

**UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI**

**Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal**

**Ana Flávia Leão**

**FUNGOS CAVERNÍCOLAS DA GRUTA VELHA NOVA  
NA SERRA DO ESPINHAÇO EM MONJOLOS, MINAS GERAIS - BRASIL**

**Diamantina**

**2021**

**Ana Flávia Leão**

**FUNGOS CAVERNÍCOLAS DA GRUTA VELHA NOVA  
NA SERRA DO ESPINHAÇO EM MONJOLOS, MINAS GERAIS - BRASIL**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, como requisito para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Henrique Graziotti

Co-orientador: Prof. Dr. Olinto Liparini Pereira

**Diamantina**

**2021**

Ficha Catalográfica – Sistema de Bibliotecas/UFVJM  
Bibliotecário

L437 2021	<p data-bbox="679 1099 906 1128">Leão, Ana Flávia</p> <p data-bbox="264 1151 1321 1294">FUNGOS CAVERNÍCOLAS DA GRUTA VELHA NOVA NA SERRA DO ESPINHAÇO EM MONJOLOS, MINAS GERAIS - BRASIL [manuscrito] / Ana Flávia Leão. -- Diamantina, 2021.</p> <p data-bbox="746 1317 858 1346">70 p. : il.</p> <p data-bbox="517 1429 1091 1514">Orientador: Prof. Paulo Henrique Graziotti. Coorientador: Prof. Olinto Liparini Pereira.</p> <p data-bbox="284 1592 1321 1736">Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) -- Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, Diamantina, 2021.</p> <p data-bbox="296 1812 1311 1955">1. Microbiologia. 2. Fungos. 3. Cavernas. 4. Serra do Espinhaço Meridional. 5. Filogenia. I. Graziotti, Paulo Henrique . II. Pereira, Olinto Liparini . III. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri. IV. Título.</p>
--------------	---

Elaborada com dados fornecidos pelo(a) autor(a).



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI

ANA FLÁVIA LEÃO

FUNGOS CAVERNÍCOLAS DA GRUTA VELHA NOVA  
NA SERRA DO ESPINHAÇO EM MONJOLOS, MINAS GERAIS - BRASIL

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação Produção Vegetal da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM), nível de Mestrado, como requisito parcial para obtenção do título de **Mestra em Produção Vegetal**.

Orientador: Prof. Paulo Henrique Graziotti

Coorientador: Prof. Olinto Liparini Pereira

Data de aprovação 22/04/2021.

Prof. Paulo Henrique Graziotti - (UFVJM)

Prof. Olinto Liparini Pereira - (Universidade Federal de Viçosa)

Prof. Soraya de Carvalho Neves - (UFVJM)



Documento assinado eletronicamente por **Paulo Henrique Graziotti, Servidor**, em 22/04/2021, às 16:49, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Soraya de Carvalho Neves, Servidor**, em 23/04/2021, às 12:17, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Olinto Liparini Pereira, Usuário Externo**, em 24/04/2021, às 10:20, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site

[https://sei.ufvjm.edu.br/sei/controlador\\_externo.php?](https://sei.ufvjm.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0)

[acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufvjm.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **0336759** e o código CRC **6D95D549**.

Dedico aos meus pais, que devido às dificuldades da vida não puderam continuar seus estudos e mesmo assim incentivaram e proporcionaram a educação superior aos três filhos.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pelo dom da vida e por me conceder tudo necessário a esta conquista. Essa conquista é fruto de uma família que passou fome, que ia a escola para comer, que não pode estudar para se sustentar, mas que nunca desistiu da educação e faz a segunda geração alcançar o que para eles foram impossível.

Aos meus pais, Dalva e Geraldo, minhas bases, pelo amor incondicional, e por nunca mediram esforços para me apoiar e incentivar a nunca desistir.

Aos meus irmãos, Fabiana e Geraldo Júnior, que me ensinaram o significado das palavras companheirismo e lealdade, e mesmo com a distância nos separando nunca deixaram de me apoiar.

A minha família (meus avós, tios e primos) que sempre esteve presente em minha vida incentivando sempre a alcançar meus sonhos.

Aos meus pequenos Pedro Henrique e Yuri Gabriel, meus amores incondicionais, que me motivam a cada dia ser uma pessoa melhor. Em especial ao meu afilhado Yuri, que ainda da seus primeiros passinhos no mundo e me enche de alegrias a cada dia.

As minhas amigas Leticia, Ana Carolina e Danielle, que mesmo com a distância estão sempre presentes me proporcionado boas conversas, risadas e conselhos. Ao Leandro, um grande amigo desde a época da agronomia, muito obrigada por todo apoio em minha mudança a Viçosa. Ao Tiago, uma pessoa incrível e um companheiro maravilhoso, meu presente de mudança. As meninas da Republica Senhora dos Anjos que me receberam e tive a oportunidade de conviver em Viçosa.

Ao meu orientador, Professor Dr. Paulo Henrique Graziotti, por todos os ensinamentos, suporte, conselhos, pela paciência e amizade. Muito obrigada por toda orientação ao longo da graduação e deste mestrado.

Ao professor Dr. Olinto Liparini Pereira, pelo acolhimento em seu laboratório por todos os ensinamentos para condução deste trabalho.

A Professora Soraya Neves, pela oportunidade de participar deste trabalho.

A Universidade Federal Dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM), de maneira especial ao Programa de Pós Graduação em Produção Vegetal, pela oportunidade de realização deste mestrado e pela contribuição à minha formação.

A Universidade Federal de Viçosa, em especial ao Programa de Pós Graduação em Microbiologia Agrícola, pela oportunidade da mobilidade e realização da pesquisa.

A FAPEMIG pelo apoio financeiro do projeto (Pesquisa na área de Espeleologia – Parceria FAPEMIG-VALE – RDP 00017-18).

Aos colegas do Laboratório de Microbiologia do Solo, a qual faço parte a anos, e que mesmo com minha ausência sempre estiveram dispostos a me ajudar.

Ao Micolab e todos os colegas que me receberam de braços abertos e me ajudam neste trabalho, em especial aos meninos André, Athus, Fabio, Thiago e Yan, que contribuíram diretamente para conclusão dessa dissertação e pela paciência em me ensinar. Muito obrigada.

A todos obrigada, pela paciência, ajuda, pelo carinho e compressão de cada um.

## RESUMO

As cavernas são ambientes pobres em carbono orgânico e alguns nutrientes que possuem características únicas onde ocorrem organismos desconhecidos ou adaptados. Os fungos que ocorrem nas cavernas podem ser endêmicos ou adaptados a esse ambiente e podem apresentar metabolismo específico com produção de compostos desconhecidos e de interesse à humanidade. Assim, esses ambientes são frequentemente explorados na busca de novos compostos bioativos produzidos por fungos. O presente trabalho teve como objetivo revisar a importância da identificação dos fungos que ocorrem em cavernas e seus potenciais biotecnológicos, preservação desses ambientes, e o isolamento de fungos que ocorrem na Caverna Velha Nova, Monjolos, localizada na Serra do Espinhaço Meridional de Minas Gerais. Na revisão são abordados principalmente a importância dos fungos, o impacto do turismo sobre a ecologia cavernícola, medidas de preservação e a importância dos estudos nestes ambientes. Para o isolamento de fungos da caverna Velha Nova, foram utilizadas amostras do ar, solo, rochas, espeleotemas e serrapilheira. Após o isolamento, os microfungos foram identificados por métodos morfológicos e sequenciamento do DNA genômico. Cento e setenta e oito isolados foram obtidos e entre estes foram identificados os gêneros *Aspergillus*, *Amphichorda*, *Chaetomium*, *Penicillium*, *Humicola*, *Mucor*, *Gliomastix*, *Clonostachys*, *Myrothecium*, *Cladosporium*, *Scedosporium*, *Meyerozyma* e *Rhizopus*. Devido a possível identificação de uma nova espécie de *Amphichorda*, seu posicionamento filogenético foi descrito.

Palavras-chave: Microrganismos. Bioprodutos. Farmáculos. Revisão. Filogenia. Nova espécie. *Amphichorda*.

## ABSTRACT

Caves are environments poor in organic carbon and some nutrients that have unique characteristics where unknown or adapted organisms occur. Fungi that occur in caves can be endemic or adapted to this environment and can present specific metabolism with the production of unknown compounds of interest to humanity. Thus, these environments are frequently explored in the search for new bioactive compounds produced by fungi. The present work aimed to review the importance of the identification of fungi that occur in caves and their biotechnological potentials, preservation of these environments, and the isolation of fungi that occur in the Velha Nova cave, Monjolos, located in the Serra do Espinhaço Meridional of Minas Gerais. The review deals mainly with the importance of fungi, the impact of tourism on cave ecology, preservation measures and the importance of studies in these environments. Samples from the air, soil, rocks, speleothems and litter were used to isolate fungi from Velha Nova cave. After isolation, some fungi were identified with morphological methods and DNA sequencing. One hundred and seventy-eight isolated fungi were obtained and among these, *Aspergillus*, *Amphichorda*, *Chaetomium*, *Penicillium*, *Humicola*, *Mucor*, *Gliomastix*, *Clonostachys*, *Myrothecium*, *Cladosporium*, *Scedosporium*, *Meyerozyma* and *Rhizopus* were identified. Due to the isolation of a new species of *Amphichorda*, its phylogenetic position has been described.

Keywords: Microorganisms. Bioproducts. Farmacles. Revision. Phylogeny. New species. *Amphichorda*.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 2.1 – Planta baixa da Caverna Velha Nova, com perfis longitudinais e cortes transversais. ....	45
Figura 2.2 – Imagens da caverna Velha Nova. a Entrada da caverna; b-f Alguns espeleotemas encontrados no interior da caverna; e Destaque de gotejamentos encontrados; g Fóssil calcificado de animal vertebrado não identificado; i Exemplo de um dos insetos encontrados .....	46
Figura 2.3 – Árvore filogenética obtida por Inferência Bayesiana dos isolados de <i>Amphichorda</i> , com concatenação de sequências das regiões ITS, TEF e RPB2. ....	57
Figura 2.4 – Isolado <i>Amphichorda</i> sp. a Placa de onde o fungo foi isolado, com destaque para o inseto que passou sobre o meio; b Cultura do isolado; c Destaque das do sinêmio ramificado; d-f Células conidiogênicas; g Conídios; h Cultura em meio BDA; i Cultura em meio de aveia; j Cultura em meio SNA; Escala das barras: d-f 20 µm; g 10 µm. ....	576

## LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 - Espécies e códigos de acesso ao Genbank utilizados para análise de inferência Bayesiana (Figura 3).....	51
Tabela 2.2 – Isolados e código COAD, origem do isolamento e agrupamento em gênero, família, ordem e filo, de acordo com o BLASTn das sequências de DNA dos isolados.....	55
Tabela 2.3 – Comparação de características de espécies do gênero Amphichorda com os isolados fúngicos deste estudo.....	56

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL .....	15
CAPÍTULO I.....	16
RESUMO .....	16
ABSTRACT.....	17
1.1 REVISÃO .....	18
1.2 CONCLUSÃO .....	33
REFERÊNCIAS .....	34
CAPÍTULO 2.....	40
RESUMO .....	40
ABSTRACT.....	41
2.1 INTRODUÇÃO .....	42
2.2 MATERIAIS E MÉTODOS .....	44
2.3 RESULTADOS.....	53
2.4 DISCUSSÃO.....	58
2.5 CONCLUSÕES.....	62
REFERÊNCIAS .....	63

## INTRODUÇÃO GERAL

As cavernas são os principais ambientes subterrâneos estudados, apresentando características singulares, como delimitação espacial, ausência da incidência luz solar direta e escassez de nutrientes, formando um microclima único. Os fungos são encontrados em todas as superfícies da caverna, desde locais com maior acúmulo de material orgânico, como o piso e solo, a rochas componentes da caverna e espeleotemas, que possuem pouco a nenhum material orgânico.

As cavernas são *hotspot* de biodiversidade microbiana, abrigando espécies conhecidas e desconhecidas. Os fungos nas cavernas se adaptam para sobreviver produzindo compostos incomuns que podem ser bioativos e de interesse para a humanidade.

Nos últimos anos o número de estudos sobre o ambiente cavernícola tem aumentado principalmente para o conhecimento dos microrganismos potencialmente patogênicos ao homem, como o *Histoplasma capsulatum* e *Trichophyton mentagrophytes*. Outro fator importante dos estudos é a identificação dos impactos causados por ações antrópicas, como o turismo e a mineração.

A grande maioria dos estudos sobre cavernas ainda são desenvolvidos em regiões de clima temperado, sendo escassos os estudos em cavernas tropicais. Assim este trabalho teve como objetivo realizar uma revisão de estudos cavernícolas sobre a identificação de fungos e seus potenciais biotecnológicos, a importância de preservação dos ambientes cavernícolas e o isolamento fungos presentes na Caverna Velha Nova – Monjolos, localizada na Serra do Espinhaço Meridional de Minas Gerais.

## CAPÍTULO I

### CAVERNAS E FUNGOS

#### RESUMO

As cavernas são ambientes restritos e oligotróficos, e possuem uma grande biodiversidade microbiana, destacando a presença dos fungos. Os fungos fazem parte de todo ecossistema da caverna e geralmente são decompositores ou parasitas. Estes para sobreviver no ambiente único das cavernas sofrem adaptações que não são encontradas em outros ambientes. O ecossistema da caverna possui um delicado equilíbrio ecológico, propenso a grandes mudanças por ações antrópicas, e uma das principais ações é o turismo, que causa mudança do microclima cavernícola e conseqüentemente da biodiversidade presente. O objetivo deste trabalho foi revisar os estudos e identificação de fungos cavernícolas e a importância desses para o potencial uso biotecnológico e para a preservação desses ambientes. E os estudos com fungos cavernícolas demonstra que as cavernas abrigam uma grande quantidade de espécies ainda desconhecida e que as espécies encontradas possuem grande potencial de uso biotecnológico, principalmente pela produção de metabólitos secundários adaptados as condições extremas. Porém a quantidade de estudos nestes ambientes, principalmente em regiões tropicais ainda é pequeno, deixando uma grande lacuna sobre a diversidade desses ambientes e ressaltando a necessidade de mais pesquisas.

Palavras-chave: Revisão. Microrganismos. Compostos bioativos. Turismo. Impactos.

## **CHAPTER I**

### **CAVE AND FUNGI**

#### **ABSTRACT**

The caves are restricted and oligotrophic environments, and have a great microbial biodiversity, highlighting the presence of fungi. Fungi are part of the entire cave ecosystem and are usually decomposers or parasites. This one to survive in the unique environment of the caves undergoes adaptations that are not found in other environments. The cave's ecosystem has a delicate ecological balance, prone to major changes due to anthropic actions, and one of the main actions is tourism, which causes changes in the cave microclimate and consequently in the present biodiversity. The objective of this work was to review the studies and identification of cave fungi and their importance for the potential biotechnological use and for the preservation of these environments. Studies with cave fungi show that the caves are home to a large number of species still unknown and that the species found have great potential for biotechnological use, mainly due to the production of secondary metabolites adapted to extreme conditions. However, the number of studies in these environments, especially in tropical regions, is still small, leaving a large gap on the diversity of these environments and underscoring the need for more research.

**Keywords:** Review. Microorganisms. Bioactive compounds. Tourism. Impacts.

## 1.1 REVISÃO

O Reino Fungi, é caracterizado por grandes diversidades ecológicas, fisiológicas e morfológicas. Engloba desde seres microscópicos, como os fungos e leveduras, a fungos que produzem estruturas macroscópicas, como os cogumelos (ABREU; ROVIDA; PAMPHILE, 2015; MADIGAN *et al.*, 2016). Os fungos são organismos eucarióticos pluricelulares, quimiorganotróficos, e podem ser encontrados em todos os ambientes da natureza (MADIGAN *et al.*, 2016; SILVA; MALTA, 2016). Acredita-se que exista aproximadamente cerca de 5,1 milhões de espécies de fungos, porém apenas cerca de 5% já foram catalogados e identificados. A dificuldade em identificação dos fungos está relacionada à diversos fatores, incluindo a incapacidade de cultivos de alguns grupos em laboratório (ABREU; ROVIDA; PAMPHILE, 2015; SILVA; MALTA, 2016; VAUGHAN; MAIER; PRYOR, 2011).

Os fungos são extremamente importantes, estão presentes na produção de alimentos, produzem compostos bioativos de interesse das indústrias, principalmente das farmacêuticas; participam do processo de biodegradação, são utilizados no tratamento biológico de efluentes e também estão presentes na agricultura, como pragas ou como agentes de controle biológico (ABREU; ROVIDA; PAMPHILE, 2015). A ausência dos fungos dizimaria diversas espécies, incluindo a humana, pois estes organismos são responsáveis por uma parte do ciclo biológico, importante para a vida (ABREU; ROVIDA; PAMPHILE, 2015; SILVA; MALTA, 2016).

Os fungos estão presentes na alimentação humana há séculos, na produção de produtos fermentados e bebidas alcoólicas, eles podem adicionar fibras, vitaminas e proteínas aos alimentos fermentados (BOURDICHON *et al.*, 2012). Um exemplo de uso de produtos advindos de fungos na alimentação humana é o uso de licopeno produzido pelo fungo *Blakeslea trispora*. O licopeno é uma substância carotenoide, de coloração avermelhada encontrada em tomates, melancia, goiaba e outros alimentos. Quando ingerido o licopeno age como antioxidante, possuiu alto teor de radical livre e capacidade de limpeza das células. A empresa espanhola Vitatene, comercializa essa substância na Europa desde 2006 (DUFOSSÉ, 2018). Já na alimentação animal os fungos são utilizados para o tratamento das forrageiras. A inoculação de fungos na massa das forrageiras diminui o teor de lignina, favorecendo a degradabilidade e digestibilidade das mesmas no rúmen, e conseqüentemente um melhor aproveitamento dos nutrientes (MONÇÃO *et al.*, 2018).

Uma das descobertas mais relevantes para a medicina foi realizada em 1929 por Alexander Fleming, quando este descobriu que metabolitos produzidos pelo fungo

*Penicillium notatum*, eram capazes de combater infecções bacterianas (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). A penicilina tornou-se um dos fármacos mais conhecidos e usados, abrindo caminho para descobertas de outros fármacos de grande relevância médica como é o caso da ciclosporina. A ciclosporina é isolada de fungos de solo, e é um dos principais imunossupressores usados no tratamento de pacientes que passam por transplantes de órgãos (GUERRA JUNIOR *et al.*, 2010; SILVA; MALTA, 2016).

O maior desafio da agricultura nos últimos anos é aumentar a produtividade de alimentos e preservar o meio ambiente, principalmente o solo. Com a busca de técnicas sustentáveis para o plantio, o uso de fungos micorrízicos tem ganhado destaque na agricultura (THIRKELL *et al.*, 2017; ZHANG, S., *et al.*, 2018;). A inoculação de fungos micorrízicos arbusculares nas culturas de milho, trigo, arroz, cevada, sorgo, painço e aveia podem aumentar a produção em até 16% (ZHANG, S., *et al.*, 2018). Outras vantagens dos fungos micorrízicos é a capacidade de secretar metabolitos que disponibilizam o fósforo do solo para a absorção das raízes (THIRKELL *et al.*, 2017). Mudanças de café inoculadas com *Rhizophagus clarus* e *Claroideoglossum etunicatum* (MOREIRA *et al.*, 2019) e de *Eucalyptus* inoculadas com *Pisolithus microcarpus* (COSTA *et al.*, 2019) cresceram mais que mudas não inoculadas, principalmente quando doses menores de fósforo foram aplicadas.

Os fungos micorrízicos também podem ser utilizados como aliados na biorremediação e fitorremediação no tratamento de solos contaminados. Os fungos quando associados às plantas aumentam a tolerância à toxicidade por metais pesados, melhora a absorção de água e de nutrientes do solo (FARIA *et al.*, 2017). Em um solo oriundo da mineração de ferro, a inoculação com fungos micorrízicos aumentou o crescimento de mudas de *Kielmeyera rubriflora* (LARA *et al.*, 2020). Todas as mudas cultivadas apresentaram sintomas de toxicidade ao ferro do solo, porém as mudas inoculadas apresentaram um crescimento médio de 50% maior do que às não inoculadas (LARA *et al.*, 2020). A inoculação do fungo *Trichoderma*, num solo contaminado com arsênio e chumbo, aumentou a tolerância do girassol a esses metais pesados, além de favorecer o crescimento pela produção de ácido indolacético (GOVARTHANAN *et al.*, 2018).

A busca por novas espécies fúngicas e metabolitos bioativos produzidos por elas, levou a pesquisas em ambientes pouco explorados como as cavernas.

### 1.1.1 Características das Cavernas

As cavernas são ambientes subterrâneos muito específicos resultantes de ações físicas e reações químicas sobre a rocha, apresentam uma grande variação de tamanho,

permitindo o acesso de animais e seres humanos (LOBO, 2012; PARK *et al.*, 2020; POPOVIĆ *et al.*, 2015; TEIXEIRA-SILVA *et al.*, 2005). As cavernas podem ser classificadas como primárias, quando sua existência remota ao surgimento das rochas que a originam, e secundárias, quando as cavernas se formam após o surgimento das rochas por ação externa, como água percolada entre as rochas solúveis e ventos. O material rochoso que constitui as cavernas influencia no tamanho e na formação de espeleotemas. As cavernas mais comuns são formadas por rochas calcárias que geralmente apresentam um maior tamanho, e mais ornamentações espeleológicas, quando comparadas às cavernas compostas por rochas ferríferas, siliciclásticas e quartzítica. Em uma caverna é possível notar três zonas: a zona fótica, ou entrada, parte inicial da caverna, onde a incidência de luz direta é maior, além de sofrer maiores influências do ambiente externo. A próxima zona é conhecida como zona do crepúsculo, caracteriza-se por ser uma zona de transição entre a zona fótica e a zona afótica. Na zona de crepúsculo não ocorre incidência direta da luz, e o microclima é pouco influenciado pelo ambiente externo. Já na zona afótica ocorre uma ausência completa da luz, e o microclima permanece constante, sem grandes alterações de temperatura e umidade (LOBO, 2012; PARK *et al.*, 2020; POPOVIĆ *et al.*, 2015).

As cavernas apresentam características únicas como confinamento espacial, ausência de luz direta, temperaturas e umidade constante, e escassez de matéria orgânica (JURADO; SÁIZ-JIMÉNEZ, 2016; LIMA; MORAIS, 2006; LOBO, 2012; OGÓREK; LEJMAN; MATKOWSKI, 2013; PARK *et al.*, 2020; POPOVIĆ *et al.*, 2015; TAYLOR; STOIANOFF; FERREIRA *et al.*, 2013; ZHANG, Z., *et al.*, 2020). O ambiente cavernícola é oligotrófico, extremamente pobre em nutrientes, apresentando uma concentração muito baixa de carbono orgânico, que associado a altas concentrações de minerais, forma um nicho ecológico para o desenvolvimento de microrganismos altamente especializados (BASTIAN; ALABOUVETTE; SAIZ-JIMENEZ, 2009; BELYAGOUBI *et al.*, 2018; JURADO; SÁIZ-JIMÉNEZ, 2016; LIMA; MORAIS, 2006; MARQUES *et al.*, 2019; RAJI *et al.*, 2019; RODRIGUES *et al.*, 2009). Os microrganismos nestes ambientes competem pelos recursos disponíveis, levando a uma grande bioatividade metabólica, principalmente para produção de substâncias para inibir outros microrganismos. Associando essas características as diferentes formações das cavernas, o ambiente cavernícola se torna um ambiente extremamente único no ponto de vista microbiológico, com um delicado equilíbrio ecológico (BASTIAN; ALABOUVETTE; SAIZ-JIMENEZ, 2009; BELYAGOUBI *et al.*, 2018; HELD; SALOMON; BLANCHETTE, 2020; JURADO; SÁIZ-JIMÉNEZ, 2016; LIMA; MORAIS,

2006; MARQUES *et al.*, 2019; RODRIGUES *et al.*, 2009; ZHANG, Z., *et al.*, 2017; ZHANG; ZHAO; CAI, 2018).

As cavernas são ecossistemas únicos, sua importância pode ser classificada de diversas formas. Do ponto de vista geológico a caverna pode apresentar espeleotemas únicos, não encontrados em outras cavernas. Do ponto de vista histórico, servia de abrigo para os antepassados e nelas está gravada uma parte única da humanidade, como por exemplo, as pinturas rupestres das cavernas Lascaux, na França e Altamira, na Espanha. A importância religiosa da caverna para a sociedade como a Lapa do Bom Jesus na Bahia. Outro quesito para classificar a importância de uma caverna é a sua fauna, principalmente a microbiológica. Porém esta é a menos estudada e infelizmente a mais atingida pela intervenção humana nas cavernas.

### 1.1.2 Fungos nas cavernas

O primeiro registro relatando fungos cavernícolas foi realizado por Humboldt em 1794 (DOBAT, 1967), porém com o passar dos anos a nomenclatura sofreu alterações e hoje esses dados fornecem pouquíssimas informações úteis (*apud* HELD; SALOMON; BLANCHETTE, 2020; VANDERWOLF *et al.*, 2013; ZHANG, Z., *et al.*, 2017; ZHANG; ZHAO; CAI, 2018). Até 1980 os estudos em cavernas eram voltados principalmente à fauna e à patógenos, como *Histoplasma capsulatum* e *Trichophyton mentagrophytes* (ZHANG *et al.*, 2017; ZHANG; ZHAO; CAI, 2018). Estima-se que no ambiente cavernícola possa haver de 50.000 a 100.000 espécies de fungos (ZHANG; ZHAO; CAI, 2018).

Os fungos foram relatados em todos os nichos do ambiente cavernícola, como o ar, rocha, sedimentos, solo, água, guano, matéria orgânica e na biota presente na caverna (JURADO; SÁIZ-JIMÉNEZ, 2016; NOVÁKOVÁ, 2009; OGÓREK; LEJMAN; MATKOWSKI, 2013). Os fungos não se distribuem uniformemente dentro das cavernas, fatores como fluxo de água, umidade, oxigênio, luz, pH, disponibilidade de nutrientes, presença de metais, composição mineral e propriedades físicas da rocha, como a porosidade, podem influenciar o crescimento fúngico (BELYAGOUBI *et al.*, 2018; HELD; SALOMON; BLANCHETTE, 2020; NOVÁKOVÁ, 2009; PARK *et al.*, 2020; POPOVIĆ 2015; RAJI *et al.*, 2019; VANDERWOLF *et al.*, 2013). Geralmente são encontrados mais fungos nos solos e pisos das cavernas, possivelmente por ocorrer um maior acúmulo de carbono orgânico, que nas paredes e teto (BELYAGOUBI *et al.*, 2018; HELD; SALOMON; BLANCHETTE, 2020; VANDERWOLF *et al.*, 2013). A colonização de fungos nas cavernas pode ser visível a olho nu, principalmente em substratos orgânicos, onde podem apresentar um crescimento de hifas

longas ou formação de micélios, com diferentes cores (JURADO; SÁIZ-JIMÉNEZ, 2016). As correntes de ar que circulam nas cavernas, podem levar novos esporos fúngicos, bem como distribuir esporos dentro das cavidades, sendo um fator importante na determinação da origem dos fungos na caverna (VANDERWOLF *et al.*, 2013).

As cavernas possuem uma biota distinta, composta por fungos, bactérias, vírus, algas, protozoários, artrópodes e animais, como o morcego (OGÓREK; LEJMAN; MATKOWSKI, 2013; RAJI *et al.*, 2019). Os fungos são um dos grupos mais importantes encontrados nas cavernas (NOVÁKOVÁ, 2009; TAYLOR; STOIANOFF; FERREIRA, 2013), eles são capazes de formar associações com outros microrganismos (RAJI *et al.*, 2019), tendo assim um papel importante na alimentação da comunidade cavernícola (NOVÁKOVÁ, 2009; ZHANG, Z., *et al.*, 2017; ZHANG, Z., *et al.*, 2020), sendo a principal fonte de alimento para animais troglóbios não predador (VANDERWOLF *et al.*, 2013), estão envolvido na ciclagem de nutrientes (OGÓREK; LEJMAN; MATKOWSKI, 2013; TAYLOR; STOIANOFF; FERREIRA, 2013) e são capazes de controlar populações de alguns invertebrados (TAYLOR; STOIANOFF; FERREIRA, 2013).

A caverna é um ambiente estável, geralmente os recursos alimentares advêm do meio exterior, influenciando na composição da biota encontrada. Os fungos podem ser residentes na caverna ou habitar por um período (HELD; SALOMON; BLANCHETTE, 2020; RODRIGUES *et al.*, 2009). Os microrganismos residentes sobrevivem somente dos recursos encontrados na caverna, enquanto os oportunistas crescem somente enquanto ocorre a disponibilidade de nutrientes externos, que entram na caverna trazidos pelo ar, pela água, por animais e pelo homem (RODRIGUES *et al.*, 2009). A entrada da caverna é o local que mais recebe influências exteriores, geralmente o solo apresenta um maior teor de material orgânico, comparando ao solo do interior da caverna (HELD; SALOMON; BLANCHETTE, 2020; POPOVIĆ *et al.*, 2015). Nesses ambientes é encontrada maior diversidade de espécies, geralmente saprófitas, que podem ter sido levadas a caverna pelo vento ou por animais, e crescem no material orgânico presente (HELD; SALOMON; BLANCHETTE, 2020).

Os fungos encontrados nas cavernas podem ser decompositores ou parasitas (HELD; SALOMON; BLANCHETTE, 2020; POPOVIĆ *et al.*, 2015; VANDERWOLF *et al.*, 2013). Diversas espécies de fungos parasitas foram relatadas em invertebrados troglóbios (POPOVIĆ *et al.*, 2015; VANDERWOLF *et al.*, 2013). Em cavernas pouco profundas, onde as raízes das árvores conseguem penetrar já foram relatados fungos micorrízicos não identificados (VANDERWOLF *et al.*, 2013). Porém nem todos os fungos isolados da caverna, obrigatoriamente crescem no ambiente cavernícola, mas estão presentes por meio de esporos

trazidos do ambiente externo, alguns cientistas defendem a correlação entre fungos entomopatogênicos cavernícolas e artrópodes (OGÓREK; LEJMAN; MATKOWSKI, 2013; RODRIGUES *et al.*, 2009; VANDERWOLF *et al.*, 2013).

Os fungos decompositores decompõem todo o material orgânico e inorgânico presente na caverna. Espécies de fungos como *Fusarium* e *Cladosporium*, já foram isolados em insetos mortos na caverna, fauna, fezes e matéria orgânica estranha (RAJI *et al.*, 2019). As cavernas apresentam diferentes comunidades fúngicas devido à variação da composição das rochas ou solos onde elas ocorrem que pode possuir predominância na sua composição de carbonatos, silicatos, ferrosos, entre outros, (MARQUES *et al.*, 2019). Fungos já foram relatados em espeleotemas, contribuindo para a formação de estalactites e estalagmites, em filme de água sobre as rochas e nas rochas (JURADO; SÁIZ-JIMÉNEZ, 2016; RAJI *et al.*, 2019; RODRIGUES *et al.*, 2009; VANDERWOLF *et al.*, 2013), contribuindo para solubilização de nutrientes inorgânicos da rocha (JURADO; SÁIZ-JIMÉNEZ, 2016; RODRIGUES *et al.*, 2009; VANDERWOLF *et al.*, 2013). Os fungos ao crescer na superfície mineral causam a degradação biológica da rocha, separando fisicamente as partículas e por ação metabólitos secundários e ácidos orgânicos excretados. Os metabólitos provocam a alteração do pH do microambiente, podendo alterar a energia de íons na superfície da rocha. Durante o processo de dissolução da rocha, os fungos disponibilizam nutrientes e um espaço físico adequado para o crescimento de outros micróbios que habitam os minerais (HELD; SALOMON; BLANCHETTE, 2020; VAUGHAN; MAIER; PRYOR, 2011). O processo de crescimento dos fungos nas rochas as enfraquece facilitando a quebra, contribuindo para a expansão da caverna (RAJI *et al.*, 2019). Na caverna Altamira, Espanha, observou-se que os depósitos de calcita, e outros minerais como a hidromagnesita, óxidos de ferro e manganês e opala, que compõem estalactites, estalagmites e leite lunar tiveram origem biogênica, como distrito por Cañaveras *et al.* (2001) (*apud* JURADO; SÁIZ-JIMÉNEZ, 2016).

Os principais filos de fungos observados em cavernas foram: Ascomycota, Basidiomycota, Mucoromycotina, (VANDERWOLF *et al.*, 2013). Os autores relataram que a maioria dos observaram a ocorrência de *Histoplasma spp.* e *Geomyces destructans* causadoras de doenças de grande relevância. Outros gêneros e, ou espécies menos frequentes são: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Cladosporium*, *Alternaria*, *Paecilomyces*, *Acremonium*, *Chrysosporium*, *Laboulbenia*, *Rhizopus*, *Mortierella*, *Chaetomium*, *Rhachomyces*, *Trichophyton*, *Humicola*, *Isaria*, *Absidia*, *Beauveria*, *Phoma*, *Verticillium*, *Aureobasidium*, *Gliocladium*, *Coprinus*, *Cunninghamella*, *Epicoccum*, *Geotrichum*, *Microsporum*, *Botrytis*, *Candida*, *Mycena*, *Scopulariopsis* e *Stachybotrys*. As

principais espécies isoladas incluem *Aspergillus fumigates*, *A. versicolor*, *A. niger*, *A. ustus*, *A. flavus*, *Fusarium solani*, *Nocardia altamirensis*, *Geotrichum sp.*, *Penicillium chrysogenum*, *P. brevicompactum*, *P. simplicissimum*, *Mucor sp.*, *Fusarium solani*, *Mortierella sp.*, *Geomyces pannorum*, *Trichoderma viride*, *Beauveria bassiana*, *Cephalotrichum stemonitis*, *Cladosporium herbarum*, *Alternaria alternata*, *Aureobasidium pullulans*, *Paecilomyces lilacinus*, *Rhizopus stolonifer* e *Cladosporium cladosporioides* (VANDERWOLF *et al.*, 2013).

As frequências de espécies observadas nas cavernas também são influenciadas pelas metodologias de estudo, como meios altamente nutritivos e temperaturas superiores a 20°. A discrepância entre relatos de fungos pertencentes ao filo Ascomycota com o filo Basidiomycota, também pode ser explicada pelo fato de não haver compostos orgânicos nas cavernas e os métodos de identificação ser tendenciosos para o isolamento de Ascomycota, visto que os Basidiomycotas são de difícil cultivo. Outro fator relevante é o fácil reconhecimento do filo Mucoromycotina, devido ao rápido crescimento e grande produção de esporos, podendo ter tido sua taxa superestimado no ambiente cavernícola (VANDERWOLF *et al.*, 2013).

### 1.1.3 Estudos de fungos nas cavernas

É impossível comparar o ecossistema cavernícola com outros ecossistemas, as características únicas encontradas nas cavernas atuam como pressão de seleção sobre os microrganismos presentes (HELD; SALOMON; BLANCHETTE, 2020; LIMA; MORAIS, 2006; MARQUES *et al.*, 2015; VISAGIE *et al.*, 2020). Os fungos presentes no ambiente cavernícola que passam por essas pressões são propensos a desenvolver novos compostos ou rotas metabólicas de grande interesse para a ciência (HELD; SALOMON; BLANCHETTE, 2020; MARQUES *et al.*, 2015; RAJI *et al.*, 2019; RODRIGUES *et al.*, 2009).

Os primeiros estudos de fungos cavernícolas estavam relacionados a fungos patogênicos, como *Pseudogymnoascus destructans* e o *Histoplasma capsulatum*. O fungo *Pseudogymnoascus destructans* (= *Geomyces destructans*) é o responsável pela Síndrome do Nariz Branco. Quando os morcegos ao hibernarem nas cavernas, a resistência do seu sistema imunológico diminui facilitando o crescimento do fungo principalmente nos olhos e boca, levando a morte. Somente na América do Norte calcula-se a morte de aproximadamente seis milhões de morcegos norte-americanos, e um prejuízo anual de mais de US \$ 3 bilhões por ano, para as culturas agrícolas norte-americanas (JURADO, V., *et al.*, 2010; VANDERWOLF *et al.*, 2013; VISAGIE *et al.*, 2020). Já o fungo *Histoplasma capsulatum*, é o agente causador

da histoplasmose pulmonar, em humanos, afetando principalmente exploradores cavernícolas. A histoplasmose pode ser letal aos mamíferos, os esporos fúngicos são encontrados em maior frequência em cavernas onde ocorre alta concentração de morcegos, conseqüentemente uma alta concentração de guano, enriquecendo o solo de material orgânico (JURADO, V., *et al.*, 2010; VANDERWOLF *et al.*, 2013).

Mesmo com o aumento dos estudos o universo dos fungos presentes em cavernas ainda é pouco conhecido, considerando as características únicas das cavernas, esse ambiente é *hotspot* de biodiversidade, sendo uma grande fonte de novas espécies fúngicas e mesmo de espécies conhecidas com novas atividades metabólicas não apresentadas em outros ambientes (HELD; SALOMON; BLANCHETTE, 2020; MARQUES *et al.*, 2015; RODRIGUES *et al.*, 2009; VISAGIE *et al.*, 2020). Por exemplo, na caverna Lechuguilla, no Novo Mexico, foram descritas nove novas espécies dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, (CUNNINGHAM *et al.* 1995 *apud* ZHANG, Z., *et al.*, 2017), na Caverna Domica, na Eslováquia foram listadas 195 espécies que pertenciam a 73 gêneros (NOVÁKOVÁ, 2009). Na Caverna de Kartchner foi observado grande número de fungos associados aos espeleotemas das cavernas (VAUGHAN; MAIER; PRYOR, 2011). Em cavernas da China foram observadas mais de 50 novas espécies de fungos (ZHANG, Z., *et al.*, 2017, 2020). Mesmo com novos fungos cavernícolas descritos ainda não se confirmou a existência de fungos troglóbio obrigatório (VISAGIE *et al.*, 2020; ZHANG, Z., *et al.* 2017). Vinte e três isolados de *Penicillium* spp. da caverna Chaabe, na Argélia, apresentaram atividade antimicrobiana contra microrganismos patogênicos, destacando um percentual de inibição superior a 40% para *Candida albicans* (BELYAGOUBI *et al.*, 2018). Os compostos antimicrobianos são os metabolitos mais desejados que contribuíram para exploração do ambiente cavernícola, devido sua importância para as indústrias e para produção de fármacos (MARQUES *et al.*, 2015). Este estudo comprova a importância da preservação dos ambientes cavernícolas pouco estudados, devido ao seu potencial de descoberta de novos compostos antimicrobianos (BELYAGOUBI *et al.*, 2018; MARQUES *et al.*, 2015).

#### 1.1.4 O turismo e os impactos nas cavernas

O ambiente cavernícola é sensível a mudanças externas, que podem trazer inúmeras conseqüências a este ambiente (VANDERWOLF *et al.*, 2013). Atualmente um dos principais impactos causados a esse ambiente é o turismo. Desde os primórdios da humanidade as cavernas são utilizadas como abrigo, e hoje são ambientes extremamente ricos para historia, pelas incontáveis e únicas pinturas rupestres. Além desse fator, a própria

ornamentação de espeleotemas da caverna, é um patrimônio único, tanto que diversas cavernas estão incluídas no Patrimônio Mundial da UNESCO (FIGUEIREDO, 2010; JURADO, V., *et al.*, 2010; POPOVIĆ *et al.*, 2015).

O espeleoturismo tornou-se hoje uma grande atração e o interesse em praticar estão ligados a fatores, como presença de pinturas rupestres na caverna, belíssimas formações de espeleotemas, ou mesmo questões religiosas. No Brasil, a visitação das cavernas começou no século XVII com peregrinações religiosas (FIGUEIREDO, 2010). E somente após a década de 1980, que ocorreu o aumento com fins turísticos. Em Minas Gerais, destaca-se o Circuito das Grutas, projeto de espeleoturismo, implantado em 2006, para incentivar o turismo na região ao entorno dos municípios de Sete Lagoas, Lagoa Santa e Cordisburgo, região de rochas carbonáticas com aproximadamente 500 cavidades catalogadas, sendo a mais visitada a Lapa Nova de Maquiné.

O turismo é um dos maiores setores de geração de renda as comunidades, porém pode produzir impactos ao meio ambiente, principalmente ao ambiente cavernícola (JURADO; SÁIZ-JIMÉNEZ, 2016; LIMA; MORAIS, 2006). A abertura das cavernas ao turismo é uma fonte irreversível de danos ao ecossistema, à mudança brusca do microclima, favorece a deterioração de espeleotemas e pinturas rupestres presente na caverna (FIGUEIREDO, 2010; BASTIAN *et al.*, 2010; JURADO; SÁIZ-JIMÉNEZ, 2016; OGÓREK; LEJMAN; MATKOWSKI, 2014; RAJI *et al.*, 2019). A visitação provoca alteração da população microbiana, aumento da temperatura, da concentração de CO<sub>2</sub>, do vapor de água, compactação do solo, adição novas fontes de matéria orgânica na caverna, além da alteração da paisagem interna com construções (FIGUEIREDO, 2010; JURADO; SÁIZ-JIMÉNEZ, 2016; OGÓREK; LEJMAN; MATKOWSKI, 2013, 2014; RAJI *et al.*, 2019).

O grande fluxo de turistas entrando nas cavernas altera o microclima ambiente, favorece a importação de microrganismos do meio exterior e influência a distribuição dos mesmos ao transitar fazendo a suspensão de conídios presentes, causando a proliferação de espécies oportunistas, provocando a eliminação de espécies nativas e redução da biodiversidade (ABRIS *et al.*, 2020; TAYLOR; STOIANOFF; FERREIRA, 2013; VANDERWOLF *et al.*, 2013). Comparando uma caverna com alto índice de visitação e uma com baixa visitação, percebe-se alteração das espécies encontradas. Nas cavernas frequentemente visitadas foi observado maior número de fungos, porém com menor diversidade do que na caverna pouco visitada (VANDERWOLF *et al.*, 2013). Os fungos no ambiente cavernícola são controlados pela presença de nutrientes disponíveis, um novo

material orgânico nas cavernas é rapidamente colonizado por *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. e *Mucor* sp. (Min, 1988, *apud* VANDERWOLF *et al.*, 2013).

Outro impacto gerado pelo turismo as cavernas são as adaptações realizadas para melhor atendimento do público, que muitas vezes não respeitam o ambiente da caverna, causando severos impactos. Na caverna Altamira, Espanha, foram construídas paredes de concreto, galerias e corredores artificiais, que modificaram toda a estrutura original da caverna (JURADO; SÁIZ-JIMÉNEZ, 2016). Já na caverna Glowworm, na Nova Zelândia, foi colocada uma porta na entrada da caverna, provocando uma alteração da atmosfera subterrânea (LOBO, 2012). O fechamento artificial da caverna pode provocar um aumento ou a diminuição da condensação nas paredes da caverna, influenciando os processos de deposição mineral e evaporação da caverna (LOBO, 2012).

O sistema de iluminação artificial das cavernas causa impactos na comunidade fúngica, além de alterar a luz presente, também provoca aumento da temperatura e redução da umidade relativa (LOBO *et al.*, 2015; VANDERWOLF *et al.*, 2013). Outro problema gerado pelo tipo de iluminação é o risco aos turistas. No Brasil, o uso de reatores de carbureto, são os mais comuns nas cavernas. Apresentam baixo custo e uma boa iluminação. Porém apresentam riscos a saúde humana, como possibilidade de queimaduras, caso ocorra uma combustão acidental, e produção de acetileno, que provoca dores de cabeça, enjoos, vômito, perda da coordenação motora, entre outros (LOBO *et al.*, 2015).

A colonização de espeleotemas por fungos geralmente é um aspecto ignorado, nos manejos de cavernas onde é realizado o espeleoturismo (JURADO; SÁIZ-JIMÉNEZ, 2016). A pressão pelo desenvolvimento turístico e algumas vezes incentivos governamentais andam na contramão da preservação das cavernas (JURADO; SÁIZ-JIMÉNEZ, 2016). Os maiores exemplos dos impactos causados pelo turismo podem ser vistos nas cavernas de Lascaux na França e na Caverna Altamira, na Espanha (BELYAGOUBI *et al.*, 2018; JURADO; SÁIZ-JIMÉNEZ, 2016). Essas cavernas possuem um grande acervo de pinturas rupestres e receberam uma grande visitação que impactaram grandemente no ecossistema. Na caverna Altamira, na Espanha, uma invasão de bactérias ameaça toda a arte rupestre presente (JURADO; SÁIZ-JIMÉNEZ, 2016). Na caverna de Lascaux, na França, já ocorreram diversos surtos microbiológicos que colocaram o acervo da caverna em risco de extinção. A caverna foi descoberta em 1940, e chegou a receber mais de cem mil visitantes por ano na década de 1960. A coleção de pinturas de arte rupestre da caverna é considerada um dos melhores exemplares existentes. Durante os anos de 1947 a 1958, a caverna passou por adaptações para receber o público, isso aliado ao grande fluxo de visitantes e a falta de conhecimento

científico para preservação, provocou uma grande alteração do microclima impactando fortemente todo o ecossistema. O grande impacto gerado na caverna pela iluminação artificial, em 1963, foi responsável pelo crescimento biofilme verde nas pinturas rupestres, gerado pela invasão da alga *Bracteacoccus minor*. Em 2001 ocorreu na caverna um surto de *Fusarium solani*, e a última ameaça registada é o crescimento de manchas negras produzidas pelo fungo *Ochroconis lascauxensis* (BASTIAN *et al.*, 2010; MARTIN-SANCHEZ *et al.*, 2014;). Esses exemplos mostram que são necessários estudos e conhecimentos sobre os microrganismos presentes e sua distribuição na caverna, para assim estabelecer medidas e políticas de conservação e prevenção de invasões microbianas (JURADO; SÁIZ-JIMÉNEZ, 2016).

Além dos impactos causados pelo turismo a caverna, é importante ressaltar que o ambiente cavernícola pode trazer também consequências à saúde dos visitantes. Cavernas com alta visitação ou densamente povoadas por animais são grandes reservatórios de fungos e outros microrganismos patogênicos, como tem sido relatado na literatura (JURADO, V., *et al.*, 2010). Ainda é difícil a associação de uma única visita a cavernas com doenças, porém é necessário o conhecimento de tais organismos presentes nestes ambientes e a informação destes ao visitante (JURADO, V., *et al.*, 2010). Um visitante com o sistema imunológico baixo é mais propenso a desenvolver alguma doença advinda de um microrganismo oportunista (JURADO, V., *et al.*, 2010).

O número de estudos sobre microrganismos cavernícolas está em crescente aumento, a maioria destes foram realizados na Europa e no EUA (BASTIAN *et al.*, 2010; VANDERWOLF *et al.*, 2013), e se limitavam a aspectos como taxonomia, efeitos de microrganismos ou colonização por fungos em pinturas rupestres (BASTIAN *et al.*, 2010). Os microrganismos presentes nestes ambientes apresentam uma grande importância, e a carência de estudos em regiões tropicais e subtropicais, representa um grande risco de perda de espécies que ainda nem foram descobertas (SILVA; MALTA, 2016). O conhecimento dos microrganismos presentes nas cavernas pode ser um excelente indicador para o acompanhamento de impactos gerados ao ambiente e para medidas de conservação (MULEC; OARGA-MULEC, 2016).

#### 1.1.5 Medidas de proteção às cavernas

Buscando preservar estes ecossistemas é possível encontrar em todo mundo leis que protegem esses ambientes (JURADO; SÁIZ-JIMÉNEZ, 2016). A UNESCO, já relatou diversas cavernas como Patrimônio Natural da Humanidade (BARROS; TURATTI, 2017;

POPOVIĆ *et al.*, 2015). Nas Filipinas existe a Lei da República 9072 - Lei Nacional de Gestão e Proteção de Cavernas e Recursos de Cavernas, que formulou um programa de gestão para conservação das cavernas, visando proteger esses ambientes dos problemas socioeconômicos e políticos do país (ABRIS *et al.*, 2020). Na Groenlândia a lei “*The Nature Conservation Act*” Nº. 44, de 22 de março de 1999, garante a proteção das cavidades naturais e áreas adjacentes (SANGUINETTO; DANIEL; FERREIRA, 2018). Já Decisão Nº 451 de 16 de setembro de 1993, do Conselho de Ministros da Albânia, proíbe qualquer forma de degradação a cavernas. E Nos EUA a *Federal Cave Resources Protection Act* of 1988, garante a proteção das cavernas, define os critérios de relevância e determina que danificar as cavernas pode levar desde penalidades civis a prisão (SANGUINETTO; DANIEL; FERREIRA, 2018).

No Brasil, a Constituição Federal do Brasil de 1988 determina no seu artigo 20 que as cavidades naturais são bens da União e estabelece no artigo 225 que o poder público deve preservar o meio ambiente e garantir que este seja ecologicamente equilibrado para o uso de toda população e preservado para as gerações futuras (BRASIL, 1988; CAVALCANTI, 2017; FIGUEIREDO, 2010; SANGUINETTO; DANIEL; FERREIRA, 2018; SANTOS *et al.*, 2018; VIDRIH FERREIRA, 2017). Em 1997 foi criado o Centro Nacional de Estudos, Proteção e Manejo de Cavernas (CECAV), como medida de política pública para preservação destes ambientes, principalmente visando o manejo turístico (CAVALCANTI, 2017; FIGUEIREDO, 2010).

E em 2008 foi publicado o Decreto 6640, onde reafirma a proteção das cavidades naturais brasileiras, assegurando o direito de realização de pesquisas científicas e de atividades étnico-culturais e recreativas. O Decreto estabelece também a proteção de todas as áreas que compõem e influenciam o ambiente cavernícola, visando manter o equilíbrio e a integridade das cavernas (BRASIL, 2008; SANGUINETTO; DANIEL; FERREIRA, 2018). Porém com a publicação do Decreto 6640 de 2008, a legislação brasileira de proteção das cavernas sofreu grandes retrocessos por classificar as cavidades naturais em grau de importância, permitindo assim medidas menos restritivas que culminam na destruição de parte do patrimônio espeleológico, na grande maioria ainda desconhecida do ponto de vista microbiológico (CAVALCANTI, 2017; FIGUEIREDO, 2010; OLIVEIRA; OLIVITO; RODRIGUES-SILVA, 2011; SANGUINETTO; DANIEL; FERREIRA, 2018, SANTOS *et al.*, 2018; TAYLOR; STOIANOFF; FERREIRA, 2013; VIDRIH FERREIRA, 2017). Os atributos biológicos, ecológicos, físicos, geológicos, hidrológicos, paleontológicos, cênicos, socioeconômicos e histórico-culturais das cavernas são levados em consideração para a

classificação das cavernas em graus de máxima, alta, média ou baixa relevância. (BRASIL, 2008; OLIVEIRA; OLIVITO; RODRIGUES-SILVA, 2011; SANGUINETTO; DANIEL; FERREIRA *et al.*, 2018; SANTOS *et al.*, 2018; VIDRIH FERREIRA, 2017). Essa classificação passa a permitir que cavernas e toda sua área de influência, não classificadas em grau de máxima relevância possam sofrer danos irreparáveis ou até mesmo serem destruídas, por atividades como o turismo e a mineração, que geraram grandes impactos na ecologia e fauna cavernícola pouco estudada ao nível microbiológico (FIGUEIREDO, 2010; OLIVEIRA; OLIVITO; RODRIGUES-SILVA, 2011; SANTOS *et al.*, 2018; TAYLOR; STOIANOFF; FERREIRA, 2013). Para o uso dessas áreas é possível pedir um licenciamento ambiental e este definirá a necessidade de preservação, bem como o nível de compensação para o impacto ambiental gerado (BRASIL, 2008; CAVALCANTI, 2017; SANGUINETTO; DANIEL; FERREIRA *et al.*, 2018; SANTOS *et al.*, 2018).

Para proteger adequadamente as cavernas faz-se necessário proteger também a superfície que a cerca (ABRIS *et al.*, 2020). A floresta nativa é uns principais pontos a serem preservados, pois sua ausência influencia o ecossistema da caverna. Outro ponto apresentado é o monitoramento de áreas de atividades agrícolas e mineração, próximo a esses ambientes, visando à solução de potenciais problemas. As duras críticas ao Decreto 6640 de 2008 levou a publicação da Portaria 358/2009 do Ministério do Meio Ambiente, criando o Programa Nacional de Conservação do Patrimônio Espeleológico. Este programa passou a exigir a criação de planos de manejos e uso sustentável das cavernas para o turismo, contendo principalmente um inventário microbiológico de fungos patogênicos, com destaque para o fungo *Histoplasma capsulatum*, causador da histoplasmose. Outro ponto relevante do programa é a destinação dos recursos advindos de compensação ambiental de obras que geram impactos espeleológico a projetos com temática espeleológica (CAVALCANTI, 2017; MMA, 2009; SANTOS *et al.*, 2018; TAYLOR; STOIANOFF; FERREIRA, 2013).

#### 1.1.6 Projeto de estudo

Com a Portaria 358/2009 do Ministério do Meio Ambiente, recursos de obras de impactos espeleológicos começaram a ser investidos em trabalhos da área espeleológica visando à preservação ambiental do ambiente cavernícola. Com estes recursos nasceu o Núcleo de Estudos em Espeleologia da Serra do Espinhaço na Universidade Federal dos Vales Jequitinhonha e Mucuri – UFVJM, com o objetivo de estudar cavernas da região da Serra do Espinhaço Meridional de Minas Gerais. Após trabalhos iniciais desenvolvidos por Neves *et al.*, 2017, em cavernas da região de Diamantina, foi constatado nos espeleotemas atividade

microbiana. Essa descoberta levantou-se a hipótese que microrganismos estariam diretamente ligados à formação de espeleotemas nas cavernas da região.

Com o intuito de aprofundamento dos estudos foi realizada uma parceria com a Universidade Federal de Viçosa - UFV, formando um grupo multidisciplinar, voltado ao estudo das cavernas nas proximidades do município de Diamantina situadas na Serra do Espinhaço Meridional. Atualmente o grupo de pesquisa é composto pelos membros: Prof<sup>a</sup>. Soraya de Carvalho Neves, Prof. Lucio Mauro Soares Fraga, Prof. Paulo Henrique Graziotti da UFVJM, Prof<sup>a</sup>. Maria Catarina Megumi Kasuya e Prof. Olinto Liparini Pereira da UFV, pelos pós-doutores: Meiriele da Silva e André Wilson Campos Rosado, pelo doutorando Tiago Conde – UFV, pelo mestre Yan Lucas Gomes Dutra – UFV e pela mestranda Ana Flávia Leão – UFVJM.

### *1.1.7 Serra do Espinhaço*

O patrimônio espeleológico de Minas Gerais é incomparável com a presença de rochas carbonáticas, siliciclásticas e ferríferas (NEVES *et al.*, 2017; TIMO; ROMANO; TIMO, 2015). O estado de Minas Gerais possui mais de sete mil cavidades naturais registradas, sendo o estado brasileiro com maior número de cavernas (CECAV, 2018). Porém este rico patrimônio ainda é pouco explorado e estudado. O estado abriga uma das principais formações geológicas do Brasil, a Serra do Espinhaço.

A Serra do Espinhaço é um cinturão de deformação e cavalgamento, formado por rochas metassedimentares e metavulcânicas de idade mesoproterozóicas (NEVES *et al.*, 2017; TEIXEIRA-SILVA *et al.*, 2005). A Serra ocupa uma área de mais de três milhões de hectares, comportando-se como um grande divisor de águas, entre as bacias do Brasil central e a bacia do Rio São Francisco (BAGGIO; SOUZA; TRINDADE, 2012; VASCONCELOS; RODET, 2019). A Serra do Espinhaço é dividida em Serra do Espinhaço setentrional e meridional, sendo esta última onde este estudo ocorreu (BAGGIO; SOUZA; TRINDADE, 2012; TIMO; ROMANO, 2015; VASCONCELOS; RODET, 2019).

A Serra do Espinhaço Meridional possui aproximadamente 300 km, inicia-se na Serra do Cipó, próximo a Belo Horizonte e estende-se até a cidade de Couto Magalhães – MG. Apresenta como principal característica geológica a predominância de quartizitos, que confere uma cobertura rígida e densa, porém fraturada e cisalhada (BAGGIO; SOUZA; TRINDADE, 2012; TIMO; ROMANO; TIMO, *et al.*, 2015; VASCONCELOS; RODET, 2019). Esta característica também serve para a classificação de pseudo-cárste das formações crásticas, justamente por não ocorrer à predominância de rochas carbonáticas

(VASCONCELOS; RODET, 2019). O relevo resultante da dissecação fluvial é marcado por cristas, escarpas e vales profundos relacionados com as direções tectônicas estruturais (BAGGIO; SOUZA; TRINDADE, 2012; VASCONCELOS; RODET, 2019).

A Serra do Espinhaço Meridional apresenta características únicas que a transforma em uma região extremamente rica e diversificada, abrigando um dos maiores campos rupestres do Brasil, possui fauna e flora endêmicas. A altitude da Serra gira em torno de 1200 m, chegando a mais de dois mil metros no Pico do Itambé. O cráste da Serra do Espinhaço Meridional ainda é pouco explorado e estudado, pesquisas recentes revelam inúmeras cavidades naturais, com diversas formações rochosas, ricas em espeleotemas, ainda totalmente desconhecidas biologicamente, evidenciando a necessidade de preservação do ambiente e de novos estudos. A caverna Velha Nova, objeto deste estudo, esta localizada no município de Monjolos.

## 1.2 CONCLUSÃO

Os fungos possuem capacidade única de adaptação a ambientes extremos e uma importância inegável para o ambiente e a humanidade. A maioria dos estudos revisados foi realizada em cavernas em regiões de clima temperado, deixando uma lacuna enorme para a diversidade presente em cavernas de clima tropical. Os estudos apresentem uma grande variedade de amostras coletas nas cavernas, porém muitas vezes não ocorre uma descrição detalhada destas, fragmentos rochosos que tiveram contato com o solo da caverna pode abrigar fungos que somente cresceram pela presença de material orgânico do solo. Uma amostra de espeleotema pode apresentar uma composição mineral diferente da rocha da caverna influenciando a microbiota presente. Um melhor detalhamento das amostras, explicando a origem dentro da caverna colaboraria para a melhor compreensão da dispersão dos fungos dentro da caverna.

Os fungos possuem um grande papel na ecologia das cavernas, atuam como decompositores da rocha da caverna, parasita e alimento para outras espécies que vivem nas cavernas. Muitos estudos focam na identificação de fungos de caverna patógenos, ainda assim demonstram que nas cavernas existe grande diversidade de fungos ainda desconhecida. Essas novas espécies fúngicas apresentam potencial desconhecido para uso biotecnológico, pois devido às características das cavernas esses microrganismos possuem adaptação no seu metabolismo.

O mundo microbiano cavernícola, principalmente o tropical, apresenta um grande campo para pesquisa e grandes descobertas, as pesquisas devem explorar todos os aspectos possíveis da caverna, desde a serapilheira, ar, água, rocha, espeleotemas, solo, fezes de animais e raízes de plantas que adentram a caverna, quanto mais aspectos da caverna forem estudados a terá uma melhor compreensão da entrada e distribuição desses organismos no ambiente.

## REFERÊNCIAS

- ABREU, J. A. S.; ROVIDA, A. F. S.; PAMPHILE, J. A.. Fungos de interesse: aplicações biotecnológicas. **Revista UNINGÁ**. v. 21, n.1, p.55-59, jan – mar. 2015.
- ABRIS, M. I.; PALANCA, M. S.; DE LEON, M. P.; BANAAAY, C. G. B.. Microbial Air and Water Quality Assessment of a Freshwater Limestone Cave in the Philippines and Its Implications for Ecotourism Management. **Journal of Nature Studies**. v.19, n. 1, p. 33-48, 2020.
- BAGGIO, H.; SOUZA, F. C. R.; TRINDADE, W. M.. Morfologia Cárstica do Maciço Quartzítico da Gruta do Salitre, Diamantina – MG. **Revista Vozes dos Vales: Publicações Acadêmicas** Reg.: 120.2.095–2011 – PROEXC/UFVJM Nº 01 – Ano I – 05/2012  
www.ufvjm.edu.br/vozes
- BARROS, A. A.; TURATTI, L.. A proteção do patrimônio, segundo a ONU, a UNESCO e a Constituição Federal Brasileira. **Revista Estudo & Debate**. Lajeado, v. 24, n. 1, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.22410/issn.1983-036X.v24i1a2017.1246>
- BASTIAN, F.; ALABOUVETTE, C.; SAIZ-JIMENEZ, C.. The impact of arthropods on fungal community structure in Lascaux Cave. **Journal of Applied Microbiology**. v.106, p. 1456–1462, 2009.
- BASTIAN, F.; JURADO, V.; NOVAKOVA, A.; ALABOUVETTE, C.; SAIZ-JIMENEZ, C.. The microbiology of Lascaux Cave. **Microbiology**. v.156, p. 644–652, 2010. DOI 10.1099/mic.0.036160-0
- BELYAGOUBI, L.; BELYAGOUBI-BENHAMMOU, N.; JURADO, V.; DUPONT, J.; LACOSTE, S.; DJEBBAH, F.; OUNADJELA, F. Z.; BENAÏSSA, S.; HABI, S.; ABDELOUAHID, D. E.; SAIZ-JIMENEZ, C.. Antimicrobial activities of culturable microorganisms (actinomycetes and fungi) isolated from Chaabe Cave, Algeria. **International Journal of Speleology**. Tampa, FL (USA), v. 47, n. 2, p. 189-199, mai. 2018.
- BOURDICHON, F.; CASAREGOLA, S.; FARROKH, C.; FRISVAD, J. C.; GERDS, M. L.; HAMMES, W. P.; HARNETT, J.; HUYS, G.; LAULUND, S.; OUWEHAND, A.; POWELL, I. B.; PRAJAPATI, J. B.; SETO, Y.; SCHURE, E. T.; BOVEN, A. V.; VANKERCKHOVEN, V.; ZGODA, A.; TUIJTELAARS, S.; HANSEN, E. B.. Food fermentations: Microorganisms with technological beneficial use. **International Journal of Food Microbiology**. v.154, p. 87–97, dez. 2012.
- BRASIL. Constituição (1988). Constituição da República Federativa do Brasil. Disponível em: < [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/constituicao/constituicao.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/constituicao/constituicao.htm)>. Acesso em: 15 de junho de 2020.
- BRASIL. DECRETO Nº 6.640, DE 7 DE NOVEMBRO DE 2008.. Disponível em: < [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_Ato2007-2010/2008/Decreto/D6640.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2007-2010/2008/Decreto/D6640.htm)>. Acesso em: 15 de junho de 2020.
- CAÑAVERAS, J.C.; SÁNCHEZ–MORAL, S.; SOLER, V. Y; SÁIZ-JIMÉNEZ, C.. Microorganisms and microbially induced fabrics in cave walls. **Geomicrobiology Journal**, v.

18, p. 223-240, 2001. *apud* JURADO, V; SÁIZ-JIMÉNEZ, C. 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**. v. 24, n. 1, p. 51-60, 2016.

CAVALCANTI, L. F.. Dados secundários de espécies classificadas como troglóbias e troglomórficas para o projeto áreas prioritárias para a conservação do patrimônio espeleológico brasileiro. In: RASTEIRO, M.A.; TEIXEIRA-SILVA, C.M.; LACERDA, S.G. (orgs.) CONGRESSO BRASILEIRO DE ESPELEOLOGIA, 34, 2017. Ouro Preto. **Anais...** Campinas: SBE, p.43-66, 2017.

CENTRO NACIONAL DE PESQUISA E CONSERVAÇÃO DE CAVERNAS/ INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE. Banco de dados. Brasília: CECAV. Disponível em: <[http://www.icmbio.gov.br/cecav/images/stories/downloads/Anuario/CECAV\\_-\\_Anuario\\_estatistico\\_espeleol%C3%B3gico\\_2018.pdf](http://www.icmbio.gov.br/cecav/images/stories/downloads/Anuario/CECAV_-_Anuario_estatistico_espeleol%C3%B3gico_2018.pdf)> Acesso em: 08 mai. 2019

COSTA, L. S.; GRAZZIOTTI, P. H.; SILVA, A. C.; FONSECA, A. J.; GOMES, Â. L. F.; GRAZZIOTTI, D. C. F. S.; ROSSI, M. J.; Alginate Gel Entrapped Ectomycorrhizal Inoculum Promoted Growth Of Eucalyptus Clones Cutting Under Nursery Conditions. **Canadian Journal of Forest**. v. 4, n. 8, mar. 2019. doi:10.1139/cjfr-2018-0129

CUNNINGHAM, K. I.; NORTHUP D. E.; POLLASTRO, R. M.; *et al.* Bacteria, fungi and bioKarst in Lechuguilla Cave, Carlsbad Caverns National Park, New Mexico. **Environmental Geology**. v. 25, p. 2–8, 1995. *apud* ZHANG, Z. F.; LIU, F.; ZHOU, X.; LIU, X. Z.; LIU, S. J.; CAI, L.. Culturable mycobiota from Karst caves in China, with descriptions of 20 new species. **Persoonia**. v. 39, p.1–31, 2017. <https://doi.org/10.3767/persoonia.2017.39.01>

DOBAT, K. Ein bisher unveroffentlichtes botanisches manuscript Alexander von Humboldts: Plantae subterranae Europ (1794) cum Iconibus. **Akademie Der Wissenschaften und der Literatur**. v.6 p. 16–19, 1967. *apud* HELD, B. W.; SALOMON, C. E.; BLANCHETTE, R. A.. Diverse subterranean fungi of an underground iron ore mine. **Plos One**. v.15, n. 6, 2020. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0234208>.

DUFOSSÉ, L.. Red colourants from filamentous fungi: Are they ready for the food industry? **Journal of Food Composition and Analysis**. v. 69, p. 156-161, jun. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2017.11.002>

FARIA, A. B. C.; MONTEIRO, P. H. R.; AUER, C. G.; ÂNGELO, A. C.. Uso De Ectomicorrizas na Biorremediação Florestal. **Ciência Florestal**. Santa Maria, v. 27, n. 1, p. 21-29, jan.-mar., 2017.

FIGUEIREDO, L. A. V.. A invenção do fenômeno espeleoturístico: Considerações internacionais e suas influências no turismo em cavernas brasileiras. **Anais...VI Seminário Latino-Americano de Geografia Física. II Seminário Ibero-Americano de Geografia Física** Universidade de Coimbra. mai. 2010.

GOVARTHANANA, M.; MYTHILIB, R.; SELVANKUMARB, T.; KAMALA-KANNANC, S.; KIMA, H.. Myco-phytoremediation of arsenic- and lead-contaminated soils by *Helianthus*

annuus and wood rot fungi, *Trichoderma* sp. isolated from decayed wood. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 151, p. 279–284, 2018.

GUERRA JUNIOR, A. A.; ACÚRCIO, F. A.; ANDRADE, E. I. G.; CHERCHIGLIA, M. L.; CESAR, C. C.; QUEIROZ, O. V.; SILVA, G. D.. Ciclosporina versus tacrolimus no transplante renal no Brasil: uma comparação de custos. **Cadernos de Saúde Pública**. Rio de Janeiro, v. 26, n. 1, jan. 2010. <https://doi.org/10.1590/S0102-311X2010000100017>

HELD, B. W.; SALOMON, C. E.; BLANCHETTE, R. A.. Diverse subterranean fungi of an underground iron ore mine. **Plos One**. v.15, n. 6, 2020. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0234208>

JURADO, V.; LAIZ, L.; RODRIGUEZ-NAVA, V.; BOIRON, P.; HERMOSIN, B.; SANCHEZ-MORAL, S., SAIZ-JIMENEZ, C.. Pathogenic and opportunistic microorganisms in caves. **International Journal of Speleology**. Bologna (Italy), v. 39, n. 1, p. 15-24, jan. 2010.

JURADO, V.; SÁIZ-JIMÉNEZ, C. 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**. v. 24, n. 1, p. 51-60, 2016.

LARA, R. O.; SILVA, M. A. P.; OLIVEIRA, P. A.; PEREIRA, I. M.; GRAZZIOTTI, P. H.. Growth of *Kielmeyera rubriflora* inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi on iron mining substrates. **FLORESTA**. Curitiba, PR, v. 50, n. 1, p. 915 - 922, jan-mar 2020. DOI: 10.5380/ufv.v50 i1. 58894

LIMA, T. F.; MORAIS, M. S.. Contribuições para o desenvolvimento de plano de manejo em ambiente cavernícola - Gruta do Maquiné: um estudo de caso. **Geonomos**. v. 14, n. 1-2, p. 45 -53, 2006.

LOBO, H. A. S.. Espeleoclima e suas aplicações no manejo do turismo em cavernas. **Revista do Departamento de Geografia**. São Paulo, v. 23, p. 27-54, 2012.

LOBO, H. A. S.; BOGGIANI, P. C.; SAYEG, I. J.; PERINOTTO, J. A. J.. Impactos ambientais em espeleotemas causados pela visitação pública com carbureteiras na Caverna Santana (Parque Estadual Turístico do Alto Ribeira, Iporanga-SP). **Geociências**. São Paulo, v. 34, n. 1, p.103-115, 2015.

MADIGAN, M.; MARTINKO, J.; BENDER, K.; BUCKLEY, D.; STAHL, D. *Microbiologia de Brock*. 14. ed. – Porto Alegre: Artmed, 2016.

MARQUES, E. L. S.; CORREIA, D. C.; OLIVEIRA, R. B. F.; SILVA, K. B.; DIAS, J. C. T.; PIROVANI, C. P.; REZENDE, R. P.. Potencial biotecnológico de microrganismos isolados de cavernas de Paripiranga, Bahia. In: RASTEIRO, M.A.; SALLUN FILHO, W. (orgs.) CONGRESSO BRASILEIRO DE ESPELEOLOGIA, 33, 2015. Eldorado. **Anais...** Campinas: SBE, p.161-168. 2015.

MARQUES, E. L. S.; DIAS, J. C. T.; GROSS, E.; CERQUEIRA E SILVA, A. B.; MOURA, S. R.; REZENDE, R. P.. Purple Sulfur Bacteria Dominate Microbial Community in Brazilian

Limestone Cave. **Microorganisms**. v. 7, n. 29, jan. 2019.  
doi:10.3390/microorganisms7020029

MARTIN-SANCHEZ, P. M.; JURADO, V.; PORCA, E.; BASTIAN, F.; LACANETTE, D.; ALABOUVETTE, C.; SAIZ-JIMENEZ, C.. Airborne microorganisms in Lascaux Cave (France). **International Journal of Speleology**. Tampa, FL (USA), v. 43, n. 3, p. 295-303, set. 2014.

MIN, K. H. Fungus flora of Seongrya Cave in Korea. **Transactions of the Mycological Society of Japan**. v. 29, p. 479-487, 1988. *apud* VANDERWOLF, K. J.; MALLOCH, D.; MCALPINE, D. F.; FORBES, G. J.. A world review of fungi, yeasts, and slime molds in caves. **International Journal of Speleology**. Tampa, FL (USA), v. 42, n. 1, p. 77-96, jan. 2013.

MINISTERIO DO MEIO AMBIENTE. PORTARIA n° 358, DE 30 DE SETEMBRO 2009. Disponível em: < [https://www.icmbio.gov.br/cecav/images/download/Portaria\\_358\\_2009-MMA\\_PNCPE.pdf](https://www.icmbio.gov.br/cecav/images/download/Portaria_358_2009-MMA_PNCPE.pdf) >. Acesso em: 15 de junho 2020.

MONÇÃO, F. P.; RIGUEIRA, J. P. S.; SALES, E. C. J.; LEAL, D. B.; SILVA, J. T.; LEITE, G. D. O.; CHAMONE, J. M. A.. Utilização de fungos em forrageiras e na alimentação e ruminantes – Revisão. **Science and Animal Health**. v. 6, n. 2, p. 173-187, Mai.-Ago. 2018.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O.. Microbiologia e Bioquímica do Solo. Editora UFLA, Lavras, 2006. 2 ed.

MOREIRA, S. D.; FRANÇA, A. C.; GRAZZIOTTI, P. H.; LEAL, F. D. S.; SILVA, E. B.. Arbuscular mycorrhizal fungi and phosphorus doses on coffee growth under a non-sterile soil. **Rev. Caatinga**. Mossoró, v. 32, n. 1, p. 72 – 80, jan. – mar., 2019.  
<http://dx.doi.org/10.1590/1983-21252019v32n108rc>

MULEC, J.; OARGA-MULEC, A.. ATP luminescence assay as a bioburden estimator of biomass accumulation in caves. **International Journal of Speleology**. Tampa, FL (USA), v. 45, n. 3, p. 207-218, set. 2016.

NEVES, S. C.; FRAGA, L. M. S.; SILVA, A. C.; GRAZZIOTTI, P. H.; RODRIGUES, F. P.; SANTIAGO NEVES, C. M. Estudo preliminar sobre as interações geomicrobiológicas em cavidades quartzíticas na Serra do Espinhaço Meridional. 34 CONGRESSO BRASILEIRO DE ESPELEOLOGIA, **Anais...** p.367-373, 2017.

NOVÁKOVÁ, A.. Microscopic fungi isolated from the Domica Cave system (Slovak Karst National Park, Slovakia). A review. **International Journal of Speleology**. Bologna (Italy), v. 38, n. 1, p. 71-82, jan. 2009.

OGÓREK, R.; LEJMAN, A.; MATKOWSKI, K.. Fungi isolated from Niedźwiedzia Cave in Kletno (Lower Silesia, Poland). **International Journal of Speleology**. Tampa, FL (EUA), v. 42, n. 2, p. 161-166, 2013. <http://dx.doi.org/10.5038/1827-806X.42.2.9>

OGÓREK, R.; LEJMAN, A.; MATKOWSKI, K.. Influence of the External Environment on Airborne Fungi Isolated from a Cave. **Pol. J. Environ. Stud**. v. 23, n. 2, p. 435-440, 2014.

OLIVEIRA, O. A. B.; OLIVITO, J. P. R.; RODRIGUES-SILVA, D.. Caracterização da unidade espeleológica e das unidades geomorfológicas da Região do Quadrilátero Ferrífero – MG. **EspeleoTema**. Campinas, SP, v.22, n.1, 2011.

PARK, S.; CHO, Y. J.; JUNG, D.; JO, K.; LEE, E. J.; LEE, J. S.. Microbial Diversity in Moonmilk of Baeg-nyong Cave, Korean CZO. **Front. Microbiol.** v.11, n. 613, 2020. doi: 10.3389/fmicb.2020.00613

POPOVIĆ, S.; SIMIĆ, G. S.; STUPAR, M.; UNKOVIĆ, N.; PREDOJEVIĆ, D.; JOVANOVIĆ, J.; GRBIĆ, M. L.. Cyanobacteria, algae and microfungi present in biofilm from Božana Cave (Serbia). **International Journal of Speleology**. Tampa, FL (USA), v. 44, n. 2, p. 141-149, mai. 2015.

RAJI, R. O.; OYEWOLE, O. A.; IBRAHIM, O. H.; TIJANI, Y. N.; GANAÇÃO, M.. Microbial communities and activities in caves. **Brazilian Journal of Biological Sciences**. v. 6, n. 14, p. 557-564, 2019. doi.org/10.21472/bjbs.061407

RODRIGUES, A. A.; CARRIM, A. J. I.; SADOYMA, G.; VIEIRA, J. D. G.. Potencialidades biotecnológicas de *Bacillus cereus* isolado em uma caverna. **ANAIS do XXX Congresso Brasileiro de Espeleologia**. Montes Claros, MG, jul. 2009.

SANGUINETTO, E.; DANIEL, G. O.; FERREIRA, M. D.. Inclusão de áreas de proteção em feições cársticas e inovação minerária no município de Pains, MG. **Caderno Prudentino de Geografia**. Presidente Prudente, n. 40, v. 1, p. 68-92, Jan./Jun. 2018.

SANTOS, A. C.; SANTOS, W. H.; BORGES, M. S.; SANTOS, O.; PAIXÃO, R.; FREIFELD, F.. O Turismo Espeleológico na Amazônia como Garantia do Desenvolvimento Sustentável: Uma Análise das Cavernas Areníticas do Município de Presidente Figueiredo. **Anuário do Instituto de Geociências – UFRJ**. v. 41, n. 3, p. 260-269, 2018.

SILVA, C. J. A.; MALTA, D. J. N.. A Importância dos Fungos da Biotecnologia. **Ciências biológicas e da saúde**. Recife, v. 2, n. 3, p. 49-66, jul. 2016.

TAYLOR, E. L. S.; STOIANOFF, M. A. R.; FERREIRA, R. L. Mycological study for a management plan of a neotropical show cave (Brazil). **International Journal of Speleology**. Tampa, FL (USA), v. 42, n. 3, p. 267-277, Set. 2013.

TEIXEIRA-SILVA, C. M.; FALEIROS-SANTOS, T.; ROBERTO, G. G.; VIEIRA, F. F.; MORAIS, F.; OLIVEIRA, G. P. C.; ONOFRE-OLIVEIRA, S.; FERREIRA, A. S.; MATTEO, D. E. G.. Espeleologia na área cárstica de Monjolos, MG. **Anais do 28º Congresso Brasileiro de Espeleologia**. SBE. Campinas, SP. Jun. 2005.

THIRKELL, T. J.; CHARTERS, M. D.; ELLIOTT, A. J.; SAIT, S. M.; FIELD, K. J.. Are mycorrhizal fungi our sustainable saviours? Considerations for achieving food security. **Journal of Ecology**. v. 105, p. 921-929, 2017. doi: 10.1111/1365-2745.12788

TIMO, J. B.; ROMANO, A. W.; TIMO, M. B.. Caracterização dos espeleotemas de 2 cavernas em rochas ferríferas na unidade geomorfológica quadrilátero oeste, Congonhas (MG). SBE, **Espeleo-Tema**. Campinas, SP, v.26, n.1. 2015.

VANDERWOLF, K. J.; MALLOCH, D.; MCALPINE, D. F.; FORBES, G. J.. A world review of fungi, yeasts, and slime molds in caves. **International Journal of Speleology**. Tampa, FL (USA), v. 42, n. 1, p. 77-96, jan. 2013.

VASCONCELOS, A. M. C.; RODET, JOEL. GRUTAS E POLJES NA SERRA DO ESPINHAÇO MERIDIONAL, EXPRESSÃO DA CARSTIFICAÇÃO DO QUARTZITO. **XVII Simposio Brasileiro de Geografia Fisica Aplicada**. Fortaleza Ceara. p. 1, jun. 2019.

VAUGHAN, M. J.; MAIER, R. M.; PRYOR, B. M.. Fungal communities on speleothem surfaces in Kartchner Caverns, Arizona, USA. **International Journal of Speleology**. Tampa, FL (USA), v. 40, n. 1, p. 65-77, jan. 2011.

VIDRIH FERREIRA, G. L. B.. A classificação do grau de relevância das cavidades naturais subterrâneas como mecanismo de compatibilização. **Prisma Jurídico**. São Paulo, Brasil, v. 16, n. 1, p. 123-149, 2017.

VISAGIE, C. M.; YILMAZ, N.; VANDERWOLF, K.; RENAUD, J. B.; SUMARAH, M. W.; HOUBRAKEN, J.; ASSEBGUI, R.; SEIFERT, K.A.; MALLOCH, D.. Penicillium diversity in Canadian bat caves, including a new species, *P. speluncae*. **Fungal Systematics and Evolution**. v. 5, p. 1-15, jun. 2020. doi.org/10.3114/fuse.2020.05.01.

ZHANG, S.; LEHMANN, A.; ZHENG, W.; YOU, Z.; RILLIG, M. C.. Arbuscular mycorrhizal fungi increase grain yields: a meta-analysis. **New Phytologist**. v. 222, p. 543–555, 2019. doi: 10.1111/nph.15570

ZHANG, Z. F.; LIU, F.; ZHOU, X.; LIU, X. Z.; LIU, S. J.; CAI, L.. Culturable mycobiota from Karst caves in China, with descriptions of 20 new species. **Persoonia**. v. 39, p.1–31, 2017. <https://doi.org/10.3767/persoonia.2017.39.01>

ZHANG, Z. F.; ZHAO, P.; CAI, L. Origin of Cave Fungi. **Front. Microbiol**. v.9, jun. 2018. doi: 10.3389/fmicb.2018.01407

ZHANG, Z. F.; ZHOU, S. Y.; EURWILAICHITR, L.; INGSRISWANG, S.; RAZA, M.. Culturable mycobiota from Karst caves in China II, with descriptions of 33 new species. **Fungal Diversity**. Jul. 2020. <https://doi.org/10.1007/s13225-020-00453-7>

**CAPÍTULO 2**  
**IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS DA CAVERNA VELHA NOVA – MONJOLOS, NA**  
**SERRA DO ESPINHAÇO MERIDIONAL - MINAS GERAIS - BRASIL**

**RESUMO**

Nas cavernas ocorrem muitos fungos desconhecidos e podem produzir metabolitos secundários com potencial para uso biotecnológico, porém os estudos em cavernas tropicais são escassos. Assim o objetivo deste trabalho foi o isolamento de fungos da caverna calcária Velha Nova, Monjolos, localizada na Serra do Espinhaço Meridional de Minas Gerais. Amostras do ar, solo, rochas, espeleotemas da caverna e serapilheira do exterior da caverna foram coletadas, inoculados em meio de cultura para isolamento. Cento e setenta e oito isolados fúngicos foram obtidos. Destes, os isolados pigmentados e com produção de esporos pigmentados e um isolado hialino com formação de sinêmio, foram selecionados para a extração e sequenciamento do DNA. Por meio de comparações pelo BLASTn, foram *Aspergillus*, *Amphichorda*, *Chaetomium*, *Penicillium*, *Humicola*, *Mucor*, *Gliomastix*, *Clonostachys*, *Myrothecium*, *Cladosporium*, *Scedosporium*, *Meyerozyma* e *Rhizopus*. Devido ao isolamento de uma nova espécie de *Amphichorda*, seu posicionamento filogenético foi descrito.

**Palavras-chave:** Microrganismos. Bioprodutos. Farmáculos Filogenia. Nova espécie. *Amphichorda*. Potencial biotecnológico.

**CHAPTER 2**  
**IDENTIFICATION OF FUNGI OF THE CAVE VELHA NOVA - MONJOLOS, IN**  
**SERRA DO ESPINHAÇO MERIDIONAL - MINAS GERAIS - BRAZIL**

**ABSTRACT**

Many unknown fungi occur in caves and can produce secondary metabolites with potential for biotechnological use, however studies in tropical caves are scarce. Thus, the objective of this work was the isolation of fungi from the limestone Velha Nova cave, Monjolos, located in the Serra do Espinhaço Meridional of Minas Gerais. Samples of air, soil, rocks, cave speleothems and litter from outside the cave were collected, inoculated in culture medium for isolation. One hundred and seventy-eight fungal isolates were obtained. Of these, pigmented isolates with pigmented spore production and a hyaline isolate with growth of synnemata hyphae were selected for DNA extraction and sequencing. Through BLASTn comparisons, they were *Aspergillus*, *Amphichorda*, *Chaetomium*, *Penicillium*, *Humicola*, *Mucor*, *Gliomastix*, *Clonostachys*, *Myrothecium*, *Cladosporium*, *Scedosporium*, *Meyerozyma* and *Rhizopus*. Due to the isolation of a new species of *Amphichorda*, its phylogenetic position has been described.

Keywords: Microorganisms. Bioproducts. Farmacles. Phylogeny. New species. Amphichorda. Biotechnological potential.

## 2.1 INTRODUÇÃO

As cavernas são aberturas entre as rochas com limitação espacial, pouca variação na temperatura e umidade, ausência de incidência de luz solar, e escassez de nutrientes. Esses fatores fazem com que a caverna tenha seu próprio microclima, e abrigue uma diversidade de animais e microrganismos (JURADO; SÁIZ-JIMÉNEZ, 2016; TAYLOR; STOIANOFF; FERREIRA *et al.*, 2013; ZHANG, Z., *et al.*, 2020).

Dos microrganismos de caverna, os fungos possuem o maior destaque (VANDERWOLF *et al.*, 2013) e participam de toda a ecologia da caverna, servindo de alimento para animais não predadores, agindo como decompositores das rochas e praticando simbiose com outros microrganismos (NOVÁKOVÁ, 2009; TAYLOR; STOIANOFF; FERREIRA, 2013; VANDERWOLF *et al.*, 2013; ZHANG, Z., *et al.*, 2017; 2020). Os fungos conseguem se adaptar a condições extremas, e no ambiente oligotrófico das cavernas esses produzem metabolitos que podem apresentar atividade bioativa (HELD; SALOMON; BLANCHETTE, 2020; MARQUES *et al.*, 2015; RODRIGUES *et al.*, 2009).

As de cavernas ainda são pouco explorados e apresentam um potencial de descobertas para novas espécies (HELD; SALOMON; BLANCHETTE, 2020; MARQUES *et al.*, 2015; RODRIGUES *et al.*, 2009; VISAGIE *et al.*, 2020). Na caverna Lechuguilla, no Novo Mexico, foram descritas nove novas espécies dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, (CUNNINGHAM *et al.* 1995 *apud* ZHANG, Z., *et al.*, 2017), e em cavernas da China foram observadas mais de 50 novas espécies de fungos (ZHANG, Z., *et al.*, 2017, 2020).

Os microrganismos de cavernas são uma fonte para descobertas de novos compostos bioativos (HELD; SALOMON; BLANCHETTE, 2020; MARQUES *et al.*, 2015; RODRIGUES *et al.*, 2009; VISAGIE *et al.*, 2020). Na caverna Chaabe, na Algeria, 23 isolados de *Penicillium* spp. apresentaram atividade antimicrobiana contra microrganismos patogênicos, com um percentual de inibição superior a 40% para *C. albicans* (BELYAGOUBI *et al.*, 2018). E na caverna de Sthreepura, no Sri Lanka, três isolados foram eficazes contra pelo cinco patógenos humanos, destacando o isolado de *Aspergillus fumigatus*, que apresentou alta atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* (SILVA *et al.*, 2021).

Mudanças antrópicas no ambiente cavernícola, como o turismo e a mineração, colocam em risco o equilíbrio do ambiente ocasionando diversas consequências, como alteração do microclima e diversidade de fungos (ABRIS *et al.*, 2020; TAYLOR; STOIANOFF; FERREIRA, 2013; VANDERWOLF *et al.*, 2013). Isto pode provocar a

extinção de microrganismos com potencial biotecnológico mesmo antes de serem identificados.

Assim o objetivo deste trabalho foi investigar a comunidade fúngica da caverna calcária Velha Nova - Monjolos, localizada na Serra do Espinhaço Meridional em Minas Gerais - Brasil.

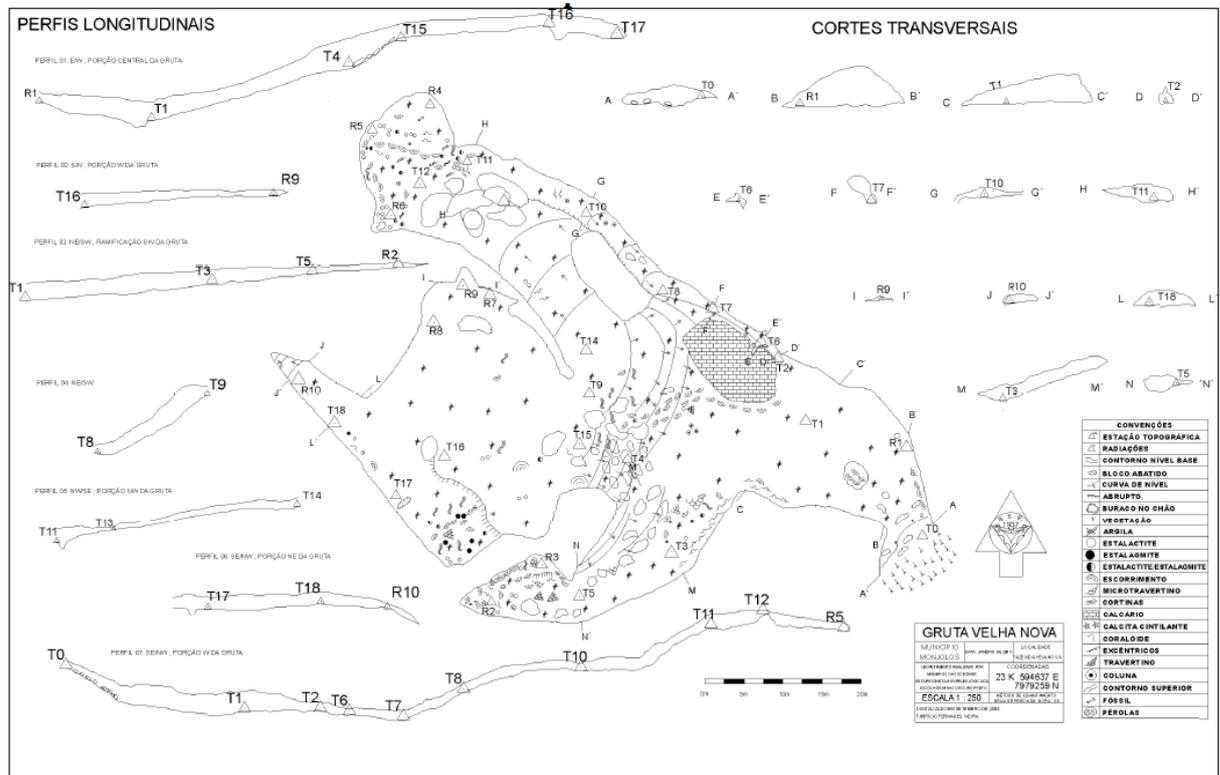
## 2.2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.2.1 Localização e caracterização da caverna Velha Nova

A caverna Velha Nova localiza-se nos domínios da Fazenda Velha Nova, coordenadas UTM 7978954N e 594939E, altitude: 698m, zona 23K, datum Córrego Alegre. É uma caverna preservada, com pouca interferência humana, e apresenta uma classificação de grau um para ações prioritárias de preservação segundo Plano de Ação para Conservação Do Patrimônio Espeleológico Nas Áreas Cársticas Da Bacia Do Rio São Francisco – PAN (CECAV, 2018).

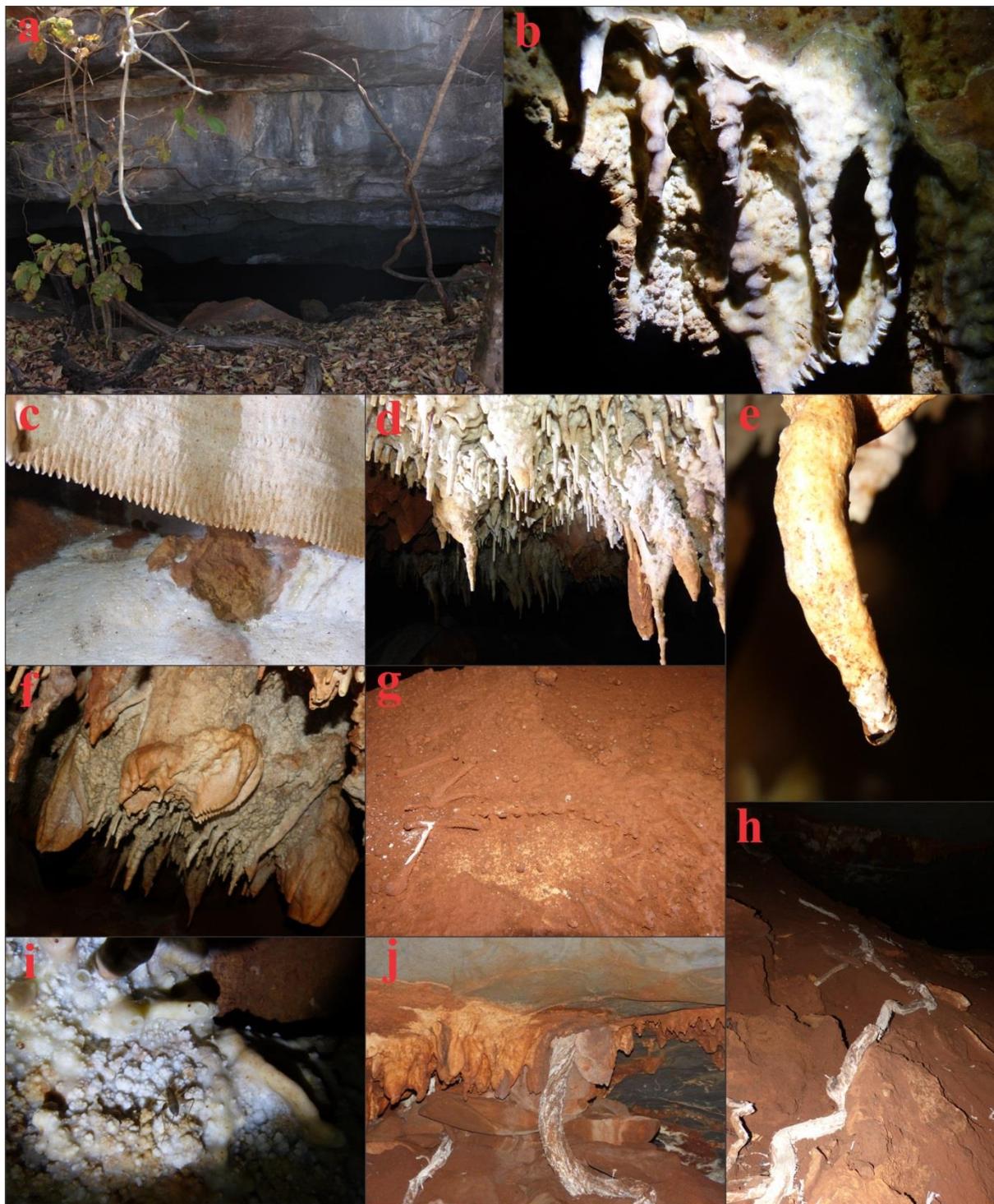
A caverna está situada na área de afloramento do supergrupo Espinhaço, centro – leste do Craton do São Francisco Meridional (TEIXEIRA-SILVA *et al.*, 2005). É formada por uma rocha calcária calcítica cristalina, apresentando 460 m de comprimento horizontal (Figura 2.1). A entrada da caverna é de fácil acesso, por um caminho através da pastagem (Figura 2.2a). No interior da caverna é observada em alguns pontos a formação de estalactites e estalagmites (Figura 2.2b-f). A presença de água na caverna foi observada apenas em alguns pontos, com pequenos gotejamentos (Figura 2.2e). No piso da caverna observa-se uma cobertura de sedimentos argilosos. Na caverna foi observada a presença de alguns animais (Figura 2.2i) e raízes de árvores (Figura 2.2j-h). Morcegos foram observados apenas no primeiro salão. No último salão, denominado de Salão do fóssil, encontra-se um pequeno esqueleto animal fossilizado (Figura 2.2g). A caverna Velha Nova já foi objeto de estudos geológicos (TEIXEIRA-SILVA *et al.*, 2005) porém nenhum de inventario microbiológico. A umidade da caverna estava por volta de 90% e a temperatura em 24 °C.

Figura 2.1 - Planta baixa da Caverna Velha Nova, com perfis longitudinais e cortes transversais.



Fonte: TEXEIRA-SILVA *et al.*, 2005.

Figura 2.2 – Imagens da caverna Velha Nova. a Entrada da caverna; b-f Alguns espeleotemas encontrados no interior da caverna; e Destaque de gotejamentos encontrados; g Fóssil calcificado de animal vertebrado não identificado; i Exemplo de um dos insetos encontrados



## 2.2.2. Amostragem, processamento das amostras e isolamento de fungos

### 2.2.2.1 Amostragem

Amostras de ar, solo, rocha, espeleotemas e serapilheira foram coletadas no interior da caverna em 17 de junho de 2019. As amostras do ar foram coletadas pelo método de sedimentação de Koch. Quatorze placas de petri contendo meio de cultura batata-dextrose-agar (BDA – Acumedia®) foram abertas no interior da caverna por 15 min, sendo quatro placas no salão mais externo, seis placas no decorrer do caminho até o ao salão mais interno e quatro placas no salão mais interno a aproximadamente 450 m da entrada da caverna. As amostras de solo foram coletadas no salão mais interno, quatro amostras de aproximadamente 10 g foram coletadas na camada de 1 a 5 cm de profundidade e armazenadas em tubos Falcons esterilizados. As amostras de rochas foram coletadas das paredes da caverna, sendo uma do corredor até o salão mais interno e duas do salão mais interno. Um espeleotema foi amostrado no corredor até o salão mais interno e dois no salão mais interno e acondicionado em tubos Falcon esterilizados. Amostras de serapilheira foram coletadas no exterior da caverna em até aproximadamente 1 m da entrada da caverna e foram acondicionadas em sacos de papel.

Todas as amostras foram acondicionadas em caixas térmicas e transportadas para o Laboratório de Micologia e Etiologia de Doenças Fúngicas de Plantas do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa - MG, onde foram armazenadas em geladeira/temperatura ambiente até seu processamento.

### 2.2.2.2 Processamento das amostras e isolamento

No laboratório, as placas com o meio BDA abertas no interior da caverna com objetivo de coletar fungos do ar foram incubadas no escuro a 25°C por 14 dias. As amostras de rochas e espeleotema foram lavadas com etanol 95 % e com a solução esterilizada de 0,1 % de Tween 20 em água, para eliminar a microbiota superficial (Ruibal et al., 2005). Após a lavagem o um fragmento de aproximadamente 3 g de cada amostra de rochas e de espeleotemas foram moídos com o auxílio de cadinho e pistilo. Para o isolamento, 1 g de cada amostra de rocha e espeleotemas moídos e de solo foram separadamente adicionados em 9 mL de água destilada esterilizada e homogeneizadas com auxílio de Vortex por 1 minuto. Em seguida as suspensões foram diluídas seriadamente até a diluição de  $10^{-1}$  para as amostras de rocha e de espeleotemas e até a diluição de  $10^{-4}$  para as amostras de solo. Três porções de 100  $\mu$ L, 200  $\mu$ L e 300  $\mu$ L da diluição de  $10^{-1}$  da suspensão de rocha e de espeleotemas e de 200  $\mu$ L

de todas as diluições da suspensão de solo foram espalhadas sobre 20 mL de BDA adicionado de 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de ampicilina contidos em placas de Petre de 100 mm de diâmetro (RUIBAL; PLATAS; BILLS, 2005; ZHANG, Z., *et al.* 2017).

Amostras de serapilheira foram lavadas em água corrente durante uma hora (CASTAÑEDA-RUIZ, 2005) e incubadas por 30 dias em câmaras-úmidas, no escuro a 25°C. Durante este período, a cada 7 dias as amostras foram observadas sob microscópio estereoscópico e as estruturas de reprodução dos fungos observadas foram e transferidas para BDA adicionado de 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de ampicilina e incubadas a 25°C. A cada dois dias essas placas foram analisadas quanto ao crescimento de novas colônias crescentes e quando presentes foram transferidos nova placa de Petri contendo o mesmo meio de cultura. Em seguida, destas culturas foram obtidas culturas puras pelos métodos de isolamento por ponta de hifa ou isolamento monospórico. O primeiro consistiu em colocar uma pequena amostra fúngica para crescer em 20 mL de meio de Agar-Água 3% (Imedia®) por 24 horas a 25°C, após este período a amostra em crescimento foi observada sob microscópio estereoscópico, e uma pequena ponta de hifa foi retirada com o auxílio de uma agulha e transferida para meio BDA de 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de ampicilina (DHINGRA; SINCLAIR, 1995). Para isolamento monospórico, uma pequena amostra de esporos foi espalhada com uma alça de Drigalsk na superfície de 20 mL de meio de Agar-Água 3% contido em placa de Petri de 100 mm de diâmetro e, em seguida esporos isolados foram transferidos coletados sob microscópio estereoscópico e transferido para 20 mL de BDA de 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de ampicilina (ZAMBOLIM; PEREIRA, 2012).

### *2.2.3 Identificação Molecular e Morfológica dos fungos cavernícolas*

#### *2.2.3.1 Extração do DNA genômico*

Os isolados fúngicos pigmentados e com produção de esporos pigmentados foram selecionados para extração do DNA genômico. Também foi selecionado um isolado hialino, com formação de sinêmio, isolado a partir de uma placa de amostra do ar cujo um inseto passou sobre o meio, cuja morfologia observada foi diferente das espécies mais conhecidas. Estes isolados foram crescidos por 7 dias à 25°C sobre celofane disposto sobre 20 mL de meio de BDA adicionado de 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de ampicilina. Em seguida, aproximadamente 40 mg de micélio fúngico foram acondicionados em microtubo de 2 mL, contendo 600  $\mu\text{L}$  de Nuclei Lysis Solution do Kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega®), 100 mg de

polivinilpirrolidona (Sigma-Aldrich®) e quatro esferas de aço (2,8 mm de diâmetro) e macerado a 4.000 rpm por um minuto no aparelho L-Beader 6 (Loccus Biotecnologia®).

Os micélios macerados foram centrifugados por 5 segundos, e incubados a 65°C por 15 min. Em seguida, 3 µL de solução de RNAase foi adicionada, agitado em vortex e incubado novamente a 37° C por 15 min. As amostras foram refrigeradas a -20 °C por 5 min, e adicionado 200 µL de solução de precipitação de proteína, agitado por 10 segundos em vortex e centrifugado por 5 min a 14.000 rpm. Em seguida, 600 µL do sobrenadante, suspensão com o DNA, foi transferida para um microtubo de 1,5 mL com 600 µL de isopropanol resfriado. Os tubos foram agitados por 5 min manualmente, incubados por 20 min em freezer a -20 °C, e centrifugados por 5 min a 14.000 rpm. Após a centrifugação, o sobrenadante das amostras foi descartado e o pellet com o DNA foi lavado com 600 µL de etanol 70% resfriado, agitado manualmente por 2 min e centrifugado por 5 min a 14.000 rpm. Após descarte do etanol, o microtubo permaneceu por 15 min na posição horizontal, para evaporação do restante do etanol. Após a evaporação 100 µL de Solução de Reidratação de DNA do Kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega®) foram adicionados nas amostras e estas foram incubadas em banho seco por 60 min a 65°C. Esse protocolo segue as indicações do fabricante do Kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega®) e modificações feitas por PINHO *et al.*, (2013).

### 2.2.3.2 Amplificação e sequenciamento

Todos os isolados foram sequenciados pela amplificação das regiões do Espaçador Transcrito Interno (ITS) regiões (ITS1, 5.8S rRNA e ITS2), da Região Maior da Subunidade do RNA Polimerase II (RPB2) e da região do Fator de Alongamento da Tradução 1- $\alpha$  (TEF1- $\alpha$ ). A região ITS foi amplificada utilizando os primers ITS1 (5' - TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') e ITS4 (5' -TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') (WHITE *et al.*, 1990), a região RPB2 foi amplificada utilizando os primers RPB2-5F (5' – GAY GAY MGW GAT CAY TTY GG – 3') e fRPB2-7cR (5' – CCC ATR GCT TGY TTR CCC AT – 3') (SUNG *et al.* 2007) e a região TEF1- $\alpha$  foi amplificada utilizando os primers EF1-983F (5' – GCY CCY GGH CAY CGT GAY TTY AT – 3') e EF1-2218R (5' – ATG ACA CCR ACR GCR ACR GTY TG – 3') (REHNER; BUCKLEY, 2005).

As Reações em Cadeia da Polimerase (PCR) foram realizadas em Termociclador T100™ Thermal Cycler (BIO-RAD®) contendo 18 µL de Platinum PCR SuperMix (Life Technologies®), 0,4 µL de cada primer (10 mM), 1,2 µL de DNA (25 ng µL<sup>-1</sup>). Controles negativos foram realizados utilizando água livre de nuclease no lugar do DNA nas reações. As

condições do PCR consistiam em desnaturação inicial à 94°C por 120 segundos, seguido de 35 ciclos de desnaturação à 94°C por 30 segundos, hibridação do primer à 49°C para a região do ITS, à 50°C para a região do RPB2 e à 55°C para a região TEF 1- $\alpha$ , por 30 segundos e a extensão à 72°C por 120 segundos.

Os resultados da PCR foram corados com GelRed (Biotium Inc.®) e analisados em eletroforese com gel de agarose 2%, a 80 Volts, por 40 min, em tampão Tris-acetato-EDTA 1 g/mL. A verificação do tamanho da amplificação e pureza foi realizada em luz ultravioleta. As amostras de PCR foram enviadas para purificação e sequenciamento na Macrogen Inc., Coreia do Sul (<http://www.macrogen.com>). A edição das sequências foi realizada utilizando o software FinchTV v.1.4.0. As sequências obtidas foram disponibilizadas ao banco de dados GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

#### 2.2.3.3 Identificação dos fungos e análises filogenéticas

O algoritmo BLAST foi utilizado para selecionar sequências de nucleotídeos armazenadas no banco de dados do NCBI, que apresentavam similaridade superior a 95% com as sequências dos fungos isolados e um banco de dados foi construído junto com sequências de outros trabalhos já publicados e utilizados como referências para cada grupo. As novas sequências foram adicionadas ao conjunto de sequências obtido no Genbank e alinhadas no programa MUSCLE® (EDGAR, 2004) existente no software MEGA v. 7.

As árvores filogenéticas foram construídas utilizando a análise de Inferência Bayesiana (BI), por meio do MrMODELTEST 2.3 selecionou-se o modelo de substituição de nucleotídeos de acordo com o Akaike Information Criterion (AIC). Para a elaboração das árvores usou-se o programa MrBayes v.3.2.6 na plataforma CIPRES. Na análise de inferência bayesiana quatro cadeias Markov chain Monte Carlo (MCMC) foram conduzidas simultaneamente, iniciando as árvores aleatoriamente até 10.000.000 de gerações. As árvores foram amostradas a cada 1.000 gerações, resultando em 10.000 árvores. As primeiras 2.500 árvores foram descartadas da análise. Os valores de probabilidade posterior (RANNALA; YANG, 1996) foram determinados da árvore consenso por meio das 7.500 árvores remanescentes. As árvores filogenéticas de cada região genica foram obtidas separadamente, e também com as sequências de todas as regiões concatenadas (filogenia multilocus). As árvores resultantes foram visualizadas no software FigTree (RAMBAUT, 2014) e exportadas para programas gráficos.

A tabela 2.1 apresenta todos os isolados e os números de acesso ao Genbank usados para elaboração da análise de inferência bayesiana para os isolados de *Amphichorda* (COAD 3124, COAD 3125 e COAD 3120).

Tabela 2.1 - Espécies e códigos de acesso ao Genbank utilizados para análise de inferência Bayesiana (Figura 3).

Espécie	Código	Número de acesso ao Genbank		
		ITS	TEF	RBP2
<b><i>Amphichorda</i> sp.</b>	<b>COAD 3120</b>	-	-	-
<b><i>Amphichorda</i> sp.</b>	<b>COAD 3124</b>	-	-	-
<b><i>Amphichorda</i> sp.</b>	<b>COAD 3125</b>	-	-	-
<i>Amphichorda cavernicola</i>	LC12485	MK329058	MK335999	-
<i>Amphichorda cavernicola</i>	CGMCC3.19571	MK329056	MK335997	-
<i>Amphichorda felina</i>	CBS 250.34 T	AY261369.	-	-
<i>Amphichorda felina</i>	MTCC 2499	JQ266096.1	JQ990899.1	JQ990855.1
<i>Amphichorda guana</i>	CGMCC3.17908	KU746665	KX855211	KY883228.
<i>Amphichorda guana</i>	CGMCC3.17909	KU746666	KX855212	-
<i>Beauveria amorfa</i>	ARSEF 2641 T	AY532008	AY531917	HQ880952
<i>Beauveria amorfa</i>	ARSEF 7542	HQ880805	HQ881007	HQ880949
<i>Beauveria asiática</i>	ARSEF 4474	AY532027.	AY531936	HQ880930
<i>Beauveria asiática</i>	ARSEF 4850 T	AY532028.	AY531937	HQ880931
<i>Beauveria australis</i>	ARSEF 4580	HQ880788	HQ880994	HQ880932
<i>Beauveria australis</i>	ARSEF 4598 T	HQ880789	HQ880995	HQ880933
<i>Beauveria bassiana</i>	ARSEF 1564 T	HQ880761	HQ880974	HQ880905
<i>Beauveria bassiana</i>	ARSEF 1811	AY531992	AY531901	HQ880909
<i>Beauveria brongniartii</i>	ARSEF 2271	HQ880779	HQ880988	HQ880923
<i>Beauveria brongniartii</i>	ARSEF 617 T	HQ880782	HQ880991	HQ880926
<i>Beauveria caledonica</i>	ARSEF 1567	AY531986	AY531894	HQ880960
<i>Beauveria caledonica</i>	ARSEF 2567 T	AY532006	AY531915	HQ880961
<i>Beauveria kipukae</i>	ARSEF 7032 T	HQ880803	HQ881005	HQ880947
<i>Beauveria lii</i>	ARSEF 11741 T	JN689372	JN689371	JN689370
<i>Beauveria malawiensis</i>	ARSEF 7760 T	HQ880825	HQ881015	HQ880967
<i>Beauveria malawiensis</i>	ARSEF 4755	DQ376247	DQ376246	HQ880969
<i>Beauveria pseudobassiana</i>	ARSEF 3405 T	AY532022	AY531931	HQ880936
<i>Beauveria pseudobassiana</i>	ARSEF 7242	HQ880793	HQ880997	HQ880937
<i>Beauveria sungii</i>	ARSEF 1685 T	AY531990	AY531899	HQ880953
<i>Beauveria sungii</i>	ARSEF 5689	AY532030	AY531939	HQ880954
<i>Beauveria varroae</i>	ARSEF 8257 T	HQ880800	HQ881002	HQ880944
<i>Beauveria varroae</i>	ARSEF 8259	HQ880801	HQ881003	HQ880945
<i>Beauveria vermiconia</i>	ARSEF 2922 T	AY532012	AY531920	HQ880966
<i>Cordyceps militaris</i>	ARSEF 5050 T	HQ880829	HQ881020	HQ880973
<i>Nomuraea rileyi</i>	CBS 806.71	HQ165711.	HQ165688.	EF468937.1
<i>Nomuraea rileyi</i>	NBRC8560	AY624205.	EF468787.1	-
<i>Parengyodontium lilacinum</i>	CBS284.36 T	AY624189	EF468792	EF468941
<i>Parengyodontium lilacinum</i>	CBS431.87	AY624188	EF468791	EF468940
<i>Tolypocladium</i>	CBS 719.70 T	MK984581.	MK984569.	MK984573.

<i>Tolypocladium geodes</i>	ARSEF 2684 T	FJ973059.1	-	-
<i>Tolypocladium nubicola</i>	ARSEF 3434	FJ973067.1	-	-
<i>Tolypocladium parasiticum</i>	ARSEF 3436	FJ973068.1	EF468799.1	EF468945.1
<i>Tolypocladium tundrense</i>	ARSEF 3400	FJ973069.1	-	-

#### 2.2.3.4 Caracterização Morfológica

Os isolados selecionados foram cultivados em lâmina pela técnica do Micro cultivo. Os isolados foram inoculados em discos de meio Agar – Água 3% dispostos sobre lâminas esterilizadas e em seguida cobertos com lamínula também esterilizada e incubados em câmara úmida por 7 dia a 25 °C e no escuro. Após este período as lamínulas foram transferidas para novas lâminas e examinadas ao microscópio óptico (Olympus BX53) e estruturas vegetativas e reprodutivas do isolados foram fotografadas (câmera digital, Olympus Q-Color5) e 30 medições de conídios foram realizadas por meio do software Olympus cellSens Dimension v. 1.9.

Para caracterização morfológica das colônias os isolados hialino, com formação de sinêmio, foram colocados para crescer em meios de cultura tipo BDA, Synthetic Nutriente-Poor Agar (SNA) e em meio de aveia (MA). As colônias foram medidas aos 14 dias de crescimento.

#### 2.2.4 Armazenamento e depósito

Os isolados foram armazenados em glicerol 10% (CASTELLANI, 1939) e sílica gel (DHINGRA; SINCLAIR, 1995). E estão armazenados no Laboratório de Micologia e Etiologia de Doenças Fúngicas de Plantas da Universidade Federal de Viçosa e foram depositados na Coleção Octávio Almeida Drummond (COAD), para recebimento do número COAD e espécimes do Tipo serão depositadas no Herbário VIC, ambas as coleções pertencentes à Universidade Federal de Viçosa. Novidades taxinômicas serão depositadas no MycoBank ([www.mycobank.org](http://www.mycobank.org)).

## 2.3 RESULTADOS

### 2.3.1 Isolados identificados

Cento e setenta e oito isolados fúngicos foram obtidos das amostras coletadas na caverna Nova Velha, sendo 49 isolados do ar, 48 do solo, 11 de rochas, 22 de espeleotemas, e 48 da serapilheira da entrada da caverna. Dentre estes, 23 isolados foram selecionados para o sequenciamento. Dos isolados selecionados, sete foram obtidos do ar, quatro da serapilheira, seis do solo e cinco de rochas e um dos espeleotemas (Tabela 2.2).

Treze gêneros foram identificados por meio de comparação das sequências utilizando a ferramenta megaBLASTn, porém um isolado não se assemelhou a outros sequenciamentos e a nenhum gênero já descrito. Vinte isolados pertencem ao filo Ascomycota e três isolados ao subfilo Mucoromycotina (Tabela 2.2). Do filo Ascomycota os gêneros *Aspergillus*, *Amphichorda* e *Chaetomium* tiveram três isolados cada, os gêneros *Penicillium* e *Humicola* dois isolados cada, e os gêneros *Gliomastix*, *Clonostachys*, *Myrothecium*, *Cladosporium*, *Scedosporium* e *Meyerozyma* um isolado cada (Tabela 2.2). Um isolado pertence à família Gymnoascaceae, gênero não identificado até o presente momento. E no subfilo Mucoromycotina foi identificado dois gêneros, *Mucor* com dois isolados e *Rhizopus* com um isolado.

### 2.3.2 Análises filogenéticas

De acordo com análise filogenética por inferência bayesiana, os três isolados de *Amphichorda*, se agruparam em clado distinto e com alto suporte filogenético, das espécies já descritas, indicando uma possível espécie nova de *Amphichorda* (Figura 2.3).

### 2.3.3 Taxonomia

As culturas dos isolados COAD 3124, COAD 3125 e COAD 3120 de *Amphichorda*, em meio BDA são brancas a cremes, com 16 a 26 mm de diâmetro aos 14 dias (Tabela 2.3), bordas irregulares, e produzem um círculo de coloração amarelo-amarronzada no meio de cultura ao redor da colônia, e muitos micélios aéreos (Figura 2.4h). As colônias em meio de aveia medem de 30 a 46 mm de diâmetro (Tabela 2.3), com coloração branca e presença de grande quantidade de hifas aéreas centrais (Figura 2.4i). Já em meio SNA as colônias medem de 18 a 38 mm de diâmetro (Tabela 2.3), possui aparência transparente e poucas hifas aéreas centrais (Figura 2.4j). As colônias dos isolados apresentam formação de sinêmio, com espessura média de 0,69 mm e comprimento máximo de 40 mm (Figura 2.4c).

As hifas dos isolados são septadas e hialinas (Figura 2.4d-g). Os isolados apresentam conidióforos cilíndricos, solitários ou ramificados (Figura 2.4d-g) e células conidiogênicas medindo 3,1 a 6,1  $\mu\text{m}$  por 2,7 a 5,1  $\mu\text{m}$  (Tabela 2.3). Os isolados possuem conídios hialinos com tamanho variando de 2,8 a 3,7  $\mu\text{m}$  por 1,8 a 2,9  $\mu\text{m}$  (Tabela 2.3) (Figura 2.4g).



Tabela 2.2 – Isolados e código COAD, origem do isolamento e agrupamento em gênero, família, ordem e filo, de acordo com o BLASTn das sequências de DNA dos isolados.

Filo	Ordem	Família	Gênero	Origem	Isolados	Código COAD		
Ascomycota	Eurotiales	Aspergillaceae	<i>Aspergillus</i>	Ar	2841	COAD 3128		
				Serapilheira	2843	COAD 3130		
				Solo	2852	COAD 3139		
			<i>Penicillium</i>	Espeleotema	2857	COAD 3144		
				Rocha	2859	-		
				Ar	2835	COAD 3124		
			Hypocreales	Cordycipitaceae	<i>Amphichorda</i>	Ar	2836	COAD 3125
						Ar	2837	COAD 3120
						Solo	2851	COAD 3138
	Cladosporiales	Bionectriaceae	<i>Gliomastix</i>	Solo	2851	COAD 3138		
				<i>Clonostachys</i>	Rocha	2858	COAD 3145	
				<i>Myrothecium</i>	Serapilheira	2829	COAD 3123	
		Cladosporiaceae	<i>Cladosporium</i>	Rocha	2856	COAD 3143		
				Ar	2839	COAD 3126		
				<i>Humicola</i>	Ar	2840	COAD 3127	
	Sordariales	Chaetomiaceae	<i>Chaetomium</i>	Ar	2822	COAD 3122		
				Serapilheira	2842	COAD 3129		
				Serapilheira	2844	COAD 3131		
	Microascales	Microascaceae	<i>Scedosporium</i>	Rocha	2855	COAD 3142		
Saccharomycetales	Debaryomycetaceae	<i>Meyerozyma</i>	Solo	2845	COAD 3132			
Onygenales	Gymnoascaceae	-	Rocha	2854	COAD 3141			
Mucoromycotina	Mucorineae	Mucoraceae	<i>Mucor</i>	Solo	2848	COAD 3135		
			Solo	2850	COAD 3137			
		Rhizopodaceae	<i>Rhizopus</i>	Solo	2849	COAD 3136		

Tabela 2.3 – Comparação de características de espécies do gênero *Amphichorda* com os isolados fúngicos deste estudo.

Espécies		<i>Amphichorda felina</i>	<i>Amphichorda guana</i>	<i>Amphichorda cavernícola</i>	Isolados COAD 3120, COAD 3124 e COAD 3125
Isolamento		-	Guano de morcego Caverna em Guizhou – China.	Fezes de pássaros e morcegos Caverna Feng em Sichuan – China.	Amostra de ar Caverna Velha Nova, Monjolos - Brasil.
Coloração e diâmetro (mm) das colônias aos 14 dias em diferentes meios	BDA	-	Branco amarelado 14 a 18 mm	Amarelo creme 9 a 15 mm	Branças a cremes 16 a 26 mm
	SNA	-	Branca a amarelo 13 a 21	Branca 9 a 13 mm	Incolor 18 a 38 mm
	MA	-	-	Branca 18 a 22 mm	Branca 30 a 46 mm
Conidióforos arranjados em sinêmio	BDA	Sim	Sim (ramificada)	Sim	Sim (ramificada)
	SNA	-	Não	Não	Sim (ramificada)
	MA	-	-	Sim	Sim (ramificada)
Tamanho das células conidiogênicas (µm)		-	7 a 10 por 2 a 3	4.5 a 8.0 por 2.0 a 3.0	3,1 a 6,1 por 2,7 a 5,1
Tamanho dos conídios (µm)		3,5 a 4,0 por 2,5 a 3	4,5 a 5,5 por 3,5 a 5	2,5 a 4,0 por 2,0 a 3,5	2,8 a 3,7 por 1,8 a 2,9
Referências		SEIFERT <i>et al.</i> , 2011	ZHANG, Z., <i>et al.</i> , 2017	ZHANG, Z., <i>et al.</i> , 2020	

Figura 2.3 – Árvore filogenética obtida por Inferência Bayesiana dos isolados de *Amphichorda*, com concatenação de sequências das regiões ITS, TEF e RPB2. A árvore estava enraizada com *Parengyodontium lilacinum* (CBS284.36 T e CBS431.87) T= Material tipo.

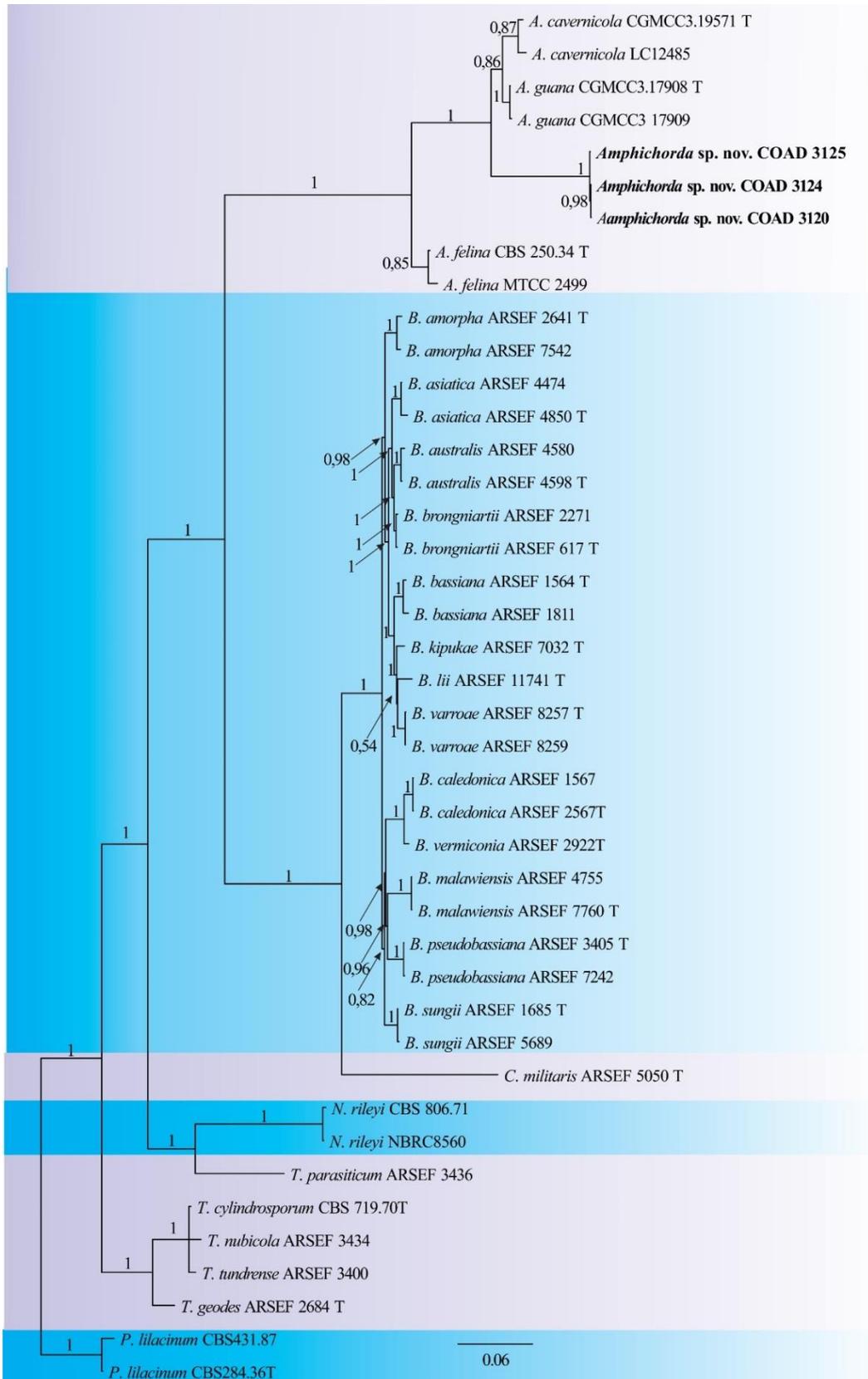
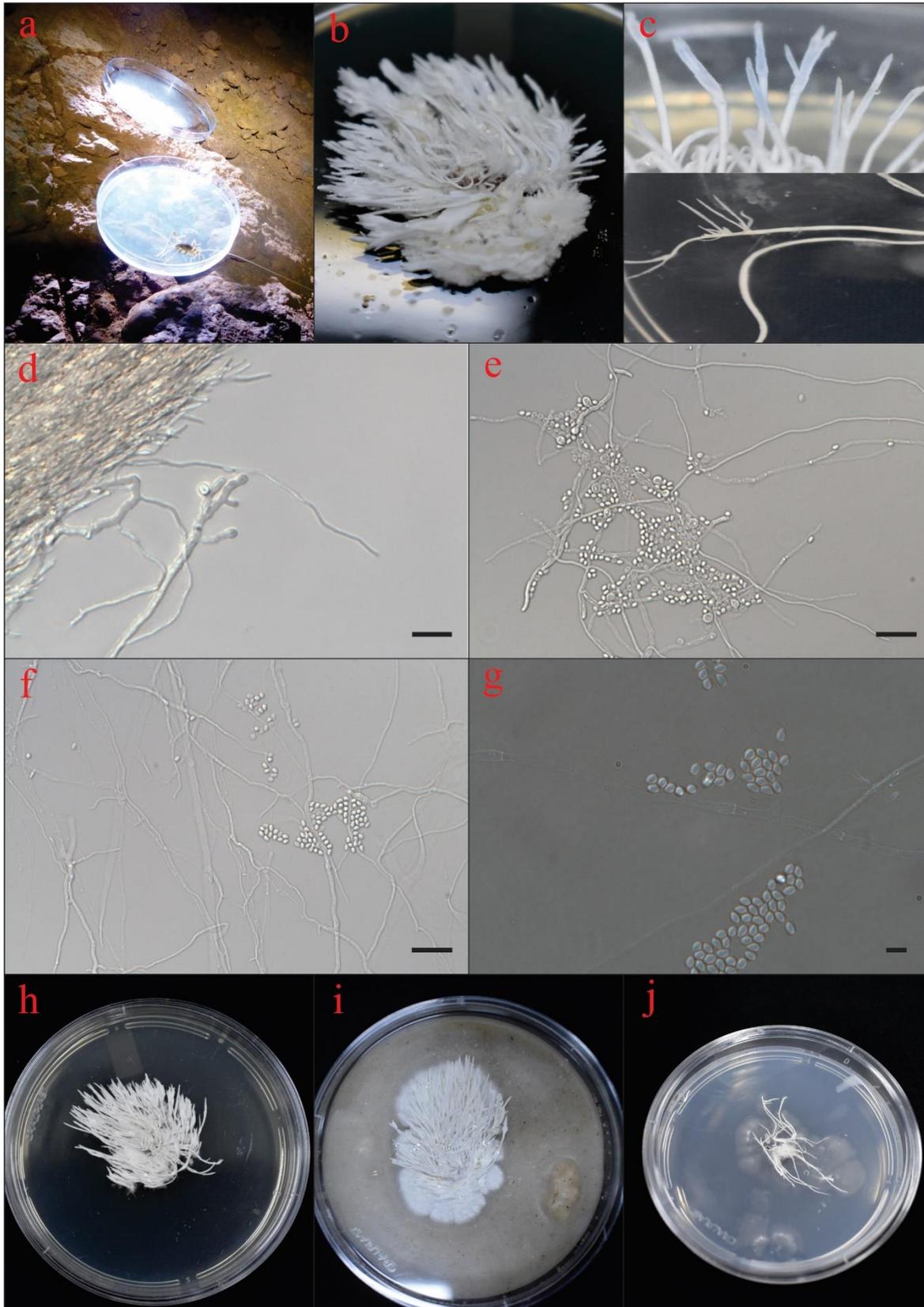


Figura 2.4 – Isolado de *Amphichorda* sp. a) Placa de onde o fungo foi isolado, com destaque para o inseto que passou sobre o meio; b) Cultura do isolado; c) Destaque do sinêmio ramificado; d-f) Células conidiogênicas; g) Conídios; h) Cultura em meio BDA; i) Cultura em meio de aveia; j) Cultura em meio SNA; Escala das barras: d-f) 20  $\mu$ m; g) 10  $\mu$ m.



2.4  
DI  
SC  
US  
SÃ  
O

E

entre  
os  
23  
isol  
ado  
s  
sele  
cio  
nada  
os  
par  
a o  
seq  
uen  
cia  
me  
nto  
e  
ide  
ntif

icação foram constados a ocorrência de 14 gêneros diferentes (Tabela 2.2), esse fato indica que a Caverna Velha Nova abriga uma grande variedade de espécies, mesmo a seleção tendo escolhido menos de 20% do total de isolados. Este resultado confirma que mesmo o ambiente cavernícola sendo considerado pobre em questão de nutrientes é possível encontrar uma grande variedade de fungos crescendo neste ambiente (HELD; SALOMON; BLANCHETTE, 2020; POPOVIĆ *et al.*, 2015; VANDERWOLF *et al.*, 2013).

Nas amostras de ar coletadas dentro da caverna e da serapilheira coletadas no exterior da caverna foram isolados os gêneros *Aspergillus* e *Chaetomium* (Tabela 2.2). Isto está de acordo com a hipótese que alguns fungos são levados do meio externo ao ambiente cavernícola, através corrente de ar e pela entrada de humanos e animais na caverna (BELYAGOUBI *et al.*, 2018; HELD; SALOMON; BLANCHETTE, 2020; NOVÁKOVÁ, 2009; PARK *et al.*, 2020; POPOVIĆ *et al.*, 2015; RAJI *et al.*, 2019; VANDERWOLF *et al.*, 2013).

Nas amostras de ar da caverna foram observadas espécies de *Aspergillus* e *Chaetomium* (Tabela 2.2). Um isolado pertencente ao gênero *Scedosporium* foi obtido de uma amostra de rocha. Algumas espécies pertencentes aos gêneros de *Scedosporium*, *Aspergillus* e *Chaetomium* podem ser patogênicas ao homem causando infecções e micoses, a observação destas reforça a necessidade de cuidados ao explorar as cavernas (JURADO, V., *et al.*, 2010).

Na serapilheira observou-se um isolado do gênero *Myrothecium* que não foi observado nas amostras coletadas dentro da caverna. A amostra de serapilheira foi coletada na área externa da entrada da caverna, região onde recebe influência direta da vegetação e possui maior deposição de matéria orgânica, indicando que algumas espécies não se adaptam ao ambiente oligotrófico das cavernas (HELD; SALOMON; BLANCHETTE, 2020; RODRIGUES *et al.*, 2009).

Nas amostras de solo foram observados cinco gêneros e foi o único tipo de amostra que ocorreram representantes dos dois filos, isso pode estar associado a maior teor de matéria orgânica neste tipo de amostras (BELYAGOUBI *et al.*, 2018; HELD; SALOMON; BLANCHETTE, 2020; POPOVIĆ *et al.*, 2015).

A maioria dos fungos identificados (87%) pertence ao filo Ascomycota (Tabela 2.2). É consenso na literatura que os meios de isolamento de fungos são tendenciosos ao isolamento de Ascomycotas, considerando que os Basidiomycotas possuem um crescimento mais lento e difícil identificação, e os Mucoromycotinas são de fácil identificação pela grande produção de esporos (VANDERWOLF *et al.*, 2013). Essa tendência ao isolamento de Ascomycotas aliado a seleção de fungos pigmentados ou com produção de esporos

pigmentados para o sequenciamento, favoreceu a observação da maioria dos isolados pertencerem a este filo. Este resultado pode não representar a real diversidade de fungos da Caverna Velha Nova, sendo necessária a realização de estudos de diversidade. Os isolados pertencentes ao subfilo Mucoromycotina foram isolados apenas de amostras de solo.

Entre os gêneros identificados neste estudo, os de maiores relatos encontrados no ambiente cavernícola são, em ordem decrescente: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Cladosporium*, *Rhizopus*, *Chaetomium* e *Humicola* (VANDERWOLF *et al.*, 2013).

Espécies de *Aspergillus* foram isoladas de amostras de ar, serapilheira e solo demonstrando que este gênero coloniza todos os ambientes da caverna, embora não tenha sido isolado em amostras de rocha e espeleotemas neste estudo, existem relatos na literatura sobre a ocorrência de espécies em rochas (RAJI *et al.*, 2019). A presença de *Aspergillus* nas amostras de serapilheira e solo, amostras com maior quantidade de material orgânico corrobora com os relatos de Min (1988), de que espécies deste gênero colonizam rapidamente qualquer material orgânico disponível (*apud* VANDERWOLF *et al.*, 2013).

Os isolados de *Penicillium* e *Cladosporium* foram provenientes de amostras de rocha, espécies desse gênero já foram identificadas em rochas de cavernas e no geral são decompositoras (JURADO; SÁIZ-JIMÉNEZ, 2016; RAJI *et al.*, 2019). O único isolado a partir do espeleotema foi do gênero *Penicillium*, confirmando a hipótese que espécies desse gênero decompõem as rochas das cavernas.

#### 2.4.1 *Amphichorda*

Os três isolados de *Amphichorda* agruparam em um clado distinto das demais espécies já descritas, na análise por inferência Bayesiana, assim esses isolados são de uma linhagem genéticas distinta e ainda não conhecida e serão propostas como uma nova espécie dentro do gênero *Amphichorda* (Figura 3). Estes isolados pertencem ao gênero *Amphichorda* por apresentar conidióforos arranjados em sinêmio, característica desse gênero (LANGENFELD *et al.*, 2011; ZHANG, Z., *et al.*, 2017, 2020).

As características morfológicas também corroboram a proposição de que os isolados COAD 3120, COAD 3124 e COAD 3125 não pertencem às espécies já descritas *Amphichorda felina*, *A. guana* e *A. cavernícola*. Os isolados apresentam um maior tamanho de diâmetro das colônias aos 14 dias nos meios BDA, SNA e MA, e menor tamanho de conídios que as espécies já descritas (Tabela 2.3).

Os isolados COAD 3120, COAD 3124 e COAD 3125 apresentam sinêmios e em todos os meios de cultura que foi cultivado (Tabela 2.3; Figura 2.4c). A formação de sinêmio não é observada nas outras espécies no meio de cultura SNA, e o sinêmio ramificado é relatada apenas na espécie *A. guana* em meio de cultura BDA (Tabela 2.3) (ZHANG, Z., *et al.*, 2017).

Os isolados COAD 3120, COAD 3124 e COAD 3125 se diferem das demais espécies descritas para o gênero *Amphichorda*, a espécie *A. felina* é a única com relatos de sua presença no Brasil (VITA-MARQUES *et al.*, 2008) enquanto as espécies *A. guana* e *A. cavernícola* foram relatadas apenas em cavernas na China, isoladas a partir de guano de morcego (Tabela 2.3) (ZHANG, Z., *et al.*, 2017, 2020), a distância geográfica entre os países reforça a possibilidade dos isolados obtidos aqui não pertencerem as espécies já descritas.

Os isolados pertencentes ao gênero *Amphichorda*, foram obtidos a partir de uma placa com meio BDA, que durante o período que estava exposta para coletar amostra de ar (Tabela 2.2), um inseto identificado como pertencente à família Rhabdophoridae, passou e alimentou-se do meio (Figura 2.4a). Os isolados podem ter surgido na placa por meio de esporos fúngicos presentes no ar cavernícola ou podem ter sido deixados na placa pelo inseto que teve contato com algum resíduo orgânico presente no interior da caverna, como guano de morcego ou estarem parasitando o inseto. As espécies de *Amphichorda* já descritas, *A. felina*, *A. guana* e *A. cavernícola* são coprófilas (XU *et al.*, 2018; ZHANG, Z., *et al.*, 2017, 2020), o que sugere que estes isolados também sejam e foram parar na placa carregados pelo do inseto. A possibilidade de estar parasitando o inseto poderia ser sustentada pelo fato de *Amphichorda felina* ser relatada na literatura como entomopatogênica (BELYAGOUBI *et al.*, 2018; XU *et al.*, 2018).

Embora não investigado neste estudo os isolados podem produzir metabólitos bioativos com grande potencial de uso biotecnológico, a espécie *A. felina* é a única com relatos atuais de produção de metabolitos bioativos (CHUNG *et al.*, 2013; DU *et al.*, 2014a, 2014b; LANGENFELD *et al.*, 2011; MENG *et al.*, 2015; VITA-MARQUES *et al.*, 2008; XU *et al.*, 2018; YURCHENKO *et al.*, 2014).

Os isolados COAD 3120, COAD 3124 e COAD 3125 possuem algumas características morfológicamente semelhantes ao gênero *Beauveria*, assim como as demais espécies do gênero *Amphichorda*, diferindo de *Beauveria* por não apresentar células conidiogênicas alongadas com raque denticulada apical (ZHANG, Z., *et al.*, 2017, 2020).

## 2.5 CONCLUSÕES

Os gêneros identificados na caverna Velha Nova foram *Aspergillus*, *Amphichorda*, *Chaetomium*, *Penicillium*, *Humicola*, *Mucor*, *Gliomastix*, *Clonostachys*, *Myrothecium*, *Cladosporium*, *Scedosporium*, *Meyerozyma* e *Rhizopus*.

A caverna Velha Nova abriga fungos pertencentes a gêneros que inclui espécies patogênicas ao homem.

Os isolados COAD 3124, COAD 3125 e COAD 3120, se agrupam em um clado, pertencente ao gênero *Amphichorda*, porém não se agruparam com nenhuma espécie descrita, indicando ser uma nova espécie do gênero.

## REFERÊNCIAS

- ABRIS, M. I.; PALANCA, M. S.; DE LEON, M. P.; BANAAAY, C. G. B.. Microbial Air and Water Quality Assessment of a Freshwater Limestone Cave in the Philippines and Its Implications for Ecotourism Management. **Journal of Nature Studies**. v.19, n. 1, p. 33-48, 2020.
- BELYAGOUBI, L.; BELYAGOUBI-BENHAMMOU, N.; JURADO, V.; DUPONT, J.; LACOSTE, S.; DJEBBAH, F.; OUNADJELA, F. Z.; BENAÏSSA, S.; HABI, S.; ABDELOUAHID, D. E.; SAIZ-JIMENEZ, C.. Antimicrobial activities of culturable microorganisms (actinomycetes and fungi) isolated from Chaabe Cave, Algeria. **International Journal of Speleology**. Tampa, FL (USA), v. 47, n. 2, p. 189-199, mai. 2018.
- CASTAÑEDA-RUIZ, R.F.. Metodología en el estudio de los hongos anamorfos. In **Anais do V Congresso Latino Americano de Micologia**, Brasília, p.182-183, 2005.
- CASTELLANI, A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 42, p.225, 1939.
- CENTRO NACIONAL DE PESQUISA E CONSERVAÇÃO DE CAVERNAS/ INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE. Banco de dados. Brasília: CECAV. Disponível em: <[http://www.icmbio.gov.br/cecav/images/stories/downloads/Anuario/CECAV\\_-\\_Anuario\\_estatistico\\_espeleol%C3%B3gico\\_2018.pdf](http://www.icmbio.gov.br/cecav/images/stories/downloads/Anuario/CECAV_-_Anuario_estatistico_espeleol%C3%B3gico_2018.pdf)> Acesso em: 08 mai. 2019
- CHUNG, Y.; EL-SHAZLY, M.; CHUANG, D.; HWANG, T.; ASAI, T.; OSHIMA, Y.; ASHOUR, M. L.; WU, Y.; CHANG, F.. Suberoylanilide Hydroxamic Acid, a Histone Deacetylase Inhibitor, Induces the Production of Anti-inflammatory Cyclodepsipeptides from *Beauveria felina*. **J. Nat. Prod.** v. 76, n. 7, p. 1260–1266, Jul. 2013. [dx.doi.org/10.1021/np400143j](https://doi.org/10.1021/np400143j)
- CUNNINGHAM, K. I.; NORTHUP D. E.; POLLASTRO, R. M.; *et al.* Bacteria, fungi and bioKarst in Lechuguilla Cave, Carlsbad Caverns National Park, New Mexico. **Environmental Geology**. v. 25, p. 2–8, 1995. *apud* ZHANG, Z. F.; LIU, F.; ZHOU, X.; LIU, X. Z.; LIU, S. J.; CAI, L.. Culturable mycobiota from Karst caves in China, with descriptions of 20 new species. **Persoonia**. v. 39, p.1–31, 2017. <https://doi.org/10.3767/persoonia.2017.39.01>
- DHINGRA, O. D.; SINCLAIR, J. B. Basic Plant Pathology Methods. **Boca Raton, FL, USA**, CRC Press.1995.
- DU, F.; LI, X.; ZHANG, P.; LI, C.; WANG, B.. Cyclodepsipeptides and Other O-Containing Heterocyclic Metabolites from *Beauveria felina* EN-135, a Marine-Derived Entomopathogenic Fungus. **Mar Drugs**. v. 12, p. 2816-2826, mai. 2014. [doi:10.3390/md12052816](https://doi.org/10.3390/md12052816) (a)
- DU, F.; ZHANG, P.; LI, X.; LI, C.; CUI, C.; WANG, B.. Cyclohexadepsipeptides of the Isaridin Class from the Marine- Derived Fungus *Beauveria felina* EN-135. **J. Nat. Prod.** v. 77, p. 1164–1169, 2014 [dx.doi.org/10.1021/np4011037](https://doi.org/10.1021/np4011037) (b)

- EDGAR, R. C.. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Research**, v. 32, p. 1792–1797, 2004.
- HELD, B. W.; SALOMON, C. E.; BLANCHETTE, R. A.. Diverse subterranean fungi of an underground iron ore mine. **Plos One**. v.15, n. 6, 2020.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0234208>
- JURADO, V.; LAIZ, L.; RODRIGUEZ-NAVA, V.; BOIRON, P.; HERMOSIN, B.; SANCHEZ-MORAL, S., SAIZ-JIMENEZ, C.. Pathogenic and opportunistic microorganisms in caves. **International Journal of Speleology**. Bologna (Italy), v. 39, n. 1, p. 15-24, jan. 2010.
- JURADO, V; SÁIZ-JIMÉNEZ, C. 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**. v. 24, n. 1, p. 51-60, 2016.
- LANGENFELD, A.; BLOND, A.; GUEYE, S.; HERSON, P.; NAY, B.; DUPONT, J.; PRADO, S.. Insecticidal Cyclodepsipeptides from *Beauveria feline*. **Journal of Natural Products**. v. 74, p. 825–830, 2011. [dx.doi.org/10.1021/np100890n](https://doi.org/10.1021/np100890n)
- MARQUES, E. L. S.; CORREIA, D. C.; OLIVEIRA, R. B. F.; SILVA, K. B.; DIAS, J. C. T.; PIROVANI, C. P.; REZENDE, R. P.. Potencial biotecnológico de microrganismos aislados de cavernas de Paripiranga, Bahia. In: RASTEIRO, M.A.; SALLUN FILHO, W. (orgs.) CONGRESSO BRASILEIRO DE ESPELEOLOGIA, 33, 2015. Eldorado. **Anais...** Campinas: SBE, p.161-168. 2015.
- MENG, L.; LIU, Y.; LI, X.; XU, G.; JI, N.; WANG, B.. Citrifelins A and B, Citrinin Adducts with a Tetracyclic Framework from Cocultures of Marine-Derived Isolates of *Penicillium citrinum* and *Beauveria feline*. **J Nat Prod**. v. 78, n. 9, p. 2301-5, set.2015. DOI: [10.1021/acs.jnatprod.5b00450](https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b00450)
- MIN, K. H. Fungus flora of Seongrya Cave in Korea. **Transactions of the Mycological Society of Japan**. v. 29, p. 479-487, 1988. *apud* VANDERWOLF, K. J.; MALLOCH, D.; MCALPINE, D. F.; FORBES, G. J.. A world review of fungi, yeasts, and slime molds in caves. **International Journal of Speleology**. Tampa, FL (USA), v. 42, n. 1, p. 77-96, jan. 2013.
- NOVÁKOVÁ, A.. Microscopic fungi isolated from the Dómica Cave system (Slovak Karst National Park, Slovakia). A review. **International Journal of Speleology**. Bologna (Italy), v. 38, n. 1, p. 71-82, jan. 2009.
- PARK, S.; CHO, Y. J.; JUNG, D.; JO, K.; LEE, E. J.; LEE, J. S.. Microbial Diversity in Moonmilk of Baeg-nyong Cave, Korean CZO. **Front. Microbiol**. v.11, n. 613, 2020. doi: [10.3389/fmicb.2020.00613](https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00613)
- PINHO, D. B., FIRMINO, A. L., FERREIRA-JUNIOR, W. G.; PEREIRA, O. L. An efficient protocol for DNA extraction from *Meliolales* and the description of *Meliola centellae* sp. nov. **Mycotaxon**. v.122, p. 333–345, 2013.

POPOVIĆ, S.; SIMIĆ, G. S.; STUPAR, M.; UNKOVIĆ, N.; PREDOJEVIĆ, D.; JOVANOVIĆ, J.; GRBIĆ, M. L.. Cyanobacteria, algae and microfungi present in biofilm from Božana Cave (Serbia). **International Journal of Speleology**. Tampa, FL (USA), v. 44, n. 2, p. 141-149, mai. 2015.

RAJI, R. O.; OYEWOLE, O. A.; IBRAHIM, O. H.; TIJANI, Y. N.; GANAÇÃO, M.. Microbial communities and activities in caves. **Brazilian Journal of Biological Sciences**. v. 6, n. 14, p. 557-564, 2019. doi.org/10.21472/bjbs.061407

RAMBAUT, A. FigTree 1.4.2 software. Institute of Evolutionary Biology, Univ. Edinburgh. 2014. Disponível em: <<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>>. Acesso em: 20 set. 2020.

RANNALA, B.; YANG, Z. Probability distribution of molecular evolutionary trees: a new method of phylogenetic inference. **Journal of Molecular Evolution**, v. 43, p. 304–311, 1996.

REHNER, S. A.; BUCKLEY, E. A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1- $\alpha$  sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* teleomorphs. **Mycologia**. v. 97, p. 84–98, 2005.

RODRIGUES, A. A.; CARRIM, A. J. I.; SADOYMA, G.; VIEIRA, J. D. G.. Potencialidades biotecnológicas de *Bacillus cereus* isolado em uma caverna. **ANAIS do XXX Congresso Brasileiro de Espeleologia**. Montes Claros, MG, jul. 2009.

RUIBAL, C.; PLATAS, G.; BILLS, G. F. Isolation and characterization of melanized fungi from limestone formations in Mallorca. **Mycological Progress**. v. 4, p. 23-38, 2005.

SILVA, E. I. P.; JAYASINGHA, P.; SENANAYAKE, S.; DANDENIYA, A.; MUNASINGHE, D. H.. Microbiological study in a gneissic cave from Sri Lanka, with special focus on potential antimicrobial activities. **International Journal of Speleology**. Tampa, FL USA, v. 50, n. 1, p. 41-51, jan., 2021. <https://doi.org/10.5038/1827-806X.50.1.2343>

SUNG, G. H.; SUNG, J. M.; HYWEL-JONES, N. L.; SPATAFORA, J. W.. A multi-gene phylogeny of Clavicipitaceae (Ascomycota, Fungi): Identification of localized incongruence using a combinational bootstrap approach.. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, in press. 2007

TAYLOR, E. L. S.; STOIANOFF, M. A. R.; FERREIRA, R. L. Mycological study for a management plan of a neotropical show cave (Brazil). **International Journal of Speleology**. Tampa, FL (USA), v. 42, n. 3, p. 267-277, Set. 2013.

TEIXEIRA-SILVA, C. M.; FALEIROS-SANTOS, T.; ROBERTO, G. G.; VIEIRA, F. F.; MORAIS, F.; OLIVEIRA, G. P. C.; ONOFRE-OLIVEIRA, S.; FERREIRA, A. S.; MATTEO, D. E. G.. Espeleologia na área cárstica de Monjolos, MG. **Anais do 28º Congresso Brasileiro de Espeleologia**. SBE. Campinas, SP. Jun. 2005.

VANDERWOLF, K. J.; MALLOCH, D.; MCALPINE, D. F.; FORBES, G. J.. A world review of fungi, yeasts, and slime molds in caves. **International Journal of Speleology**. Tampa, FL (USA), v. 42, n. 1, p. 77-96, jan. 2013.

VISAGIE, C. M.; YILMAZ, N.; VANDERWOLF, K.; RENAUD, J. B.; SUMARAH, M. W.; HOUBRAKEN, J.; ASSEBGUI, R.; SEIFERT, K.A.; MALLOCH, D.. Penicillium diversity in Canadian bat caves, including a new species, *P. speluncae*. **Fungal Systematics and Evolution**. v. 5, p. 1-15, jun. 2020. doi.org/10.3114/fuse.2020.05.01.

VITA-MARQUES, A. M.; LIRA, S. P.; BERLINCK, R. G. S.; SELEGHIM, M. H. R.; SPONCHIADO, S. R. P.; TAUKE-TORNISIELO, S. M.; BARATA, M.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; CAVALCANTI, B. C.; NASCIMENTO, G. G. F.; SOUZA, A. O.; GALETTI, F. C. S.; SILVA, C. L.; SILVA, M.; PIMENTA, E. F.; THIEMANN, O.; PASSARINI, M. R. Z.; SETTE, L. D.; A Multi-Screening Approach For Marine-Derived Fungal Metabolites And The Isolation Of Cyclodepsipeptides From *Beauveria felina*. **Quim. Nova**. v. 31, n. 5, p. 1099-1103, 2008.

SEIFERT, K. A.; MORGAN-JONES, G.; GAMS, W.; KENDRICK, B.. The genera of *Hyphomycetes*. **CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre**. Utrecht, 2011.

WHITE, T. J., BRUNS, T., LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. and White, T.J. (Eds.) *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. San Diego, CA, USA: **Academic Press**, p. 315–322, 1990.

XU, L.; LI Y.; BIGGINS, J. B.; BOWMAN, B. R.; VERDINE, G. L.; GLOER, J. B.; ALSPAUGH, J. A.; BILLS, G. F.. Identification of cyclosporin C from *Amphichorda felina* using a *Cryptococcus neoformans* differential temperature sensitivity assay. **Appl Microbiol Biotechnol**. v. 102, p. 2337–2350, 2018. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8792-0>

YURCHENKO, A. N.; SMETANINA, O. F.; KALINOVSKY, A. I.; PUSHILIN, M. A.; GLAZUNOV, V. P.; KHUDYAKOVA, Y. V.; KIRICHUK, N. N.; ERMAKOVA, S. P.; DYSHLOVOY, S. A.; YURCHENKO, E. A.; AFIYATULLOV, S. S. H.. Oxirapentyns F–K from the Marine-Sediment-Derived Fungus *Isaria felina* KMM 4639. **J. Nat. Prod.** v. 77, n. 6, p. 1321–1328, jun. 2014. dx.doi.org/10.1021/np500014m

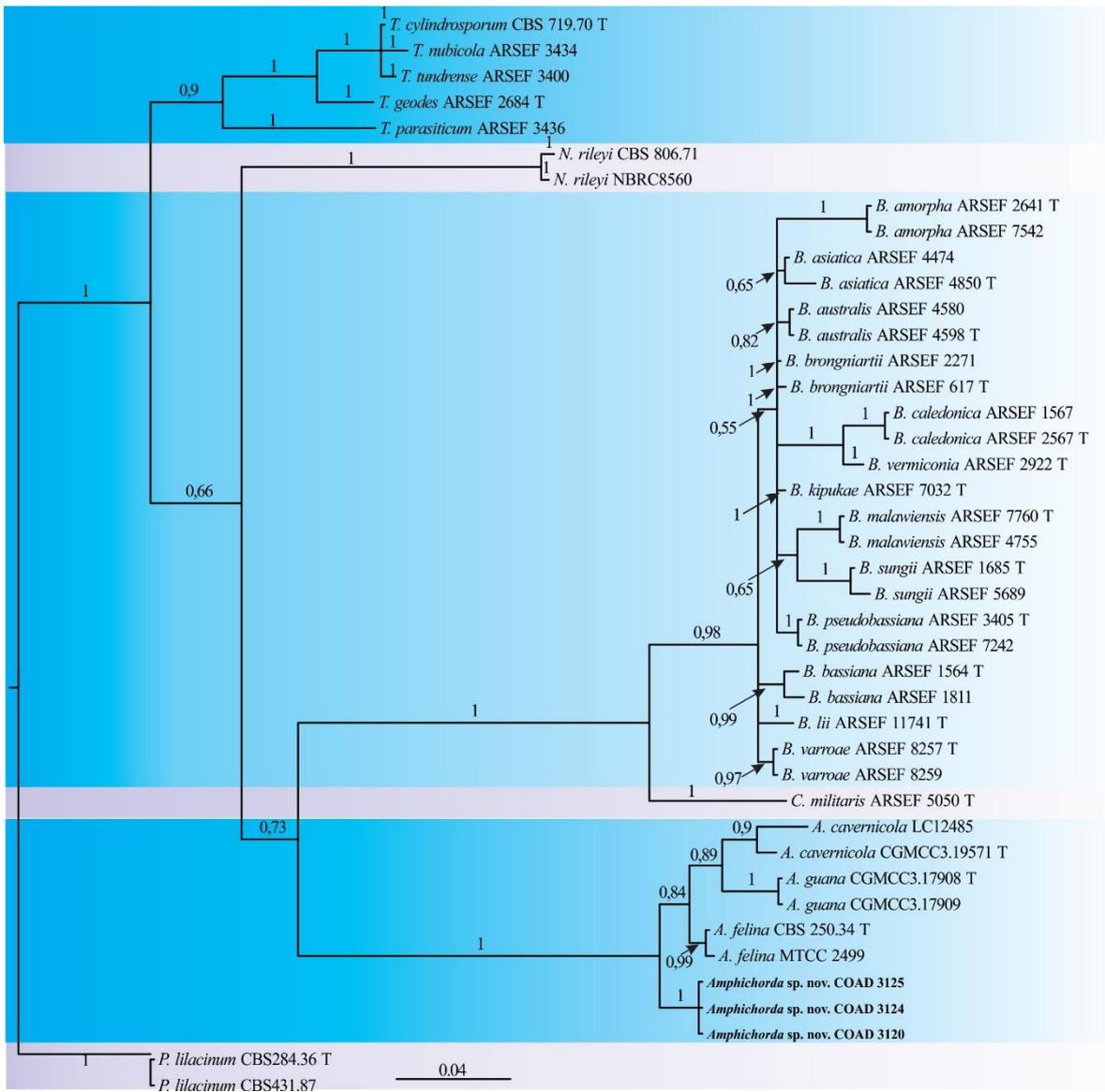
ZAMBOLIM, L.; PEREIRA, O.L. Isolamento de fungos. In: Zambolim, L.; Jesus Júnior, W.C.; Pereira, O.L. **O essencial da Fitopatologia**. Suprema Gráfica e Editora Ltda. Pp. 253-286, 2012.

ZHANG, Z. F.; LIU, F.; ZHOU, X.; LIU, X. Z.; LIU, S. J.; CAI, L.. Culturable mycobiota from Karst caves in China, with descriptions of 20 new species. **Persoonia**. v. 39, p.1–31, 2017. <https://doi.org/10.3767/persoonia.2017.39.01>

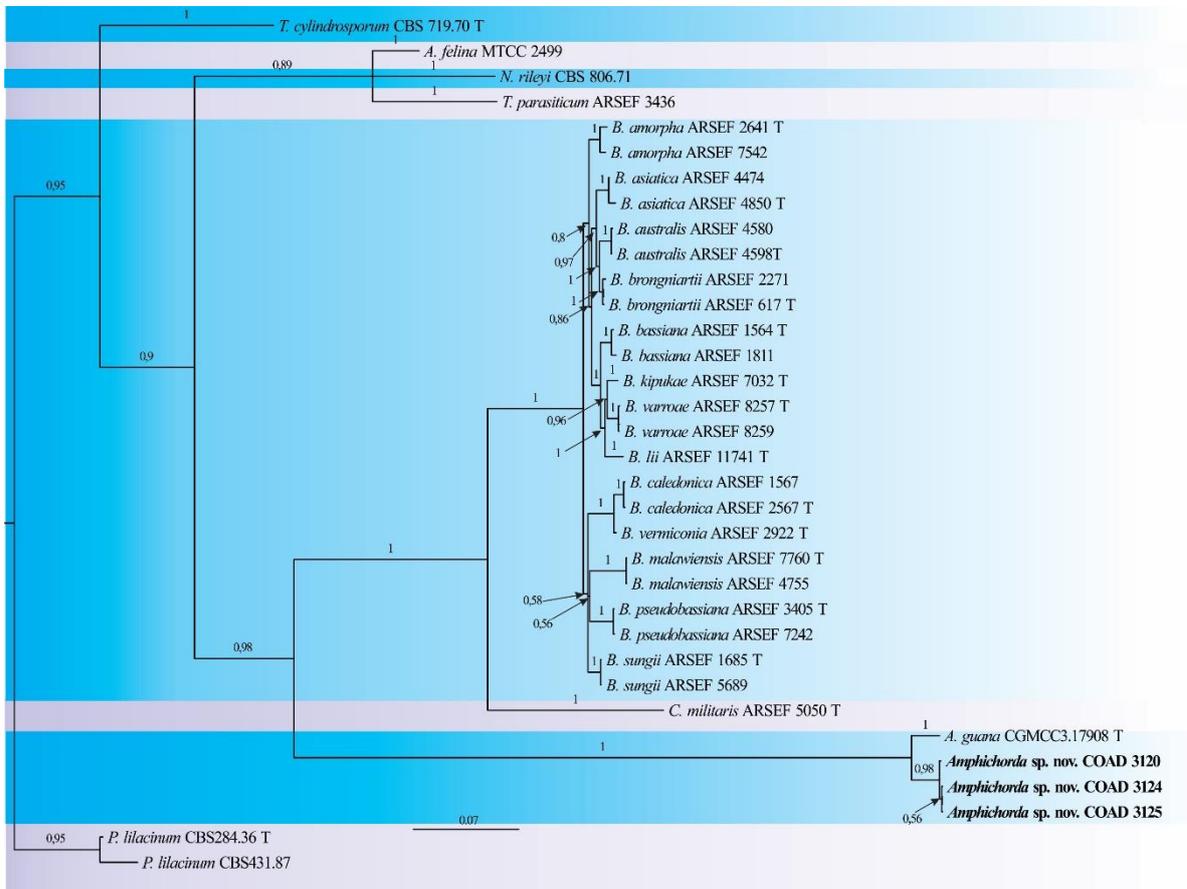
ZHANG, Z. F.; ZHOU, S. Y.; EURWILAICHITR, L.; INGSRISWANG, S.; RAZA, M.. Culturable mycobiota from Karst caves in China II, with descriptions of 33 new species. **Fungal Diversity**. Jul. 2020. <https://doi.org/10.1007/s13225-020-00453-7>

**ANEXOS**

Anexo A – Árvore filogenética obtida por Inferência Bayesiana dos isolados de Amphichorda, da região ITS. A árvore estava enraizada com *Parengyodontium lilacinum* (CBS284.36 T e CBS431.87) T= Material tipo.



Anexo B – Árvore filogenética obtida por Inferência Bayesiana dos isolados de Amphichorda, da região RPB2. A árvore estava enraizada com *Parengyodontium lilacinum* (CBS284.36 T e CBS431.87) T= Material tipo.



Anexo C – Árvore filogenética obtida por Inferência Bayesiana dos isolados de Amphichorda, da região TEF. A árvore estava enraizada com *Parengyodontium lilacinum* (CBS284.36 T e CBS431.87) T= Material tipo.

