

Subterranean mycobiota: a preliminary study of fungi isolated from the soil of Pulpito Cave, Ferruginous Fields National Park

Aparecida Silva (1), Joenny Lima (2), Vitória Alves (3), Emily Fonseca (4), Sabrina Silva (5), Diego Bento (6), Cristina Souza-Motta (7) & Jadson Bezerra (8)

(1) Programa de Pós Graduação em Biologia de Fungos, Departamento de Micologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil, aparecida.csilva@ufpe.br (autor correspondente)

(2) Programa de Pós Graduação em Biologia de Fungos, Departamento de Micologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil, joennym@gmail.com

(3) Programa de Pós Graduação em Biotecnologia, Departamento de Micologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil, vitoria.cristinaa@ufpe.br

(4) Programa de Pós Graduação em Biologia de Fungos, Departamento de Micologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil, emily.fonseca@ufpe.br

(5) Programa de Pós Graduação em Biologia de Fungos, Departamento de Micologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil, sabrina.alvess@ufpe.br

(6) Cecav/ICMBio, Base Avançada no Rio Grande do Norte, Natal, RN, Brasil diego.bento@icmbio.gov.br

(7) Programa de Pós Graduação em Biologia de Fungos, Departamento de Micologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil, cristina.motta@ufpe.br

(8) Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, , jadsonbezerra@ufg.br

Resumo

Os fungos desempenham um papel fundamental na manutenção dos ecossistemas naturais, especialmente em ambientes extremos como as cavernas, que, apesar de baixos níveis de nutrientes, são habitat de diversas espécies. A Serra dos Carajás, no estado do Pará, destaca-se por seu patrimônio espeleológico único, embora a expansão do turismo e das atividades mineradoras ameace a conservação dessas áreas. O estudo teve como objetivo analisar, preliminarmente, a riqueza e abundância de fungos isolados do solo/sedimento da Caverna do Pulpito (Caverna SB_51), localizada no Parque Nacional dos Campos Ferruginos. Ao todo, foram isoladas 125 Unidades Formadoras de Colônias (UFCs) de fungos a partir do solo de dois pontos da caverna. Desse total, 82 UFCs foram registradas no ponto 2 e 43 UFCs no ponto 1. Por meio da análise morfológica e análises de sequências de DNA via BLASTn do NCBI, 49 isolados foram identificados como pertencentes ao filo *Ascomycota* (40 gêneros), seguidos por *Basidiomycota* (6) e *Mucoromycota* (3). Os gêneros mais abundantes foram *Trichoderma* (10 isolados), seguido por *Apiotrichum*, *Blastobotrys* e *Metarhizium*. Outros gêneros, como *Penicillium* (4), *Aspergillus* (3) e *Humicola* (3) também se destacaram. Este é o primeiro estudo de fungos da Caverna do Pulpito (Caverna SB_51), localizada no Parque Nacional dos Campos Ferruginos, revelando uma grande riqueza de gêneros.

Abstract

Fungi play a fundamental role in maintaining natural ecosystems, especially in extreme environments such as caves, which are habitats for several species despite their inhospitable conditions and low levels of nutrients. Serra dos Carajás, in the state of Pará, stands out for its unique speleological heritage, although the expansion of tourism and mining activities threatens the conservation of these areas. The study aimed to preliminarily analyze the richness and abundance of fungi isolated from the sediment of the Pulpit Cave (Cave SB_51) located in the Campos Ferruginos National Park. In total, 125 Colony Forming Units (CFUs) of fungi were isolated from the sediment/soil at two points in the cave. Of this total, 82 UFCs were recorded at point 2 and 43 UFCs at point 1. Through morphological analysis and BLAST sequencing, 49 isolates were identified at the genus level. Most of the fungi identified belong to the phylum *Ascomycota* (40 genera), followed by *Basidiomycota* (6) and *Mucoromycota* (3). *Trichoderma* (10 isolates), *Apiotrichum*, *Blastobotrys* and *Metarhizium* were the most abundant genera. Other genera, such as *Penicillium* (4), *Aspergillus* (3) and *Humicola* (3), also stood out.

1. Introdução

Os fungos são reconhecidos por sua notável capacidade de colonizar uma ampla variedade de ambientes (PEAY et al., 2016), desempenhando um papel crucial na manutenção e equilíbrio de ecossistemas naturais (BALDRIAN et al., 2021; WIJAYAWARDENE et al., 2022). Estudos sobre

as estimativas da diversidade de fungos têm demonstrado que estes organismos compreendem aproximadamente 20% de todas as espécies eucarióticas existentes, no entanto, essa quantidade ainda é incipiente em relação ao número de espécies que podem ser encontradas em ecos-

sistemas considerados extremos (TEDERSOO et al., 2022; IUCN, 2021). Um dos exemplos, os ambientes cavernícolas, que embora possuam poucos nutrientes, abrigam diversas espécies de fungos que desempenham um papel essencial na ciclagem de nutrientes e no fornecimento de recursos orgânicos (NOVÁKOVÁ, 2009; VANDERWOLF et al., 2013; CUNHA et al., 2020). A região Norte do Brasil, especialmente a Amazônia, que abriga mais de 3.122 cavernas (ICMBio/CECAV, 2022), apresenta grande potencial para a descoberta de espécies endêmicas ou desconhecidas. A baixa incidência de luz e a alta umidade favorecem a sobrevivência de fungos cavernícolas, os quais ainda necessitam de muitos estudos (VANDERWOLF et al., 2013; ALVES et al., 2022; PRAZERES et al., 2025). A Serra dos Carajás, no sudeste do Pará, é uma região de significativa importância espeleológica, com diversas cavernas formadas por minerais ferríferos e um rico patrimônio natural (WILLIAMS et al., 2005). No entanto, apesar dos esforços de con-

servação, a expansão do turismo e das atividades mineradoras em áreas pouco exploradas tem causado perda de recursos biológicos e materiais específicos (TAYLOR et al., 2009;). Esse cenário destaca a carência de dados sobre as relações ecológicas e a microbiota cavernícola, levantando questões para a comunidade científica que busca catalogar e conservar esses ambientes (PRAZERES et al., 2025). Portanto, a catalogação e análise da riqueza e abundância de fungos cavernícolas na região são fundamentais para compreender as comunidades fúngicas subterrâneas, bem como, para subsidiar políticas públicas de conservação mais eficazes, alinhadas ao uso sustentável dos recursos naturais. Nesse contexto, o objetivo desta pesquisa foi estudar, de forma preliminar, a riqueza e abundância de fungos isolados do sedimento da Caverna do Púlpite (SB_51), localizada no Parque Nacional dos Campos Ferruginosos, em Canaã de Carajás, Pará, Brasil.

2. Materiais e Métodos

A Caverna do Púlpite (SB_51) está localizada no município Canaã dos Carajás, Pará, Brasil (SANTOS et al., 2025). A região apresenta um complexo montanhoso, onde está situado o Parque Nacional dos Campos Ferruginosos, uma Unidade de Conservação de Proteção Integral (VIDAL & MASCARENHAS, 2020). A caverna SB_51, também conhecida como Gruta do Púlpite, localiza-se a uma latitude 62°22'32" sul e a uma longitude 93°016'83" oeste, estando a uma altitude de 616 metros (Fig. 1).



Figura 1 : Entrada da caverna (A); Coleta de sedimento/solo na caverna do Púlpite em Canaã dos Carajás (B). Foto: Diego Bento (2024).

Foram selecionados dois pontos internos da para coleta (triplicata) de sedimento/solo na caverna (ponto 1 e ponto 2). Os pontos se diferenciavam pela incidência de morcegos, sendo presente apenas no ponto 2. Para o isolamento dos fungos, 1 g de sedimento foi suspenso em 9 mL de água destilada e esterilizada (Fig. 2 A-B) e agitado por 20 min a 100 rpm para diluições seriadas de até 10^{-4} (Fig. 2 C-D). Dessa suspensão retirou-se 1 mL e o líquido foi transferido para a superfície dos meios BHI e SAB contidos em placas de Petri, que foram incubadas no escuro a 25 °C por até 14 dias. Após o crescimento fúngico, as colônias foram purificadas e transferidas para tubos de ensaio contendo SAB e/ou Batata Dextrose Ágar (BDA). Posteriormente, o número de UFC por 1 g de sedimento foi calculado como médias das réplicas (Cunha et al., 2020). Além disso, foi realizado o isolamento em câmara úmida, em que o sedimento de cada amostra composta, foi espalhado sob um papel filtro em placas de Petri (Fig. 2 E-F). Em seguida o sedimento/solo foi umedecido com água destilada e esterilizada e incubado por 14 dias no escuro, até que

fosse possível a visualização de culturas fúngicas (RICHARDSON, 2008). Para a identificação morfológica estruturas macro e micromorfológicas foram observadas (Crous et al., 2009; Samson et al., 2010; Seifert et al., 2011). Nas análises moleculares, o DNA genômico foi extraído conforme o protocolo do Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, USA). A região ITS rDNA foi amplificada com os primers ITS1/ITS4 (White et al., 1990). As reações de amplificação, os amplicons purificados e as reações de sequenciamento foram realizadas de acordo com a metodologia de Bezerra et al. (2017).

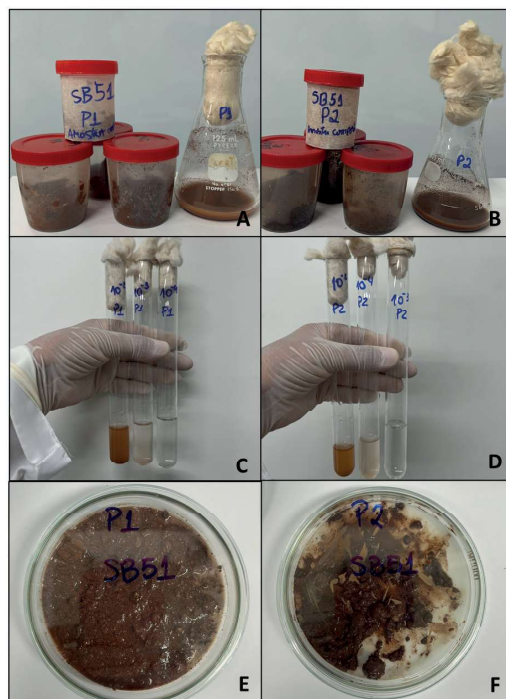


Figura 2 : Suspensão das amostras de sedimento/solo do ponto 1 e 2 respectivamente (A-B); Diluição seriada até 10^{-4} (B-C); Método de câmara úmida das amostras compostas (E-F).

3. Resultados

A abundância de fungos foi determinada pelo número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) isoladas do sedimento/solo em dois

pontos da caverna, totalizando 125 UFCs. No ponto 2, foram registradas 82 UFCs, enquanto no ponto 1, 43 UFCs. As colônias foram seleciona-

das para isolamento com base nas diferenças morfológicas. O gênero de 49 isolados foi identificado por meio de análise morfológica e de sequências de DNA via BLASTn do NCBI. Quanto à riqueza encontrada, a maioria dos fungos identificados pertence ao filo *Ascomycota* (40 isolados), seguidos por *Basidiomycota* (6) e *Mucoromycota* (3) (Fig. 3). Os fungos foram agrupados em 18 gêneros, com *Trichoderma* sendo o mais abundante com dez isolados, seguido por *Apiotrichum*, *Blastobotrys* e

Metarhizium, cada um com cinco isolados. Gêneros como *Penicillium* (4 isolados), *Aspergillus* (3) e *Humicola* (3) também se destacaram. Os demais gêneros foram menos frequentes, com alguns isolados apenas uma vez, como *Achaetomiella*, *Parahumicola*, *Crinitomyces*, *Umbelopsis*, *Maudiozyma*, *Chrysosporium*, *Saitozyma* e *Oidiodendron*, e outros duas vezes, como *Chaetomium*, *Gongronella* e *Gymnascella*.

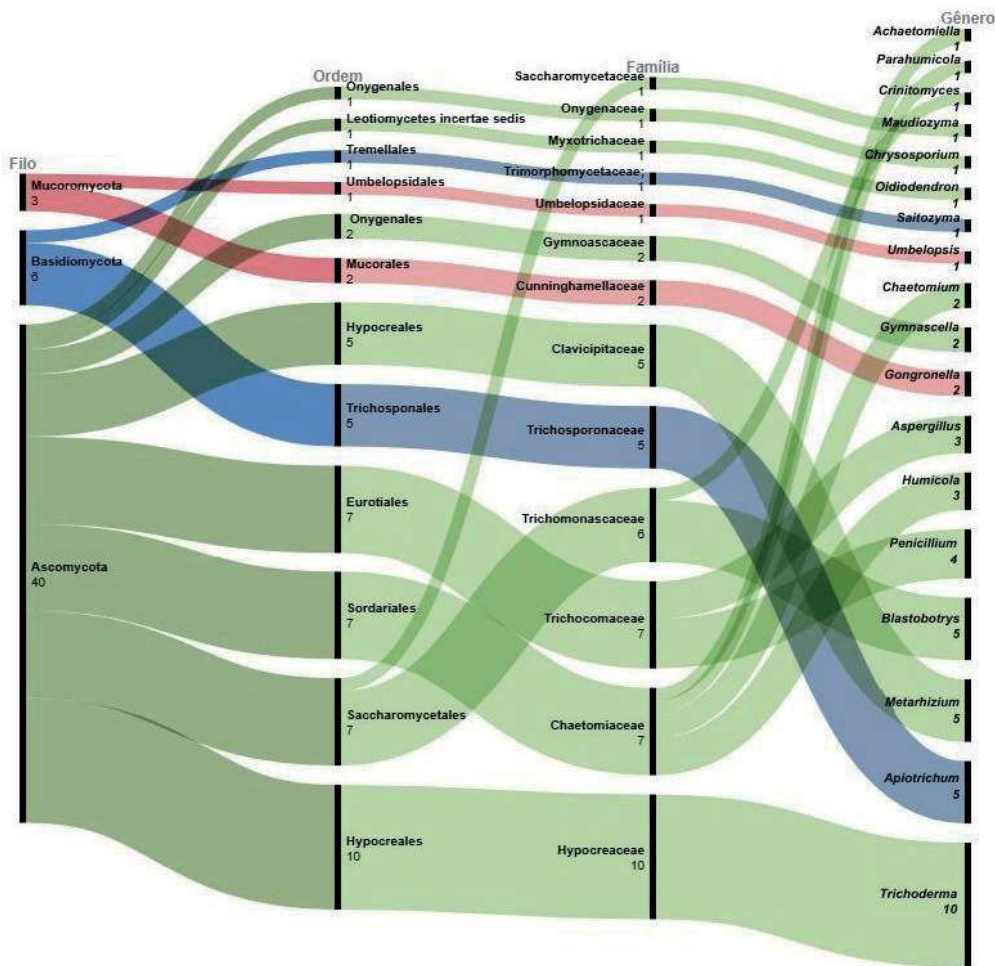


Figura 3: Riqueza de fungos isolados da Caverna do Pulpito (SB_51) localizada no município Canaã dos Carajás, Pará, Brasil.

4. Discussão

A maior abundância de UFCs foi verificada no ponto 2 (82), local com presença de uma colônia de morcegos. Isso sugere que a área do ponto 2 da caverna seja mais propensa a suportar uma comunidade microbiana mais densa, possivelmente devido à maior disponibilidade de nutrientes e presença de morcegos (VANDERWOLF et al. 2013; CUNHA et al. 2020). Nesse sentido, os pontos de coleta e os isolados analisados apresentam características variáveis, corroborando com outros estudos que demonstraram que os diferentes espaços e substratos influenciam diretamente na riqueza e abundância de fungos em ambientes cavernícolas (CUNHA et al. 2020; ALVES et al. 2022). A maioria dos gêneros encontrados neste estudo pertence ao filo *Ascomycota*, semelhante com estudos de cavernas no Brasil (ALVES et al. 2022; OLIVEIRA et al. 2024; PRAZERES et al. 2025). Dentre os gêneros de *Ascomycota* comumente encontrados em ambientes cavernícolas, destacam-se *Trichoderma* (VANDERWOLF et al. 2013; JURADO et al. 2016), *Aspergillus*, *Penicillium* e

Humicola (NOVÁKOVÁ, 2009; AZADEH & SAFAIEFARAHANI, 2021), os quais, são amplamente reconhecidos pela sua capacidade de adaptação aos substratos e condições extremas (VANDERWOLF et al. 2013; OLIVEIRA et al. 2024). NÓBREGA et al. (2024) também apresentaram espécies de *Penicillium* encontradas em caverna da Amazônia, confirmando a riqueza de gêneros encontrados no nosso estudo. Segundo VANDERWOLF et al. (2013), o filo *Ascomycota* é geralmente encontrado em abundância em ambientes cavernícolas, destacando-se pela sua adaptação a condições extremas de umidade, temperatura e nutrientes limitados, típicas desses ecossistemas subterrâneos. O filo *Basidiomycota* foi o segundo mais abundante em nosso estudo, sendo representado pelos gêneros *Saitozyma* e *Apiotrichum*. Este último, foi previamente registrado em amostras de guano em cavernas do Japão (TAKASHIMA et al. 2020). O filo *Mucoromycota* foi representado por apenas dois gêneros, entre os quais *Umbelopsis* foi registrado em ambientes cavernícolas (PREEDANON et

al. 2023). Nesse sentido, em termos de número de representantes dos gêneros encontrados nas amostras de solo/sedimento, esses resultados se assemelham com os achados de VANDERWOLF et al. (2013); ALVES et

al. (2022) e PRAZERES et al. (2025), que destacaram a predominância de fungos *Ascomycota* em ambientes cavernícolas.

5. Conclusão

A Caverna do Pulpito, em Canaã de Carajás, apresentou uma riqueza cultivável de 49 gêneros de fungos, sendo predominantemente habitada por membros do filo *Ascomycota*, seguido por *Basidiomycota* e *Mucoromycota*. A diversidade dos gêneros foi elevada, com destaque para *Trichoderma*, que apresentou o maior número de isolados, seguido por *Apiotrichum*, *Blastobotrys* e *Metarhizium*. Além disso, foi observada a presença de gêneros mais raros, como *Achaetomiella*, *Parahumicola*,

Crinitomyces, *Umbelopsis*, entre outros. O estudo preliminar realizado na Caverna do Pulpito, em Canaã de Carajás, trouxe *insights* valiosos sobre a microbiota subterrânea da região, com foco na abundância e riqueza de fungos presentes no sedimento/solo. Além disso, as informações geradas podem fornecer subsídios para pesquisas que explorem os potenciais biotecnológicos e ecológicos desses organismos e para a conservação da biodiversidade subterrânea da Amazônia.

Agradecimentos

Agradecemos à Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo financiamento da pesquisa através de bolsa de doutorado, equipe da Micoteca URM da Universidade Federal de Pernambuco pelo auxílio no desenvolvimento do estudo. Ao Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Cavernas (CECAV) pela parceria

e expedições realizadas e a equipe do Laboratório de Ciência Aplicada à Conservação da Biodiversidade (UFPE) pela realização das coletas do referido estudo. Jadson Bezerra também agradece ao CNPq e à FAPEG. Jadson Bezerra e Cristina Motta são bolsistas de produtividade do CNPq.

6. Referências

ALVES, V.C.S., Lira, R.A., Barbosa, R.N., BENTO, D.M., BARBIER, E., SOUZA-MOTA, C.M., BEZERRA, J.D.P. (2022). Unravelling the fungal darkness in a tropical cave: richness and Ingenta Connect. *Fungal Systematics and Evolution* 10:1-15.

AZADEH, H., BANAFSHEH, S. (2021) Identification of fungi from soil and sediment in Jeřiz Cave; the first survey in a cave from Iran. *Journal of Cave and Karst Studies* 83(2): 71-77

BALDRIAN, P., Větrovský, T., Lepinay, C., & Kohout, P. (2022) High-throughput sequencing view on the magnitude of global fungal diversity. *Fungal Diversity*, 114(1):539-547.

BEZERRA, J. D., Oliveira, R. J., Paiva, L. M., Silva, G. A., Groenewald, J. Z., Crous, P. W., Souza-Motta, C. M. (2017). Bezerromycetales and Wiesneriomycetales ord. nov. (class Dothideomycetes), with two novel genera to accommodate endophytic fungi from Brazilian. *Mycological Progress* 16(4):297-309.

Crous, P.W., Verkley, G.J., Groenewald, J.Z., & Samson, R.A. (2009) Fungal biodiversity. *Fungal biodiversity*.

Cunha, A. O., Bezerra, J. D. 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: e0243494.

CENTRO NACIONAL DE PESQUISA E CONSERVAÇÃO DE CAVERNAS (ICMBIO/CECAV). Anuário estatístico do patrimônio espeleológico brasileiro 2020. Brasília, 2022. Disponível em: <<https://www.gov.br/icmbio/pt-br/assuntos/centros-de-pesquisa/cecaav/anuario-estatistico>>

Groenewald, J. Z., Nakashima, C., Nishikawa, J., Shin, H. D., Park, J. H., Jama, A. N., ... & Crous, P. W. (2013) Species concepts in *Cercospora*: spotting the weeds among the roses. *Studies in Mycology* 75(1): 115-170.

IUCN 2021. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2021-2. International Union For Conservation of Nature, Gland.

JURADO V, SÁIZ-JIMÉNEZ C. (2016) Vida microbiana en las cavernas: el fascinante mundo de la biodiversidad subterránea y su papel en los procesos de deterioro. *Enseñanza de las Ciencias de la Tierra* 24: 51-60..

PEAY, K.; KENNEDY, P.; TALBOT, J. (2016) Dimensions of biodiversity in

the Earth mycobiome. *Nature Reviews Microbiology*, 14(7): 434-447.

PRAZERES J.F.S.A., BERNARD E., SOUZA-MOTTA C.M., BENTO D.M., SILVA-JÚNIOR E.N.M., BARBIER E., FONSECA E.O., LIMA J.M.S., CARVALHO J.L.V.R., MIRANDA L.S., PEREIRA O.L., BARBOSA R.N., MOMOLI R.S., CONDÉ T.O., SILVA T.C., VICENTE V.A., ALVES V.C.S., OLIVEIRA P.H.F., BEZERRA J.D.P. (2025) Current knowledge on the cave fungi in Brazilian biomes. *Fungal Biology Reviews* 51:100412.

PREEDANON, S., SUETRONG, S., SRIHOM, C., SOMRITHIPOL, S., KOBMOO, N., SAENGKAEWSUK, S., ... & Boonyuen, N. (2023). Eight novel cave fungi in Thailand's Satun Geopark. *Fungal Systematics and Evolution*, 12(1): 1-30.

NÓBREGA, J. P., DO NASCIMENTO BARBOSA, R., LIMA, J. M. D. S., DE MEDEIROS BENTO, D., DE SOUZA-MOTTA, C. M., & MELO, R. F. R. (2024). Six new *Penicillium* species in the section *Lanata-Divariata* from a cave in Amazon rainforest, Brazil. *Mycological Progress* 23(1): 1-24.

NOVÁKOVÁ, A. (2009) Microscopic fungi isolated from the domica cave system (slovak karst national park, slovakia). a review. *International Journal of Speleology*, 38(1):72-81.

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. *Revista Brasileira de Espeleologia-RBEsp*, 1(13):339-369.

RICHARDSON, M. J. (2008). Records of coprophilous fungi from the Lesser Antilles and Puerto Rico. *Caribbean Journal of Science* 44(2):206-214.

SAMSON, R. A., HOUBRAKEN, J., THRANE, U., FRISVAD, J. C., ANDERSEN, B. (2010) Food and indoor fungi: CBS-KNAW fungal biodiversity centre. CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, the Netherlands.

SANTOS, D.J., TRAVASSOS, L. E.P., RUCHKYS, Ú.A., GOMES, M. (org.). (2025) Tesouros da Terra: tesouros da terra descobrindo a geodiversidade no parque nacional dos campos ferruginosos e na floresta nacional de carajás - pa. Brasília: labs, 2025. Disponível em: https://www.gov.br/icmbio/pt-br/assuntos/centros-de-pesquisa/cavernas/publicacoes/20250127_tc-ce-ferropuro_carajas_tesouros-da-terra_web_compressed.pdf. Acesso em: 08 fev. 2025

- SEIFERT, K. A., GAMS, W. (2011) The genera of Hyphomycetes–2011 update. *Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 27(1): 119-129.
- TAKASHIMA, M., KURAKADO, S., CHO, O., KIKUCHI, K., SUGIYAMA, J., & SUGITA, T. (2020). Description of four *Apiotrichum* and two *Cutaneotrichosporon* species isolated from guano samples from bat-inhabited caves in Japan. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(8), 4458-4469.
- TAYLOR, E. L. S.; FERREIRA, R. L.; SILVA, D.; CANESTRI, G. B.; BATISTA, L. R. (2009). Levantamento e distribuição mínima de fungos filamentosos em cavernas da caatinga brasileira. In: III CONGRESSO LATINO AMERICANO DE ECOLOGIA. 2009, Minas Gerais. Anais eletrônicos.
- Tedersoo, L., Mikryukov, V., Zizka, A., Bahram, M., Hagh-Doust, N., Anslan, S., ... & Abarenkov, K. (2022). Towards understanding diversity, endemism and global change vulnerability of soil fungi. *bioRxiv*.
- VANDERWOLF, K. J., Malloch, D., McAlpine, D. F. F., Graham, J. (2013) A world review of fungi, yeasts, and slime molds in caves. *International Journal of Speleology* 42:77-96.
- VIDAL, M. R. DOS SANTOS MASCARENHAS, A. L. (2020). Mapeamento geológico no Parque Nacional dos Campos Ferruginosos de Carajás/Pará-Brasil. *Ateliê Geográfico*, 14(3): 218-238.
- WHITE, T. J., BRUNS, T., LEE, S. J. W. T., TAYLOR, J. (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*. 18(1): 315-322
- WIJAYAWARDENE, N. N. et al., 2022. Forecasting the number of species of asexually reproducing fungi (*Ascomycota* and *Basidiomycota*). *Fungal Diversity* 1-28.
- WILLIAMS, P. J., BARTON, M. D., JOHNSON, D. A., Fontboté, L., De Haller, A., Mark, G., ... & Marschik, R. (2005). Iron oxide copper-gold deposits: Geology, space-time distribution, and possible modes of origin. *Economic Geology*:371-405.