a região seja um dos maiores biomas do Brasil, a maioria das pesquisas sobre cavernas se concentram em biomas como Caatinga e o Cerrado. No Pará, que possui o maior número de cavernas na Região Norte, estudos abrangendo a diversidade da microbiota cavernícola ainda não foram realizados até o momento. Desta forma, este estudo tem como objetivo investigar os fungos presentes no ar e no sedimento de uma caverna ferrífera na FLONA de Carajás/PA.

2. Materiais e métodos

Amostras de solo e de propágulos de fungos presentes no ar foram coletados da caverna Vale da Lua (código N4WS-0067) (Fig. 1), localizada no município de Parauapebas (6°04'23.2"S, 50°11'31.3"W), na FLONA de Carajás, estado do Pará. A caverna é formada por rochas ferruginosas, com latossolo vermelho-amarelo distrófico, apresenta uma projeção horizontal de 216 m, possui poças d'água e espeleotemas (ICMBIO, 2016).

Em triplicata, amostras de solo foram coletadas em três pontos no interior da caverna, armazenadas em potes esterilizados e transportados para análise em laboratório, onde foram mantidos sob refrigeração (5 °C) até que a etapa de isolamento fosse realizada. Para isolamento dos fungos presentes no solo foi realizada a técnica de suspensão seriada em placas e de câmara úmida (CUNHA et al. 2020). Uma amostra composta foi feita das amostras simples de cada ponto de coleta, em seguida, um grama de solo de cada amostra composta foi suspenso em 9 mL de água destilada esterilizada e, após agitação, a suspensão foi diluída até atingir o fator de diluição de 10^{-3} . Em triplicata, alíquotas de 1 mL das diluições de 10^{-2} e 10^{-3} foram semeadas, respectivamente, na superfície dos meios de cultura Ágar Sabouraud Dextrose (SAB) e Brain Heart Infusion (BHI), ambos adicionados de 100 mg/L de cloranfenicol para inibir o crescimento bacteriano. As placas foram incubadas em câmara escura, por sete dias, a 28 °C.

Para o isolamento em câmara úmida, o sedimento de cada amostra composta foi semeado em placas de Petri contendo papel filtro previamente esterilizado. O solo foi umidificado com água destilada esterilizada, e as placas foram incubadas no escuro, por até 15 dias, em temperatura ambiente (27 ± 2 °C) até o surgimento de culturas fúngicas visíveis. Os fungos presentes no ar foram amostrados por meio da técnica de sedimentação, em que placas de Petri contendo meio SAB adicionado de cloranfenicol (100 mg/L) foram posicionadas em

triplicada nos pontos de amostragem, com distância de 1 m do chão. As placas foram abertas e expostas ao ar da caverna por 20 minutos, e após esse tempo, foram fechadas, identificadas, acondicionadas em caixa térmica e transportadas para o laboratório, onde as placas foram incubadas no escuro, por 7 dias, a 28 °C.

Os isolados fúngicos foram distinguidos de acordo com suas características fenotípicas como cor, forma, tamanho, textura da superfície da colônia e pigmentação das hifas, e posteriormente foram purificados através de repique contínuo em placas contendo meio SAB.

A abundância dos fungos na caverna foi determinada com base no número de Unidades Formadoras de Colônias (UFCs) em cada ponto de amostragem. Os isolados fúngicos foram identificados por meio de observação das características morfológicas em microscópio óptico, e por meio de identificação molecular. A extração do DNA fúngico foi realizada utilizando colônias com até 7 dias de crescimento em meio SAB, e foi utilizado o kit de extração de DNA genômico da Promega (Wizard Genomic DNA Purification Kit), seguindo as recomendações do fabricante. As reações de PCR foram realizadas de acordo com as condições e primers determinados em estudos prévios dependendo do grupo de fungos a ser estudado, e as espécies de determinados gêneros e foram identificadas usando regiões específicas do DNA conforme a indicação da literatura. Os produtos de PCR foram purificados com as enzimas EXO + SAP (Alkaline Phosphatase/Exonuclease I) (Cellco, Brasil), conforme as orientações do fabricante, e foram encaminhados para sequenciamento na Plataforma Multiusuária de Sequenciamento de DNA do Centro de Biociências da UFPE utilizando os mesmos primers utilizados durante a amplificação (PCR). Após editadas, as sequências de nucleotídeos foram comparadas com sequências de referência depositadas no banco de dados do GenBank por meio da ferramenta BLAST, disponível na plataforma do Centro Nacional de Informação sobre Biotecnologia (NCBI).



Figura 1: Caverna Vale da Lua (N4WS-0067) na Floresta Nacional (FLONA) de Carajás, Pará, Brasil. Vista de fora da entrada da caverna (A); Coleta de sedimento no ponto de amostragem 1 (B); Vista do interior da caverna dos pontos de amostragem 2 (C) e 3 (D). Fotos: Diego Bento (2022).

3. Resultados

Foram contabilizados um total de 809 UFCs de fungos na caverna Vale da Lua, sendo 691 UFCs recuperadas no sedimento e 118 UFCs no

ar da caverna. O maior quantitativo de UFCs foi registrado no primeiro ponto de coleta (Fig. 2), tanto para o sedimento (289 UFCs) quanto

para o ar (57 UFCs). Quanto à riqueza de fungos, foram identificados 38 táxons distribuídos em 14 gêneros e 3 filios: *Ascomycota*, *Basidiomycota* e *Mucoromycota* (Fig. 3).

Entre os fungos anemófilos, 15 táxons foram identificados, classificados em 8 gêneros distintos, sendo alguns desses gêneros exclusivos nesse substrato, são eles, *Curvularia*, *Pestalotiopsis* e *Tritirachium*. A abundância e a riqueza de fungos foram mais expressivas no sedimento, que apresentou 31 táxons e 11 gêneros. Ainda neste substrato, foram observados gêneros exclusivos, como *Aspergillus*, *Humicola*, *Sporothrix*, *Tolyposcladium*, *Saitozyma* e *Absidia*.

Em relação à distribuição filogenética, os fungos anemófilos encontrados pertencem exclusivamente ao filo *Ascomycota*, enquanto no sedimento foram observadas espécies dos filios *Basidiomycota* e *Mucoromycota*. O gênero *Penicillium* apresentou uma riqueza significativamente maior que os demais grupos, com 13 táxons identificados, seguido por *Talaromyces* e *Aspergillus* com 5 e 4 táxons, respectivamente.

4. Discussão

Este estudo é um dos poucos realizados em ambientes cavernícolas no bioma amazônico, sendo uma das primeiras investigações sobre a microbiota de cavernas no estado do Pará. A caverna Vale da Lua apresentou uma alta diversidade de fungos, tanto em riqueza quanto em abundância, totalizando mais de 800 UFCs. Em comparação, estudos realizados em cavernas de outros biomas brasileiros, como a Caatinga, relataram números significativamente superiores. Por exemplo, ALVES et al. (2022) encontraram 3.704 UFCs na caverna Abrigo do Letreiro, no Rio Grande do Norte, e CUNHA et al. (2020) registraram 1.356 colônias na Bat Cave Meu Rei, em Pernambuco. Além disso, a maior abundância de fungos foi observada no primeiro ponto de amostragem, mais próximo da entrada da caverna, o que é consistente com outros estudos que indicam uma diminuição da diversidade e biomassa em direção às áreas mais profundas (VANDERWOLF et al. 2013). Além disso, estudos encontraram uma maior diversidade de espécies de fungos fora das cavernas em comparação com o interior, e como a maioria dos táxons documentados em cavernas já foram relatados em ambientes não hipógeos, especula-se que a abundância e diversidade seja maior na entrada de cavernas por conta do material fúngico que é transportado pelo vento, visto que o fluxo de ar é frequentemente maior nessas áreas, dependendo da estrutura da caverna (VANDERWOLF et al. 2013). Esse padrão é provavelmente devido ao maior fluxo de ar e ao transporte de material fúngico pela corrente de vento, que é mais intenso nas regiões próximas à entrada das cavernas.

Em relação à riqueza de fungos, foram identificadas 38 espécies distribuídas em 14 gêneros e três filios na caverna Vale da Lua. Na caverna Abrigo do Letreiro, ALVES et al. (2022) encontraram 41 espécies em 19 gêneros e dois filios (*Ascomycota* e *Basidiomycota*), enquanto em uma caverna de Minas Gerais, TAYLOR et al. (2014) relataram 47 espécies, distribuídas em 15 gêneros e dois filios (*Ascomycota* e *Mucoromycota*).

Neste estudo, o filo *Ascomycota* foi o mais representativo, com mais de 90% das espécies identificadas, um padrão comum em cavernas tanto no Brasil quanto globalmente. ZHANG et al. (2021), em um estudo

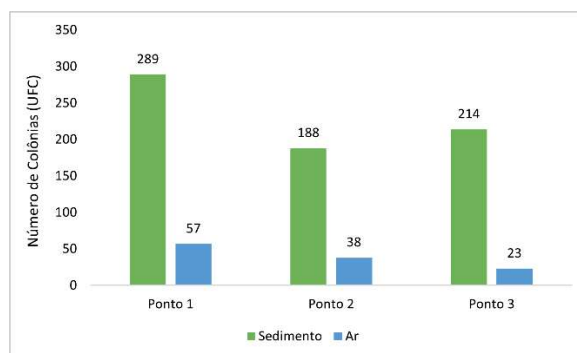


Figura 2: Abundância de fungos (UFC) observada no ar e no sedimento da caverna Vale da Lua, no Pará, Brasil.

realizado em 13 cavernas na China, também observaram que 88% das espécies pertenciam a esse filo, seguido por *Basidiomycota* e *Mucoromycota*, que representam 8% e 1,9% das espécies, respectivamente. Em uma revisão mundial sobre fungos em cavernas e minas, *Ascomycota* foi o filo dominante, com cerca de 75% das espécies descritas (ZHANG et al. 2021).

Os gêneros *Penicillium* e *Aspergillus*, conhecidos por sua distribuição cosmopolita, foram encontrados na caverna Vale da Lua, com *Penicillium* apresentando a maior abundância, com 13 espécies (aproximadamente 34% do total de espécies identificadas). Este gênero também foi amplamente registrado em cavernas europeias, representando 29% dos táxons identificados por KOZLOVA & MAZINA (2020). Por outro lado, *Talaromyces* foi o segundo gênero mais diverso, com 5 táxons identificados, o que contrasta com a tendência observada na maioria dos estudos, em que *Penicillium* e *Aspergillus* dominam as cavernas (VISAGIE et al. 2020; VISAGIE et al. 2021). Apesar de espécies de *Talaromyces* não serem constantemente encontradas em ambientes cavernícolas como outros representantes da ordem Eurotiales, já foram relatadas mais de 24 espécies do gênero presentes em cavidades subterrâneas pelo mundo (ZHANG et al. 2021). Ainda que *Aspergillus* seja um grupo geralmente relatado em maior quantidade de espécies isoladas de cavernas (VANDERWOLF et al. 2013; CUNHA et al. 2020; ALVES et al. 2022), neste estudo não houve um número expressivo de espécies, sendo identificado apenas 4 táxons.

Dentre as espécies obtidas tanto do ar quanto do sedimento da caverna Vale da Lua, algumas ainda não foram relatadas em cavernas pelo mundo, e outras são potencialmente espécies ainda não descritas para a ciência. Existem cerca de 140.000 espécies de fungos descritas atualmente, e apenas 2.000 espécies, aproximadamente, foram relatadas em ambientes cavernícolas (ZHANG et al. 2021), o que mostra o quão pouco estudada é a microbiota desses locais, o que resulta em estudos constantemente demonstrando novas ocorrências de espécies em cavernas, e até mesmo descrição de novos gêneros e espécies.

| Filo | Gênero | Número de espécies | Presença | |
|---------------|-----------------------|--------------------|-----------|-----------|
| | | | Ar | Sedimento |
| Ascomycota | <i>Aspergillus</i> | 4 | - | P |
| | <i>Blastobotrys</i> | 2 | P | P |
| | <i>Cladosporium</i> | 3 | P | P |
| | <i>Curvularia</i> | 1 | P | - |
| | <i>Humicola</i> | 1 | - | P |
| | <i>Penicillium</i> | 13 | P | P |
| | <i>Pestalotiopsis</i> | 1 | P | - |
| | <i>Sporothrix</i> | 1 | - | P |
| | <i>Talaromyces</i> | 5 | P | P |
| | <i>Tolypocladium</i> | 1 | - | P |
| | <i>Trichoderma</i> | 3 | P | P |
| | <i>Tritirachium</i> | 1 | P | - |
| Basidiomycota | <i>Saitozyma</i> | 1 | - | P |
| Mucoromycota | <i>Absidia</i> | 1 | - | P |
| TOTAL | | 14 | 38 | 8 |
| | | | 8 | 11 |

Figura 3: Lista dos gêneros e quantitativo de espécies de fungos isolados do ar e do sedimento da caverna Vale da Lua, Pará, Brasil. P = gênero presente (observado) e - = gênero ausente (não observado).

5. Conclusão

A caverna Vale da Lua apresentou uma riqueza e abundância significativas de fungos cultiváveis. Grande parte das espécies identificadas já foram registradas em ambientes subterrâneos, entretanto também houve novas ocorrências de espécies de fungos para ambientes cavernícolas no Brasil e mundo, além da descoberta de possíveis espécies ainda não descritas. Tais dados corroboram afirmações de que cavernas possuem grande potencial para abrigar espécies de fungos ainda des-

conhecidas, o que reforça a necessidade de políticas e práticas voltadas para a preservação e uso sustentável de cavernas, ainda mais de locais ameaçados e explorados como a região de Carajás no Pará. Além disso, esses resultados contribuirão para a elaboração do plano de manejo da caverna Vale da Lua, aumentando o apelo pela conservação de cavernas, sobretudo do bioma amazônico.

Agradecimentos

Esta pesquisa foi possível graças ao financiamento do Termo de Compromisso de Compensação Espeleológica (TCCE) 01/2018, assinado entre o Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) e a Vale S.A., com gestão de recursos pela Instituto Brasileiro de Desenvolvimento e Sustentabilidade (IABS). Recebemos também suporte

do Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) (Processos nº 408788/2021-6 e 311187/2022-6) Nós também expressamos nossas gratidões à equipe e colaboradores do ICMBio/CECAV e ao Centro de Gestão Integrada do ICMBio em Carajás pelo apoio logístico.

Referências

ALVES V.C.S., LIRA R.A., LIMA J.M.S., BARBOSA R.N., BENTO D.M., BARBIER E., BERNARD E., SOUZA-MOTTA C.M., BEZERRA J.D.P. (2019) Unravelling the fungal darkness in a tropical cave: richness and the description of one new genus and six new species. *Fungal Systematics and Evolution* 10: 139-167.

CASTRILLÓN A.L., MORAES M.A.P., FURTADO M.S.S. (1976) Isolamento de *Microsporum amazonicum* do solo do estado do Amazonas, Brasil. *Acta Amazônica* 6: 487-490.

CONDÉ T.O., LEÃO A.F., DUTRA Y.L.G., ROSADO A.W.C., NEVES S.C., FRAGA L.M.S., KASUYA M.C.M., PEREIRA O.L. (2023) Shedding light on the darkness: a new genus and four new species in the family Chaetomiaceae from Brazilian neotropical caves revealed by multi-gene phylogenetic analyses. *Mycological Progress* 22: 49.

CTFB. (2024) Catálogo Taxonômico da Fauna do Brasil. Disponível em: <<http://fauna.jbrj.gov.br/fauna>>. Acesso em: 02 nov. 2024.

CUNHA A.O., BEZERRA J.D.P., OLIVEIRA T.G., BARBIER E., BERNARD E., MACHADO A.R., SOUZA-MOTTA C.M. (2020) Living in the dark: Bat caves

as hotspots of fungal diversity. *PLoS ONE* 15(12): 1-24.

FLORA E FUNGA DO BRASIL. (2024) Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>>. Acesso em: 20 Nov 2024.

GABRIEL C.R., NORTHUP D.E. (2013) Microbial ecology: caves as na extreme habitat. In: CHEEPTHAM N. (ed.). *Cave microbiomes: a novel resource for drug discovery*. New York: Springer, p. 85-108.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/geociencias/informacoes-ambientais/vegetacao/15842-biomas>>. Acesso em: 14 jan. 2025.

ICMBIO. Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. (2016) STCP Engenharia de Projetos Ltda. Plano de Manejo da Floresta Nacional de Carajás. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, v. 2.

ICMBIO. Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. (2017) Plano de pesquisa geossistemas ferruginosos da Floresta Nacional de Carajás: temas prioritários para pesquisa e diretrizes para ampliação do conhecimento sobre os geossistemas ferruginosos da Floresta Nacional de Carajás e seu entorno. Brasília: ICMBIO, 82 p.

- KENDRICK B. (2017) *The Fifth Kingdom: An Introduction to Mycology*. USA: Hackett Publishing Company, 4. ed., 512 p.
- KOZLOVA E.V., MAZINA S.E. (2020) Biodiversity of Fungi in the photic and aphotic zones of Montenegro caves. *Aerobiologia* 36: 589–604.
- NOVÁKOVÁ A. (2009) Microscopic fungi isolated from the Domica Cave system (Slovak Karst National Park, Slovakia). A review. *International Journal of Speleology* 38(1): 71-82.
- OGÓREK R., LEJMAN A., MATKOWSKI K. (2014) Influence of the external environment on airborne fungi isolated from a cave. *Polish Journal of Environmental Studies* 23(2): 435–440.
- SILVA J.M.P. (2013) *Território e Mineração em Carajás*. Belém: GAFTA/UFBA, 1 ed., 275 p.
- TAYLOR E.L.S., FERREIRA R.L., CARDOSO P.G., STOIANOFF M.A.R. (2014) Cave entrance dependent spore dispersion of filamentous fungi isolated from various sediments of iron ore cave in Brazil: a colloquy on human threats while caving. *Ambient Science* 1: 16–28.
- VANDERWOLF K.J., MALLOCH D., MCALPINE D.F., FORBES G.J. (2013) A world review of fungi, yeasts, and slime molds in caves. *International Journal of Speleology* 42: 77–96.
- VISAGIE C.M., GOODWELL M., NKWE D.O. (2021) *Aspergillus* diversity from the Gcwihaba Cave in Botswana and description of one new species. *Fungal Systematics and Evolution* 8: 81–89.
- VISAGIE C.M., YILMAZ N., VANDERWOLF K., RENAUD J.B., SUMARAH M.W., HOUBRAKEN J., ASSEBGUI R., SEIFERT K.A., MALLOCH D. (2020) *Penicillium* diversity in Canadian bat caves, including a new species, *P. speluncae*. *Fungal Systematics and Evolution* 5: 1-15.
- WEBSTER J., WEBER W.S. (2007) *Introduction to Fungi*. Cambridge: Cambridge University Press, 3 ed., 875 p.
- ZHANG Z.F., ZHOU S.Y., EURWILAICHITR L., INGSRISWANG S., RAZA M. (2021) Culturable mycobiota from Karst caves in China II, with descriptions of 33 new species. *Fungal Diversity* 106 : 29–136.