

Richness of anemophilous fungi in a bat cave of FLONA de Carajás-PA, Brazil

Maiara Silva(1), Vitória Alves (2), Joenny Lima (3), Rafaela Lira (4), Aparecida Silva (5), Sabrina Silva (6), Diego Bento (7), Cristina Souza-Motta (8)

- (1) Departamento de Micologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil, maybmendes@gmail.com
 (2) Departamento de Micologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil, vitoria.cristinaa@ufpe.br (autor correspondente)
 (3) Departamento de Micologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil, joenny.lima@ufpe.br
 (4) Departamento de Micologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil, rafaela.alveslira@ufpe.br
 (5) Departamento de Micologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil, aparecida.csilva@ufpe.br
 (6) Departamento de Micologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil, sabrina.scl2345@gmail.com
 (7) Cecav/ICMBio, Base Avançada no Rio Grande do Norte, CEP: 59015-350, Natal, RN, Brasil, diego.bento@icmbio.gov.br
 (8) Departamento de Micologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil, cristina.motta@ufpe.br

Resumo

As cavernas são ambientes com características únicas e condições abióticas pouco variáveis, algumas apresentam uma propícia para o surgimento de novas populações de microorganismo, como fungos, justamente por ser um local com baixa disponibilidade de nutrientes e ausência de luz direta. Os fungos devido a sua viabilidade dos esporos são organismos que conseguem se adaptar facilmente a esse ambiente. Diante disso, este estudo teve como objetivo identificar as espécies mais abundantes de fungos presentes no ar da Caverna N5SM2 que fica localizada em uma Unidade de Conservação Federal no estado do Pará que está situada na região Amazônica do Brasil. A caverna foi tratada como uma única câmara com dois pontos de coleta a partir da entrada principal. No total, foram obtidas 297 UFC, sendo o ponto 2 que apresentou mais colônias (UFC = 271), seguido pelo pontos 1 (UFC = 26). Foram selecionados 27 isolados que foram identificados como pertencentes a 4 gêneros do filo Ascomycota e um do filo Basidiomycota (*Rigidoporus sp.*) O gênero *Aspergillus* e *Penicillium* foram os gêneros mais comuns. Do total de isolados foram identificadas 17 espécies das quais, duas foram consideradas como possíveis novidades taxonômicas do gênero *Aspergillus*. Este estudo proporcionou o conhecimento da abundância e riqueza de fungos presentes na caverna dos Carajás.

Abstract

Caves are environments with unique characteristics and somewhat variable abiotic conditions, some are conducive to the emergence of new populations of microorganisms, such as fungi, precisely because it is a place with low nutrient availability and absence of direct light. Fungi, due to their presence of spores, are organisms that easily adapt to this environment. Therefore, this study aimed to identify the most abundant species of fungi present in the air of Cave N5SM2, which is located in a Federal Conservation Unit in the state of Pará, which is located in the Amazon region of Brazil. The cave was secured as a single chamber with two collection points from the main entrance. In total, 297 CFU were obtained, with point 2 receiving the most colonies (CFU = 271), followed by point 1 (CFU = 26). 27 isolates were selected and identified as belonging to 4 genera of the phylum Ascomycota and one of the phylum Basidiomycota (*Rigidoporus sp.*) The genera *Aspergillus* and *Penicillium* were the most common genera. Of the total number of isolates, 17 species were identified, two of which were considered possible taxonomic novelties of the genus *Aspergillus*. This study provided knowledge of the abundance and richness of fungi present in the Carajás cave.

1. Introdução

O bioma Amazônia revela uma identidade única do Brasil, apresentando uma vasta biodiversidade e constituindo um importante patrimônio cultural e social do país. Cerca de um décimo das espécies do mundo ocorrem nele (MITTERMEIER et al. 2022). Neste Bioma, 0,98% de sua extensão corresponde a Floresta Nacional dos Carajás (FLONA) (ICMBio, 2016). A FLONA é caracterizada por suas formações ferríferas e dominações lateríticas ferruginosas (ICMBio, 2016), além disso, apresenta o maior número de cavernas ferruginosas conhecidas no Brasil (ICMBio, 2017). Cavernas possuem condições ambientais consideradas extremas, limitantes e desfavoráveis para muitos organismos. Porém, estudos bioespeleológicos confirmam que organismos como os fungos possuem populações bem estabelecidas em ambientes cavernícolas. Os fungos são organismos eucarióticos, unicelulares e são aclorofilados e devido

a sua fácil adaptação metabólica sobrevivem em ambientes extremos e oligotróficos. Fungos cavernícolas estão presentes em diferentes substratos como o ar, corpo dos morcegos e outros animais, guano, sedimento, espeleotemas e rochas (CUNHA et al. 2020). A presença dos fungos nas cavernas é fortemente influenciada por diversos fatores, como correntes de ar que advêm do ambiente externo, (ZHELJAZKOVA et al. 2020). Bat caves são cavernas que abrigam grandes populações de morcegos, havendo grande deposição do guano, que serve como uma rica fonte nutricional para fungos e outros organismos (PIMENTEL & BERNARD, 2024). Nesse contexto, esse estudo teve como objetivo, identificar os fungos presentes no ar da bat cave N5SM2, localizada no Pará, na região Amazônica do Brasil, e com isso, fornecer dados para a elaboração de um inventário micológico.

2. Materiais e Métodos

A Caverna N5SM2-099 (06°08'09.2"S, 50°07'47.8"W; registro CECAV 007313.01012.15.05536) está localizada em uma Unidade de Conservação Federal no Estado do Pará que está situada na região Amazônica do Brasil e abrange uma área de 411.948 hectares.

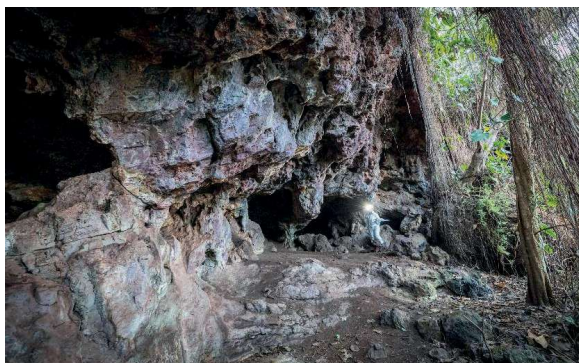


Figura 1: Entrada da caverna N5SM2-099.

A coleta dos fungos do ar foi realizada utilizando a metodologia de sedimentação em meio de cultura contidos em placas de Petri (*gravity settling culture plate method*). Dois pontos foram escolhidos para a verificação dos fungos do ar, em cada ponto foram abertas três placas de Petri de 90mm com meio de cultura Ágar Sabouraud adicionado de cloranfenicol (80 mg/L). As placas foram posicionadas paralelas umas das outras, a 1 metro do chão da caverna por 20 minutos (CUNHA et al. 2020). Após a exposição, as placas foram fechadas, identificadas e embaladas, em seguida foram encaminhadas ao Laboratório de Taxonomia e Biotecnologia Utilizando Fungos. As placas foram incubadas por até 14 dias no escuro, sendo diariamente avaliadas a fim de observar o surgimento de fungos.

Após o crescimento, as Unidades Formadoras de Colônia (UFC) foram contadas, parâmetro que determinou a abundância de fungos. As colônias morfológicamente distintas, foram sub cultivadas em meio Ágar Sabouraud acrescidos com cloranfenicol (80 mg/L). Após a confirmação

3. Resultados

A abundância dos fungos presentes no ar da bat cave foi determinada através dos número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) em cada ponto amostral. Após a análise das placas do ar, foram contabilizadas 297 UFC nos dois pontos amostrais, sendo 26 no ponto 1 e 271 no ponto 2. Dos 37 fungos com morfologias distintas, 27 foram selecionados para as etapas seguintes, enquanto os demais não resistiram ao método de preservação.

Com base na caracterização morfológica, os isolados fúngicos foram agrupados em quatro gêneros pertencentes ao filo *Ascomycota*,

da pureza, os fungos isolados foram preservados em uma solução de glicerol a 30% e com solução salina e foram mantidos na coleção de trabalho do laboratório.

Para a identificação dos isolados, inicialmente foi extraído o DNA fúngico através do Kit de extração de DNA genômico da Promega (Wizard Genomic DNA Purification Kit) seguindo as instruções do fabricante. Para a amplificação das regiões específicas do DNA foi realizada a metodologia de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) utilizando primers como ITS1 e ITS4 para a região barcode ITS rDNA, Bt2a e Bt2b para β -tubulina (TUB2), CMD5 e CMD6 para calmodulina (CAL), EF-728F e EF-986R para fator de alongamento da tradução (TEF1) seguindo as recomendações da literatura para cada gênero de fungo. Para verificação da amplificação das sequências específicas foi realizada a eletroforese em gel de agarose e posteriormente os produtos de PCR foram purificados com as enzimas EXO + SAP (Alkaline Phosphatase/Exonuclease I) (Cellco, Brasil) de acordo com as orientações do fabricante. Após a preparação, as amostras foram encaminhadas para sequenciamento na Plataforma Multiusuária de Sequenciamento de DNA do Centro de Biociências da UFPE, com os mesmos primers utilizados na amplificação (PCR).

Para as inferências filogenéticas, as sequências de DNA foram editadas e comparadas com outras sequências do banco de dados do GenBank do NCBI através da busca no BlastN para observação da proximidade com gênero ou espécies fúngicas. As análises filogenéticas foram realizadas com as sequências obtidas neste estudo, combinadas com sequências de referência da base de dados GenBank, onde foram montados alinhamentos, seguindo os artigos que tratam cada gênero. As sequências foram alinhadas utilizando a ferramenta online MAFFT v.7 e editadas manualmente no MEGA v.7. Os alinhamentos foram utilizados para mostrar as relações filogenéticas através de uma árvore de máxima verossimilhança (ML), usando o programa RAxML-HPC BlackBox (8.2.12) (STAMATAKIS, 2014) na plataforma CIPRES Science Gateway (MILLER et al. 2010) com as configurações estabelecidas. As árvores filogenéticas resultantes foram visualizadas no software FigTree (RAMBAUT, 2009) (dados não mostrados) e através dessas árvores, as espécies de fungos foram determinadas ao agrupar-se com espécies já conhecidas.

sendo eles *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicillium* e *Talaromyces*, e apenas o gênero *Rigidoporus* representando o filo Basidiomycota. Os 27 isolados foram agrupados em 17 espécies, com a predominância dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* (Figura 1). A análise filogenética preliminar revelou que dois isolados do gênero *Aspergillus* não se agruparam com nenhuma espécie previamente conhecida, sendo consideradas possíveis novidades taxonômicas pertencentes às seções *Cremeri* e *Circumdati*.

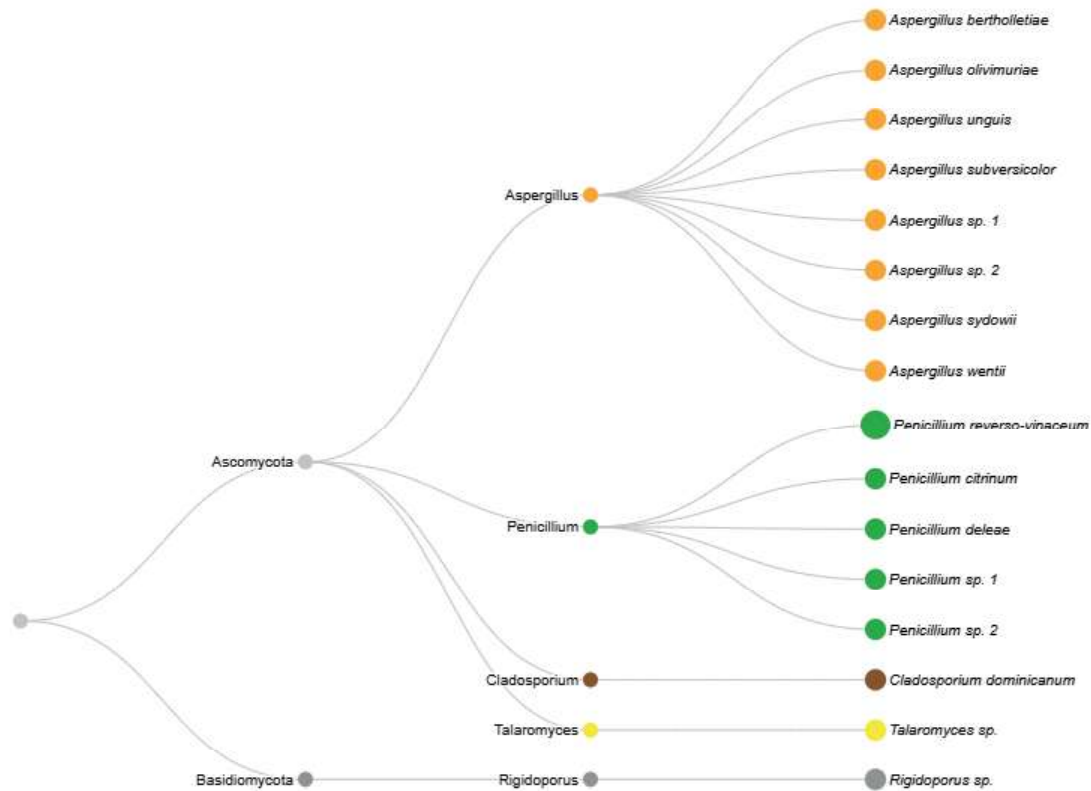


Figura 1: Representação dos isolados da bat cave N5SM2-099 separados por Filo, gênero e espécies.

4. Discussão

A riqueza e abundância de fungos anemófilos foi maior no ponto 2 em relação ao ponto 1. A ocorrência de fungos ao longo da caverna responde a vários fatores, incluindo condições ambientais, disponibilidade de nutrientes e fluxo de pessoas e animais (VANDERWOLF et al. 2013). Dessa forma, a maior incidência no ponto 2 pode ser atribuída à maior estabilidade das condições ambientais, uma vez que a influência do meio externo é reduzida, bem como pode estar relacionada a ocorrência e movimentação de morcegos que podem contribuir para alterar a micodiversidade (CUNHA et al. 2020).

Em relação a diversidade, os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* foram mais recorrentes. O que está de acordo com diversos estudos que descrevem estes gêneros como mais prevalentes na composição da microbiota cavernícola, em função da capacidade destes em prosperar mesmo em condições limitantes (ALVES et al. 2022; CUNHA et al. 2020.; VANDERWOLF et al. 2013).

Isso corrobora com vários estudos de cavernas de diferentes biomas e litologias (ALVES et al. 2022). Em um estudo de fungos filamentosos isolados de diferentes tipos de sedimento de uma caverna de minério

de ferro no Brasil, TAYLOR et al. (2014) relataram a presença dos gêneros *Aspergillus*, *Cladosporium* e *Penicillium*. Recentemente, NÓBREGA et al. (2024) identificaram uma riqueza de espécies de *Penicillium* em uma caverna na FLONA de Carajás incluindo novidades taxonômicas, a espécie *P. reverso-vinaceum* publicada por esses autores também foi encontrada neste estudo, o que confirma que os morcegos fazem o movimento de transição de uma caverna para outra. O gênero *Aspergillus* foi o mais representativo do filo Ascomycota, estando presente em todos os pontos amostrais da caverna N5SM2-99. Espécies desse gênero são relatadas em diversos estudos realizados em cavernas tropicais e subtropicais, e também em países europeus (VANDERWOLF et al. 2013). Apenas um isolado do filo Basidiomycota foi identificado, pertencendo ao gênero *Rigidoporus*, esse fungo já foi isolado em caverna por CUNHA et al. (2020) no guano de morcego. Além das espécies identificadas que já são conhecidas, dois isolados foram observados como possíveis espécies novas, o que confirma que o ambiente cavernícola abriga grandes novidades para a ciência.

5. Conclusão

A caverna N5SM2-099, PA-Brasil, apresentou uma riqueza de fungos anemófilos cultiváveis, os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* foram os mais abundantes, estando presentes em todos os pontos amostrados, incluindo táxons que possivelmente, ainda são desconhecidos para a

ciência. Os dados apresentados confirmam a necessidade de estudos deste tipo, pois contribuem para o estabelecimento de um plano de manejo e visitação segura para esta caverna, além de contribuir com pesquisas sobre a diversidade micológica.

Agradecimentos

Agradecemos a Micoteca URM da Universidade Federal de Pernambuco pela disponibilidade dos equipamentos e recursos necessários para a realização deste trabalho. Ao Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Cavernas (CECAV) pelo apoio e expedições para realização da coleta na caverna estudada. Agradecemos aos Termos de

Compromisso de Compensação Espeleológico (TCCE)/ ICMBio/Vale: 01/2018, 01/2022-Subprojeto 25.9 e 01/2023-Subprojeto 19, com a gestão de recursos pelo Instituto Brasileiro de Desenvolvimento e Sustentabilidade (IABS), assim como ao CNPq Processos N^o 408788/2021-6 e N^o 311187/2022-6, pelo suporte essencial à realização do presente estudo.

Referências

ALVES V.C.S. et al. (2022) 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.

CENTRO NACIONAL DE PESQUISA E CONSERVAÇÃO DE CAVERNAS (ICMBIO/CECAV). (2008) Termo de Referência para o plano de manejo espeleológico de cavernas com atividades turísticas. Brasília, 2008.

CUNHA A.O.B. et al. (2020) Living in the dark: Bat caves as hotspots of fungal diversity. *PLoS ONE* 15(12): e0243494.

ICMBIO. Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. STCP Engenharia de Projetos Ltda. Plano de Manejo da Floresta Nacional de Carajás. Brasília: MMA, 2016. 2 v.

MITTERMEIR R.A., Mittermeier C.G., Pilgrim J., Fonseca G., Konstant, W.R. (2002). *Wilderness: Earth's last wild places*. México: Cemex.

NÓBREGA J.P. et al. (2024). Six new *Penicillium* species in the section *Lanata-Divariata* from a cave in Amazon rainforest, Brazil. *Mycological Progress* 23(1): 1-24.

PIMENTEL N.T, BERNARD E. (2024) Monitoramento térmico de Bat caves na Floresta Nacional de Carajás. *Revista Brasileira de Espeleologia* 01(1):11–45.

RAMBAUT, A. FigTree v1.3.1. Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh, Edinburgh, 2009.

STAMATAKIS, A. RAxML Version 8: A tool for Phylogenetic Analysis and Post Analysis of Large Phylogenies. *Bioinformatics*, 2014.

VANDERWOLF K., 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(1):77–96.

ZHELIAZKOVA V. et al. (2020) Did you wash your caving suit? Cavers' role in the potential spread of *Pseudogymnoascus destructans*, the causative agent of White-Nose Disease. *International Journal of Speleology* 49(2):149-159.

ZHANG Z.F., ZHAO P., CAI L. (2018) Origin of cave fungi. *Frontiers in Microbiology* 9:1407.