



RELATÓRIO TÉCNICO FINAL

TCCE Nº 01/2018

**“Micobiota de cavernas da FLONA Carajás/PA: inventário
e subsídios para o manejo espeleoturístico”**

Sub-Projeto: 17.7

Coordenadora: Profa. Cristina Maria de Souza Motta

Departamento de Micologia, Centro de Biociências, UFPE

Abril/2024

1. INTRODUÇÃO

Estimativas da diversidade de fungos têm demonstrado que existem cerca de 2,5 milhões de espécies, das quais pouco mais de 120 mil são conhecidas (Niskanen et al. 2023). O Brasil é destacado como um dos países com maior diversidade fúngica e que necessita ser estudada, pois possui um grande potencial taxonômico, ecológico, biotecnológico e econômico (Maia et al. 2015; Boekhout et al. 2021). Apesar das políticas públicas nacionais de estudo e conservação da diversidade existentes, há uma grande lacuna no conhecimento da biodiversidade em cavidades naturais, com destaque para estudos microbiológicos - principalmente de fungos (Taylor et al. 2013, 2014; Paula et al. 2016; Paula et al. 2019; Cunha et al. 2020; Alves et al. 2022; Carvalho et al. 2022; Pereira et al. 2022; Lima et al. 2024).

A microbiota de cavernas é um assunto de grande importância, que tem tido maior interesse desde 2013 quando Vanderwolf et al. publicaram uma revisão global de fungos de ambientes cavernícolas. Os autores analisaram 225 artigos e observaram que 1029 espécies de fungos foram citadas entre as publicações, deste total apenas três estudos para o Brasil, com registro da ocorrência de 17 fungos. Da região Norte do Brasil, uma única pesquisa foi citada que registrou fungos em solo de uma gruta no Amazonas (Castrillón et al. 1976). A ausência de informação microbiológica de cavernas em um país megadiverso é uma parte ainda desconhecida da biodiversidade que necessita ser desvendada para auxiliar os gestores de Unidades de Conservação (UC) no planejamento de atividades turísticas, bem como fornecer informações da diversidade de espécies de fungos conhecidos ou ainda não descritos pela ciência, atuando diretamente nas estimativas nacionais e globais da diversidade micológica (Taylor et al. 2013; Cunha et al. 2020).

A Floresta Nacional (FLONA) de Carajás é uma UC de uso sustentável, uma das principais UC's pertencentes ao mosaico da Serra dos Carajás/PA, e possui milhares de cavidades ferruginosas que, além de possuir informações antropológicas e arqueológicas da história amazônica, abriga uma diversidade de plantas e animais de relações ecológicas especializadas com seus ecossistemas (Bezerra et al. 2017). A pouca informação existente sobre a fauna e a flora desses ambientes demonstra o potencial para inventário de espécies conhecidas e desconhecidas pela comunidade científica, que necessitam de catalogação e conservação (Bezerra et al. 2017). No Brasil, temos conhecimento de apenas um estudo de fungos em sedimentos de uma cavidade em minério de ferro em Minas Gerais, da qual foram obtidos cerca de 4.500 Unidades Formadoras de Colônias (UFCs) pertencentes a 34 espécies de 12 gêneros, sendo *Aspergillus* e *Penicillium* os gêneros mais abundantes (Taylor et al. 2014).

Estudando uma *bat cave* em área de Caatinga, Cunha et al. (2020) relataram a presença de cerca de 1.500 UFCs obtidas do ar, guano e corpo de morcegos e identificaram os isolados em 59 táxons pertencentes a 37 gêneros, com destaque para *Aspergillus*. Ainda, Cunha et al. (2020) também relataram uma nova espécie de *Geosmithia* obtida de asa do morcego *Carollia perspicillata* (Crous et al. 2018). Outros estudos estão sendo realizados em cavernas de UCs da Caatinga e têm demonstrado um grande potencial para inventários de espécies descritas ou desconhecidas pela ciência. Por exemplo, Pereira *et al.* (2022) relataram a presença de oito espécies de *Cladosporium*, sendo duas novas para a ciência; os autores ainda destacaram que outros isolados obtidos necessitam de mais estudos e coletas pois apresentam potencial de serem descritos como novidades taxonômicas.

As milhares de cavidades ferruginosas que são encontradas na FLONA Carajás, bem como em outras UC's da região, tais como o Parque Nacional (PARNA) dos Campos Ferruginosos, têm um potencial de serem descobertas como um hotspot não só da diversidade da fauna e flora, mas também da diversidade de fungos na Amazônia brasileira (Bezerra et al. 2017). A grande lacuna no conhecimento da diversidade fúngica desses ambientes no Brasil é um dos fatores que nos motivaram para a construção do inventário de espécies de fungos presentes no ar, no sedimento (guano dos morcegos e solo), no corpo dos morcegos, e em outros substratos/hospedeiros observados no momento da coleta, além do fornecimento de informações que contribuirão diretamente como subsídios para o manejo espeleoturístico (a partir do relato de espécies potencialmente ou reconhecidamente patogênicas). Ainda, apesar de não ser o foco da presente pesquisa, fungos obtidos em ambientes cavernícolas poderão ter o seu potencial biotecnológico/econômico verificado em outros estudos, pois estarão preservados em coleções de culturas nacionais com intuito de proteger o patrimônio genético do Brasil em seu próprio território (Barbosa et al. 2020). Além disso, pesquisas micológicas pioneiras, como a aqui apresentada, trazem informações importantes para que a diversidade micológica nacional preencha lacunas nas estimativas da diversidade global de fungos, podendo atuar diretamente no plano estratégico de políticas públicas de conservação de cavidades ferruginosas no Brasil.

Os resultados aqui apresentados contribuem para o atendimento aos componentes 1 (Conhecimento do Patrimônio Espeleológico), 2 (Realização de estudos espeleológicos na elaboração de Planos de Manejo nas Unidades de Conservação federais), 3 (Utilização Sustentável dos Componentes do Patrimônio Espeleológico) e 6 (Fortalecimento Institucional para a Gestão do Patrimônio Espeleológico) do Programa Nacional de Conservação do Patrimônio Espeleológico, instituído pela Portaria MMA N° 358/2009.

2. OBJETIVOS PROPOSTOS NO PROJETO

Registrar/Identificar a diversidade fúngica presente em amostras do ar, da água, de sedimentos, do corpo dos morcegos, e outros substratos/hospedeiros em cavernas ferríferas na Serra dos Carajás/PA, gerando subsídios para o manejo espeleoturístico.

- Catalogar as espécies de fungos que ocorrem em até seis cavernas localizadas na Serra dos Carajás, estado do Pará;
- Contribuir com o inventário de espécies de fungos presentes no ar, na água, no sedimento (e.g. guano dos morcegos e solo), no corpo dos morcegos, e outros substratos/hospedeiros encontrados no momento da coleta;
- Identificar os isolados obtidos por meio de análises morfológicas e moleculares;
- Explorar a diversidade fúngica de cavernas com base nas bibliotecas de metagenoma de ITS;
- Realizar análises filogenéticas das sequências de DNA obtidas e posicionar filogeneticamente as espécies encontradas;
- Descrever novos táxons e/ou novos relatos de espécies de fungos em cavernas;
- Depositar pelo menos um isolado de cada espécie de fungo na coleção de culturas Micoteca URM, com vistas a proteger o patrimônio genético brasileiro;
- Disponibilizar, por meio da Micoteca URM, culturas de fungos de ambientes cavernícolas para outros estudos de produção de moléculas de interesse biotecnológico;
- Avaliar a abundância de fungos pela quantificação das UFCs em todos os substratos estudados, e estimar a diversidade de espécies a partir de análises ecológicas;
- Contribuir com a formação de recursos humanos qualificados em taxonomia e ecologia de fungos em ambientes de cavernas;
- Contribuir com aprimoramento do conhecimento dos técnicos do ICMBio e demais técnicos de órgãos ambientais, frente à importância e riscos dos fungos em ambientes de cavernas;
- Contribuir com a elaboração e atualização das ações de manejo das cavernas, seguindo orientações do CECAV/ICMBio e do Plano de Ação em Ciência, Tecnologia e Inovação para os Biomas Brasileiros, assim como colaborar com a execução do Programa Nacional de Conservação do Patrimônio Espeleológico, ao gerar informações necessárias ao uso sustentável de cavernas com foco no espeleoturismo.

3. METODOLOGIA

Seis cavernas em litologias ferríferas da FLONA Carajás-PA, as quais estão em processo de estudos para liberação ao turismo, foram indicadas pela equipe gestora do Núcleo de Gestão Integrada (NGI) Carajás para a realização do inventário de fungos. Foram estudados os fungos presentes no ar (anemófilos), na água, no sedimento (e.g. guano dos morcegos, solo), no corpo dos morcegos e em outros substratos/hospedeiros encontrados no momento da coleta. As coletas seguiram metodologias previamente estabelecidas pelo grupo de pesquisa, sendo realizadas em pontos específicos a depender da estrutura de cada caverna. Os fungos foram isolados do ar (sedimentação passiva), do guano (diluição seriada e câmara úmida), do solo (diluição seriada e câmara úmida), e dos morcegos (esfregaços com swabs na cavidade oral, pelos, asas e região urogenital) de acordo com Cunha et al. (2020) (SISBIO 82248/1). A quantificação das UFCs (abundância) foi realizada em todos os substratos e análises ecológicas foram utilizadas para estimar a diversidade de fungos.

Os fungos foram identificados por caracteres morfológicos e inferências filogenéticas de sequências de rDNA (extração, amplificação, purificação e sequenciamento de marcadores específicos como ITS, LSU, beta tubulina, calmodulina, TEF, dentre outras a depender do táxon isolado) usando protocolos de extração de DNA e reações de PCR e sequenciamento previamente estabelecidas (ex. Barbosa et al. 2020, Cunha et al. 2020).

Todos os isolados obtidos estão depositados nas coleções de trabalho dos Laboratório de Taxonomia e Biotecnologia da UFPE e fungos isolados de duas cavernas e processados pela equipe da UFG estão depositados na coleção de trabalho do Laboratório de Micologia (IPTSP-UFG). Os fungos estão em processo de depósito na Micoteca URM/UFPE e os exemplares serão preservados por no mínimo dois métodos (ex. óleo mineral, liofilização, ultracongelamento, etc.). As sequências de DNA estão sendo armazenadas em associação com os dados depositados nas coleções onde os fungos estão armazenados e serão depositadas em repositórios públicos como o GenBank a partir da submissão das publicações científicas. As informações resultantes deste projeto contribuirão com o conhecimento da micota presente nas cavernas estudadas, servirão para a elaboração e atualização das ações de manejo das cavernas (seguindo orientações do CECAV/ICMBio), e serão disponibilizadas em bancos de dados públicos para estimativa nacional e global da diversidade de fungos nestes ambientes.

Para a análise dos hifomicetos de folheto, em pontos escolhidos aleatoriamente em cada caverna, foram coletadas amostras de folheto que foram armazenadas em sacos plásticos e levadas ao Laboratório de Hifomicetos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). As

folhas foram lavadas com água corrente para eliminar detritos e nematoides (Castañeda-Ruiz (2005). Após esse processo, as folhas foram postas sobre um papel toalha durante 10 minutos para serem secas e posteriormente cortadas em fragmentos de aproximadamente 7 cm². Para cada amostra foram montadas câmaras úmidas em placas de Petri, contendo três fragmentos de folhas e incubadas em uma caixa de isopor. O material incubado foi observado com estereomicroscópio e durante 30 dias. As estruturas fúngicas foram montadas em lâminas com ácido láctico a 90% e visualizadas em microscópio de luz para identificação dos espécimes.

Para a análise metagenômica, o material genético total das amostras coletadas foi obtido pelo kit de extração da MO-Bio (Power Soil DNA Isolation Kit). Um arquivo metadados foi gerado incluindo todas as informações e descrição das amostras, categoria de cada dado, numérico ou categórico (Arquivos metadados-Metagenômica). As sequências foram analisadas utilizando o programa Qiime2 (v.2017.6.0), Quantitative Insights Into Microbial Ecology, seguindo o pipeline Casava 1.8 paired-end demultiplexed fastq e o “Atacama soil microbiome tutorial”. A classificação taxonômica foi feita utilizando o feature-classifier classify-sklearn (Pedregosa et al., 2011), que utiliza VSEARCH global alignment, e o banco UNITE v8.2020.

4. RESULTADOS

4.1 FUNGOS CULTIVÁVEIS

A abundância dos fungos encontrados nos substratos das cavernas analisados foi estipulada com base no número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) (Tabela 1). Para o ar e sedimento/guano de todas as cavernas analisadas foram contabilizadas 1.382 e 11.973 UFC, respectivamente. Para as amostras do corpo dos morcegos e paredes/espeleotemas foram obtidas 720 e 888 UFC, respectivamente. Deste total, foram obtidos 422 isolados do ar, 411 isolados do sedimento/guano, 57 isolados do corpo dos morcegos e 20 isolados das paredes/espeleotemas (Tabela 2). Com o maior quantitativo de isolados do ar, destacam-se as cavernas N1-0174 (Gruta do N1/Janela verde) e S11D-0001, com 102 e 118 isolados, respectivamente. Enquanto para o sedimento, as cavernas N1-0174 (Gruta do N1/Janela verde) e N4WS-0067 (Vale da Lua) somam 90 e 115 isolados, respectivamente.

Tabela 1: Número de **Unidade Formadora de Colônias (UFC)** de cada caverna amostrada.

Caverna	Local de coleta			Paredes/ Espeleotemas	Total
	Ar	Sedimento/ guano	Morcego		
N1-0174 (Gruta do N1/Janela verde)	254	525	-	112	891
S11D-0001	308	1.676	-	215	2.199
N4WS-0067 (Vale da Lua)	196	1.621	-	322	2.139
N1-0002	183	1.140	-	-	1.323
N1-0004	144	5.078	-	239	5.461
N5SM2-099 (bat cave)	297	1.933	720	-	2.950
Total	1.382	11.973	720	888	14.963

Tabela 2: Número de isolados sendo estudados e/ou preservados de cada caverna amostrada.

Caverna	Local de coleta			Paredes/ Espeleotemas	Total
	Ar	Sedimento/ guano	Morcego		
N1-0174 (Gruta do N1/Janela verde)	102	90	-	4	196
S11D-0001	118	74	-	4	196
N4WS-0067 (Vale da Lua)	58	115	-	5	178
N1-0002	45	50	-	-	95
N1-0004	62	67	-	7	136
N5SM2-099 (bat cave)	37	15	57	-	109
Total	422	411	57	20	910

A partir das análises morfológicas e de sequências de DNA, 40 gêneros foram identificados nas amostras do ar (Tabela 3) e 35 nas amostras do sedimento/guano (Tabela 4) das seis cavernas estudadas (Figura 1). Os gêneros *Cladosporium* e *Penicillium* foram comuns para o ar de todas as cavernas, enquanto no sedimento, apenas *Penicillium* foi encontrado em todas as amostras. Alguns gêneros foram comuns em um substrato de pelo menos três das seis cavernas analisadas, foram eles: *Aspergillus*, *Blastobotrys*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Epicoccum*, *Fusarium*, *Talaromyces*, *Trichoderma* e *Tolypocladium*. Em relação aos gêneros encontrados no ar das cavernas analisadas, cerca de 23,2% dos gêneros são exclusivos para a caverna N1-0174, 19,6% são exclusivos para a caverna S11D-0001, 10,7% são exclusivos para a caverna N1-0004, 8,3% são exclusivos para a caverna N1-0002 e 5,4% são exclusivos para a caverna N4WS-0067 (Figura 2). Para os fungos isolados do corpo dos morcegos e em paredes/espeleotemas as etapas de identificação ainda estão em processamento, visto que, para a grande maioria, a extração de DNA não foi bem sucedida.

Das cavidades estudadas, destaca-se a caverna N4WS-0067 (Vale da Lua) com o maior quantitativo de gêneros identificados (32, sendo 17 do ar e 15 do sedimento/guano).

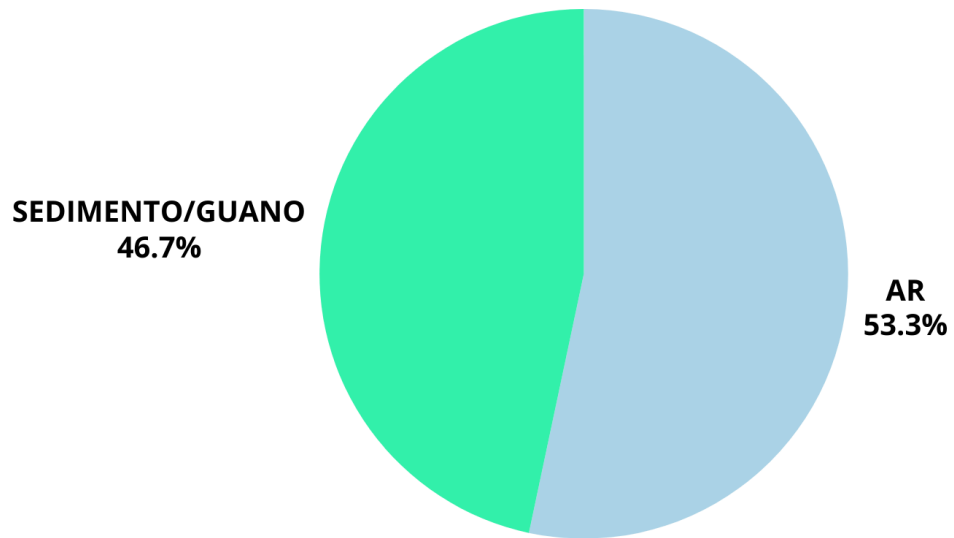


Figura 1: Percentual de gêneros encontrados por substrato (ar e sedimento/guano).

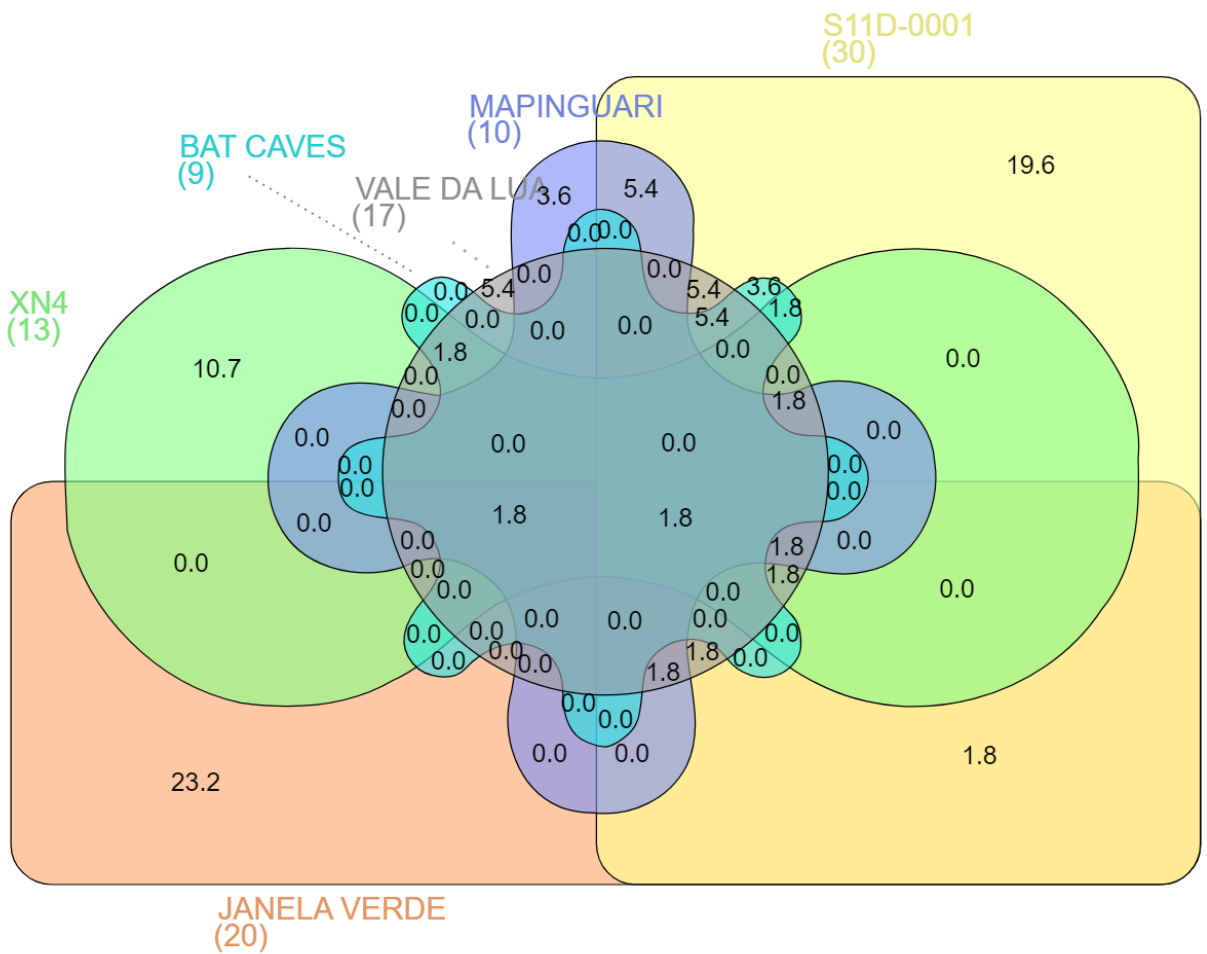


Figura 2: Percentual de gêneros de fungos cultiváveis no ar das cavernas analisadas.

Tabela 3: Gêneros de fungos cultiváveis encontrados no ar das cavernas S11D-0001, N4WS-0067 (Vale da Lua), N1-0004, N1-0174 (Gruta do N1/Janela verde), N1-0002 (Mapinguari) e N5SM2-99 (bat cave), da Flona do Carajás-PA.

Gêneros	Cavernas					
	S11D-0001	N4WS-0067	N1-0004	N1-0174	N1-0002	N5SM2-99
<i>Aspergillus</i>	+	-	+	-	-	+
<i>Aureobasidium</i>	+	-	-	-	+	-
<i>Arthrinium</i>	-	-	-	+	-	-
<i>Amphinema</i>	-	+	-	-	-	-
<i>Alternaria</i>	-	-	+	-	-	-
<i>Bipolaris</i>	+	-	-	-	+	-
<i>Blastobotrys</i>	-	+	+	-	-	+
<i>Cladosporium</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Corynespora</i>	+	-	-	-	-	-
<i>Curvularia</i>	+	+	+	-	+	-
<i>Clonostachys</i>	-	-	-	+	-	-
<i>Diaporthe</i>	-	-	+	-	-	-
<i>Debaryomyces</i>	-	-	+	-	-	-
<i>Epicoccum</i>	+	+	-	+	+	-
<i>Engyodontium</i>	-	-	-	+	-	-
<i>Fusarium</i>	+	+	-	+	-	-
<i>Inocybe</i>	-	+	-	-	-	-
<i>Lasiodiplodia</i>	-	+	-	-	-	-
<i>Mortierella</i>	+	-	-	-	-	-
<i>Metapochonia</i>	-	-	-	+	-	-
<i>Monochaetia</i>	-	+	-	-	-	-

<i>Neopestalotiopsis</i>	-	-	-	+	-	-
<i>Parahumicola</i>	+	-	-	-	-	-
<i>Pestalotiopsis</i>	+	+	-	-	-	-
<i>Penicillium</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Periconia</i>	+	-	-	-	+	-
<i>Pseudopestalotiopsis</i>	-	-	-	+	-	-
<i>Pithomyces</i>	-	-	-	+	-	-
<i>Plectosphaerella</i>	-	+	-	-	-	-
<i>Pseudopithomyces</i>	-	+	-	-	-	-
<i>Phoma</i>	-	-	+	-	-	-
<i>Phyllosticta</i>	-	-	+	-	-	-
<i>Paraconiothyrium</i>	-	-	+	-	-	-
<i>Sebacina</i>	-	+	-	-	-	-
<i>Talaromyces</i>	+	+	+	+	-	-
<i>Trichoderma</i>	+	+	+	-	+	-
<i>Tritirachium</i>	-	+	-	-	-	-
<i>Umbelopsis</i>	-	-	-	-	+	-
<i>Xylaria</i>	-	-	-	+	-	-
<i>Zasmidium</i>	+					
Total = 40	16	17	13	13	9	4

+Presença; - Ausência

Tabela 4: Gêneros de fungos cultiváveis encontrados no sedimento/guano das cavernas S11D-0001, N4WS-0067 (Vale da Lua), N1-0004, N1-0174 (Gruta do N1/Janela verde), N1-0002 (Mapinguari) e N5SM2-99 (bat cave), da Flona do Carajás-PA.

Gêneros	Cavernas					
	S11D-0001	N4WS-0067	N1-0004	N1-0174	N1-0002	N5SM2-99
<i>Aspergillus</i>	-	+	+	+	-	-
<i>Arthrimum</i>	-	-	-	+	-	-
<i>Absidia</i>	-	+	+	-	-	-
<i>Apiotrichum</i>	-	-	+	+	-	-
<i>Arcopilus</i>	-	-	-	-	+	-
<i>Blastobotrys</i>	-	+	+	-	-	-
<i>Cladosporium</i>	+	+	-	-	-	-
<i>Coniothyrium</i>	+	-	-	-	-	-
<i>Cyathicula</i>	-	-	-	+	-	-
<i>Clonostachys</i>	-	-	-	+	-	-
<i>Crocicreas</i>	-	-	-	+	-	-
<i>Cryomyces</i>	-	+	-	-	-	-
<i>Cyberlindnera</i>	-	+	-	-	-	-
<i>Debaryomyces</i>	-	-	+	-	-	-
<i>Eupenicillium</i>	-	-	-	+	-	-
<i>Engyodontium</i>	-	-	-	+	-	-
<i>Fusarium</i>	-	+	-	-	-	-
<i>Galactomyces</i>	-	-	+	-	-	-
<i>Humicola</i>	-	+	-	-	+	-
<i>Leptobacillium</i>	+	-	-	-	-	-
<i>Mucor</i>	+	-	-	-	-	-

<i>Metacordyceps</i>	+	-	-	-	-	-
<i>Penicillium</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Podila</i>	-	-	-	+	-	-
<i>Pseudallescheria</i>	-	-	+	-	-	-
<i>Sphacelia</i>	+	-	-	-	-	-
<i>Sporothrix</i>	-	+	-	-	-	-
<i>Schwanniomyces</i>	-	+	-	-	-	-
<i>Saitozyma</i>	-	+	-	-	-	-
<i>Scopulariopsis</i>	-	-	+	-	-	-
<i>Talaromyces</i>	-	+	+	+	+	-
<i>Trichoderma</i>	-	+	+	+	-	-
<i>Tolypocladium</i>	+	+	+	+	-	-
<i>Trichomonascus</i>	-	-	-	-	+	-
<i>Umbelopsis</i>	-	-	+	-	-	-
Total = 35	8	15	13	13	5	1

+Presença; - Ausência

* Uma relação das espécies de fungos cultiváveis nas cavernas S11D-0001, N4WS-0067 (Vale da Lua), N1-0004, N1-0174 (Gruta do N1/Janela verde), N1-0002 (Mapinguari) e N5SM2-99 (bat cave), da Flona do Carajás-PA, pode ser consultada na Planilha Excel constante no link:

[x](#) Tabela de espécies de fungos cultiváveis.xlsx .

A Figura 3 ilustra a presença de fungos cultiváveis comuns no ar e no sedimento/guano e os exclusivos de cada caverna estudada. Para a caverna N4WS-0067 (Vale da Lua), foram obtidos gêneros exclusivos como *Plectosphaerella*, *Inocybe*, *Amphinema*, *Lasiodiplodia*, *Monochaetia*, *Sebacina*, *Tritirachium* e *Pseudopithomyces* encontrados no ar, enquanto *Crynitomyces*, *Cyberlindnera*, *Schwanniomyces*, *Saitozyna* e *Sporothrix* estavam presentes no sedimento. Para a caverna N1-0174 (Gruta do N1/Janela verde) foram obtidos 26 gêneros (13 do ar e 13 do sedimento/guano). Nas amostras do ar foram encontrados gêneros exclusivos como *Neopestalotiopsis*, *Xylaria*, *Pseudopestalotiopsis*, *Metapoconia* e *Phytomyces* e, *Cyathicula*, *Apotrichum*, *Podila*, *Crocicreas* e *Eupenicillium* em amostras do sedimento/guano. Para a caverna S11D-0001, 24 gêneros (16 do ar e 8 do sedimento/guano) foram obtidos. A caverna S11D-0001 apresentou gêneros exclusivos do ar que incluem *Corynespora*, *Mortierella*, *Parahumicola* e *Zasmidium*, enquanto no sedimento, *Coniothyrium*, *Leptobacillium*, *Mucor*, *Metacordyceps*, *Sphacelia* e *Tolypocladium* foram exclusivos para esse substrato. A caverna N1-0004, apresentou o quantitativo de 26 gêneros (13 do ar e 13 do sedimento/guano). Para esta caverna, *Alternaria*, *Diaporthe*, *Phoma*, *Phyllosticta* e *Paraconiothyrium* foram exclusivos do ar, e *Apiotrichum*, *Galactomyces*, *Pseudallescheria* e *Scopulariopsis* foram exclusivos do sedimento. As cavernas N1-0002 (Mapinguari) e N5SM2-99 (bat cave) apresentaram 14 (9 do ar e 5 do sedimento/guano) e 5 (4 do ar e 1 do sedimento/guano) gêneros, respectivamente. A caverna N1-0002 (Mapinguari), não apresentou nenhum gênero exclusivo para o ar, porém, os gêneros *Arcopilus* e *Trichomonascus* foram exclusivos para o sedimento desta caverna. Enquanto para a caverna N5SM2-99 (bat cave), nenhum gênero fúngico foi exclusivo para os substratos analisados.

Algumas pranchas com características morfológicas macro e microscópicas de alguns fungos cultiváveis procedentes das cavernas estudadas podem ser observadas nas Figuras de 4-8. Além disso, mais pranchas com imagens das coletas realizadas nas cavernas podem ser visualizadas nas Figuras 9-13.

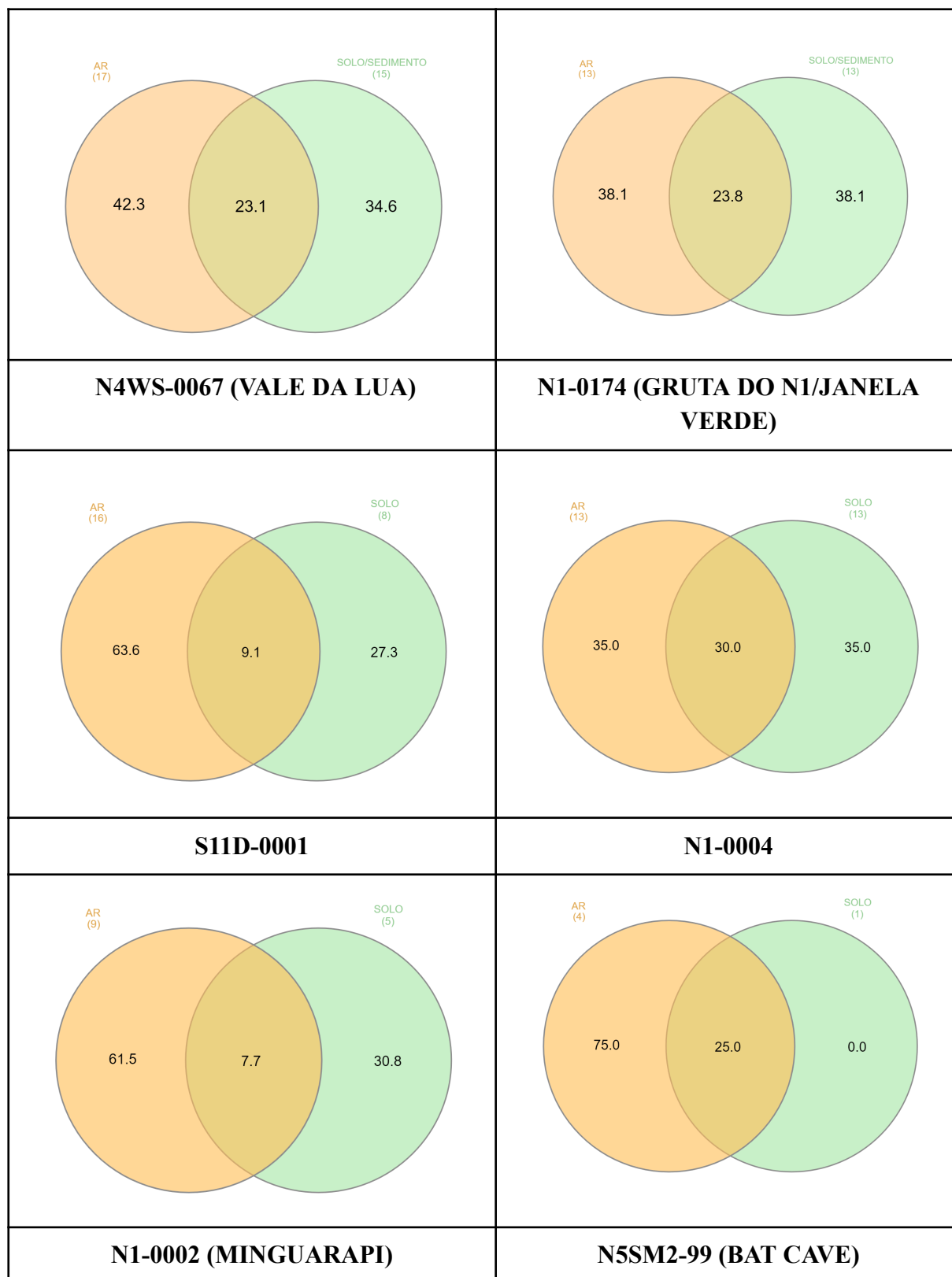


Figura 3: Percentual de gêneros de fungos cultiváveis comuns e/ou exclusivos no ar e sedimento/guano das cavernas N4WS-0067(Vale da Lua), N1-0174 (Gruta do N1/Janela verde), S11D-0001, N1-0004, N1-0002 (Mapinguari) e N5SM2-99 (bat cave), da Flona do Carajás-PA.

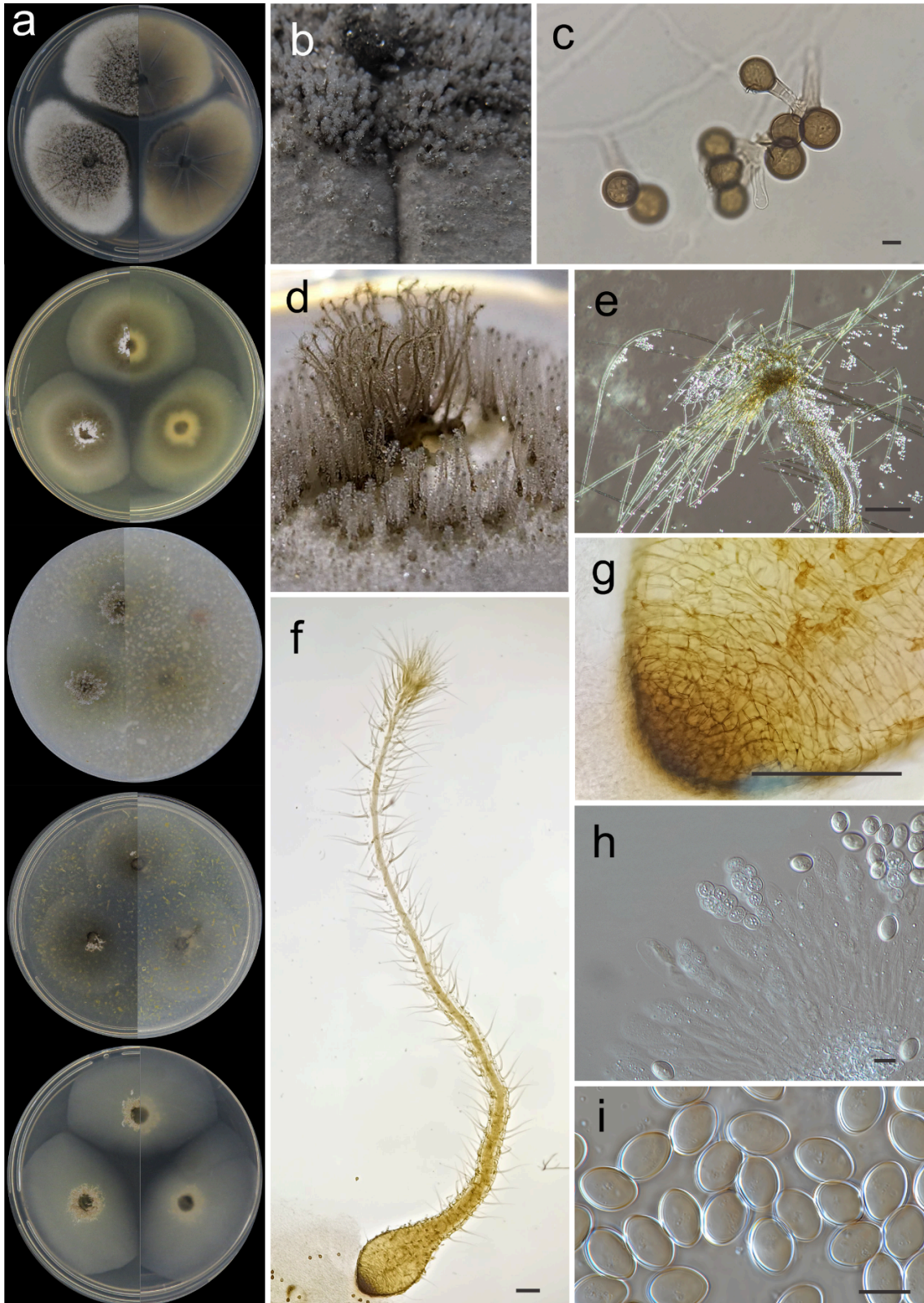


Figura 4: *Parahumicola* sp. nov. (JB696) **A.** Colonies from top to bottom PDA, MEA, AO, PCA and CMA after 7 d incubation. **B.** Part of the colony on BDA. **C.** Aleuroconidia in lactic acid. **D.** Mature ascomata on BDA, side view. **E.** Terminal ascomata hairs and ostiole **F.** Ascomata mounted in lactic acid. **G.** Structure of ascomatal wall in surface view. **H.** Asci. **I.** Ascospore.. Scale bars: E-G = 150 µm; C,H,I = 10 µm. *ARTIGO EM ELABORAÇÃO.

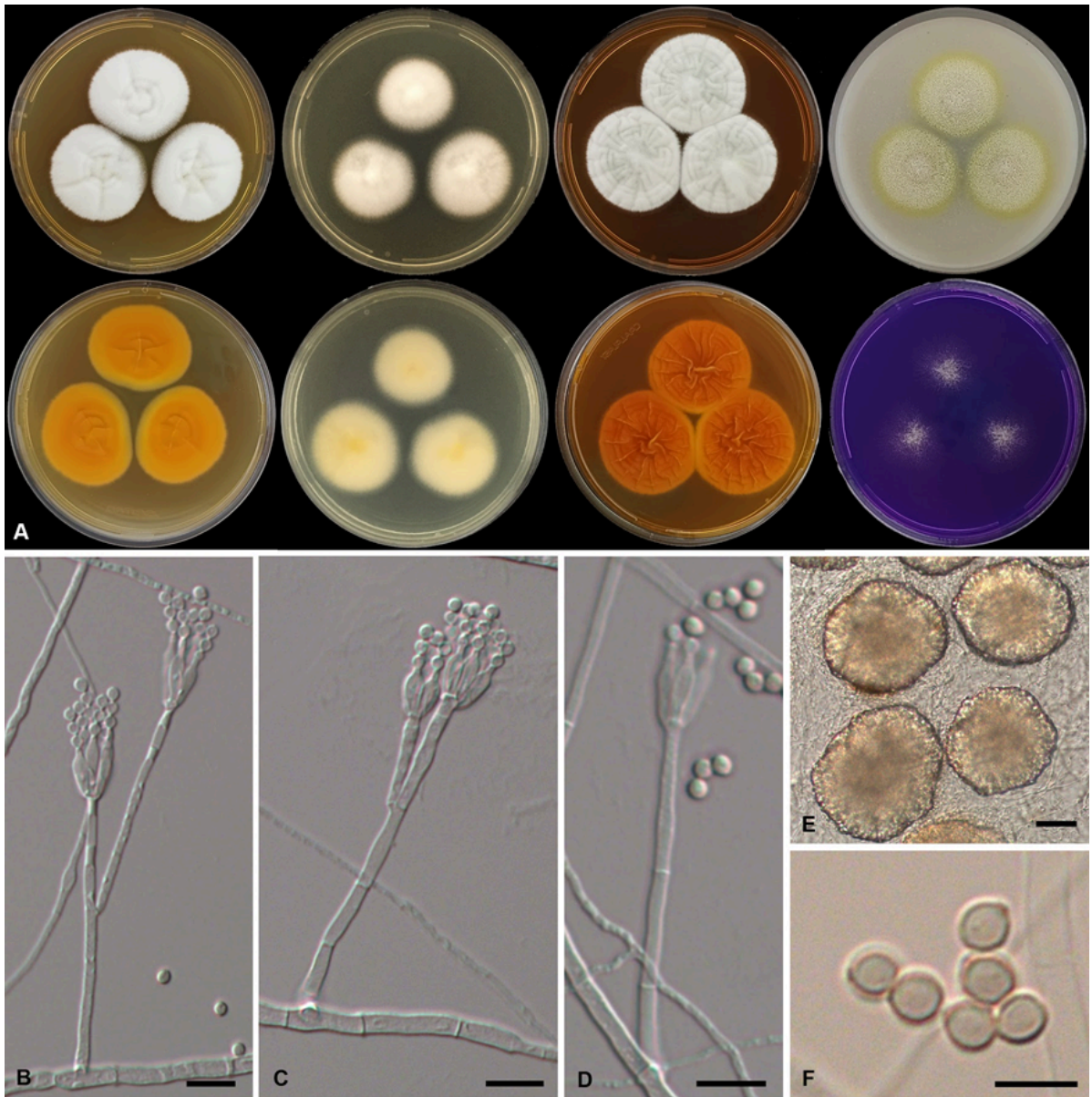


Figura 5. Morphological characters of *Penicillium albineum* URM 8918 sp. nov. isolated from Vale da Lua caves. **A.** Colonies on CYA, MEA, YES, OA, CREA. **B–D.** Conidiophores. **E.** Sclerotia. **F.** Conidia. Bars: B–D = 10 μm ; E = 50 μm ; F = 5 μm . ***ARTIGO EM PUBLICAÇÃO.**



Figura 6: Morphological characters of *Penicillium carajasense* URM 8917 sp. nov. isolated from Vale da Lua caves. **A.** Colonies on CYA, MEA, YES, OA, CREA. **B–D.** Conidiophores. **E.** Sclerotia. **F.** Conidia. Bars: B, C, D and F = 10 µm; E = 50 µm. ***ARTIGO EM PUBLICAÇÃO.**

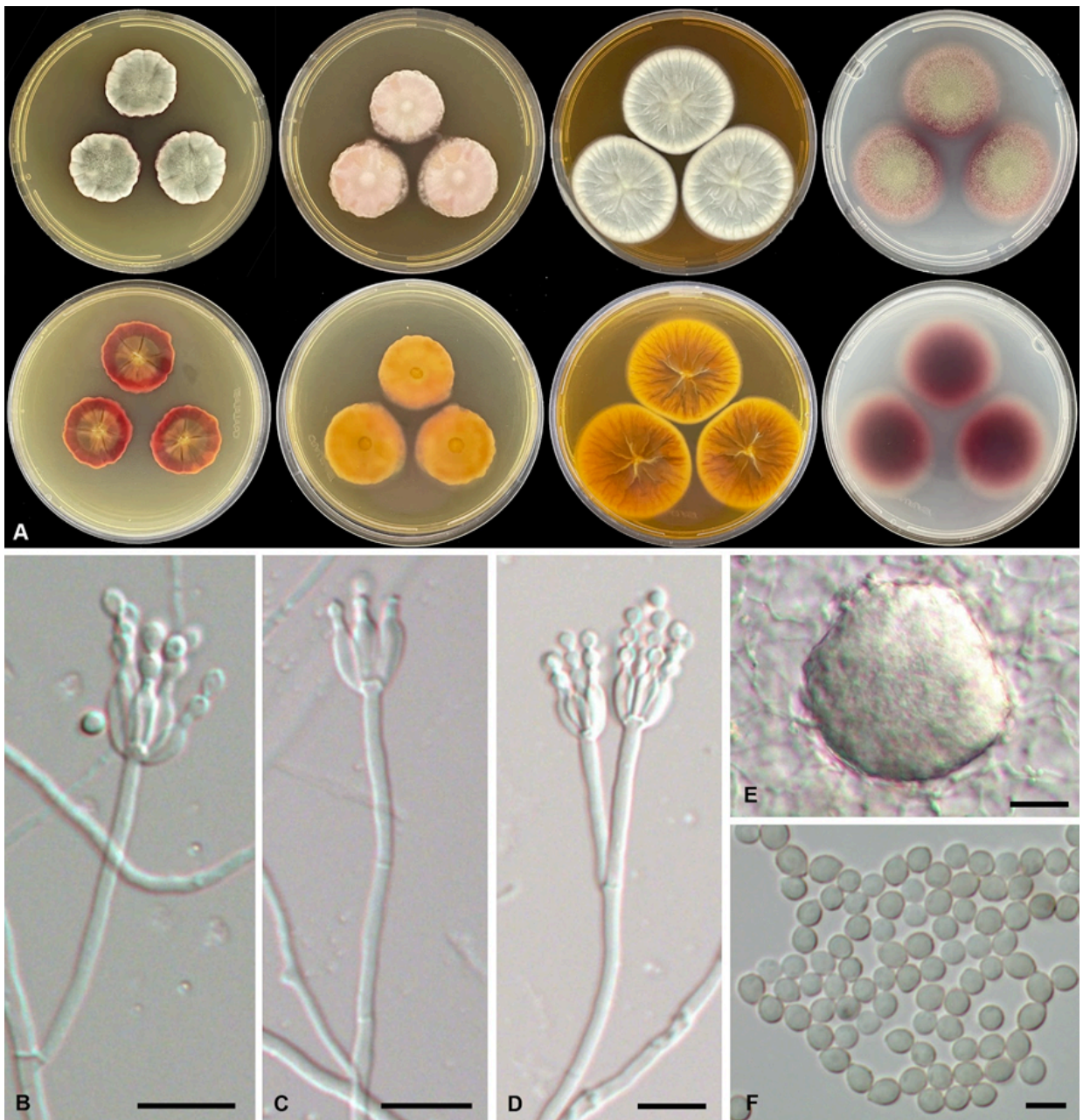
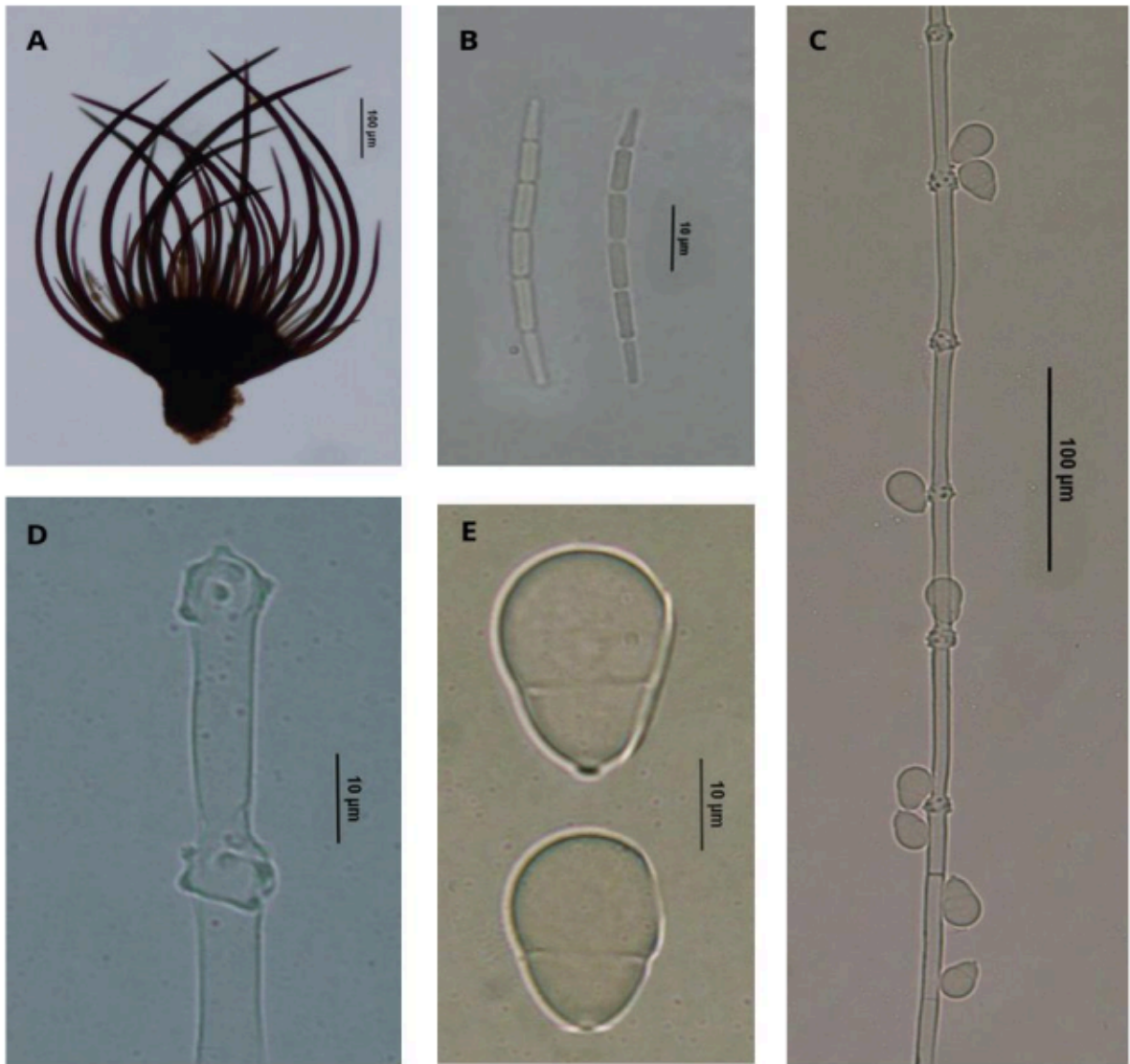
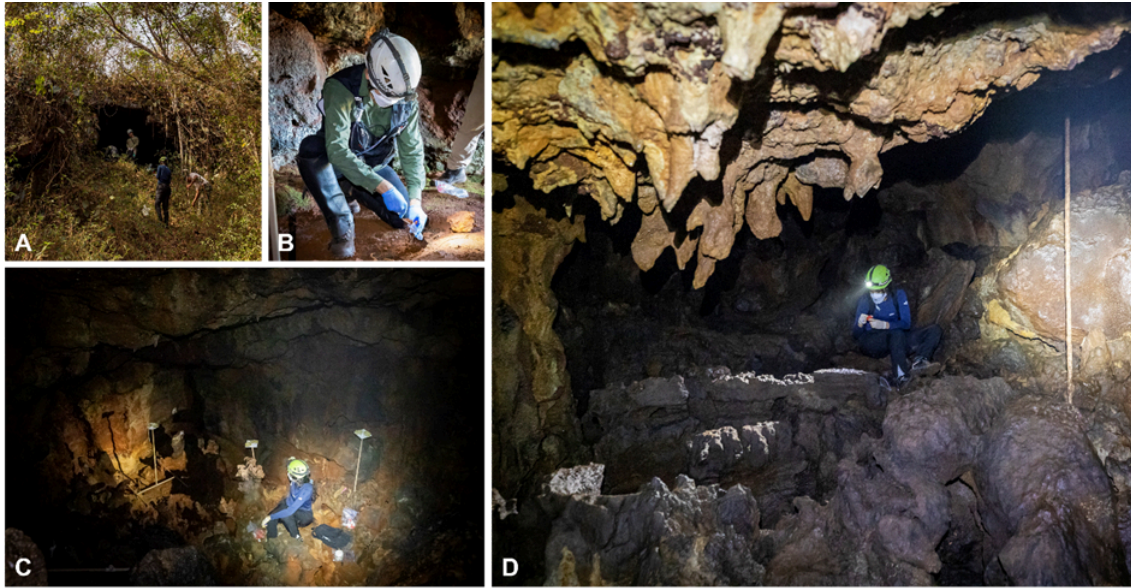


Figura 7: Morphological characters of *Penicillium reverso-vinaceum* URM 8967 sp. nov. isolated from Vale da Lua cave. **A.** Colonies on CYA, MEA, YES and CZ. **B–D.** Conidiophores. **E.** Sclerotia. **F.** Conidia. Bars: B–E = 10 μm ; F = 5 μm . ***ARTIGO EM PUBLICAÇÃO.**



Fonte: A autora, (2023). SILVA, C. C. A.

Figura 8. Fungos conidiais em folhedo terrestre nas cavernas da FLONA de Carajás, Parauapebas (PA). *Wiesneriomyces laurinus* (Caverna N1-002). A. Aspecto geral do esporodóquio. B conídios septados. *Arthrobotrys* sp. (Caverna Vale da Lua). C. Conidióforo e aglomerados de conídios. D. Célula conidiogênicas. E. Conídios. *TCC **Beatriz Marcelino**.



Fotos: Diego Bento (2022).

Figura 8: Caverna Vale da Lua (N4WS-0067) na Floresta Nacional (FLONA) de Carajás, no Pará, Brasil. Vista de fora da entrada da caverna (A); Coleta do 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).

Figura 9: Caverna N1-0174 (Gruta do N1/Janela verde) na Floresta Nacional (FLONA) de Carajás, no Pará, Brasil. Vista de dentro para a entrada da caverna (A); Coleta dos fungos do ar no ponto de amostragem 3 (B); Coleta de guano de morcego hematófago no ponto de amostragem 2 (C); Vista do interior da caverna dos pontos de amostragem 1 (D).



Fotos: Diego Bento (2022).

Figura 10: Caverna N1-0002 (Mapinguari) na Floresta Nacional (FLONA) de Carajás, no Pará, Brasil. Coleta dos fungos do ar no ponto de amostragem externo (A); Coleta dos fungos do ar no ponto de amostragem 1 (B) e (C); Coleta dos fungos do ar no ponto de amostragem 2 (D).



Fotos: Diego Bento (2022).

Figura 11: Caverna N1-0004 na Floresta Nacional (FLONA) de Carajás, no Pará, Brasil. Coleta dos fungos do ar no ponto de amostragem externo (A); Coleta dos fungos do ar no ponto de amostragem 1 (B); Coleta dos fungos do ar no ponto de amostragem 2 (C); Coleta dos fungos do sedimento/guano no ponto de amostragem 1 (D); Coleta dos fungos do ar no ponto de amostragem 3 (E).



Fotos: Diego Bento (2022).

Figura 12: Caverna N5SM2-99 (bat cave) na Floresta Nacional (FLONA) de Carajás, no Pará, Brasil. Momento da coleta dos fungos do corpo dos morcegos (A); Coleta dos fungos no corpo dos morcegos (B) e (D); Coleta dos fungos na cavidade oral dos morcegos (C); Coleta dos fungos nas asas dos morcegos (E).



Fotos: Diego Bento (2022).

Figura 13: Caverna S11D-0001 na Floresta Nacional (FLONA) de Carajás, no Pará, Brasil. Momento da coleta dos fungos do ar no ponto de amostragem 1 (A) e (B); Coleta dos fungos do ar no ponto de amostragem 2 (C); Coleta dos fungos do ar no ponto de amostragem 3 (D).

4.2 HIFOMICETOS DE FOLHEDO

Todos os dados referentes ao estudo dos hifomicetos de folheto das cavernas S11D0001, N1-0174 (Gruta do N1/Janela verde), N4WS-0067 (Vale da Lua) e N1-0002 (Mapinguari), podem ser acessados no link [TCC_de_Beatriz_Marcelino_dos_Santos_final_assinado_assinado.pdf](#) - Produto: Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) de uma aluna do Curso de Ciências Biológicas com ênfase em Ciências Ambientais da UFPE.

4.3 FUNGOS DETECTADOS POR ANÁLISE METAGENÔMICA

Na caverna N1-0174 (Janela verde) foram coletadas amostras de solo em 4 pontos, compreendendo da entrada até a zona afótica. Em uma análise geral da caverna, os táxons de fungos mais representativos foram de ascomicetos pertencentes a classe Sordariomycetes, dos gêneros *Fusarium*, *Trichoderma* e *Metacordyceps*. Na análise por ponto da caverna N1-0174, podemos observar que a abundância de táxons de fungos difere entre os pontos de coleta em relação a entrada, zona de penumbra e zona afótica. A análise das amostras de solo da entrada e da zona de penumbra 2 revelam a prevalência de fungos basidiomicetos. Os demais pontos de coleta revelam a maior quantidade de fungos ascomicetos que, no geral, prevaleceram no interior da caverna N1-0174 ([Planilha Metagenoma Caves.xlsx](#)).

Na caverna N1-0004 foram coletadas amostras de solo em 5 pontos, compreendendo da entrada até a zona afótica. Em uma análise geral da caverna, os táxons de fungos mais representativos foram de ascomicetos pertencentes às classes Sordariomycetes e Dothideomycetes, seguido de basidiomicetos da classe Agaricomycetes. Os gêneros mais representativos foram *Periconia*, *Agaricus* e *Fusarium*. Análises por ponto da caverna N1-0004 revelam que a abundância de táxons de fungos difere entre os pontos de coleta em relação a entrada, zona de penumbra e zona afótica. Na zona de penumbra 1 observa-se a maior ocorrência de fungos da ordem Mortierellales, nas demais prevalecem os ascomicetos ([Planilha Metagenoma Caves.xlsx](#)). Segundo a análise metagenômica da região ITS do DNA das amostras de solo dessa caverna, foi observado a ocorrência de *Histoplasma* na zona de penumbra.

Na caverna N5SM2-099 (bat cave) foram coletadas amostras de solo em 2 pontos na zona afótica. Em uma análise geral da caverna, os táxons de fungos mais representativos

foram de basidiomicetos pertencentes a classe Agaricomycetes do gênero *Inocybe*, e em menor quantidade ascomicetos do gênero *Penicillium* ([x Planilha Metagenoma Caves.xlsx](#)).

Na caverna N1-0002 (Mapinguari) foram coletadas amostras de solo em 3 pontos, compreendendo da entrada até a zona afótica. Em uma análise geral da caverna, os táxons de fungos mais representativos foram de ascomicetos pertencentes a classe Sordariomycetes e Dothideomycetes, dos gêneros *Trichoderma* e *Periconia*; assim como de basidiomicetos da classe Agaricomycetes, dos gêneros *Inocybe* e *Entoloma*. Na análise por ponto da caverna N1-0002, podemos observar que a abundância de táxons de fungos difere entre os pontos de coleta, prevalecendo basidiomicetos na entrada e fungos da ordem *Mortierellales* ([x Planilha Metagenoma Caves.xlsx](#)).

Na caverna S11D-0001 em uma análise geral da caverna, os táxons de fungos mais representativos para o ar foram de basidiomicetos pertencentes a classe Agaricomycetes, como o gênero *Inocybe*; e ascomicetos pertencentes a classe Sordariomycetes, como o gênero *Monochaetia*. Na análise por ponto da caverna S11D-0001, podemos observar a prevalência de basidiomicetos em todas as zonas. Em relação ao sedimento analisado nesta caverna, os táxons de fungos mais representativos foram de ascomicetos pertencentes a classe Sordariomycetes e Eurotiomycetes, como os gêneros *Penicillium*, *Trichoderma* e *Fusarium*; seguido de basidiomicetos da classe Agaricomycetes, como o gênero *Inocybe*. Na análise por ponto da caverna S11D-0001, podemos observar que a abundância de táxons de fungos difere entre os pontos de coleta, prevalecendo ascomicetos na zona de penumbra e basidiomicetos na zona afótica ([x Planilha Metagenoma Caves.xlsx](#)).

Na caverna N4WS-0067 (Vale da Lua), para os fungos presentes no ar, em uma análise da entrada da caverna, os táxons de fungos mais representativos foram de basidiomicetos pertencentes a classe Agaricomycetes, como o gênero *Inocybe*; e ascomicetos pertencentes a classe Sordariomycetes, como o gênero *Monochaetia*. Para o sedimento presente na caverna, os táxons de fungos mais representativos foram de ascomicetos pertencentes a classe Sordariomycetes e Dothideomycetes, como os gêneros *Periconia*, *Xylaria* e *Trichoderma*; seguido de basidiomicetos da classe Agaricomycetes, como o gênero *Inocybe*. Na análise por ponto da caverna Vale da Lua, podemos observar que a abundância de táxons de fungos difere entre os pontos de coleta, prevalecendo basidiomicetos na zona de entrada e afótica, ascomicetos e fungos da ordem *Mortierellales* na zona de penumbra ([x Planilha Metagenoma Caves.xlsx](#)).

* Uma relação dos gêneros de fungos encontrados por análise de metagenômica no sedimento/guano das cavernas S11D-0001, N4WS-0067 (Vale da Lua), N1-0004, N1-0174 (Gruta do N1/Janela verde), N1-0002 (Mapinguari) e N5SM2-99 (bat cave), da Flona do Carajás-PA, pode ser consultada na Planilha Excel constante no link:
📄 Fungos total metagenômica por caverna

4.4 FUNGOS ENCONTRADOS NAS CAVERNAS DA FLONA CARAJÁS COM RELATOS DE ALGUM POTENCIAL PATOGÊNICO

Na Tabela 5 estão relacionadas as espécies de fungos isoladas das cavernas estudadas que já foram citadas com algum potencial patogênico. Vale salientar que a maioria dos fungos encontrados nestas cavernas estão citados na literatura com algum relato como agente biológico de alguma micose, são classificados como Classe de Risco 1 e 2 (Brasil, 2022). A classe de risco 1 é representada por agentes biológicos não incluídos nas classes de risco 2, 3 e 4 e para os quais até o momento a capacidade de causar doença no homem não foi reconhecida. Organismos da Classe de risco 2 (moderado risco individual e limitado risco para a comunidade) incluem “os agentes biológicos que provocam infecções no ser humano ou nos animais, cujo potencial de propagação na comunidade e de disseminação no meio ambiente é limitado, e para os quais existem medidas profiláticas e terapêuticas conhecidas eficazes” (Brasil, 2022).

Apenas por análise metagenômica e nas cavernas N1-0004 e N1-0174 (Janela verde) foram detectados *Histoplasma* e *Rhinocladiella*, respectivamente. De acordo com o Ministério da Saúde (Brasil, 2022), estes gêneros possuem espécies (*Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*, *H. capsulatum* var. *duboisii*, *H. farciminosum* e *Rhinocladiella mackenziei*) classificadas como Risco Biológico 3, definido como “(alto risco individual e moderado risco para a comunidade): inclui os agentes biológicos que possuem capacidade de transmissão, em especial por via respiratória, e que causam doenças potencialmente letais em humanos ou animais, e para as quais existem, usualmente, medidas profiláticas e terapêuticas.”. Porém, espécies destes gêneros não foram isoladas em meios de cultivo na presente pesquisa, não sendo possível afirmar que existem propágulos ativos desses gêneros nas cavernas citadas. Com isso, são necessárias mais coletas para se ter uma conclusão sobre a necessidade de tomar medidas mais seguras.

Tabela 5: Fungos encontrados nas cavernas da Flona Carajás com potencial patogênico de acordo com dados da literatura.

Espécie	Patogenicidade	Referência
Patogenicidade em humanos e outros animais		
<i>Alternaria alternata</i>	Tenossinovite extensora crônica, artrite séptica da mão, ceratite, feohifomicose e rinossinusite	Kim et al. (2022); Chatterjee e Agrawal (2010); Todokoro et al. (2023); Leite et al. (2023); Campoli et al. (2020); Kellogg et al. (2023); Hattab et al. (2019); Tyrellis et al. (2022)
<i>Arthrinium phaeospermum</i>	Micose	Rai (1989)
<i>Aspergillus nomiae</i>	Aspergilose (Infecção em pacientes com fatores predisponentes)	Zhou et al. (2020)
<i>Aspergillus sydowii</i>	Aspergilose, onicomicose, eumicetoma, e patógeno fúngico de corais marinhos	Nagashima et al. (2023); Vera-Cabrera et al. (2021); Seyedmousavi et al. (2015); Negroni (1943); Walshe & English (1966); Schönborn & Schmoranzler (1970); Achten et al. (1979)
<i>Candida cf. chiropterorum</i>	Micose oportunista	Richardson (1991)
<i>Candida palmioleophila</i>	Micose	Liu (2019)
<i>Cladosporium cf. cladosporioides</i>	Infecções pulmonares e cutâneas (Infecção em pacientes com fatores predisponentes)	Kwon-Chung et al. (1975); Drabick et al. (1990); Annessi et al. (1992); López et al. (1996)
<i>Cladosporium halotolerans</i>	Dermatite em golfinhos	Butinar et al. (2005)
<i>Cladosporium subuliforme</i>	Observada em amostras clínicas de lavado broncoalveolar; unha e líquido cefalorraquidiano	Sandoval-Denis et al. (2015)
<i>Cladosporium tenuissimum</i>	Sinusite fúngica e cromoblastomicose	Nasiri-Jahrodi et al. (2023); Yang et al. (2023)
<i>Clonostachys rogersoniana</i>	Entomopatogênico	Sahin (2021)

<i>Cordyceps coleopterorum</i>	cf. Entomopatogênico	Castillo (2018)
<i>Debaryomyces hansenii</i>	Infecção óssea, fungemia, endoftalmite, infecção invasiva, infecção pulmonar e ceratite	Wong et al. (1982); St-Germain e Laverdière (1986); Carrega et al. (1997); Krcméry e Kunová (2000); Rao et al. (1991); Bibashi et al. (2009); Liu et al. (2019); Bloom et al. (1992)
<i>Engyodontium aranearum</i>	Aracnopatogênico	Shrestha (2019)
<i>Fusarium oxysporum</i>	Controle biológico de <i>Fusarium</i> spp.	Silva (2005)
<i>Metapochonia rubescens</i>	Controle biológico de nematódeos	Yung (2021)
<i>Mucorales</i>	Relatados em infecções pulmonares e cutâneas	Kwon-Chung et al. (1975); Drabick et al. (1990); Annessi et al. (1992); López et al. (1996)
<i>Paraconiothyrium cyclothyrioides</i>	Feohifomicose e infecção disseminada fatal	Gordon et al. (2012); Colombier et al. (2015)
<i>Penicillium anatolicum</i>	Controle biológico de nematódeos	Jatala (1986)
<i>Penicillium citrinum</i>	Controle biológico de <i>Spodoptera litura</i> e <i>Plutella xylostella</i> , infecções pulmonares e de trato urinário, e relato de infecção fatal em paciente com leucemia	HC Nguyen (2023); Gilliam & Vest (1951); Perry (1964); Mori et al. (1987); Mok et al. (1997)
<i>Penicillium daleae</i>	Entomopatogênico	Ragavendran (2017)
<i>Penicillium raperi</i>	Controle biológico	Lichtner, 2022
<i>Pochonia chlamydosporia</i>	Controle biológico de nematódeos	Yi (2021)
<i>Pseudallescheria boydii</i>	Osteomielite e pneumonia	Jackson et al. (2022); Cumbo-Nacheli et al. (2012)
<i>Trichoderma asperelloides</i>	Patógeno de outros fungos	Sumida (2018)
<i>Xylaria longipe</i>	Patógeno de outros fungos	Elias (2018)
Patogenicidade em plantas		
<i>Arthrinium cf. phaeospermum</i>	Fitopatogênico	Li (2016)
<i>Aspergillus europaeus</i>	Fitopatogênico	Smiri (2021)
<i>Cladosporium</i>	Fitopatogênico	Butinar et al. (2005)

<i>halotolerans</i>		
<i>Cladosporium tenuissimum</i>	Fitopatogênico	Zhou (2022)
<i>Cladosporium xanthochromaticum</i>	Fitopatogênico	Silva (2024)
<i>Corynespora cassiicola</i>	Fitopatogênico	Shiraishi (2012)
<i>Didymella subherbarum</i>	Fitopatogênico	Ahmadpour (2017)
<i>Epicoccum cf. andropogonis</i>	Fitopatogênico	Willis (2023)
<i>Epicoccum cf. latusicollum</i>	Fitopatogênico	Chang (2024)
<i>Fusarium pseudocircinatum</i>	Fitopatogênico	Shiraishi (2012)
<i>Neopestalotiopsis cf. clavispora</i>	Fitopatogênico	Daengsuwan (2021)
<i>Nigrospora oryzae</i>	Fitopatogênico	Abass (2014)
<i>Penicillium adametzii</i>	Fitopatogênico	Alwakeel (2013)
<i>Penicillium brefeldianum</i>	Fitopatogênico	Saleh (2023)
<i>Penicillium cf. mallochii</i>	Fitopatogênico	Coutinho (2020)
<i>Penicillium cf. oxalicum</i>	Fitopatogênico	Cooke (1967)
<i>Penicillium raperi</i>	Fitopatogênico	Xu (2024)
<i>Penicillium. sumatraense</i>	Fitopatogênico	Smiri (2021)
<i>Periconia byssoides</i>	Fitopatogênico	Su (2023)
<i>Periconia cf. macrospinosa</i>	Fitopatogênico	Sidhoum (2024)
<i>Phitomyces cf. chartarum</i>	Fitopatogênico	Perelló (2017)
<i>Rhizomucor cf. variabilis</i>	Fitopatogênico	Zihalirwa Kulimushi (2017)
<i>Talaromyces cf. rugulosus</i>	Fitopatogênico	Solairaj et al. (2020)
<i>Talaromyces wortmannii</i>	Fitopatogênico	Pretsch (2014)

4.5 REUNIÕES

Para planejamento das atividades, foram realizadas reuniões entre membros da equipe do projeto (UFPE, UFG e UFPR), assim como reuniões entre a equipe do projeto e o Comitê Técnico Científico do NGI Carajás.

- Reuniões entre a equipe do projeto e o Comitê Técnico Científico do NGI Carajás, para planejamento da expedição à Flona Carajás-PA para realização das coletas.
- Reunião entre membros da equipe do projeto para planejamento da preparação de material para a expedição à Flona Carajás-PA e realização das coletas.
- Reunião de acompanhamento dos resultados obtidos.
- Reuniões com a equipe responsável pela metagenômica da Universidade Federal do Paraná com o intuito de discutir a melhor metodologia para extração do DNA genômico das amostras coletadas nas cavernas da Flona Carajás-PA.

4.6 PRODUTOS

Com o desenvolvimento do presente projeto, foi possível a elaboração de trabalhos que foram apresentados em eventos científicos (Tabela 6), de artigos científicos (Tabela 7), assim como contribuiu para a formação de recursos humanos ao nível técnico, de graduação e de pós-graduação (Tabela 8).

Tabela 6. Trabalhos apresentados em eventos científicos.

AUTORES	TÍTULOS DOS RESUMOS	Evento
Jordane P. Nóbrega, Joenny M. S. Lima, Diego M. Bento, Eder S. Barbier, Renan N. Barbosa, Cristina M. Souza-Motta, Roger F. R. Melo	Fungos isolados do sedimento de uma caverna da Floresta Nacional de Carajás/PA	8º Congresso Sobre Diversidade Microbiana da Amazônia - CDMICRO, 24 a 27 de abril de 2023, Manaus - AM
Pedro Gabriel L. Silva, Victoria B. Barros, Pedro H. F. de Oliveira, José F. S. A. Prazeres, Joenny M. S. Lima, Cristina M. Souza-Motta, Jadson D. P. Bezerra	Fungos do ar da caverna ferruginosa Janela Verde, FLONA de Carajás (Amazônia)	XX Seminário de Patologia Tropical e Saúde Pública, 17, 20 e 21 de novembro de 2023, UFG, Goiânia-GO
Beatriz M. Santos, Celine Silva, M ^a Fernanda Araújo, Gisele Silva, Milena Lima, Elaine Malosso	Fungos conidiais em folheto de ambiente cavernícola da Floresta Nacional Serra dos Carajás, Pará, Brasil	VII Encontro Pernambucano de Micologia, 2023, Recife

Tabela 7. Artigos em preparação (EM)/submetidos(S)/publicados (P) em revistas científicas.

AUTORES	TÍTULOS DOS ARTIGOS	REVISTAS	SITUAÇÃO	ANO
Jordane P. Nóbrega, Renan N. Barbosa, Joenny M. S. Lima, Diego M. Bento, Cristina M. Souza-Motta, Roger F. R. Melo	Six new <i>Penicillium</i> species in the section <i>Lanata-Divaricata</i> from a cave in Amazon rainforest, Brazil	Mycological Progress	Submetido e em atendimento às sugestões dos revisores da revista.	2024
Pedro Gabriel L. Silva et al.	Fungos do ar e de sedimento de caverna da FLONA de Carajás (Amazônia) - TCC/UFG	A definir	Em preparação	-
Pedro T. S. Nogueira et al.	Redescricao do gênero <i>Parahumicola</i> para posicionamento da nova espécie sexual, <i>P. amazonica</i>	A definir	Em preparação	-
Julia Randow, Jordane Nóbrega, Renan N. Barbosa, Joenny M. S. Lima, Vitória Santiago, Diego M. Bento, Roger F. R. Melo, Cristina M. Souza-Motta	Explorando a complexa diversidade fúngica da caverna Vale da Lua da FLONA de Carajás (Amazônia)	A definir	Em preparação	-

Tabela 8. Trabalhos acadêmicos: Iniciação Científica (PIBIC). Trabalho de Conclusão de Curso (TCC), Dissertação de Mestrado (M) e Tese de Doutorado (TD).

ALUNO	Orientador(es)	Trabalho/Título	Curso	Data
Thamyres Oliveira dos Santos	Cristina M. Souza-Motta Joenny M. Silveira de Lima	PIBIC/Identificação e seleção de fungos anemófilos produtores de quitinase isolados da caverna N1-0002 em Carajás/PA	Ciências Biológicas (Bacharelado - UFPE)	Bolsa PIBIC/UFPE Iniciada em agosto/2023
Julia Radow Cavalcanti	Cristina M. Souza-Motta Joenny M. Silveira de Lima	PIBIC/ Identificação e seleção de fungos produtores de queratinases isolados do sedimento da caverna Mapinguari/PA	Ciências Biológicas (Bacharelado - UFPE)	Bolsa PIBIC/UFPE Iniciada em agosto/2023
Beatriz Marcelino dos Santos	Elaine Malosso	TCC/Fungos conidiais em folheto de ambiente cavernícola da Floresta Nacional Serra dos Carajás, Pará Brasil	Ciências Biológicas (Ênfase em Ciências Ambientais - UFPE)	22/09/2023
Maiara Beatriz M. Silva	Cristina M. Souza-Motta Vitória Cristina S. Alves	TCC/Fungos do ar de uma bat cave na Flona dos Carajás-PA e o potencial para produção de enzimas	Ciências Biológicas (Ênfase em Ciências Ambientais - UFPE)	Em andamento
Julia Radow Cavalcanti	Cristina M. Souza-Motta Joenny M. Silveira de Lima	TCC/Explorando o ar da caverna Vale da Lua e sua complexa diversidade fúngica	Ciências Biológicas (Bacharelado - UFPE)	Em andamento
Jordane P. Nóbrega	Roger Melo Cristina M. Souza-Motta	DM/Micobiota do sedimento da Caverna Vale da Lua, Flona Carajás-PA	PPGBF-DM /UFPE	28/02/2024

João Lucas Vitorio Ribeiro Carvalho	Vânia Vicente/UFPR Cristina M. Souza-Motta	Abordagem metagenômica no estudo da diversidade microbiana e bioprospecção de moléculas de interesse biotecnológicos em cavernas	PPGEBB-D/UFPR	Em andamento
---	---	--	---------------	--------------

PPGBF - PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE FUNGOS/UFPE

PPGEBB - PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA/UFPR

5. DISCUSSÃO

Estudos de fungos em ambientes subterrâneos têm ganhado destaque a partir dos dados demonstrando uma grande diversidade em diferentes substratos como sedimento, ar, guano, água, paredes, espeleotemas, entre outros (Vanderwolf et al. 2013; Cunha et al. 2020; Pereira et al. 2022; Carvalho et al. 2022; Alves et al. 2022; Lima et al. 2024). Estudos de levantamento de dados biológicos em cavernas do Brasil foram principalmente realizados em cavidades carbonáticas, embora existam cavernas em diferentes litologias no país (Trajano e Moreira 1991, Zepelini Filho et al. 2003, Ferreira 2004). O geossistema ferruginoso é abundante no Brasil, porém, os estudos sobre os fungos presentes neste ambiente ainda são escassos em comparação com o número de cavernas catalogadas até o momento, principalmente quando se trata de cavernas ferruginosas (Beltrano et al. 2000). Cavernas associadas a campos ferruginosos foram até pouco tempo “esquecidas” em estudos bioespeleológicos, embora soubessem da existência, suas dimensões, em geral reduzidas, levaram a uma interpretação de que elas pudessem ser pouco diversas (Ferreira et al. 2005).

Os dados obtidos sobre o inventário de fungos para seis cavernas ferruginosas da FLONA dos Carajás demonstraram uma grande abundância de fungos, sendo

contabilizados cerca de **15 mil UFC**. Entre as cavernas estudadas da Flona dos Carajás, a N1-0004 deteve a maior abundância de fungos, com um total de **5.461 UFC**, sendo **5.078** isolado do sedimento/guano. Em uma caverna de minério de ferro, que possui características semelhantes às localizadas na Flona dos Carajás, Taylor e colaboradores (2014) encontraram cerca de 4.500 fungos isolados a partir do sedimento, obtendo um resultado próximo ao encontrado na caverna N1-0004 em relação a abundância de fungos. Em outro estudo em uma caverna na Caatinga, Alves e colaboradores (2022), encontraram cerca de 3.000 UFC nas amostras de sedimento de uma caverna no estado do Rio Grande do Norte, incluindo leveduras e fungos filamentosos, apesar das cavernas possuírem características diferentes apresentaram quantidades numerosas de UFC quando comparado os substratos. As demais cavernas, apesar de terem apresentado um número menor, expressam um valor significativo de fungos isolados do sedimento, se destacando na abundância de fungos.

Das seis cavernas ferruginosas da Flona dos Carajás, N5SM2-099 se destaca por ser a única *bat cave* estudada. Além de obter uma abundância significativa de fungos encontrados no ar (297 UFC) e sedimento/guano (1.933 UFC), demonstrou uma grande abundância fúngica no corpo de morcegos, apresentando **720 UFC**. Estudos relacionados com a microbiota em morcegos tendem a variar em relação a sua abundância, por exemplo, Cunha e colaboradores (2020) em uma caverna no Parque Nacional do Catimbau, encontraram **105 UFC** nos morcegos. A diferença de valores pode ser explicada pela quantidade de morcegos analisados, na caverna N5SM2-099 foram capturados o dobro de indivíduos, quando comparado com o outro estudo, além da disponibilidade desses animais nas cavernas, seu hábito alimentar e as características do ambiente que a caverna está inserida.

A abundância de fungos anemófilos também foi elevada nas cavernas estudadas, tendo um destaque para a caverna S11D-0001 que apresentou um total de **308 UFC**, seguida pela *bat cave* N5SM2-099 com **297 UFC**. Estudos que relatam a abundância de fungos presentes no ar de cavernas mostram que o número de UFC no ar foi maior do que o encontrado neste inventário. Por exemplo, Taylor e colaboradores (2013) encontraram cerca de 800 UFC no ar de uma caverna neotropical em oito pontos de coleta. Cunha e colaboradores (2020) obtiveram um total de 673 UFC do ar em quatro pontos de coleta. Em outra caverna na Caatinga, o número de UFC do ar foi de 526 a partir de três pontos de coleta (Alves et al. 2022). As cavernas estudadas neste inventário, foram analisadas de 2 até 4 pontos de coleta, sendo assim uma possível

explicação para o número inferior de UFC quando comparadas a outros estudos de fungos do ar de cavernas no Brasil, além disso, por possuírem características distintas de cavernas da Caatinga, por exemplo, os fatores abióticos podem interferir na dispersão de fungos pelo ar.

Após o isolamento, foram identificados cerca de 900 fungos das seis cavernas estudadas, sendo os fungos do ar de maior destaque de número de isolados, apesar de não ter apresentado um número de UFC tão elevado em comparação aos outros substratos. Resultados semelhantes foram observados por Alves e colaboradores (2022) que, apesar da abundância ser maior no sedimento, o número de isolados total do ar foi maior. O que pode explicar esse fato é que nas diluições do sedimento utilizadas para isolamento de fungos podem influenciar no número de colônias de um mesmo fungo, sendo contabilizadas mas não isoladas. As cavernas N1-0174 e S11D-0001 foram as detentoras em número de isolados fúngicos, ambas com 196.

As cavernas analisadas apresentaram gêneros fúngicos exclusivos, tanto para o ar quanto para o sedimento, destacando a singularidade da microbiota de cavernas ferruginosas. Até o momento foram identificados 75 gêneros, sendo N4WS-006 (Vale da Lua) a caverna com o maior quantitativo, possuindo 22 gêneros. Do total, 13 foram isolados apenas nela, como *Amphinema*, *Inocybe*, *Lasiodiplodia*, *Monochaetia*, *Plectosphaerella*, *Pseudopithomyces*, *Sebacina* e *Tritirachium* encontrados no ar, e *Crynitomyces*, *Cyberlindnera*, *Schwanniomyces*, *Saitozyna* e *Sporothrix* encontrados no sedimento. Alguns desses gêneros foram citados em ambientes cavernícolas fora do Brasil, como *Inocybe*, *Plectosphaerella*, *Pseudopithomyces* e *Sporothrix* (Vanderwolf et al. 2013; Zhang et al. 2017; Zhang et al. 2021), e no Brasil, como *Tritirachium* (Alves et al. 2022).

Os gêneros mais comuns para todas as seis cavernas, foram *Cladosporium* e *Penicillium*, ambos são comumente relatados em ambientes cavernícolas (Cunha et al. 2020; Alves et al. 2022; Lima et al. 2024; Oliveira et al. 2024). O gênero *Cladosporium* vem sendo citado nos achados em cavernas no Brasil em diversos substratos, incluindo na descrição de novas espécies. No trabalho realizado por Pereira e colaboradores (2021) foi mostrada a riqueza desse gênero em uma caverna tropical localizada na Caatinga, presentes no ar e em ectoparasitas de morcegos, além disso, nesse estudo foram relatadas duas novas espécies no complexo *Cladosporium cladosporioides*.

Fungos do gênero *Penicillium* também são muito encontrados em ambientes cavernícolas, praticamente em todos os substratos. Nas cavernas da Flona dos Carajás estudadas para elaboração deste inventário os dados obtidos foram os mesmos. Em todas as seis cavernas e em todos os substratos analisados foi possível observar a presença de fungos desse gênero. Em uma revisão sobre fungos em cavernas foi possível observar que o gênero *Penicillium* era o segundo mais frequente nos estudos até aquele momento, sendo isolado em diversos substratos e em cavernas de diferentes litologias (Vanderwolf et al. 2013). Em um estudo realizado tempos depois em cavernas na China, foram encontrados 456 fungos do gênero *Penicillium* agrupados em 73 espécies, sendo considerado o mais frequente nessas cavernas (Zhang et al. 2020). Em estudos de cavernas no Brasil, fungos desse gênero também são muito comuns, associados a vários substratos como o guano, ar, sedimento e em ectoparasitos de morcego (Cunha et al. 2020; Carvalho et al. 2022; Alves et al. 2022; Oliveira et al. 2024). Mais recentemente em cavernas da Caatinga, Lima e colaboradores (2024) relataram uma riqueza de espécies de *Penicillium* incluindo uma nova espécie na seção *Cinnamopurpurea*. Até o momento, durante a identificação dos fungos nas cavernas da Flona dos Carajás, a caverna N4WS-006 (Vale da lua) apresentou seis possíveis novas espécies de *Penicillium* da seção *Lanata-Divaricata*, ressaltando a presença marcante desses fungos no ambiente cavernícola (manuscrito em revisão).

Aspergillus é um gênero amplamente encontrado em cavernas, possuindo algumas espécies com potencial patogênico e biotecnológico (Vanderwolf et al. 2013; Rawat et al. 2017; Wang et al. 2018; Zhang et al. 2022). Neste inventário a presença do gênero *Aspergillus* foi observada no ar e no sedimento/guano apenas na caverna N1-0004, somente no ar nas cavernas S11D-0001 e N5SM2-99 e somente no sedimento/guano nas cavernas N4WS-006 (Vale da lua) e N1-0174. Estudos de fungos presentes no ambiente cavernícola mostram em seus achados muitas espécies de *Aspergillus* tanto no ar quanto no sedimento (Taylor et al. 2013, 2014; Cunha et al. 2020, Alves et al. 2022; Lima et al. 2024) esses fungos geralmente são considerados ubíquos e presentes também em outros ambientes externos participando de diversas atividades ecológicas, também fazendo parte da biota presente em ectoparasitas de morcego como as *bat flies* (Carvalho et al. 2022). Apesar de ser um gênero muito numeroso em espécies, frequentemente em cavernas têm sido relatadas novas espécies de *Aspergillus*, como por exemplo Alves e colaboradores (2022) que descreveram nova

espécie de *Aspergillus* na seção *Cremeri*. Mais recentemente, Lima e colaboradores (2024) mostraram a riqueza desse gênero presente em vários substratos de duas cavernas na Caatinga, onde de 86 fungos, 34 pertenciam ao gênero *Aspergillus* que posteriormente foram identificados em 18 espécies. Entre as espécies identificadas, duas foram relatadas como novas espécies e receberam os nomes de *Aspergillus alvaroi* e *A. guanovespertilionum*.

Alguns gêneros de fungos encontrados nas cavernas da Flona dos Carajás podem ser relatados como patógenos oportunistas, como o gênero *Aspergillus* que pode causar infecções oportunistas, motivo pelo qual o grupo está na Classe de risco 2 (Brasil, 2022). Espécies de *Aspergillus* podem causar infecções em pacientes com algum tipo de imunossupressão ou com fatores predisponentes, ocasionando uma aspergilose, principalmente pulmonar, visto que a fonte de contágio mais comum é a via aérea por inalação de conídios. Outros fungos conhecidamente oportunistas são leveduras do gênero *Candida*, sendo responsáveis por grande número de infecções fúngicas, podendo causar doenças oportunistas, superficiais ou invasivas principalmente em pacientes imunocomprometidos (Richardson, 1991).

6. PRINCIPAIS DESAFIOS ENCONTRADOS

- Isolamento e preservação, na coleção de trabalho, de vários fungos cavernícolas imediatamente após a expedição, atividade que requer tempo e grande atenção de toda a equipe;
- Identificação morfológica e molecular de fungos: dificuldade de crescimento e de extração e amplificação de DNA de alguns isolados;
- Análise de grande número de dados dentro do prazo estabelecido para execução do projeto, devido ao inesperado grande número de fungos isolados. Atividades taxonômicas de identificação de fungos requerem mais tempo para a curadoria, processamento e publicação dos dados.

7. CONCLUSÃO

No presente estudo em seis cavernas ferruginosas da FLONA dos Carajás, foi inventariada uma grande riqueza e abundância de fungos cultiváveis (63 gêneros e cerca de 160 espécies), de hifomicetos de folhedo e de Unidades Taxonômicas Operacionais (UTO) a partir de análise metagenômica da região ITS do rDNA, demonstrando a expressiva presença de espécies de fungos não cultiváveis, mas detectadas durante a análise metagenômica (cerca de 503 gêneros).

Durante a análise dos dados, foi possível observar que a comunidade de fungos sofreu influência do substrato, fato este percebido tanto por técnicas dependente de cultivo quanto por metagenômica, demonstrando que diferentes substratos devem ser analisados em estudo de inventário de fungos cavernícolas. Além disso, também foi possível observar a diferença no número de espécies de fungos relacionadas com os substratos, sendo o ar o que teve maior destaque/influência. A presença de gêneros exclusivos em algumas cavernas como para a caverna N4WS-0067 (Vale da Lua) reforça que a ocorrência desses fungos possivelmente foi influenciada por fatores como condições ambientais, disponibilidade de nutrientes e interações biológicas.

Entre os gêneros de fungos cultiváveis obtidos no nosso estudo, foi possível observar que os mais frequentes foram *Aspergillus*, *Cladosporium* e *Penicillium*, os outros gêneros foram obtidos com menos frequência, mas também contribuem com a manutenção do ambiente cavernícola. Outro fator extremamente importante é a possibilidade de descrição de novas espécies de fungos. Estão sendo descritas novas espécies de *Penicillium* e uma nova espécie de um gênero recentemente descrito (*Parahumicola*) também está sendo estudada a partir de material obtido do ar de uma das cavernas. A nova espécie de *Parahumicola* apresenta a fase sexuada de um gênero descrito apenas com base nas informações do anamorfo (fase assexuada), trazendo uma novidade e redescrição do gênero de fungo com base no material coletado na FLONA dos Carajás.

Para os dados obtidos das análises de metagenômica, destacou-se o filo Basidiomycota entre os resultados obtidos. No nosso estudo, as análises de metagenômica foram cruciais para a verificação da presença de fungos que não foram cultivados, inclusive da detecção de gêneros com potencial patogênico de interesse para a visitação de cavernas com potencial turístico, tais como os gêneros *Histoplasma* e

Rhinocladiella. Nossos dados revelam a importância de compreender os riscos associados aos fungos encontrados nas cavernas da Flona dos Carajás, especialmente aqueles com capacidade de causar micoses oportunistas. O reconhecimento desses fungos como agentes causadores de infecções em indivíduos imunossuprimidos ou com fatores predisponentes ressalta a necessidade de medidas preventivas e de vigilância, não sendo por exemplo permitido a visitação por esse tipo de público. Portanto, é fundamental implementar estratégias de controle e monitoramento, assim como o uso de EPIs, para mitigar os riscos de infecções fúngicas, visando garantir a saúde e segurança dos visitantes.

Em termos gerais, a maior parte dos fungos encontrados no solo dessas cavernas desempenham funções benignas ou benéficas no ecossistema. Os fatores que limitam a análise metagenômica da região ITS do rDNA destacam a complexidade da análise em amostras do solo e a necessidade de abordagens integradas para compreender completamente a diversidade microbiana em um ambiente de caverna. É importante reconhecer essas limitações ao interpretar os resultados de estudos metagenômicos e considerar múltiplas abordagens para entender a diversidade microbiana nesses ambientes em específico.

8. PRINCIPAIS 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. and Bezerra, J.D.P. (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(1), pp.139–167. doi: <https://doi.org/10.3114/fuse.2022.10.06>.

Brasil. Secretaria de Ciência, Tecnologia, Inovação e Insumos Estratégicos em Saúde. Departamento de Gestão e Incorporação de Tecnologias e Inovação em Saúde. Classificação de risco dos agentes biológicos [recurso eletrônico] / Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia, Inovação e Insumos Estratégicos em Saúde, Departamento de Gestão e Incorporação de Tecnologias e Inovação em Saúde. – Brasília : Ministério da Saúde, 2022. 76 p.

Carvalho, R., Lima, J.M.S., Barbier, E., Bernard, E., Bezerra, J.D.P. and Souza-Motta, C.M. (2022). Ticket to ride: fungi from bat ectoparasites in a tropical cave and the description of two new species. *Brazilian Journal of Microbiology*, 53(4), pp.2077–2091. doi:<https://doi.org/10.1007/s42770-022-00841-y>.

Castrillón, A. L., Augusto, M. and Maria (1976). Isolamento de *Microsporum amazonicum* do solo do Estado do Amazonas, Brasil. *Acta Amazonica*, 6(4), pp.487–490. doi:<https://doi.org/10.1590/1809-43921976064487>.

Cunha, A.O.B., Bezerra, J.D.P., Oliveira, T.G.L., Barbier, E., Bernard, E., Machado, A.R. and Souza-Motta, C.M. (2020). Living in the dark: Bat caves as hotspots of fungal diversity. *Plos one*, 15(12), pp.e0243494–e0243494. doi:<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0243494>.

Lima, J.M.S., Barbosa, R.N., Bento, D.M., Barbier, E., Bernard, E., Bezerra, J.D.P. and Souza-Motta, C.M. (2024). *Aspergillus*, *Penicillium*, and *Talaromyces* (Eurotiales) in Brazilian caves, with the description of four new species. *Fungal Systematics and Evolution*. doi: <https://doi.org/10.3114/fuse.2024.14.06>

Maia, L.C., Carvalho Júnior, A.A. de, Cavalcanti, L. de H., Gugliotta, A. de M., Drechsler-Santos, E.R., Santiago, A.L.M. de A., Cáceres, M.E. da S., Gibertoni, T.B., Aptroot, A., Giachini, A.J., Soares, A.M. da S., Silva, A.C.G., Magnago, A.C., Goto, B.T., Lira, C.R.S. de, Montoya, C.A.S., Pires-Zottarelli, C.L.A., Silva, D.K.A. da, Soares, D.J. and Rezende, D.H.C. (2015). Diversity of Brazilian Fungi. *Rodriguésia*, 66(4), pp.1033–1045. doi:<https://doi.org/10.1590/2175-7860201566407>.

Niskanen, T., Lücking, R., Dahlberg, A., Gaya, E., Suz, L.M., Mikryukov, V., Liimatainen, K., Druzhinina, I.S., James R.S. Westrip, Mueller, G.M., Martins-Cunha, K., Kirk, P.M., Tedersoo, L. and Antonelli, A. (2023). Pushing the Frontiers of Biodiversity Research: Unveiling the Global Diversity, Distribution, and Conservation of Fungi. *Annual Review of Environment and Resources*, 48(1). doi:<https://doi.org/10.1146/annurev-environ-112621-090937>.

Oliveira P.H.F., Franco, R.F.F., Nogueira, P.T.S., Momoli, R.S., Souza-Motta, C.M., Bezerra, J.D.P. (2024). Mapa do tesouro: riqueza de espécies de *Penicillium* na caverna Lapa do Boqueirão do Cerrado goiano/Treasure map: richness of *Penicillium* species in the Lapa do Boqueirão cave in the Cerrado of Goiás. *Revista Brasileira de Espeleologia –RB Esp*, 1(13), pp. 337-369. <https://revistaeletronica.icmbio.gov.br/rebe/article/view/2602>

Pereira, S., Carvalho, R., Lima, S., Barbier, E., Bernard, E., Bezerra, P. and Souza-Motta, C.M. (2022). Richness of *Cladosporium* in a tropical bat cave with the description of two new species. *Mycological Progress*, [online] 21(1), pp.345–357. doi:<https://doi.org/10.1007/s11557-021-01760-2>.

Taylor, E., Resende Stoianoff, M. and Lopes Ferreira, R. (2013). Mycological study for a management plan of a neotropical show cave (Brazil). *International Journal of Speleology*, 42(3), pp.267–277. doi:<https://doi.org/10.5038/1827-806x.42.3.10>.

Taylor, E.L.S., Ferreira, R.L., Cardoso, P.G. and Stoianoff, M.A. de 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 whilecaving. *AMBIENT SCIENCE*, 1(1), pp.16–28. doi:<https://doi.org/10.21276/ambi.2014.01.1.ra02>.

Vanderwolf, K., Malloch, D., McAlpine, D. and Forbes, G. (2013). A world review of fungi, yeasts, and slime molds in caves. *International Journal of Speleology*, 42(1), pp.77–96. doi:<https://doi.org/10.5038/1827-806x.42.1.9>.

Zhang, Z.-F., Zhao, P. and Cai, L. (2018). Origin of Cave Fungi. *Frontiers in Microbiology*, 9. doi:<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01407>.