



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE BIOCÊNCIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE FUNGOS

JORDANE PIMENTEL NÓBREGA

**MICROBIOTA DO SEDIMENTO DA CAVERNA VALE DA LUA, FLONA  
CARAJÁS-PA**

Recife  
2024

JORDANE PIMENTEL NÓBREGA

**MICROBIOTA DO SEDIMENTO DA CAVERNA VALE DA LUA, FLONA  
CARAJÁS-PA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Biologia de Fungos. Área de concentração: Taxonomia de Fungos.

Orientador (a): Prof. Dr. Roger Fagner Ribeiro Melo (UFPE)

Coorientador (a): Profa. Dra. Cristina Maria de Souza Motta (UFPE)

Recife

2024



JORDANE PIMENTEL NÓBREGA

**MICROBIOTA DO SEDIMENTO DA CAVERNA VALE DA LUA, FLONA  
CARAJÁS-PA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Biologia de Fungos. Área de concentração: Taxonomia de Fungos.

Aprovado em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cristina Maria de Souza Motta (Coorientadora)  
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

---

Prof. Dr. Alexandre Reis Machado (Examinador Interno)  
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vânia Aparecida Vicente (Examinador Externo)  
Universidade Federal do Paraná - UFPR

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente, agradeço a Deus por ter me permitido finalizar esta grande etapa da minha vida, dando saúde e forças para completar mais essa jornada. Agradeço a minha família, que mesmo estando distante em outra cidade, em cada momento não deixou de me apoiar, sempre estando ao meu lado nas horas mais difíceis e me recebendo com muito carinho toda vez que retornava.

Agradeço aos meus orientadores, Prof. Dr. Roger Melo e Prof.<sup>a</sup> Dra. Cristina Souza-Motta, que se dispuseram a me aceitar como aluna, me guiando neste trabalho e sempre se disponibilizando para minar minhas dúvidas e questões. Agradeço também a todos do Laboratório de Taxonomia e Biotecnologia Utilizando Fungos, do Departamento de Micologia/UFPE, os quais foram os primeiros a me acolher em uma cidade que era totalmente desconhecida para mim, e que sempre me auxiliaram quando eu buscava ajuda.

Deixo meus agradecimentos a todos os novos amigos que fiz nessa jornada em Recife, por todos os momentos que passamos juntos, sempre me alegrando nos dias mais difíceis e passando momentos comigo que sempre guardarei na memória. Também agradeço aos meus amigos em Manaus, que sempre proporcionaram momentos incríveis quando eu retornava.

Agradeço ao ICMBio pela bolsa concedida, possibilitando a realização deste trabalho em Recife, longe da minha cidade natal. Por fim, agradeço a todos os professores do Departamento de Micologia (UFPE) por disponibilizar diversos recursos, seja conhecimento ou material, que me ajudaram no crescimento tanto profissional quanto pessoal.

## RESUMO

Cavernas possuem características únicas, são afóticas, temperaturas são constantemente baixas, possuem alta umidade, e são ambientes oligotróficos. Mesmo sendo ambientes difíceis para organismos viverem, as cavernas abrigam uma grande diversidade fúngica que ainda é pouco conhecida. Inventários relacionados a essa temática ainda são escassos no Brasil, principalmente em cavernas na Floresta Amazônica, o que motiva a inventariar a micobiota associada ao sedimento de cavernas nesse ambiente. As coletas foram realizadas na caverna ferruginosa Vale da Lua (N4WS-0067), localizada na Floresta Nacional (FLONA) de Carajás/PA. Para o isolamento foi realizada uma diluição seriada do sedimento, e alíquotas de 1 mL (diluições  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$ ) foram semeadas na superfície dos meios de cultura Ágar Sabouraud Dextrose (SAB) e Brain Heart Infusion (BHI), adicionados de 100 mg/L de cloranfenicol, contidos em placas de Petri. As placas foram incubadas no escuro, por 7 dias, a 28 °C. Após o crescimento de unidades formadoras de colônias (UFCs), o material foi quantificado e os isolados fúngicos foram distinguidos por suas características fenotípicas. Os isolados foram identificados a partir de análises morfológicas e moleculares. Foram contabilizadas um total de 691 UFCs nas amostras analisadas e foram obtidos 123 isolados, dentre os quais foram agrupados em 11 gêneros e 31 espécies. *Penicillium*, *Blastobotrys* e *Trichoderma* foram os grupos com maior abundância. Grande parte das espécies identificadas pertencem ao filo Ascomycota (29), sendo *Penicillium* o gênero com mais táxons representados (11). Diversas espécies encontradas ainda não tinham sido observadas em cavernas no Brasil. Sete táxons (22%) estão sendo relatados pela primeira vez em ambientes subterrâneos em todo o mundo, além de 6 possíveis novas espécies do gênero de *Penicillium* da seção *Lanata-Divaricata*. Tais dados comprovam a existência de uma diversidade ainda desconhecida desses ambientes, contribuindo para estimativas fúngicas nacionais e globais. O estudo reforça a necessidade de políticas e práticas voltadas para a preservação e uso sustentável de cavernas da Amazônia.

**Palavras-chave:** cavidades naturais; fungos em cavernas; floresta tropical.

## ABSTRACT

Caves have unique characteristics, they are aphotic, temperatures are constantly low, they have high humidity, and they are oligotrophic environments. Even though they are difficult environments for organisms to live in, caves are home to a great diversity of fungi that is still little known. Inventories related to this topic are still scarce in Brazil, mainly in caves in the Amazon Rainforest, which motivates the need to inventory the mycobiota associated with cave sediments in this environment. The collections were carried out in the ferruginous cave Vale da Lua (N4WS-0067), located in the National Forest of Carajás/PA. For isolation, a serial dilution of the sediment was carried out, and 1 mL aliquots ( $10^{-2}$  and  $10^{-3}$  dilutions) were seeded on the surface of Sabouraud Dextrose Agar (SAB) and Brain Heart Infusion (BHI) culture media, added with 100 mg/L of chloramphenicol, contained in Petri dishes. The plates were incubated in the dark for 7 days at 28 °C. After the growth of colony-forming units (CFUs), the material was quantified and the fungal isolates were distinguished by their phenotypic characteristics. The isolates were identified based on morphological and molecular analyses. A total of 691 CFUs were recorded in the analyzed samples and 123 isolates were obtained, among which they were grouped into 11 genera and 31 species. *Penicillium*, *Blastobotrys* and *Trichoderma* were the groups with the greatest abundance. Most of the identified species belong to the phylum Ascomycota (29), with *Penicillium* being the genus with the most represented taxa (11). Several species found had not yet been observed in caves in Brazil. Seven taxa (22%) are being reported for the first time in underground environments worldwide, in addition to 6 possible new species of the genus *Penicillium* from the *Lanata-Divaricata* section. Such data prove the existence of a still unknown diversity in these environments, contributing to national and global fungal estimates. The study reinforces the need for policies and practices aimed at the preservation and sustainable use of caves in the Amazon.

**Keywords:** natural cavities; fungi in caves; tropical forest.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Representação esquemática das zonas em cavernas terrestres (A) e submarinas (B). 1 – zona de entrada, 2 – zona de penumbra, 3 – zona de transição, 4 – zona profunda.	15
Figura 2 –	Áreas com potencial para ocorrência de cavernas, cavernas já cadastradas no CANIE até 2018 e algumas das principais áreas espeleológicas do Brasil.	17
Figura 3 –	Localização geográfica dos biomas brasileiros.	20
Figura 4 –	Localização geográfica da Floresta Nacional de Carajás.	22
Figura 5 –	Caverna Vale da Lua (N4WS-0067) na Floresta Nacional (FLONA) de Carajás, no Pará, Brasil. Vista de fora da entrada da caverna (A); Coleta do sedimento no ponto de amostragem 1 (B); Vista do interior da caverna dos pontos de amostragem 2 (C) e 3 (D).	27
Figura 6 –	Mapa da caverna Vale da Lua com os pontos de coleta.	28
Figura 7 –	Metodologia aplicada para isolamento de fungos de sedimento de caverna. Técnica de diluição seriada: suspensão de amostras do sedimento em água destilada (A) e plaqueamento das diluições em meio SAB e BHI (C); Isolamento por meio da técnica de câmara úmida (B); Contagem de Unidades Formadoras de Colônias - UFC (D).	29
Figura 8 –	Árvore de máxima verossimilhança obtida utilizando sequências de $\beta$ -tubulina (BenA) e calmodulina (CaM) de representantes de gêneros de Eurotiales isolados do sedimento da caverna Vale da Lua - PA. Valores de suporte maiores que 80% são mostrados próximo de nós. Sequências de culturas tipos estão indicadas por T. Isolados obtidos neste estudo estão na cor verde. A espécie <i>Penicillago nodositata</i> foi utilizada como grupo externo.	34
Figura 9 –	Árvore de máxima verossimilhança obtida utilizando sequências de ITS do rDNA de representantes de Ascomycota e Basidiomycota isolados do sedimento da caverna Vale da Lua - PA. Valores de suporte maiores que 80% são mostrados próximo	36

de nós. Sequências de culturas tipos estão indicadas por T. Isolados obtidos neste estudo estão na cor verde. A espécie *Saitozyma podzolica* (Basidiomycota) foi utilizada como grupo externo.

- Figura 10 – Riqueza de fungos obtida por meio de diferentes técnicas de isolamento em sedimento de caverna. 38
- Figura 11 – Características morfológicas de *Penicillium* sp. 1, cultura URM 8916. Culturas com 7 dias de crescimento em CYA, MEA, YES (verso e reverso), OA e CREA (A). Conidióforos (B-E). Conídios (F). Barras: B-E = 10  $\mu$ m; F = 5  $\mu$ m. 41
- Figura 12 – Características morfológicas de *Penicillium* sp. 2, cultura URM 8917. Culturas com 7 dias de crescimento em CYA, MEA, YES (verso e reverso), OA e CREA (A). Conidióforos (B-E). Conídios (F). Barras: B-F = 10  $\mu$ m; 44
- Figura 13 – Características morfológicas de *Penicillium* sp. 3, cultura URM 8918. Culturas com 7 dias de crescimento em CYA, MEA, YES (verso e reverso), OA e CREA (A). Conidióforos (B-D). Esclerócio (E). Conídios (F). Barras: B-D = 10  $\mu$ m; E = 25  $\mu$ m; F = 5  $\mu$ m. 47
- Figura 14 – Características morfológicas de *Penicillium* sp. 4, cultura URM 8919. Culturas com 7 dias de crescimento em CYA, MEA, YES (verso e reverso), OA e CREA (A). Conidióforos (B-D). Esclerócio (E). Conídios (F). Barras: B-D = 10  $\mu$ m; E = 25  $\mu$ m; F = 5  $\mu$ m. 50
- Figura 15 – Características morfológicas de *Penicillium* sp. 5, isolado SJ79. Culturas com 7 dias de crescimento em CYA, MEA, YES e CZ (verso e reverso) (A). Conidióforos (B-D). Esclerócio (E). Conídios (F). Barras: B-E = 10  $\mu$ m; F = 5  $\mu$ m. 53
- Figura 16 – Características morfológicas de *Penicillium* sp. 6, cultura URM 8920. Culturas com 7 dias de crescimento em CYA, MEA, YES (verso e reverso), OA e CREA (A). Conidióforos (B-D). Esclerócio (E). Conídios (F). Barras: B-F = 10  $\mu$ m; 56

Gráfico 1 – Abundância de fungos (UFC) observada no sedimento da 32  
caverna Vale da Lua, no Pará, Brasil.

Gráfico 2 – Abundância absoluta (UFCs) de gêneros de fungos isolados do 38  
sedimento da caverna Vale da Lua, no Pará, Brasil.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Lista de estudos sobre a micobiota de cavernas no Brasil	25
Tabela 2 – Lista de espécies de fungos isolados do sedimento da caverna Vale da Lua, no Pará, Brasil	33

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>12</b>
<b>2</b>	<b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b>	<b>14</b>
2.1	CAVERNAS	14
2.1.1	<b>Cavernas no Brasil</b>	<b>16</b>
2.1.2	<b>Espeleoturismo</b>	<b>18</b>
2.2	BIOMA AMAZÔNIA	19
2.2.1	<b>Floresta Nacional de Carajás</b>	<b>21</b>
2.3	FUNGOS	22
2.3.1	<b>Fungos em cavernas</b>	<b>23</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>26</b>
3.1	GERAL	26
3.2	ESPECÍFICOS	26
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>27</b>
4.1	ÁREA DE ESTUDO	27
4.2	COLETA DE AMOSTRAS	28
4.3	ISOLAMENTO DE FUNGOS DO SEDIMENTO	38
4.4	IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA	30
4.5	IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR	30
4.5.1	<b>Coleta de micélio e extração do DNA</b>	<b>30</b>
4.5.2	<b>Amplificação e sequenciamento de regiões específicas do DNA</b>	<b>30</b>
4.5.3	<b>Análise filogenética</b>	<b>31</b>
4.6	DEPÓSITO DOS ISOLADOS	31
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>32</b>
<b>6</b>	<b>TAXONOMIA</b>	<b>39</b>
<b>7</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>57</b>
6.1	ABUNDÂNCIA DE FUNGOS EM CAVERNAS	57
6.2	RIQUEZA DE FUNGOS EM CAVERNAS	58
6.3	FUNGOS PATOGÊNICOS E OPORTUNISTAS	60
6.4	NOVOS RELATOS DE ESPÉCIES FÚNGICAS EM CAVERNAS	61
<b>7</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>63</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>64</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Cavernas são ambientes escuros com pouca variação de temperatura, alta umidade e devido à ausência de luz, há uma escassez de matéria orgânica proveniente do processo de fotossíntese, e os poucos nutrientes existentes são carregados para o interior da caverna por meio do fluxo da água ou trazidos por animais (MAN *et al.* 2015). Por conta desses fatores, as cavernas são consideradas ambientes extremos e difíceis para organismos viverem, o que contribui para a formação de uma microbiota com características metabólicas e funções ecológicas específicas para esse tipo de ambiente (ZHANG, ZHAO & CAI, 2018).

Atualmente mais de 23.000 cavernas estão registradas no cadastro federal brasileiro, entretanto, é estimado que mais de 300.000 cavernas existam no Brasil e que ainda não foram identificadas, indicando o potencial espeleológico do Brasil (PILÓ & AULER, 2019; CECAV, 2023). Essas cavernas não só fornecem importantes registros fossilíferos, também abrigam diversos seres vivos, alguns com elevado grau de endemismo, os quais, em geral, são pouco tolerantes a fatores de estresse, além de serem dependentes de nutrientes importados do meio externo (ICMBIO, 2019). Dentre os diversos grupos taxonômicos presentes em cavernas, há animais como insetos, aracnídeos, morcegos, peixes, e principalmente microrganismos, como fungos (KOSZNIK-KWÁSNICKA *et al.* 2022).

Fungos são conhecidos principalmente pelo seu papel ecológico, sendo responsáveis pela decomposição e ciclagem de nutrientes, além de formar associações com outros organismos e causar parasitismo em animais e plantas (GARCÍA *et al.* 2012). Em ambientes cavernícolas, os fungos são dominantes devido à sua alta taxa de dispersão, sobrevivência de esporos e melhor capacidade de colonização (PAULA *et al.* 2016), sendo relatados em todos os nichos do ambiente cavernícola, como o ar, rocha, sedimentos, solo, água, guano, matéria orgânica e na biota presente na caverna (SAIZ-JIMENEZ, 2012). Os fungos desempenham um papel importante em comunidades cavernícolas, pois, juntamente com as bactérias, são as principais fontes de nutrientes para protozoários e invertebrados não predadores (VANDERWOLF *et al.* 2013).

Em uma revisão mundial realizada por Zhang *et al.* (2021), foram listadas 1923 espécies de fungos encontrados em cavernas, sendo grande pertencente ao filo Ascomycota (76%), seguido por Basidiomycota (17%) e outros. Os escassos

trabalhos para o Brasil sobre a microbiota cavernícola demonstram um potencial para a existência de uma diversidade ainda desconhecida desses ambientes. Cunha *et al.* (2020) relataram a presença de cerca de 1.500 UFCs obtidas do ar, guano e corpo de morcegos em uma *bat cave* de Caatinga e identificaram 59 táxons pertencentes a 37 gêneros.

Outro estudo que mostra tal potencial de biodiversidade em cavernas brasileiras é de Pereira *et al.* (2022) que relataram a presença de oito espécies de *Cladosporium* em cavernas de Unidades de Conservação da Caatinga, sendo duas novas para a ciência. Apesar de muitos estudos estarem relacionados a fungos patogênicos encontrados em cavernas, como *Histoplasma capsulatum* (VANDERWOLF *et al.* 2013), fungos cavernícolas também podem apresentar potencial biotecnológico, como fonte de enzimas de interesse industrial ou com atividade antimicrobiana (MARQUES *et al.* 2015).

Estudos em ambientes hipógeos na Amazônia são raros, tendo apenas uma pesquisa realizada em uma caverna no Amazonas, onde foi relatado o primeiro registo do dermatófito *Microsporium amazonicum* em solo (CASTRILLÓN *et al.* 1976). E até o presente momento não é conhecida a existência de estudos relatando a microbiota de cavernas no Pará, mesmo o estado tendo o maior quantitativo de cavernas registradas na região Norte (CECAV, 2023).

A escassez no conhecimento da diversidade fúngica desses ambientes no Brasil é um dos fatores que motivam a realizar estudos que contribuam para o inventário de espécies de fungos presentes em cavernas, além do fornecimento de informações que contribuirão diretamente como subsídios para o manejo espeleoturístico (a partir do relato de espécies potencialmente ou reconhecidamente patogênicas). As cavidades ferruginosas que são encontradas na Floresta Nacional (FLONA) de Carajás possuem um potencial de serem descobertas como um *hotspot* não só da diversidade da fauna e flora (ICMBIO, 2017), mas também da diversidade de fungos na Amazônia brasileira.

## 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 CAVERNAS

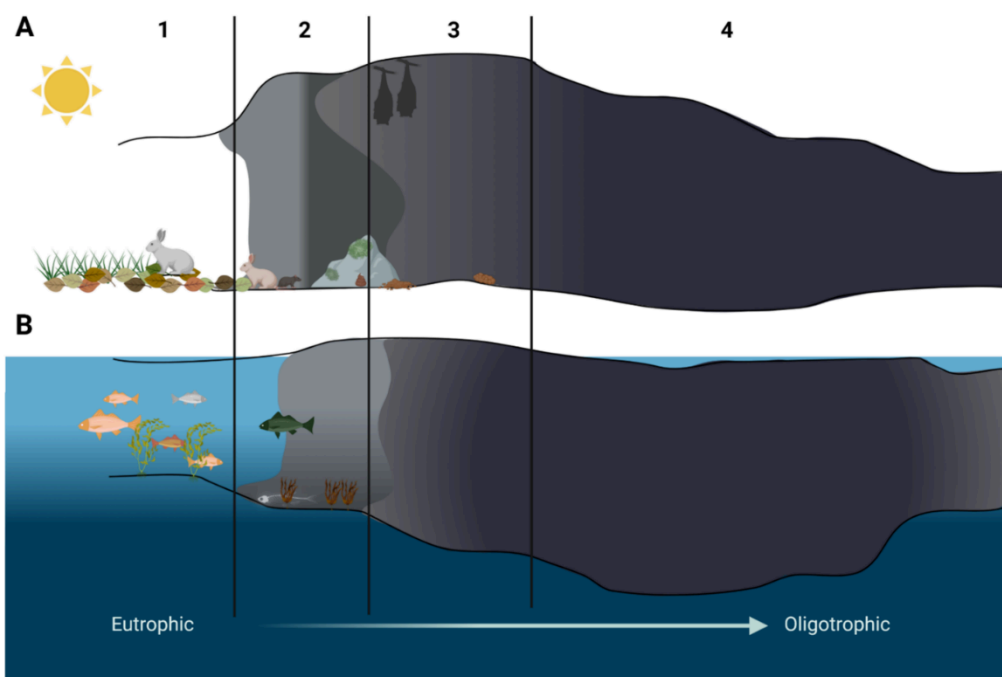
Cavernas são cavidades subterrâneas formadas por processos naturais e devem ter uma entrada grande o suficiente para um ser humano conseguir entrar, seja essa abertura identificada ou não. Este é o conceito oficial baseado na legislação brasileira (Decreto Federal nº 6.640, de 7/11/2008), o qual é utilizado por diversas instituições nacionais de espeleologia, apesar de ter um viés antropocêntrico. Cavernas também podem ser conhecidas por outros nomes, como gruta, lapa, toca, abismo, furna ou buraco (BRASIL, 2008).

Grande parte das cavernas conhecidas no mundo são formadas em rochas carbonáticas, como mármores e calcários. Esse tipo de caverna se forma por meio de infiltração da água na rocha que, ao reagir com dióxido de carbono, acaba produzindo ácido carbônico, o qual permite a dissolução da rocha, formando rachaduras que com o tempo aumentam até formar a caverna (CHEEPTHAM, 2012). Outros tipos de rochas são também muito susceptíveis à formação de cavernas, como arenitos, quartzitos e formações ferríferas (PILÓ & AULER, 2019).

Entretanto, grutas também podem ser originadas de outras formas, como cavernas de lava vulcânica, formadas durante a erupção de vulcões após o resfriamento e solidificação da lava, ou grutas resultantes da erosão das ondas do mar nas rochas costeiras, originando abrigos e cavernas marinhas (KOSZNIK-KWÁSNICKA *et al.* 2022). Ambos os tipos de caverna são consideradas pseudocársticas, pois não foram originadas por meio do processo de interação entre a rocha solúvel e diferentes tipos de água (ENGEL, 2010).

Dependendo da estrutura, cavernas podem ser divididas em quatro áreas principais: (1) zona de entrada, área diretamente abaixo da entrada da caverna, onde a luz solar brilha regularmente; (2) zona de penumbra, onde a luz começa a diminuir, mas ainda podem estar presentes pequenas vegetações; (3) zona de transição, que recebe quase nenhuma luz; (4) zona profunda, a última e mais profunda zona da caverna, é totalmente afótica, nesta área a temperatura e umidade oscilam muito pouco, e praticamente não há influência das condições do meio externo (Figura 1) (CHEEPTHAM, 2012; KOSZNIK-KWÁSNICKA *et al.* 2022).

Figura 1 – Representação esquemática das zonas em cavernas terrestres (A) e submarinas (B). 1 – zona de entrada, 2 – zona de penumbra, 3 – zona de transição, 4 – zona profunda.



Fonte: Kosznik-Kwásnicka *et al.* (2022).

A disponibilidade de luz influencia na quantidade de nutrientes disponíveis, pois grande parte da matéria orgânica é proveniente do processo de fotossíntese, e à medida que a quantidade de luz diminui, o local vai se tornando mais oligotrófico (KOSZNIK-KWÁSZNICKA *et al.* 2022). Zonas mais internas dependem praticamente dos nutrientes que são carregados para o interior da caverna por meio do fluxo da água, do ar, ou trazidos por animais, tornando esses ambientes extremos e difíceis para organismos viverem, o que contribui para a presença de formas de vida com metabolismo e funções ecológicas específicas (ZHANG, ZHAO & CAI, 2018).

Organismos capazes de viver nesses ambientes hipógeos, que uma vez se isolaram da superfície e se especializaram a ponto de se tornarem incapazes de retornar à vida epígea de seus ancestrais são chamados troglóbios ou cavernícolas obrigatórios (CULVER & PIPAN, 2009). Seres desse tipo geralmente apresentam características morfológicas (como redução da pigmentação melânica e dos órgãos visuais), fisiológicas (redução de consumo de energia, maior resistência à fome), e/ou comportamentais (baixa atividade de movimento) diferenciadas de organismos do meio epígeo (WHITE & CULVER, 2011). Espécies facultativas que conseguem

viver e completar seu ciclo de vida tanto em cavernas como no meio externo são denominadas troglófilas (TRAJANO & BESSI, 2017).

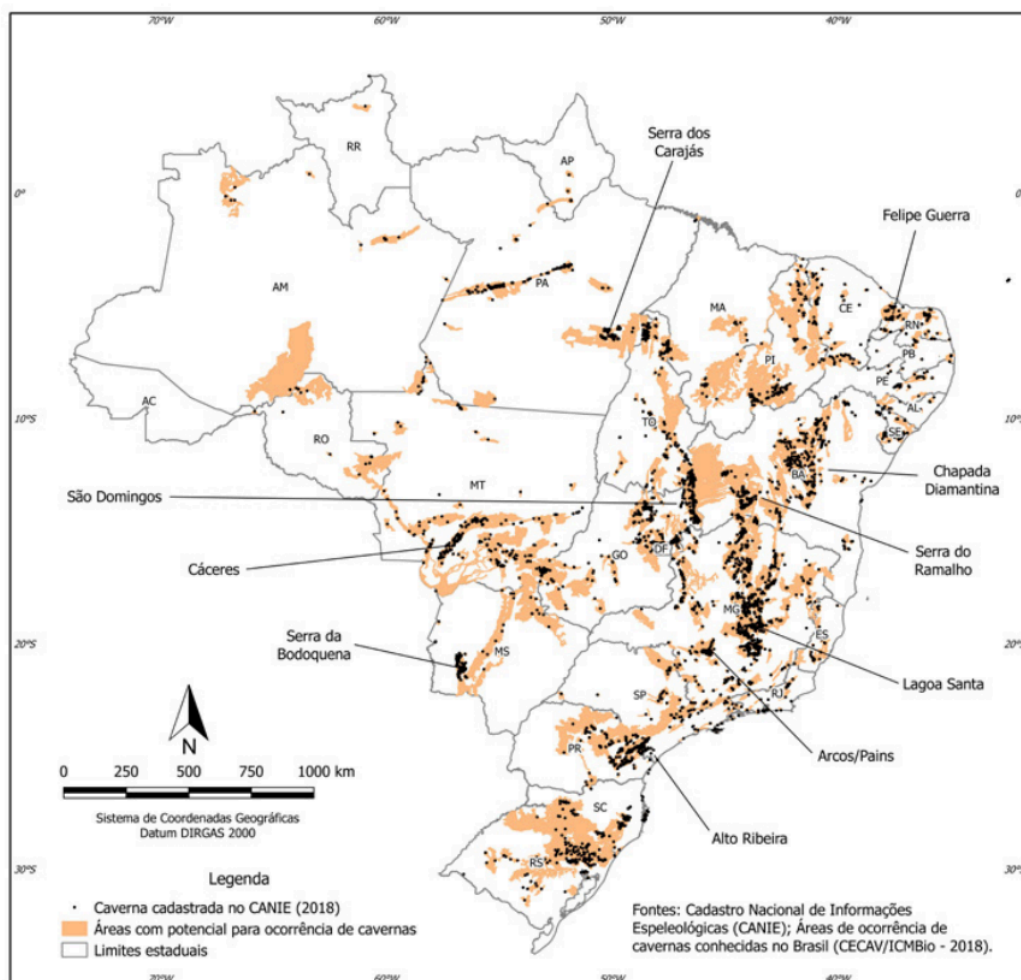
Em grutas há também os organismos considerados troglóxenos, seres que são frequentemente encontrados no ambiente subterrâneo, mas que saem regularmente do local para se alimentar (CULVER & PIPAN, 2019). Tais seres geralmente ocorrem nas proximidades das entradas das cavernas, como nas zonas de entrada e de penumbra, porém, eventualmente populações de troglóxenos podem ocorrer em locais mais distantes das entradas (TRAJANO & BESSI, 2017). Muitos destes organismos atuam como veículos de matéria orgânica do meio epígeo para o interior das cavernas, seja na forma de fezes ou restos de alimentos, e muitas vezes são os principais responsáveis pela base que sustentam as teias alimentares em sistemas cavernícolas (WHITE & CULVER, 2011).

### **2.1.1 Cavernas no Brasil**

Atualmente, mais de 23.000 cavernas estão registradas no cadastro federal brasileiro, podendo ser encontradas em todos os estados e o Distrito Federal, entretanto, é estimado que mais de 300.000 cavernas existam no território brasileiro e que ainda não foram registradas, indicando que menos de 8% das cavernas existentes no Brasil foram identificadas (PILÓ & AULER, 2019; CECAV, 2023) (Figura 2). Mais da metade das cavernas brasileiras estão formadas em rochas carbonáticas, seguidas por formações em rochas siliciclásticas e ferruginosas (CECAV, 2023).

Entre os estados brasileiros, Minas Gerais possui o maior número de cavernas conhecidas, com 10.570 (46,72%), seguido pelo Pará com 2.858 (12,63%), Bahia com 1.694 (7,49%), Rio Grande do Norte com 1.362 (6,02%), e Goiás com 1092 cavernas (4,67%) (CECAV, 2023). Minas Gerais apresenta um número significativo de cavernas por conta da ocorrência de calcários e dolomitos do Grupo Bambuí, e são rochas favoráveis à formação de cavernas que se desenvolvem desde o sul de Minas Gerais até o centro-oeste da Bahia, passando também pelo leste de Goiás (PILÓ & AULER, 2019).

Figura 2 – Áreas com potencial para ocorrência de cavernas, cavernas já cadastradas no CANIE até 2018 e algumas das principais áreas espeleológicas do Brasil.



Fonte: CECAV/ICMBio (2018).

Já o estado do Pará detém o segundo maior quantitativo de cavernas, região em que estão grande parte das cavidades naturais subterrâneas ferruginosas encontradas em ecossistemas de crostas ferríferas superficiais (chamada canga), especialmente na região da Serra dos Carajás, no sudeste do Pará (SKIRYCZ *et al.* 2014). Tais coberturas de canga recobrem principalmente rochas ferríferas arqueanas, pertencentes à Formação Carajás (Grupo Grão-Pará), e como nessa região há uma das maiores reservas de minério de ferro do mundo, atividades de mineração são recorrentes na região (PILÓ & AULER, 2009).

Grande parte das cavernas da região de Carajás estão formadas em dois tipos de rochas: formações ferríferas bandadas (itabiritos e principalmente jaspelitos), e a canga detrítica constituída por fragmentos de rochas de minério de ferro (PILÓ & AULER, 2009). A maioria das cavernas são de pequenas dimensões,

cavidades com projeções horizontais a 100 m são menos frequentes, e em relação aos padrões de cavernas existentes, dois tipos são encontrados: cavernas de câmaras irregulares e cavernas retilíneas (PILÓ & AULER, 2009).

### **2.1.2 Espeleoturismo**

O ambiente subterrâneo chama atenção por seu interesse espeleológico e turismo, tendo em vista as suas características geológicas, climáticas e bióticas diferenciadas do meio externo, e o espeleoturismo busca atividades voltadas para visita às cavernas com finalidade recreativa e turística (LOBO *et al.* 2008). Existem milhares de grutas turísticas pelo mundo, algumas delas chegam a receber mais de 50.000 visitantes por ano, e são um recurso socioeconômico significativo, revitalizando a economia local de muitas comunidades que vivem do espeleoturismo (ARAÚJO, 2019).

A legislação brasileira dá suporte para o uso turístico das grutas, porém também destaca o dever de proteger as cavidades naturais subterrâneas existentes no território nacional (BRASIL, 1990). Tais premissas são reforçadas com a Resolução 347/2004 do CONAMA que dispõe sobre a proteção do patrimônio espeleológico, e considera a necessidade de licenciamento ambiental para empreendimentos em áreas com ocorrência de cavidades naturais e o princípio da precaução na gestão das mesmas, além disso, afirma que os empreendimentos turísticos que utilizem o patrimônio espeleológico deverão elaborar e respeitar o Plano de Manejo Espeleológico (BRASIL, 2004).

No plano de manejo espeleológico, o órgão licenciador deve considerar vários fatores que podem causar impactos no patrimônio espeleológico, e para isso, deve-se conhecer diversos aspectos da caverna, como dimensões, morfologia, características geológicas, geomorfológicas e mineralógicas, existência de recursos hídricos, a diversidade biológica do local e se há ecossistemas frágeis ou espécies endêmicas, raras ou ameaçadas de extinção, além disso, deve ser determinado a ocorrência de vestígios arqueológicos e paleontológicos, e a relevância histórico-cultural ou socioeconômica na região (BRASIL, 2004).

No Brasil há muitas cavernas que são abertas à visitação, e em um levantamento preliminar, chega ao número de 175 grutas conhecidas que são visitadas (LOBO *et al.* 2008), entretanto, muitas delas não são oficialmente

turísticas, pois não possuem planos de manejo e instrumentos legais que orientem a visitação, isto é, não passaram por nenhum processo de avaliação e licenciamento ambiental, conforme determina a legislação vigente no país (ARAÚJO, 2019).

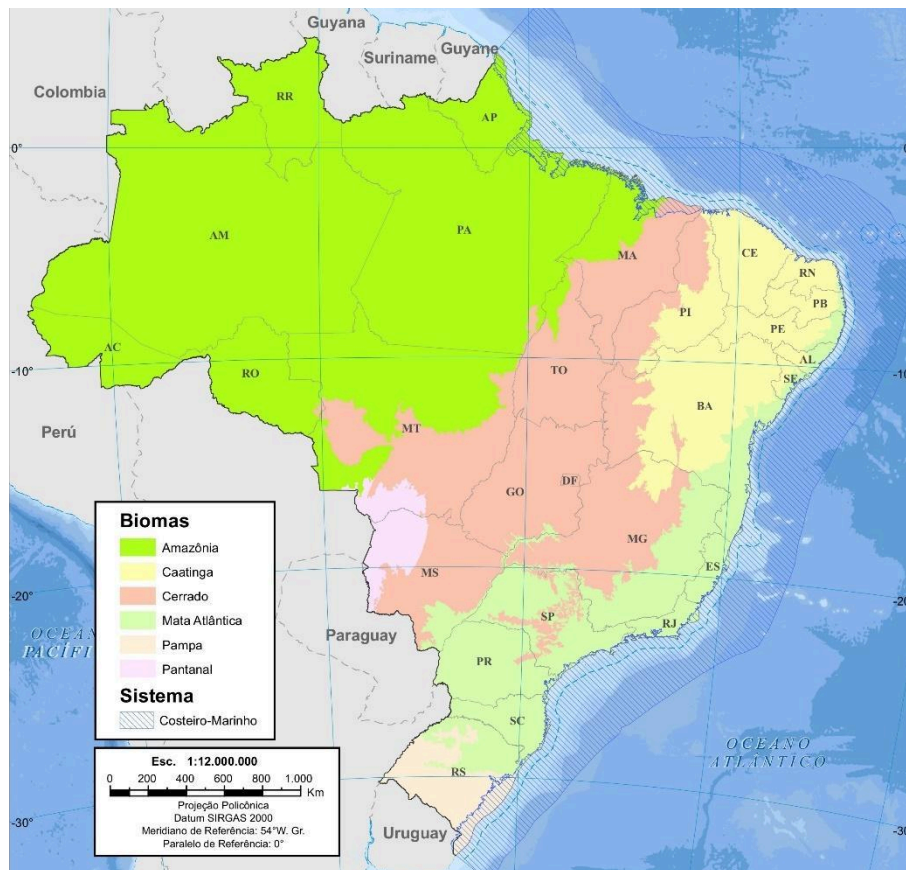
O uso de cavidades naturais sem o devido controle pode ocasionar diversos tipos de impactos ambientais negativos, seja na própria geologia da caverna ou na biota presente nessas cavernas, visto que tais ambientes são muito frágeis. Rotas de drenagem subterrânea susceptíveis às alterações ambientais potencializam a propagação de poluentes, e a biota desses ambientes em geral, principalmente seres troglóbios, são pouco tolerantes a fatores de estresse devido ao elevado grau de endemismo (CRUZ & PILÓ, 2019).

## 2.2 BIOMA AMAZÔNIA

A Amazônia é uma das maiores florestas tropicais do mundo, tem como característica principal a presença de florestas sempre verdes, densas e exuberantes devido ao clima tropical, alta umidade e quantidade de água disponível (PUIG, 2008). O bioma amazônico ocupa cerca de 49% do território brasileiro, abrangendo os estados do Acre, Amapá, Amazonas, Pará, Rondônia, Roraima e parte dos estados do Maranhão, Tocantins e Mato Grosso, além de se estender por mais oito países da América do Sul (IBGE, 2023).

Apesar de suas características marcantes, o bioma não se constitui de apenas um tipo de vegetação, visto que a Amazônia é extensa e com vários tipos de paisagens. Além da floresta densa típica encontrada em solos argilosos, há também florestas sobre solos arenosos (campinarana), florestas sobre solos hidromórficos (florestas de baixio), formações arbustivas sobre solos arenosos (campina), e as vegetações que são inundáveis periodicamente pelos rios, chamadas várzea e igapós (PIRES & PRANCE, 1985).

Figura 3 – Localização geográfica dos biomas brasileiros.



Fonte: IBGE (2023).

Considerado o bioma com a maior biodiversidade do planeta, a Amazônia abriga um número significativo de espécies da fauna e flora existentes no Brasil, como 73% das espécies de mamíferos e 80% das aves (CTFB, 2021). Além da diversidade biológica, a Amazônia também abriga uma riqueza cultural significativa, tendo em vista que a região é habitada por comunidades locais, incluindo povos indígenas, que detêm do conhecimento tradicional sobre o uso dos recursos naturais do ambiente (IBGE, 2023).

Com seus enormes rios, a Amazônia contém 20% da disponibilidade mundial de água doce (IBGE, 2023), e a vasta floresta também exerce uma influência significativa nas chuvas de outras regiões do Brasil, visto que a grande quantidade de vapor d'água que são liberados por evapotranspiração pela vegetação se condensa nas nuvens, formando os chamados "rios aéreos" (massas de ar) que acabam sendo transportados pelas correntes de ar, e fornecem chuvas para outras regiões do Brasil e para outros países do continente (ARRAUT *et al.* 2012).

Outro importante papel que as extensas florestas amazônicas possuem é como estoque de carbono, armazenando cerca de 70 bilhões de toneladas, quantidade maior da que existe atualmente na atmosfera, e a perda progressiva desta cobertura florestal acarreta o aumento da quantidade de CO<sub>2</sub> na atmosfera, agravando os problemas climáticos não só regionais como globais também (MARENGO & ESPINOZA, 2016).

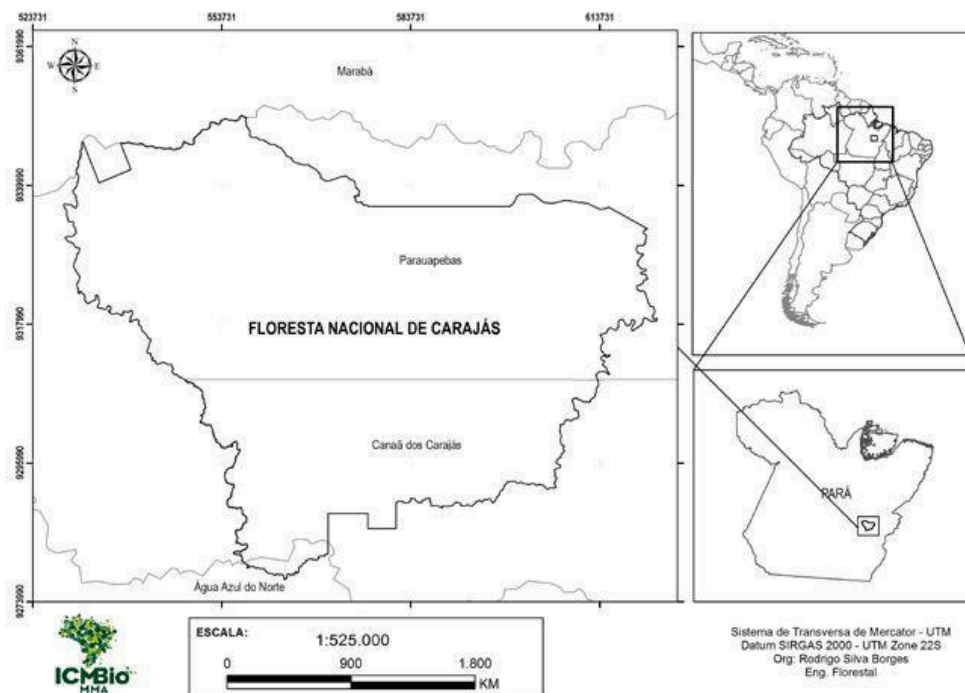
### **2.2.1 Floresta Nacional de Carajás**

A Amazônia também possui grandes reservas minerais, destacando-se a região de Carajás no Pará, onde se encontra uma das maiores reservas de minério de ferro do mundo, a qual é explorada há décadas e onde são esgotados os recursos, além da floresta ser degradada (SILVA, 2014). Por esse motivo foi criada a Floresta Nacional (FLONA) de Carajás, com o intuito inicial de ser apenas uma área livre de continuidade da atividade de mineração, porém com o tempo, as florestas nacionais passaram a ter um papel mais explícito na conservação da biodiversidade, com ênfase em métodos para exploração sustentável (ICMBIO, 2017).

A FLONA de Carajás, uma Unidade de Conservação de uso sustentável e uma das principais UC's pertencentes ao mosaico da Serra dos Carajás/PA, é localizada em partes dos municípios de Parauapebas, Canaã dos Carajás e Água Azul do Norte (Figura 4) (ICMBIO, 2017). Como a UC se encontra inserida no bioma amazônico, há predomínio de Floresta Ombrófila Aberta, Floresta Ombrófila Densa e Campo Rupestre Ferruginoso (ICMBIO, 2016).

A região é reconhecida como uma área de elevada biodiversidade, com espécies animais e vegetais raras e/ou restritas ao local, como vegetação herbácea-arbustiva associada às áreas sobre canga, animais troglóbios raros, além de registros paleoambientais e arqueológicos presentes nas cavernas (ICMBIO, 2017), podendo abrigar também uma diversidade fúngica ainda desconhecida. E sendo uma região com atividade contínua de mineração, os impactos sobre os ecossistemas cavernícolas devem ser considerados, e para isso é necessário realizar o levantamento de aspectos tanto físicos quanto biológicos das cavernas da região (ICMBIO, 2017).

Figura 4 – Localização geográfica da Floresta Nacional de Carajás.



Fonte: ICMBio (2017).

### 2.3 FUNGOS

Fungos são organismos eucariontes, podem ser unicelulares (leveduras) ou multicelulares (filamentosos), possuem parede celular em que o principal componente é o polissacarídeo quitina, não possuem organelas clorofiladas e por isso são heterotróficos, absorvem os nutrientes necessários por fagocitose por meio de exoenzimas que são liberadas no meio externo e realizam a digestão extracelular (WEBSTER & WEBER, 2007). Em sua maioria são aeróbios estritos, e podem se reproduzir tanto de forma assexuada quanto sexuada (KENDRICK, 2017).

Quanto a classificação, o reino Fungi por muitos anos foi subdividido em quatro filos: Chytridiomycota (fungos aquáticos), Zygomycota (fungos zigospóricos), Ascomycota e Basidiomycota. Porém, com o avanço da biologia molecular e das análises filogenéticas, percebeu-se que muitos desses filos, principalmente os mais basais, eram polifiléticos e não naturais (GARCÍA *et al.* 2012). Em últimas revisões de sistemática e classificação, propõe-se a subdivisão do reino dos fungos em 19 filos (WIJAYAWARDENE *et al.* 2020).

Tal grupo de organismos realiza papéis ecológicos extremamente importantes nos ecossistemas, atuando na ciclagem de nutrientes como decompositores, sendo

conhecidos como sapróbios (WEBSTER & WEBER, 2007). Também podem atuar como seres simbiotes, podendo ser mutualistas (ex. líquens, micorrizas ou endofíticos) comensais ou parasitas, causando doenças em plantas (fungos fitopatogênicos), animais e nos seres humanos (micoses) (GARCÍA *et al.* 2012).

Estes organismos também são utilizados pelos humanos em diversas áreas, como a alimentícia, sendo aplicados na produção de cerveja, vinho, pão, alguns tipos de queijos, molho de soja, ou sendo consumidos diretamente como ingredientes (KENDRICK, 2017). As enzimas produzidas também são aplicadas na fabricação de fármacos como antibióticos, e no setor agrícola, fungos entomopatogênicos são usados como controles biológicos de pragas (TEIXEIRA *et al.* 2011). Em biorremediação de solos e águas contaminadas, os fungos são utilizados na restauração de áreas desmatadas e atuam como biofertilizantes, ou degradam compostos poluentes (TEIXEIRA *et al.* 2011).

Fungos podem ser encontrados praticamente em todo o mundo, tanto no solo ou em ambientes aquáticos, sendo considerados cosmopolitas, e as duas principais razões para essa ampla presença são os esporos e as hifas (KENDRICK, 2017). Os esporos permitem uma dispersão rápida, podendo ser transportados pelo ar, água ou animais, sendo produzidos em grande quantidade e em um curto período. As hifas, com seu padrão de crescimento apical e ramificado junto às enzimas digestivas que secretam no meio externo, possibilitam penetrar e explorar de forma completa e íntima os substratos disponíveis (KENDRICK, 2017).

São conhecidas mais de 140.000 espécies fúngicas pelo mundo, e a cada ano centenas de espécies novas são descritas, entretanto, estipula-se que o número real de espécies existentes seja na verdade mais de um 1,5 milhões (HAWKSWORTH & LÜCKING, 2017; XU, 2020). Isso indica que os fungos são um dos grupos de seres vivos com a biodiversidade menos explorada no planeta, e mesmo com as novas técnicas de sequenciamento revelando diversas espécies crípticas, ainda há locais e ambientes pouco estudados (KENDRICK, 2017).

### **2.3.1 Fungos em cavernas**

As cavernas apresentam poucos fatores favoráveis para organismos conseguirem viver, apesar disso, os fungos são facilmente encontrados nesses ambientes. Assim como os demais microrganismos, os fungos desempenham

papéis importantes na regulação dos ciclos biogeoquímicos da caverna, participam da ciclagem de nutrientes, na biomineralização de compostos, na formação de espeleotemas e sedimentos, além de serem fontes de recursos orgânicos para outros organismos cavernícolas (NOVÁKOVÁ, 2009; GABRIEL & NORTHUP 2013). A maioria das espécies de fungos encontradas em cavernas são trazidas de fora, isto é, os esporos e outros propágulos são carregados pelo vento, água, ou outros animais que entram e saem constantemente (OGÓREK *et al.* 2014).

Estudos envolvendo fungos de cavernas tiveram um significativo aumento após o aparecimento súbito da doença *white-nose syndrome* em morcegos de cavernas na América do Norte, síndrome caracterizada por deixar o nariz esbranquiçado pela colonização fúngica (REEDER & MOORE, 2013). A doença foi causada pelo fungo patogênico *Pseudogymnoascus destructans* (sinônimo *Geomyces destructans*), e resultou na morte de milhões de morcegos. Mais tarde diversos estudos foram realizados em cavernas buscando a presença de *P. destructans* e de outras espécies de fungos patogênicos principalmente ao ser humano, o que aumentou significativamente o conhecimento sobre a micobiota em cavernas (ZHANG *et al.* 2021).

Outro fungo patogênico amplamente estudado e presente em cavernas é a espécie *Histoplasma capsulatum*, fungo dimórfico, isto é, apresenta a forma filamentosa em temperatura ambiente, e a 37 °C (temperatura corporal) se encontra na forma de levedura (JURADO *et al.* 2010). *Histoplasma capsulatum* é comumente encontrado em solos de cavernas habitadas por morcegos e com grande presença de guano, visto que o fungo se alimenta da matéria orgânica presente nos excrementos (JURADO *et al.* 2010). O fungo é responsável por causar histoplasmose, micose sistêmica causada pela inalação dos esporos presentes no ar, sendo uma doença relativamente frequente em exploradores de cavernas, apesar da espécie não estar restrita nesses ambientes (SCULLY & BADDLEY, 2018).

Os fungos mais frequentemente encontrados em cavernas são do filo Ascomycota, sendo os gêneros mais comuns *Penicillium*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Fusarium* e *Cladosporium*, seguido pelo filo Basidiomycota com os gêneros *Trichophyton* e *Mycena* comumente encontrados, e fungos zigospóricos principalmente do gênero *Rhizopus* (Mucoromycota) e *Mortierella* (Mortierellomycota) (VANDERWOLF *et al.* 2013; ZHANG *et al.* 2021). Em últimas

revisões sobre fungos de cavernas foram registradas 1923 diferentes espécies de fungos em cavernas distribuídas em 720 gêneros (ZHANG *et al.* 2021).

Entretanto, mesmo o Brasil tendo um número significativo de cavernas, são escassos os estudos descrevendo a micobiota desse ambiente (Tabela 1), e apenas 180 táxons foram registrados em cavernas brasileiras, indicando uma grande lacuna de conhecimento sobre a diversidade de fungos em cavernas (Alves *et al.* 2022). Os poucos estudos existentes sobre isso relatam os primeiros registros de gêneros e espécies de fungos em cavernas, além da descrição de espécies novas para os gêneros *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Talaromyces*, e até a descoberta de um gênero novo (*Pseudolecanicillium*) (PEREIRA *et al.* 2022; ALVES *et al.* 2022).

Na Amazônia os estudos são ainda mais escassos, tendo apenas um estudo realizado em uma caverna no Amazonas (CASTRILLÓN *et al.* 1976), e mesmo sendo um dos maiores biomas do Brasil, grande parte das pesquisas foram realizadas nos biomas da Caatinga e do Cerrado. Além disso, nenhum estudo relatando a micobiota de cavernas no Pará foi realizado até o momento, mesmo o estado tendo o maior quantitativo de cavernas registradas na região Norte.

Tabela 1 – Lista de estudos sobre a micobiota de cavernas no Brasil.

<b>Estado brasileiro</b>	<b>Substrato/Hospedeiro</b>	<b>Referência</b>
Rio de Janeiro	Solo	Rogers & Beneke (1963)
Amazonas	Solo	Castrillón <i>et al.</i> (1976)
Minas Gerais	Guano	Ferreira <i>et al.</i> (2000)
São Paulo	Diversos	Pedro & Bononi (2007)
Minas Gerais	Ar e guano	Taylor <i>et al.</i> (2013)
Minas Gerais	Solo	Taylor <i>et al.</i> (2014)
Bahia	Solo	Paula <i>et al.</i> (2016)
Minas Gerais	Cavernas ferruginosas	Hornick (2017)
Pernambuco	Morcegos ( <i>Carollia perspicillata</i> )	Crous <i>et al.</i> (2018)
São Paulo	Centopéias	Fonseca <i>et al.</i> (2019)
Pernambuco	Ar, guano e corpo de morcegos	Cunha <i>et al.</i> (2020)
Pernambuco	Ar	Pereira <i>et al.</i> (2022)
Pernambuco	Moscas parasitas de morcegos	Carvalho <i>et al.</i> (2022)
Rio Grande do Norte	Ar e solo	Alves <i>et al.</i> (2022)
Goiás	Solo	Sá <i>et al.</i> (2022)

Fonte: Adaptado de Alves *et al.* (2022).

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 GERAL**

Conhecer os fungos associados ao sedimento na caverna ferrífera Vale da Lua na Serra dos Carajás/PA, gerando subsídios para o manejo espeleoturístico.

#### **3.2 ESPECÍFICOS**

- Isolar fungos cultiváveis que ocorrem no sedimento na caverna Vale da Lua, localizada na Serra dos Carajás, estado do Pará;
- Identificar os fungos cultiváveis obtidos por meio de análises morfológicas e moleculares;
- Verificar da ocorrência de espécies patogênicas ao homem;
- Descrever novos táxons para a ciência e/ou novos relatos de espécies de fungos em cavernas;
- Disponibilizar, por intermédio da Micoteca URM, culturas de fungos de ambientes cavernícolas para outros estudos de produção de bioprodutos.

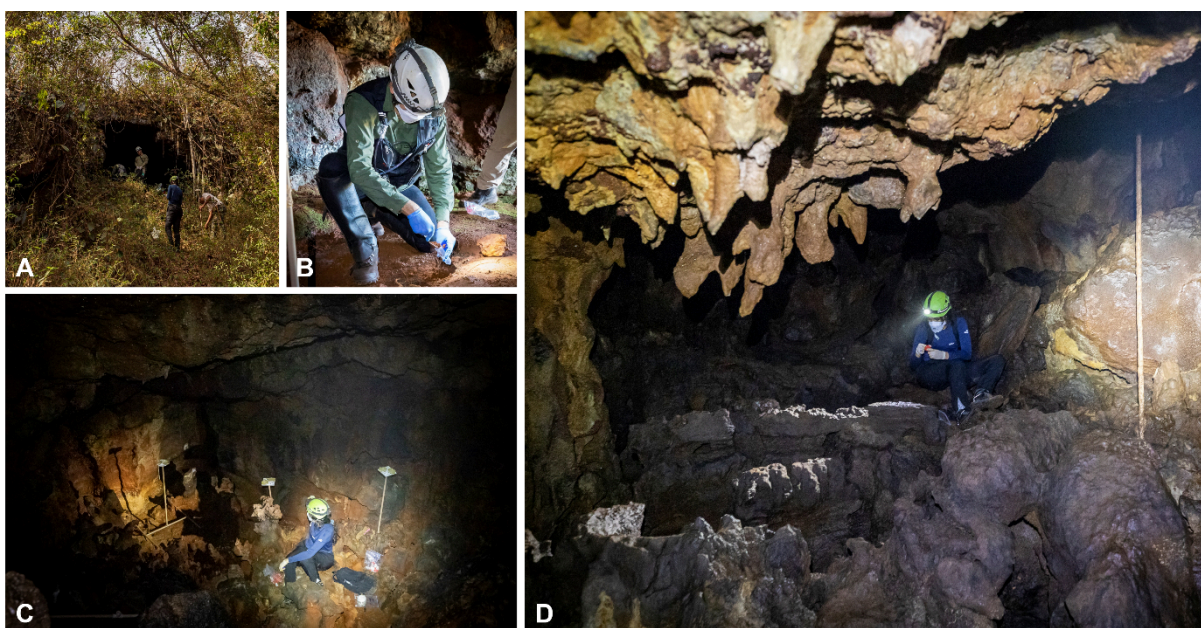
## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 ÁREA DE ESTUDO

A caverna Vale da Lua (código N4WS-0067) está localizada no município de Paraúpebas (latitude: -6,073103; longitude: -50,19203; altitude: 567 m), a 19 km do Núcleo Urbano de Carajás, no estado do Pará. A caverna é formada por rochas ferruginosas, com latossolo vermelho-amarelo distrófico, apresenta uma projeção horizontal de 216 m, possui poças d'água e espeleotemas, e a temperatura no interior da caverna é mais baixa (21 °C) comparado com o meio externo (26 °C) (ICMBIO, 2016).

O acesso à caverna é por meio de uma estrada secundária a partir da estrada principal de acesso à mina do Manganês, e é necessário andar por uma trilha até chegar ao local de entrada. A caverna apresenta diferentes níveis de piso, sendo necessário extremo cuidado ao caminhar no interior da cavidade (Figura 5), o que não interfere na potencialidade de desenvolvimento desse local para o espeleoturismo e o turismo técnico-científico, seguindo as orientações dos guias capacitados no momento da visita (ICMBIO, 2016).

Figura 5 – Caverna Vale da Lua (N4WS-0067) na Floresta Nacional (FLONA) de Carajás, no Pará, Brasil. Vista de fora da entrada da caverna (A); Coleta do sedimento no ponto de amostragem 1 (B); Vista do interior da caverna dos pontos de amostragem 2 (C) e 3 (D).

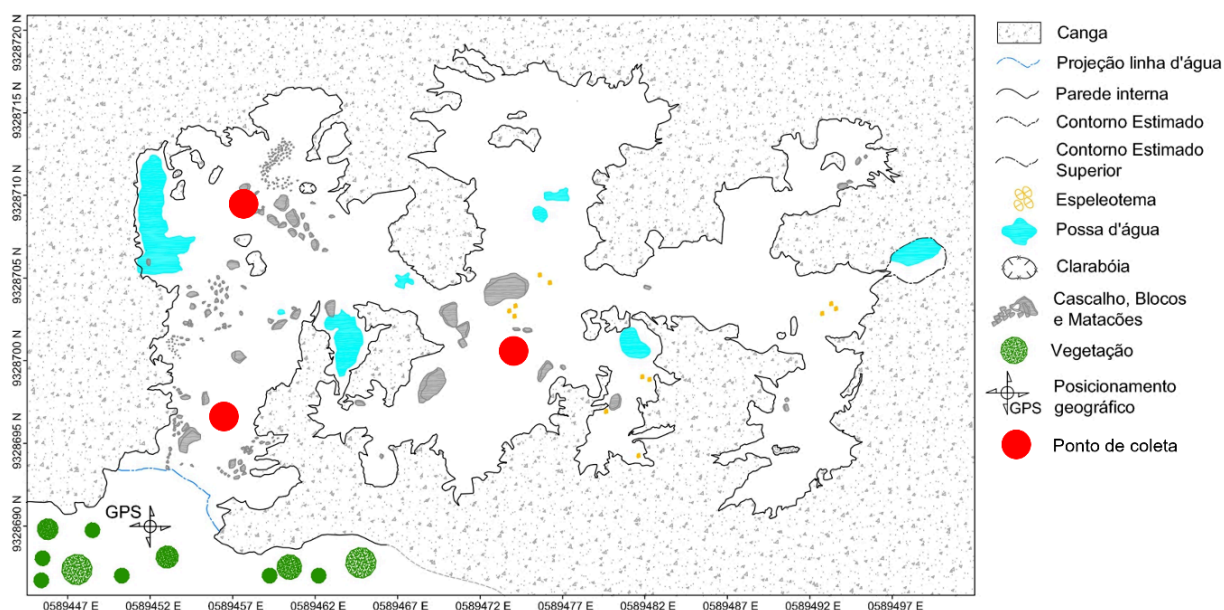


Fotos: Diego Bento (2022).

## 4.2 COLETA DE AMOSTRAS

Amostras do sedimento foram coletadas em três pontos no interior da caverna (Figura 6) em triplicata de cada ponto. As amostras foram armazenadas em potes esterilizados, os quais foram acondicionados em caixas térmicas e transportados para análise em laboratório, onde foram mantidos sob refrigeração (5 °C) até que a etapa de isolamento fosse realizada.

Figura 6 – Mapa da caverna Vale da Lua com os pontos de coleta.



Fonte: CECAV (2022).

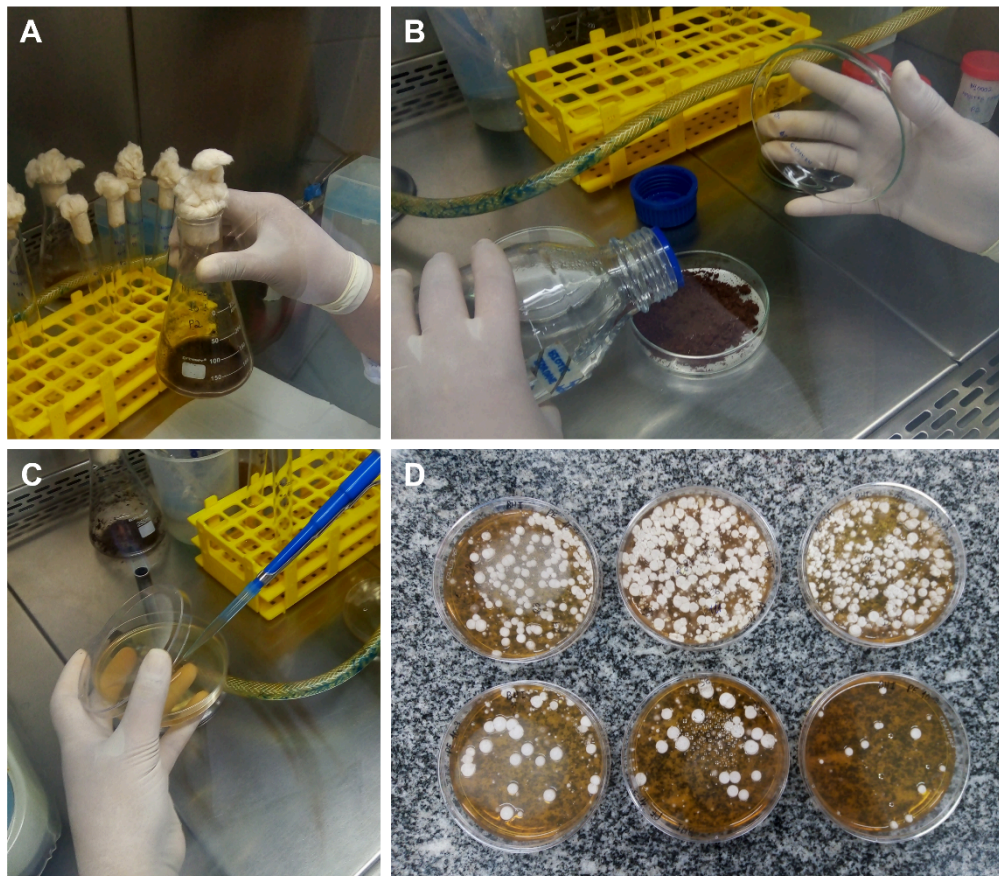
## 4.3 ISOLAMENTO DE FUNGOS DO SEDIMENTO

Para o isolamento dos fungos foi realizada a técnica de diluição seriada em placas e de câmara úmida (CUNHA *et al.* 2020). Inicialmente, uma amostra composta foi feita das amostras simples de cada ponto de coleta, em seguida, um grama de solo de cada amostra composta foi suspenso em 9 mL de água destilada esterilizada (Figura 7-A), os quais foram agitados e a suspensão foi diluída até atingir a concentração de  $10^{-4}$ . Em triplicata, alíquotas de 1 mL das diluições de  $10^{-3}$  e  $10^{-4}$  foram espalhadas (Figura 7-C), respectivamente, na superfície dos meios de cultura Ágar Sabouraud Dextrose (SAB) e Brain Heart Infusion (BHI), ambos adicionados com antibiótico (100 mg/L de cloranfenicol) para inibir o crescimento bacteriano. As placas foram incubadas em câmara escura, por sete dias, a 28 °C.

Para o isolamento em câmara úmida, o sedimento de cada amostra composta foi espalhado em placas de Petri contendo papel filtro previamente esterilizado. O solo foi umidificado com água destilada esterilizada (Figura 7-B), e as placas foram incubadas no escuro, por até 15 dias, em temperatura ambiente até o surgimento de culturas fúngicas visíveis. Os isolados fúngicos foram distinguidos de acordo com suas características fenotípicas como cor, forma, tamanho, textura da superfície da colônia e pigmentação das hifas, e posteriormente foram isolados e purificados.

A abundância de fungos cultiváveis na caverna foi determinada com base no número de Unidades Formadoras de Colônias (UFCs) em cada ponto de amostragem (Figura 7-D). A purificação foi realizada por meio de repiques das colônias para placas de Petri com meio SAB, até que fosse isolado o espécime, e por fim, os isolados foram preservados em tubos de criopreservação contendo glicerol 60% e solução salina 0,9% (proporção 1:1, v/v), e armazenados em freezer.

Figura 7 – Metodologia aplicada para isolamento de fungos de sedimento de caverna. Técnica de diluição seriada: suspensão de amostras do sedimento em água destilada (A) e plaqueamento das diluições em meio SAB e BHI (C); Isolamento por meio da técnica de câmara úmida (B); Contagem de Unidades Formadoras de Colônias - UFC (D).



Fotos: A autora (2024).

#### 4.4 IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA

Os gêneros foram identificados com base em características morfológicas. A análise se deu observando a macroscopia das colônias e a microscopia das estruturas fúngicas. Para a macroscopia foram observadas características em diferentes meios de cultura, como aspecto da superfície, presença ou ausência de exsudato, pigmentação do meio, coloração e diâmetro das colônias. As cores das colônias foram avaliadas usando os gráficos de Rayner (1970). Para a observação das características microscópicas (estruturas somáticas e reprodutivas), foram feitas lâminas diretas das culturas, e em alguns casos, cultura em lâmina, e na montagem das lâminas foram utilizados ácido láctico (60-80%) e etanol (70%), as quais foram analisadas em microscópio óptico.

#### 4.5 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR

##### 4.5.1 Coleta de micélio e extração do DNA

Para a obtenção de biomassa, os isolados fúngicos foram repicados em placas de Petri contendo meio SAB esterilizado, e foram incubadas por até sete dias, a 25 °C no escuro. Após isso, fragmentos coletados das colônias foram transferidos para microtubos de 2 mL contendo quatro esferas de vidro, e posteriormente foram acondicionados em freezer. A extração do DNA fúngico foi realizada seguindo as recomendações do fabricante do kit de extração de DNA genômico da Promega (Wizard Genomic DNA Purification Kit).

##### 4.5.2 Amplificação e sequenciamento de regiões específicas do DNA

As reações de PCR foram realizadas de acordo com as condições e *primers* determinados em estudos prévios dependendo do grupo de fungos a ser estudado. Para amplificar parte das regiões do rDNA foram utilizados os pares de *primers* V9G/LS266 (MASCLAUX *et al.* 1995; DE HOOG & VAN DEN ENDE, 1998) e ITS1/ITS4 (WHITE *et al.* 1990) para amplificar a região ITS (ITS1-5.8S-ITS2), e os *primers* LR5 e LROR (VILGALYS & HESTER, 1990) foram utilizados para amplificar parte da região LSU (Subunidade Maior do rDNA). As regiões ITS e LSU foram utilizadas na identificação do gênero de fungos filamentosos e de leveduras, respectivamente (CUNHA *et al.* 2020).

As espécies de alguns grupos específicos foram identificadas usando outras regiões do DNA conforme a indicação da literatura. Por exemplo, a região parcial do gene da  $\beta$ -tubulina (BenA), juntamente com a região do gene da calmodulina (CaM) foram utilizadas na identificação de espécies de *Aspergillus*, *Penicillium* e *Talaromyces* (HOUBRAKEN *et al.* 2020), e ambas as regiões foram amplificadas utilizando os pares de *primers* Bt2a/Bt2b (GLASS & DONALDSON, 1995) e CMD5/CMD6 (HONG *et al.* 2006), respectivamente.

Os produtos de PCR foram purificados com as enzimas EXO + SAP (Alkaline Phosphatase/Exonuclease I) (Cellco, Brasil), conforme as orientações do fabricante, e foram encaminhados para sequenciamento na Plataforma Multiusuária de Sequenciamento de DNA do Centro de Biociências da UFPE utilizando os mesmos primers utilizados durante a amplificação (PCR).

#### **4.5.3 Análise filogenética**

As análises filogenéticas foram feitas usando as sequências de nucleotídeos editadas por meio do programa BioEdit, e sequências de referência depositadas no banco de dados do GenBank. As sequências foram alinhadas usando MAFFT v.7 (KATOH & STANDLEY, 2013), e manualmente editadas pelo programa MEGA v.7 (KUMAR *et al.* 2016). As análises de Máxima Verossimilhança (ML) com regiões combinadas foram feitas usando RAxML-HPC BlackBox v. 8.2.12 (STAMATAKIS, 2014) por meio da plataforma CIPRES (MILLER *et al.* 2012). As árvores filogenéticas foram visualizadas no FigTree v. 1.1.2 (RAMBAUT, 2016).

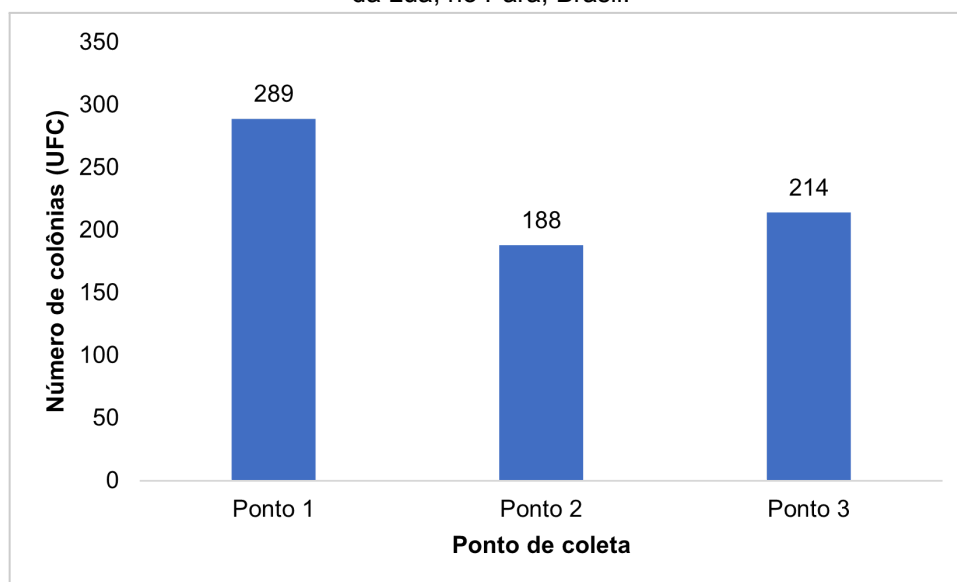
#### **4.6 DEPÓSITO DOS ISOLADOS**

Isolados representantes das espécies identificadas estão em processo para serem depositados na Coleção de Culturas - Micoteca URM do Departamento de Micologia do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco.

## 5 RESULTADOS

A abundância total de fungos encontrada no sedimento da caverna Vale da Lua foi de 691 UFCs, e o maior quantitativo foi observado no ponto 1 de coleta (289 UFCs), seguido pelo ponto 3 (214 UFCs) e ponto 2 (188 UFCs) (Gráfico 1). Um total de 123 isolados fúngicos foram obtidos e distribuídos em 11 gêneros e 31 espécies (Tabela 2) (Figuras 8 e 9). Grande parte das espécies encontradas pertencem ao filo Ascomycota (29), e os gêneros com mais táxons representados foram *Penicillium* com 11 espécies, seguido de *Talaromyces* e *Aspergillus*, ambos com 5 e 4 espécies, respectivamente. Apenas uma espécie representante dos Basidiomycota e uma dos Mucoromycota foram isoladas (Tabela 2).

Gráfico 1 – Abundância de fungos (UFC) observada no sedimento da caverna Vale da Lua, no Pará, Brasil.



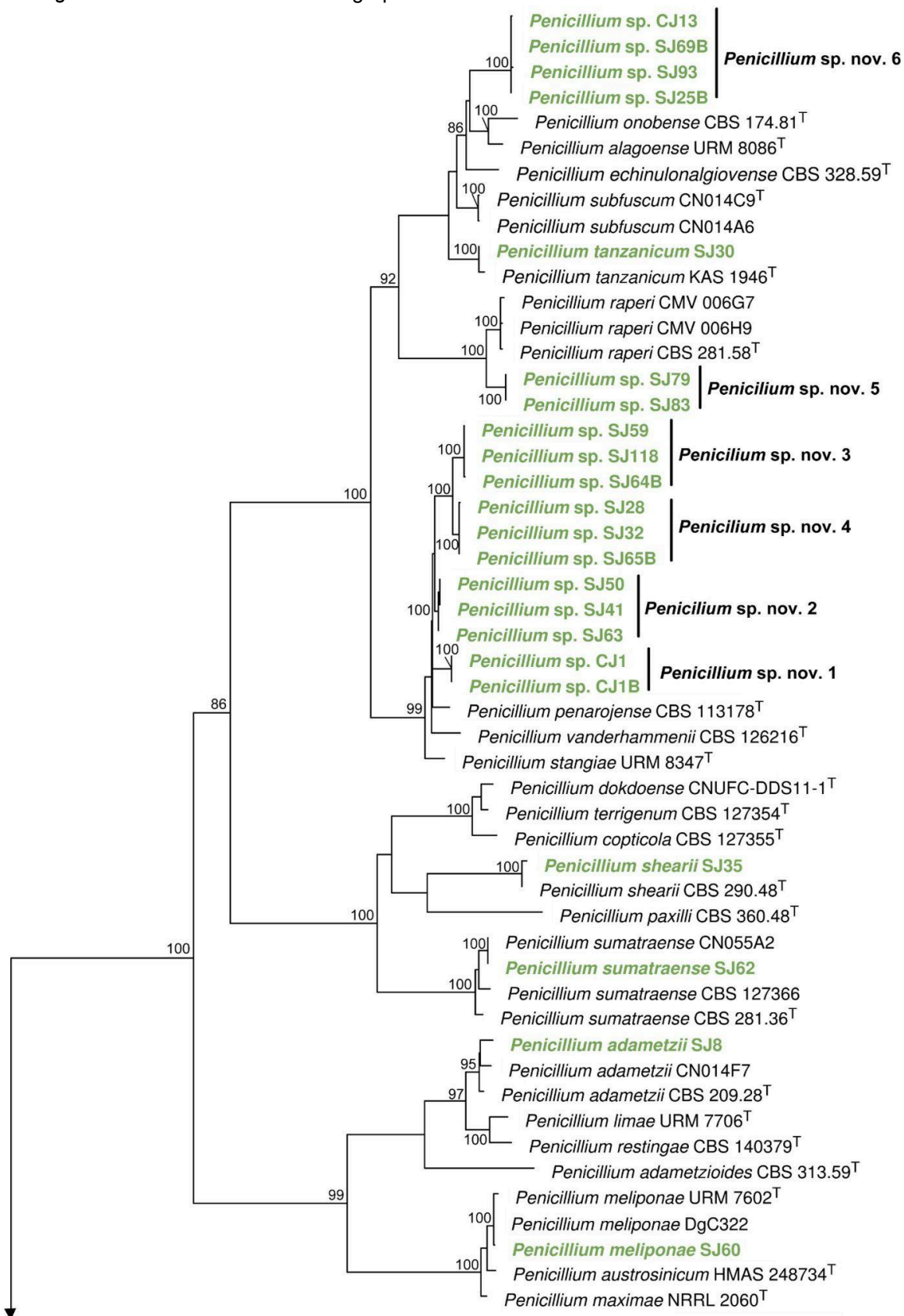
Fonte: A autora (2024).

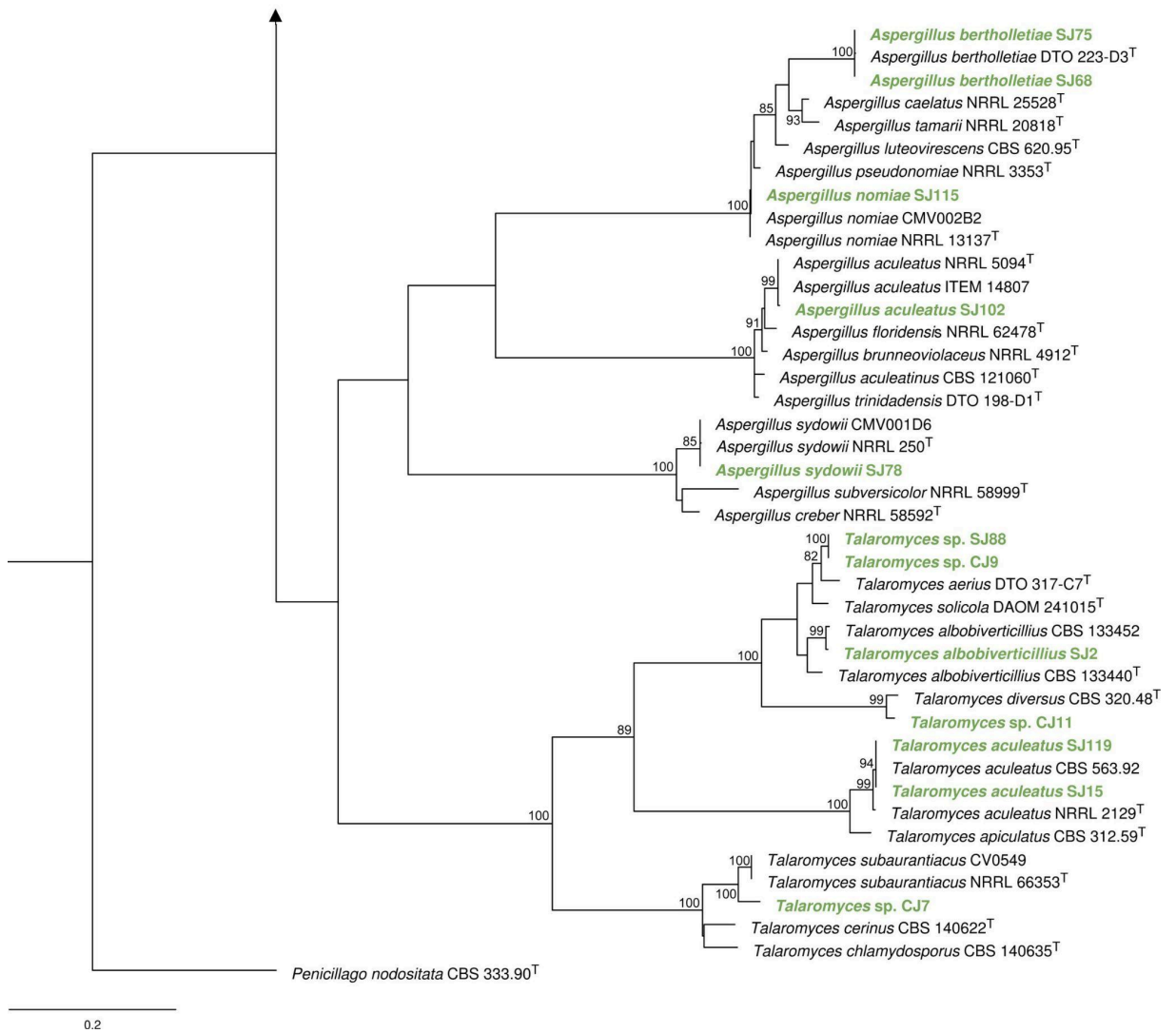
Tabela 2 – Lista de espécies de fungos isolados do sedimento da caverna Vale da Lua, Pará, Brasil. P = espécie presente (observado) e - = espécie ausente (não observado). Forma de isolamento: SAB = diluição seriada em meio de Ágar Sabouraud Dextrose, BHI = diluição seriada em meio Brain Heart Infusion e C = método de câmara úmida.

Táxon	Forma de isolamento	Ponto de coleta		
		P1	P2	P3
<b>Ascomycota</b>				
<i>Aspergillus aculeatus</i>	SAB	-	-	P
<i>Aspergillus bertholletiae</i>	BHI/SAB	-	P	-
<i>Aspergillus nomiae</i>	BHI	-	P	-
<i>Aspergillus sydowii</i>	BHI	-	P	-
<i>Blastobotrys malaysiensis</i>	BHI	P	-	-
<i>Blastobotrys cf. vanleenenianus</i>	BHI/SAB	P	P	P
<i>Cladosporium</i> sp.	BHI/SAB	P	-	P
<i>Humicola</i> sp.	C	P	-	-
<i>Penicillium cf. adametzii</i>	SAB	P	-	P
<i>Penicillium meliponae</i>	SAB	P	-	P
<i>Penicillium shearii</i>	BHI/C	P	-	-
<i>Penicillium</i> sp. nov. 1 seção <i>Lanata-Divaricata</i>	C	P	-	-
<i>Penicillium</i> sp. nov. 2 seção <i>Lanata-Divaricata</i>	BHI/SAB	P	P	P
<i>Penicillium</i> sp. nov. 3 seção <i>Lanata-Divaricata</i>	SAB	P	-	P
<i>Penicillium</i> sp. nov. 4 seção <i>Lanata-Divaricata</i>	BHI	P	-	-
<i>Penicillium</i> sp. nov. 5 seção <i>Lanata-Divaricata</i>	BHI/SAB	-	P	P
<i>Penicillium</i> sp. nov. 6 seção <i>Lanata-Divaricata</i>	C/SAB	-	P	P
<i>Penicillium sumatraense</i>	BHI	P	P	-
<i>Penicillium tanzanicum</i>	BHI	P	-	-
<i>Sporothrix cf. eucalyptigena</i>	SAB	-	-	P
<i>Talaromyces albobiverticillius</i>	SAB	P	-	-
<i>Talaromyces aculeatus</i>	C/SAB	P	-	-
<i>Talaromyces</i> sp. seção <i>Islandici</i>	C	-	-	P
<i>Talaromyces</i> sp. 1 seção <i>Trachyspermi</i>	C/SAB	-	P	P
<i>Talaromyces</i> sp. 2 seção <i>Trachyspermi</i>	C	-	P	-
<i>Trichoderma asperellum</i>	SAB	P	P	P
<i>Trichoderma koningiopsis</i>	SAB	P	-	P
<i>Trichoderma strigosum</i>	SAB	P	-	-
<i>Tolypocladium tropicale</i>	SAB	-	-	P
<b>Basidiomycota</b>				
<i>Saitozyma podzolica</i>	SAB	-	P	P
<b>Mucoromycota</b>				
<i>Absidia</i> sp.	SAB	P	P	-
<b>TOTAL</b>		<b>19</b>	<b>13</b>	<b>16</b>

Fonte: A autora (2024).

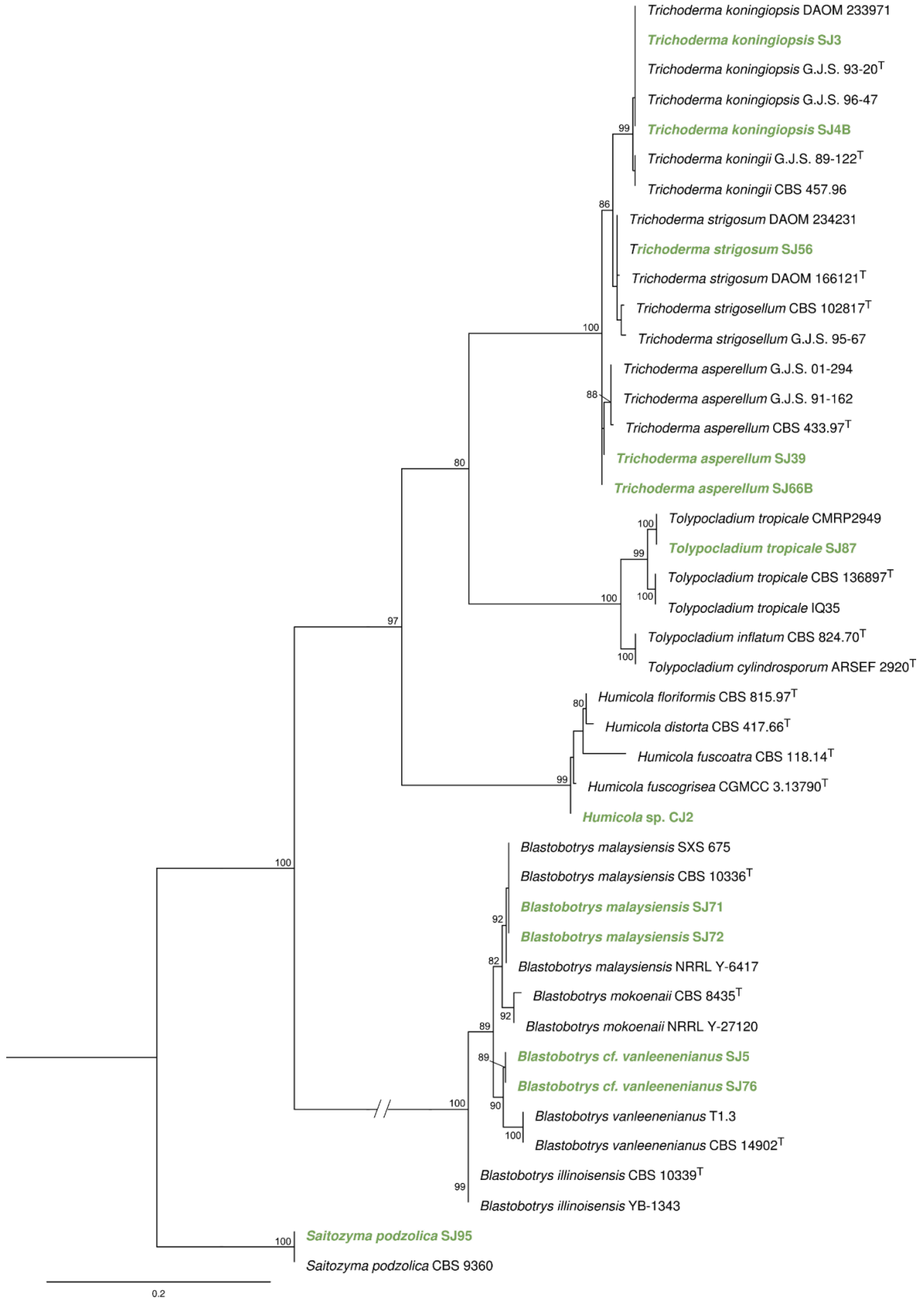
Figura 8 – Árvore de máxima verossimilhança obtida utilizando sequências de  $\beta$ -tubulina (BenA) e calmodulina (CaM) de representantes de gêneros de Eurotiales isolados do sedimento da caverna Vale da Lua - PA. Valores de suporte maiores que 80% são mostrados próximo de nós. Sequências de culturas tipos estão indicadas por <sup>T</sup>. Isolados obtidos neste estudo estão na cor verde. A espécie *Penicillium nodositata* foi utilizada como grupo externo.





Fonte: A autora (2024).

Figura 9 – Árvore de máxima verossimilhança obtida utilizando sequências de ITS do rDNA de representantes de Ascomycota e Basidiomycota isolados do sedimento da caverna Vale da Lua - PA. Valores de suporte maiores que 80% são mostrados próximo de nós. Sequências de culturas tipos estão indicadas por <sup>T</sup>. Isolados obtidos neste estudo estão na cor verde. A espécie *Saitozyma podzolica* (Basidiomycota) foi utilizada como grupo externo.



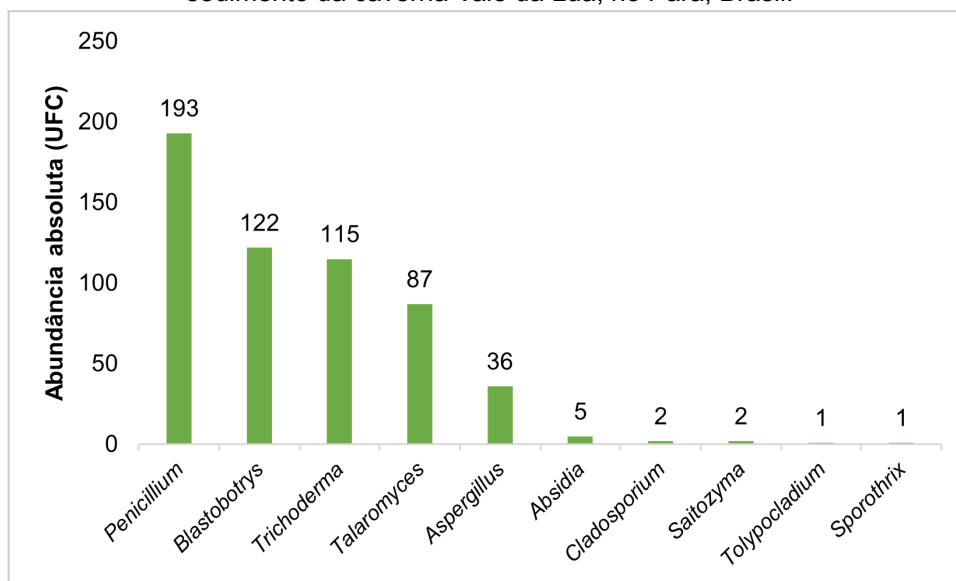
Fonte: A autora (2024).

Em relação à riqueza obtida em cada ponto coletado, foi observada uma tendência semelhante à encontrada em abundância. O ponto 1 apresentou maior quantidade de espécies identificadas (19 espécies), seguido pelos pontos 3 e 2, ambos apresentando 16 e 13 espécies, respectivamente (Tabela 2). Também se verificou que diversas espécies foram encontradas em apenas um ponto de amostragem, sendo: 9 espécies exclusivamente isoladas no ponto 1, e 4 espécies no ponto 2 e 3. Somente três espécies foram isoladas de todos os pontos amostrados na caverna, sendo estas a levedura *Blastobotrys cf. vanleenenianus*, uma possível nova espécie do gênero *Penicillium* da seção *Lanata-Divaricata*, e *Trichoderma asperellum* (Tabela 2).

Entre os gêneros encontrados, *Penicillium* apresentou a maior abundância absoluta no sedimento da caverna (193 UFCs), seguido de *Blastobotrys* (122 UFCs), *Trichoderma* (115 UFCs), *Talaromyces* (87 UFCs) e *Aspergillus* (36 UFCs) (Gráfico 2). Entre as espécies, *Penicillium* sp. 2 da seção *Lanata-Divaricata* apresentou o maior quantitativo de colônias contabilizadas (89 UFCs), seguido de *Blastobotrys cf. vanleenenianus* (73 UFCs) e *Trichoderma asperellum* (59 UFCs), o que pode se considerar esperado, visto que apenas essas espécies foram observadas em todos os pontos coletados.

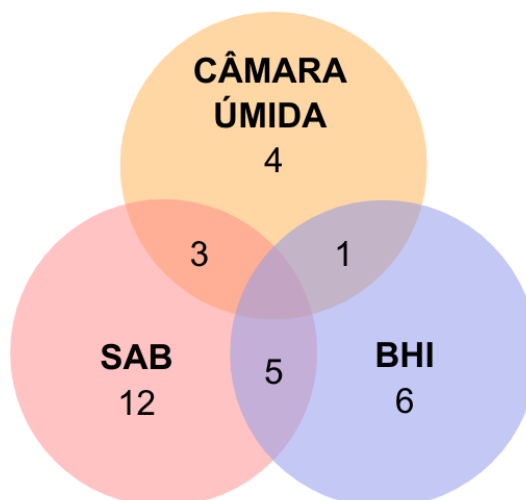
Um número expressivo de táxons de fungos foi isolado somente por meio da técnica de diluição seriada e crescimento em meio de cultura SAB (12). Seis espécies foram obtidas somente por crescimento em meio BHI. Utilizando a técnica de isolamento em câmara úmida, quatro espécies foram obtidas e nenhuma espécie fúngica foi obtida por meio das três diferentes formas de isolamento, o que mostra a importância da adoção de diferentes métodos ao isolar fungos de substratos cavernícolas, principalmente de sedimento (Figura 10).

Gráfico 2 – Abundância absoluta (UFCs) de gêneros de fungos isolados do sedimento da caverna Vale da Lua, no Pará, Brasil.



Fonte: A autora (2024).

Figura 10 – Riqueza de fungos obtida por meio de diferentes técnicas de isolamento em sedimento de caverna.



Fonte: A autora (2024).

## 6 TAXONOMIA

Seis possíveis espécies novas do gênero *Penicillium*, todas pertencentes à seção *Lanata-Divaricata* foram encontradas. Tais táxons foram confirmados por meio de análises moleculares e filogenéticas, juntamente com análise das características morfológicas, tanto macro quanto microscópicas.

***Penicillium* sp. 1** (Figura 11).

**Material examinado:** BRASIL, estado do Pará, Floresta Nacional de Carajás, caverna Vale da Lua (N4WS-0067) (6°04'23.2"S, 50°11'31.3"W), isolado do sedimento, 27 de junho de 2022, J. M. S. Lima e D. M. Bento. Cultura URM 8916.

**Diâmetro da colônia (7 d, em mm):** CYA 25 °C 32–35; CYA 10 °C sem crescimento; CYA 30 °C 40–42; CYA 37 °C 26–28; MEA 25 °C 37–38; MEA 10 °C sem crescimento; MEA 30 °C 38–39; MEA 37 °C 21–22; CYAS 25 °C 20–22; YES 25 °C 33–35; DG18 25 °C 40–41; OA 25 °C 30–32; CZ 25 °C 34–35; CREA 25 °C 6–8.

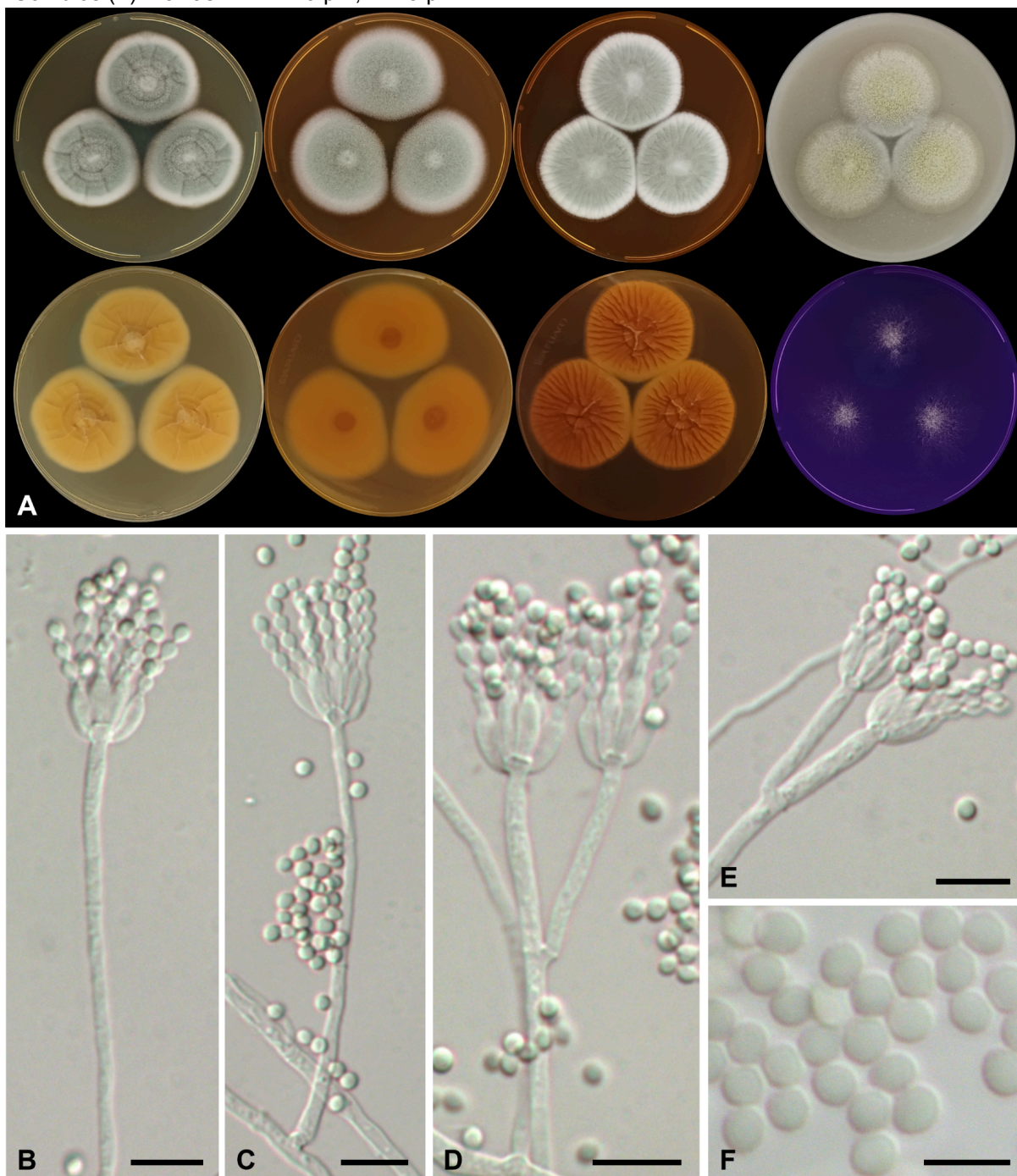
**Características da colônia (25 °C, 7 dias):** CYA: Colônias crateriformes, sulcadas radialmente; margens inteiras; micélio branco; textura aveludada; esclerócios ausentes; esporulação densa; cor dos conídios em massa *glaucous* (73); exsudato ausente; pigmento solúvel ausente; reverso *pale luteous* (11). MEA: Colônias umbonadas; margens inteiras; micélio branco; textura aveludada; esclerócios ausentes; esporulação densa; cor dos conídios em massa *greenish glaucous* (91); exsudato ausente; pigmento solúvel ausente; reverso *saffron* (10). CYAS: Colônias umbonadas, radialmente sulcadas; margens onduladas; micélio branco; textura aveludada; esclerócios ausentes; esporulação densa; cor dos conídios em massa *glaucous grey* (109); exsudato ausente; pigmento solúvel ausente; reverso *cinnamon* (62). YES: Colônias levemente elevadas, sulcadas radial e concentricamente; margens inteiras; micélio branco; textura aveludada; esclerócios ausentes; esporulação densa; cor dos conídios em massa *glaucous grey* (109); exsudato ausente; pigmento solúvel ausente; reverso *cinnamon* (62). DG18: Colônias elevadas; margens inteiras; micélio branco; textura aveludada; esclerócios ausentes; esporulação moderada a fraca; cor dos conídios em massa *dull green* (70); exsudato ausente; pigmento solúvel ausente; reverso *salmon* (41). OA: Colônias planas; margens inteiras; micélio branco; textura aveludada; esclerócios

abundantes, branco a *greyish yellow-green* (68); esporulação pobre; cor dos conídios em massa indeterminada; exsudato ausente; pigmento solúvel ausente; reverso *amber* (47). CZ: Colônias umbonadas; margens inteiras; micélio branco; textura aveludada; esclerócios abundantes, brancos a *greyish yellow-green* (68); esporulação pobre; cor dos conídios em massa indeterminada; exsudato ausente; pigmento solúvel ausente; reverso *primrose* (66). CREA: crescimento fraco; produção de ácido ausente.

**Características microscópicas:** conidióforos monoverticilados ou biverticilados, estipe de parede lisa, 30-200 × 2-3 µm; vesícula 2-3 µm; métulas 2 por estipe, 10-25 × 2-3 µm; fiálides ampuliformes, 3-7 por estipe/métula, 6,5-10,5 × 2-3 µm; conídios de paredes lisas, globosos a subglobosos, 1,5 × 3,5 µm.

**Notas:** Filogeneticamente, esta nova espécie está intimamente relacionada com *P. penarajense* na seção *Lanata-Divaricata* série *Dalearum*. Morfologicamente, esta espécie difere de *P. penarajense* pela ausência de pigmentos solúveis, ausência de produção de ácido em CREA, crescimento em CYA a 37 °C e produção de esclerócios em OA e CZ. Ambas as espécies produzem conidióforos monoverticilados e biverticilados, porém as estipes de *Penicillium* sp.1 são mais curtas (20-250 vs. 200-600 µm) (HOUBRAKEN *et al.* 2011).

Figura 11 – Características morfológicas de *Penicillium* sp. 1, cultura URM 8916. Culturas com 7 dias de crescimento em CYA, MEA, YES (verso e reverso), OA e CREA (A). Conidióforos (B-E). Conídios (F). Barras: B-E = 10  $\mu$ m; F = 5  $\mu$ m.



Fonte: A autora (2024).

***Penicillium* sp. 2** (Figura 12).

**Material examinado:** BRASIL, estado do Pará, Floresta Nacional de Carajás, caverna Vale da Lua (N4WS-0067) (6°04'23.2"S, 50°11'31.3"W), isolado do sedimento, 27 de junho de 2022, J. M. S. Lima e D. M. Bento. Cultura URM 8917.

**Diâmetro da colônia (7 d, em mm):** CYA 25 °C 45–47; CYA 10 °C sem crescimento; CYA 30 °C 54–56; CYA 37 °C 31–33; MEA 25 °C 43–50; MEA 10 °C sem crescimento; MEA 30 °C 52–58; MEA 37 °C 26–28; CYAS 25 °C 25–27; YES 25 °C 39–42; DG18 25 °C 42–44; OA 25 °C 36–38; CZ 25 °C 27–28; CREA 25 °C 5–6.

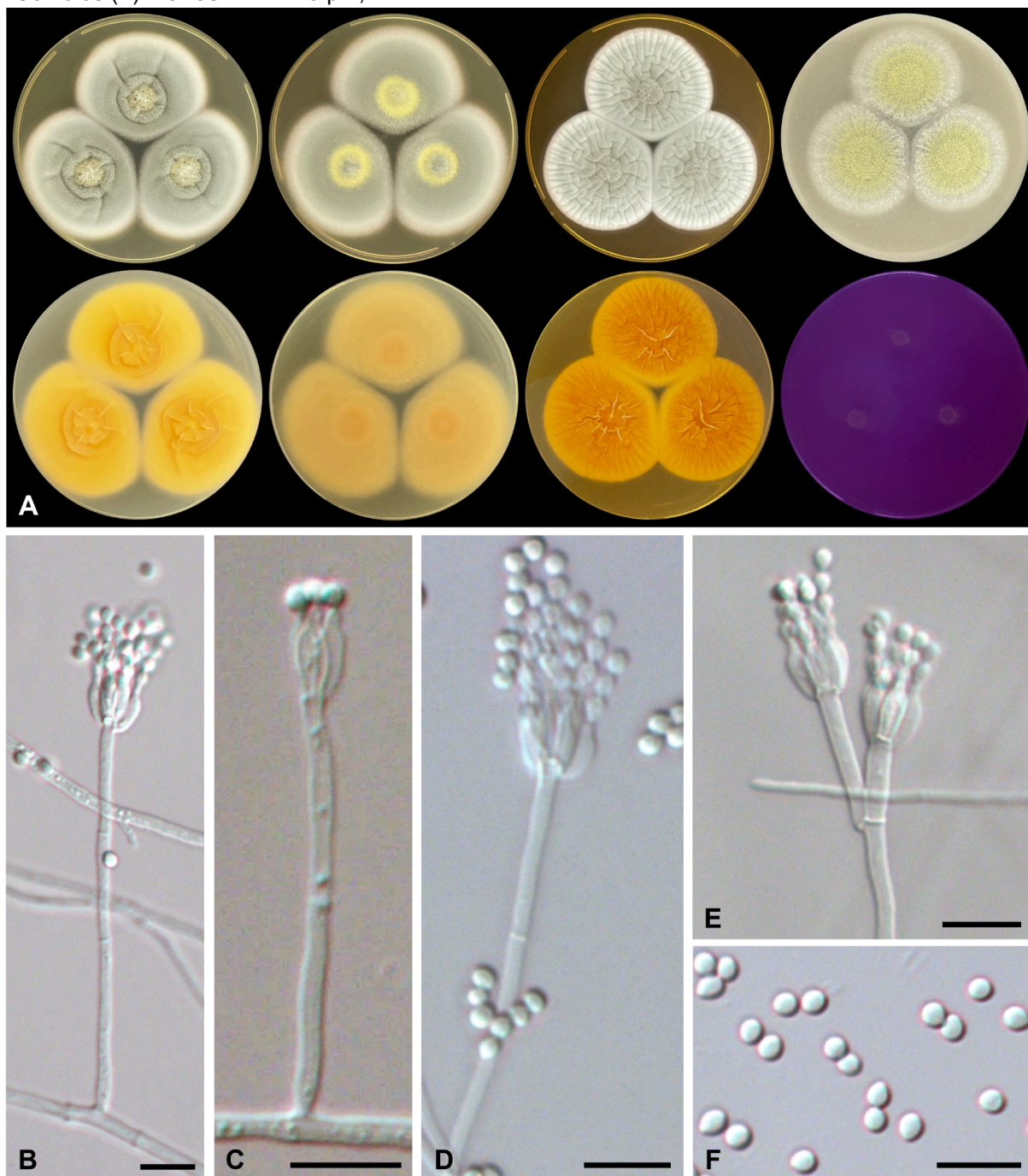
**Características da colônia (25 °C, 7 dias):** CYA: Colônias crateriformes; margens inteiras; micélio branco; textura aveludada; esclerócios no centro, brancos a *primrose* (66); esporulação densa; cor dos conídios em massa *glaucous* (73); exsudato hialino; pigmento solúvel ausente; reverso *pale luteous* (11). MEA: Colônias levemente umbonadas; margens inteiras; micélio branco; textura aveludada; esporulação densa; esclerócios abundantes centralmente, cor *sulphur yellow* (15); cor dos conídios em massa *glaucous* (73); exsudato ausente; pigmento solúvel ausente; reverso *pale luteous* (11). CYAS: Colônias crateriformes; margens inteiras; micélio branco; textura aveludada; esclerócios ausentes; esporulação densa; cor dos conídios em massa *glaucous* (73) a *dull green* (70); exsudato ausente; pigmento solúvel ausente; reverso *sienna* (8). YES: Colônias umbonadas, sulcadas radialmente e concentricamente; margens inteiras; micélio branco; textura aveludada; esclerócios ausentes; esporulação densa; cor dos conídios em massa *glaucous* (73); exsudato ausente; pigmento solúvel ausente; reverso *luteous* (12). DG18: Colônias planas; margens inteiras; micélio branco; textura aveludada; esclerócios ausentes; esporulação esparsa; cor dos conídios em massa *glaucous grey* (109); exsudato hialino; pigmento solúvel ausente; reverso *straw* (46). OA: Colônias planas; margens inteiras; micélio branco; textura granular; esclerócios abundantes, brancos a *greyish yellow-green* (68); esporulação fraca; cor dos conídios em massa indeterminada; exsudato ausente; pigmento solúvel ausente; reverso branco. CZ: Colônias planas; margens ciliadas; micélio *salmon* (41); textura aveludada; esclerócios abundantes, brancos a *sulphur yellow* (15); esporulação densa a moderada; cor dos conídios em massa *greenish glaucous* (91); exsudato

ausente; pigmento solúvel ausente; reverso *pale luteous* (11). CREA: crescimento fraco; produção de ácido ausente.

**Características microscópicas:** conidióforos monoverticilados ou biverticilados, ocasionalmente divaricata, estipe de parede lisa, (10-)20-250 × 2-3 µm; vesícula 2,5-3,5 µm; métulas 2 por estipe, 30-80 × 2-3 µm; fiálides ampuliformes, 1-5 por estipe/métula, 6,5-11,5(-15) × 2-3 µm; conídios de paredes lisas, globosos a subglobosos, 2 × 3 µm.

**Notas:** *Penicillium* sp.2 está classificado na seção *Lanata-Divaricata* série *Dalearum* próximo filogeneticamente de *Penicillium* sp. 3 e *Penicillium* sp. 4. Comparado com as outras duas espécies mencionadas, *Penicillium* sp. 2 cresce mais rápido em CYA 25 °C (45-47 vs. 32-34 vs. 32-36 mm), MEA 25 °C (43-50 vs. 36-39 vs. 34 -37 mm) e DG18 25 °C (42-44 vs. 28-30 vs. 21-24 mm). Além disso, a nova espécie é caracterizada por apresentar esclerócios abundantes nas áreas centrais e conídios abundantes em CYA e MEA.

Figura 12 – Características morfológicas de *Penicillium* sp. 2, cultura URM 8917. Culturas com 7 dias de crescimento em CYA, MEA, YES (verso e reverso), OA e CREA (A). Conidióforos (B-E). Conídios (F). Barras: B-F = 10  $\mu$ m;



Fonte: A autora (2024).

***Penicillium* sp. 3** (Figura 13).

**Material examinado:** BRASIL, estado do Pará, Floresta Nacional de Carajás, caverna Vale da Lua (N4WS-0067) (6°04'23.2"S, 50°11'31.3"W), isolado do sedimento, 27 de junho de 2022, J. M. S. Lima e D. M. Bento. Cultura URM 8918.

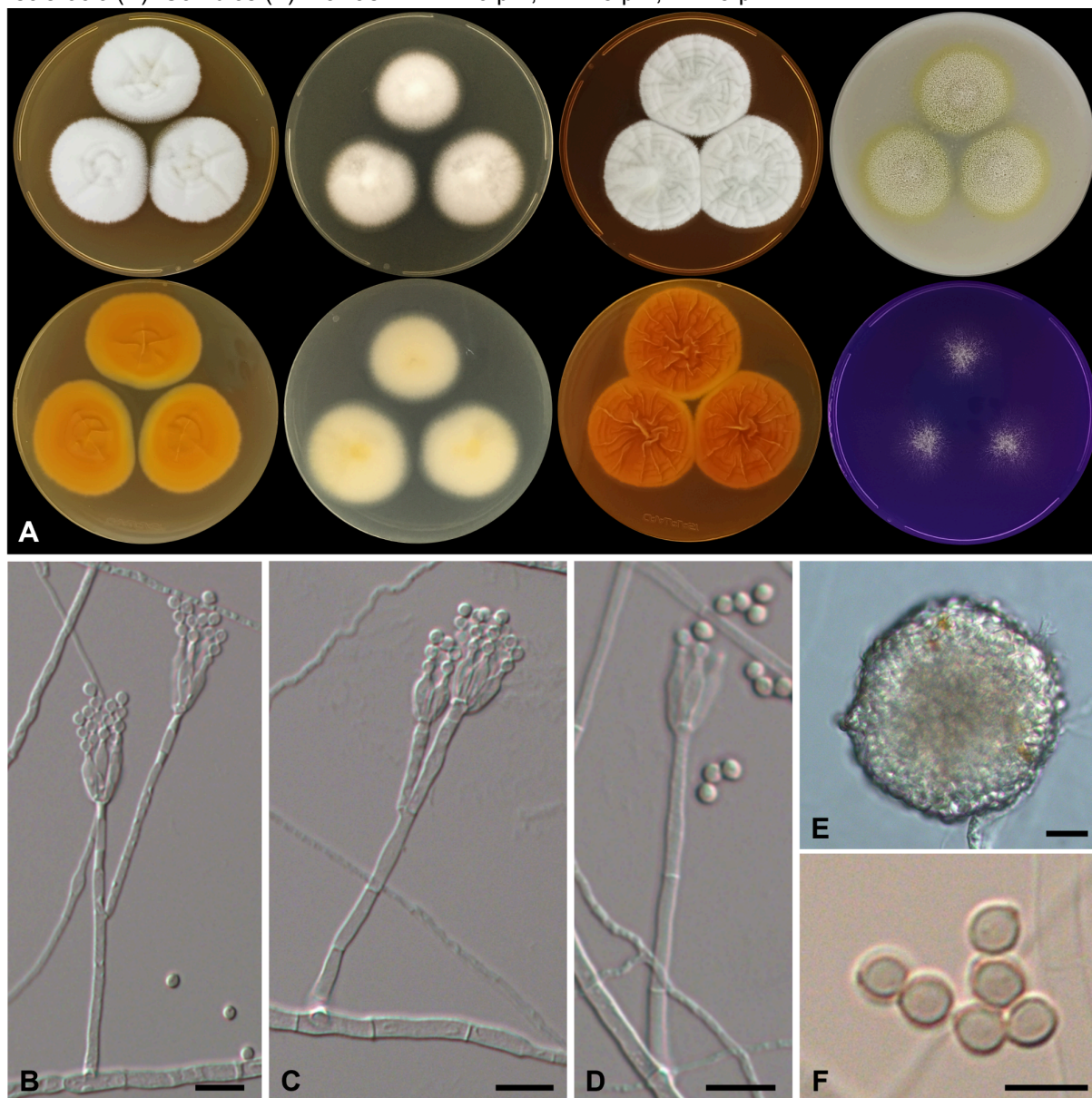
**Diâmetro da colônia (7 d, em mm):** CYA 25 °C 32–34; CYA 10 °C sem crescimento; CYA 30 °C 36–40; CYA 37 °C 30–33; MEA 25 °C 36–39; MEA 10 °C sem crescimento; MEA 30 °C 37–41; MEA 37 °C 28–30; CYAS 25 °C 18–20; YES 25 °C 35–37; DG18 25 °C 28–30; OA 25 °C 30–31; CZ 25 °C 28–29; CREA 25 °C 7–8.

**Características da colônia (25 °C, 7 dias):** CYA: Colônias levemente crateriformes; margens inteiras; micélio branco; textura aveludada; esclerócio branco; esporulação pobre; cor dos conídios em massa indeterminada; exsudato ausente; pigmento solúvel ausente; reverso *ochreous* (44). MEA: Colônias ligeiramente elevadas; margens inteiras; micélio branco; textura aveludada; esclerócios abundantes, brancos; esporulação pobre; cor dos conídios em massa indeterminada; exsudato ausente; pigmento solúvel ausente; reverso *ochreous* (44). CYAS: Colônias crateriformes; margens inteiras; micélio branco; textura aveludada; esclerócios ausentes; esporulação esparsa a fraca; cor dos conídios em massa *greenish glaucous* (91); exsudato ausente; pigmento solúvel ausente; reverso *ochreous* (44). YES: Colônias levemente elevadas, sulcadas radial e concentricamente; margens inteiras; micélio branco; textura aveludada; esclerócios ausentes; esporulação esparsa a fraca; cor dos conídios em massa *greenish glaucous* (91); exsudato ausente; pigmento solúvel ausente; reverso *sienna* (8). DG18: Colônias ligeiramente elevadas; margens inteiras; micélio branco a *smoke grey* (105); textura aveludada; esclerócios ausentes; esporulação fraca; cor dos conídios em massa indeterminada; exsudato hialino; pigmento solúvel ausente; reverso *luteous* (12). OA: Colônias planas; margens inteiras; micélio *greenish yellow* (15); textura granular; esclerócios abundantes, brancos; esporulação pobre; cor dos conídios em massa indeterminada; exsudato abundante, hialino; pigmento solúvel ausente; reverso *pale luteous* (11). CZ: Colônias planas; margens ciliadas; micélio branco; textura aveludada; esclerócios abundantes, brancos; esporulação pobre; cor dos conídios em massa indeterminada; exsudato ausente; pigmento solúvel ausente; reverso *salmon* (41). CREA: crescimento pobre; produção de ácido ausente.

**Características microscópicas:** conidióforos monoverticilados ou biverticilados, estipe de parede lisa,  $40-150 \times 2-3 \mu\text{m}$ ; vesícula  $2,5-3 \mu\text{m}$ ; métulas 2 por estipe,  $10-40 \times 2-3 \mu\text{m}$ ; fiálides ampuliformes, 3-5 por estipe/métula,  $7-12 \times 2-3 \mu\text{m}$ ; conídios de paredes lisas, globosos a subglobosos,  $2 \times 3 \mu\text{m}$ ; esclerócios subglobosos, elipsoidais ou irregulares,  $150-300 \times 200-150$ ;

**Notas:** Esta espécie é filogeneticamente irmã de *Penicillium* sp. 4, ambas com forte suporte na seção *Lanata-Divaricata* série *Dalearum*. Morfologicamente, esta espécie nova difere de *Penicillium* sp. 4 pela taxa de crescimento mais rápida em CYA 37 °C (30-33 vs. 23-24 mm), MEA 37 °C (28-30 vs. 20-21 mm) e DG18 (28-30 vs. 21-24 mm). Além disso, os esclerócios de *Penicillium* sp. 3 são maiores (150-300 vs. 50-200), apenas brancos, e a esporulação é fraca em quase todos os meios utilizados.

Figura 13 – Características morfológicas de *Penicillium* sp. 3, cultura URM 8918. Culturas com 7 dias de crescimento em CYA, MEA, YES (verso e reverso), OA e CREA (A). Conidióforos (B-D). Esclerócio (E). Conídios (F). Barras: B-D = 10  $\mu$ m; E = 25  $\mu$ m; F = 5  $\mu$ m.



Fonte: A autora (2024).

***Penicillium* sp. 4** (Figura 14).

**Material examinado:** BRASIL, estado do Pará, Floresta Nacional de Carajás, caverna Vale da Lua (N4WS-0067) (6°04'23.2"S, 50°11'31.3"W), isolado do sedimento, 27 de junho de 2022, J. M. S. Lima e D. M. Bento. Cultura URM 8919.

**Diâmetro da colônia (7 d, em mm):** CYA 25 °C 32–36; CYA 10 °C sem crescimento; CYA 30 °C 48–50; CYA 37 °C 23–24; MEA 25 °C 34–37; MEA 10 °C sem crescimento; MEA 30 °C 47–50; MEA 37 °C 20–21; CYAS 25 °C 25–26; YES 25 °C 38–40; DG18 25 °C 21–24; OA 25 °C 31–32; CZ 25 °C 33–35; CREA 25 °C 6–7.

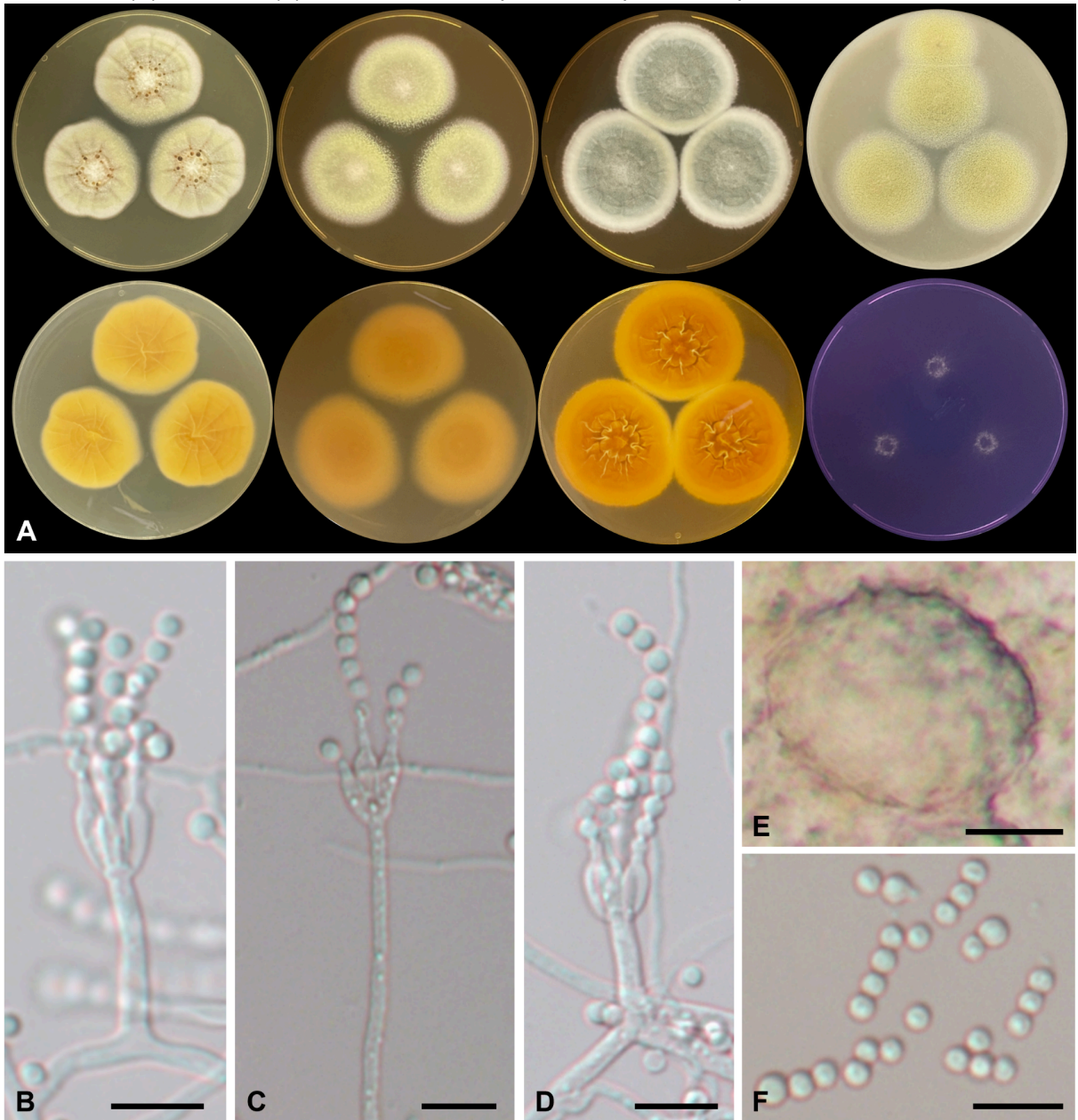
**Características da colônia (25 °C, 7 dias):** CYA: Colônias levemente umbonadas, radialmente sulcadas; margens onduladas; micélio branco; textura aveludada; esclerócios abundantes, brancos a greyish yellow-green (68); esporulação esparsa; cor dos conídios em massa *pale olivaceous grey* (120); exsudato *umber* (9); pigmento solúvel ausente, reverso *straw* (46). MEA: Colônias umbonadas; margens inteiras; micélio branco; textura aveludada; esclerócios abundantes, brancos a *greyish yellow-green* (68); esporulação fraca; cor dos conídios em massa *pale olivaceous grey* (120); exsudato ausente; pigmento solúvel ausente; reverso *buff* (45). CYAS: Colônias crateriformes; margens inteiras; micélio branco; textura aveludada; esclerócios ausentes; esporulação moderada a fraca; cor dos conídios em massa *dull green* (70); exsudato ausente; pigmento solúvel ausente; reverso *honey* (64). YES: Colônias umbonadas, sulcadas radialmente e concentricamente; margens inteiras; micélio branco; textura aveludada; esclerócios ausentes; esporulação densa; cor dos conídios em massa *pale olivaceous grey* (120); exsudato ausente; pigmento solúvel ausente; reverso *luteous* (12). DG18: Colônias levemente elevadas, radialmente sulcadas; margens irregulares; micélio branco a *primrose* (66); textura aveludada; esclerócios ausentes; esporulação pobre; cor dos conídios em massa indeterminada; exsudato *honey* (64) e hialino; pigmento solúvel ausente; reverso *olivaceous buff* (89). OA: Colônias planas; margens inteiras; micélio branco; textura granular; esclerócios abundantes, brancos a *sulphur yellow* (15); esporulação pobre; cor dos conídios em massa indeterminada; exsudato hialino; pigmento solúvel ausente; reverso *straw* (46). CZ: Colônias planas; margens inteiras; micélio *olivaceous buff* (89); textura aveludada; esclerócios abundantes, brancos a *sulphur yellow* (15); esporulação fraca; cor dos conídios em massa

indeterminada; exsudato ausente; pigmento solúvel ausente; reverso *ochreous* (44).  
CREA: crescimento pobre; produção de ácido ausente.

**Características microscópicas:** conidióforos monoverticilados ou biverticilados, estipe de parede lisa, 10-100(-180) × 2-3 μm; vesícula 2,5-3 μm; métulas 2 por estipe, 10-25 × 2-3,5 μm; fiálides ampuliformes, 2-6 por estipe/métula, 6-12 × 2,5-3,5 μm; conídios de paredes lisas, globosos a subglobosos, 2,5 × 3,5 μm; esclerócios subglobosos, elipsoidais ou irregulares, 50-200 × 30-150;

**Notas:** *Penicillium* sp. 4 possui estreita relação com *Penicillium* sp. 3 na árvore filogenética, ambos na seção *Lanata-Divaricata* série *Dalearum*. A nova espécie cresce mais rápido em CYA 30°C (48-50 vs. 36-40 mm), MEA 30°C (47-50 vs. 37-41 mm) e CYAS 25°C (25-26 vs. 18-20 mm). *Penicillium* sp. 4 produz esclerócios abundantemente, brancos a *greyish yellow-green* (68) em CYA e MEA, e os conídios são ligeiramente maiores (2,5-3,5 vs. 2-3 μm).

Figura 14 – Características morfológicas de *Penicillium* sp. 4, cultura URM 8919. Culturas com 7 dias de crescimento em CYA, MEA, YES (verso e reverso), OA e CREA (A). Conidióforos (B-D). Esclerócio (E). Conídios (F). Barras: B-D = 10  $\mu$ m; E = 25  $\mu$ m; F = 5  $\mu$ m.



Fonte: A autora (2024).

***Penicillium* sp. 5** (Figura 15).

**Material examinado:** BRASIL, estado do Pará, Floresta Nacional de Carajás, caverna Vale da Lua (N4WS-0067) (6°04'23.2"S, 50°11'31.3"W), isolado do sedimento, 27 de junho de 2022, J. M. S. Lima e D. M. Bento. Isolado SJ79.

**Diâmetro da colônia (7 d, em mm):** CYA 25 °C 24–26; CYA 10 °C sem crescimento; CYA 30 °C 36–38; CYA 37 °C 11–12; MEA 25 °C 25–27; MEA 10 °C sem crescimento; MEA 30 °C 35–37; MEA 37 °C 5–6; CYAS 25 °C 8–10; YES 25 °C 37–39; DG18 25 °C 18–20; OA 25 °C 32–34; CZ 25 °C 35–37; CREA 25 °C 5–7.

**Características da colônia (25 °C, 7 dias):** CYA: Colônias levemente elevadas, radialmente sulcadas; margens onduladas; micélio *straw* (46); textura aveludada; esclerócios ausentes; esporulação densa; cor dos conídios em massa *dull green* (70); exsudato ausente; pigmento solúvel ausente; reverso *dark vinaceous* (82). MEA: Colônias umbonadas; margens onduladas; micélio branco a *pale vinaceous* (85); textura aveludada; esclerócio branco; esporulação pobre; cor dos conídios em massa indeterminada; exsudato ausente; pigmento solúvel ausente; reverso *luteous* (12). CYAS: Colônias crateriformes; margens onduladas; micélio *straw* (46); textura aveludada; esclerócios ausentes; esporulação densa; cor dos conídios em massa *dark herbage green* (69); exsudato ausente; pigmento solúvel ausente; reverso *hazel* (88). YES: Colônias crateriformes, radialmente e concentricamente sulcadas; margens inteiras; micélio *straw* (46); textura aveludada; esclerócios ausentes; esporulação densa; cor dos conídios em massa *glaucous sky blue* (93); exsudato ausente; pigmento solúvel ausente; reverso *umber* (9). DG18: Colônias ligeiramente elevadas; margens onduladas; micélio *straw* (46); textura aveludada; esclerócios ausentes; esporulação densa; cor dos conídios em massa *dull green* (70); exsudato hialino; pigmento solúvel ausente; reverso *amber* (47). OA: Colônias planas; margens ciliadas; micélio *straw* (46); textura aveludada; esclerócio branco; esporulação esparsa; cor dos conídios em massa *greenish grey* (110); exsudato hialino; pigmento solúvel ausente, reverso *buff* (45). CZ: Colônias planas; margens inteiras; micélio branco e *dark vinaceous* (82) por baixo; textura aveludada; esclerócios ausentes; esporulação densa; cor dos conídios em massa *yellow-green* (71); exsudato ausente; pigmento solúvel ausente; reverso *dark vinaceous* (82). CREA: crescimento pobre; produção de ácido ausente.

**Características microscópicas:** conidióforos monoverticilados ou biverticilados, estipe de parede lisa, 20-250 × 2-3 µm; vesícula 2-3,5 µm; métulas 2 por estipe, 10-30 × 2-3 µm; fiálides ampuliformes, 3-5 por estipe/métula, 7-12 × 2,5-3,5 µm; conídios de paredes lisas, globosos a subglobosos, 2 × 3 µm; esclerócios subglobosos, elipsoidais ou irregulares, 30-100 × 30-80;

**Notas:** *Penicillium* sp. 5 está classificado na seção *Lanata-Divaricata* série *Janthinella* e está filogeneticamente relacionado a um clado com as espécies *P. donggangicum*, *P. koreense*, *P. raperi*, *P. tengii* e *P. yunnanense*. Este novo táxon é caracterizado por apresentar um micélio *dark vinaceous* (82) por baixo nos meios CYA e CZ. Em comparação com as outras espécies citadas, apenas em *P. raperi* foram observados traços de rosa ou malva nas culturas em CYA e MEA, porém o reverso das culturas é marrom opaco e marrom amarelado opaco, respectivamente. Além disso, *P. raperi* não produz esclerócios (SMITH, 1957).

Figura 15 – Características morfológicas de *Penicillium* sp. 5, isolado SJ79. Culturas com 7 dias de crescimento em CYA, MEA, YES e CZ (verso e reverso) (A). Conidióforos (B-D). Esclerócio (E). Conídios (F). Barras: B-E = 10 µm; F = 5 µm.



Fonte: A autora (2024).

***Penicillium* sp. 6** (Figura 16).

**Material examinado:** BRASIL, estado do Pará, Floresta Nacional de Carajás, caverna Vale da Lua (N4WS-0067) (6°04'23.2"S, 50°11'31.3"W), isolado do sedimento, 27 de junho de 2022, J. M. S. Lima e D. M. Bento. Cultura URM 8920.

**Diâmetro da colônia (7 d, em mm):** CYA 25 °C 38–40; CYA 10 °C sem crescimento; CYA 30 °C 37–39; CYA 37 °C sem crescimento; MEA 25 °C 42–44; MEA 10 °C sem crescimento; MEA 30 °C 33–35; MEA 37 °C sem crescimento; CYAS 25 °C 18–21; YES 25 °C 38–40; DG18 25 °C 39–41; OA 25 °C 34–37; CZ 25 °C 27–30; CREA 25 °C 6–7.

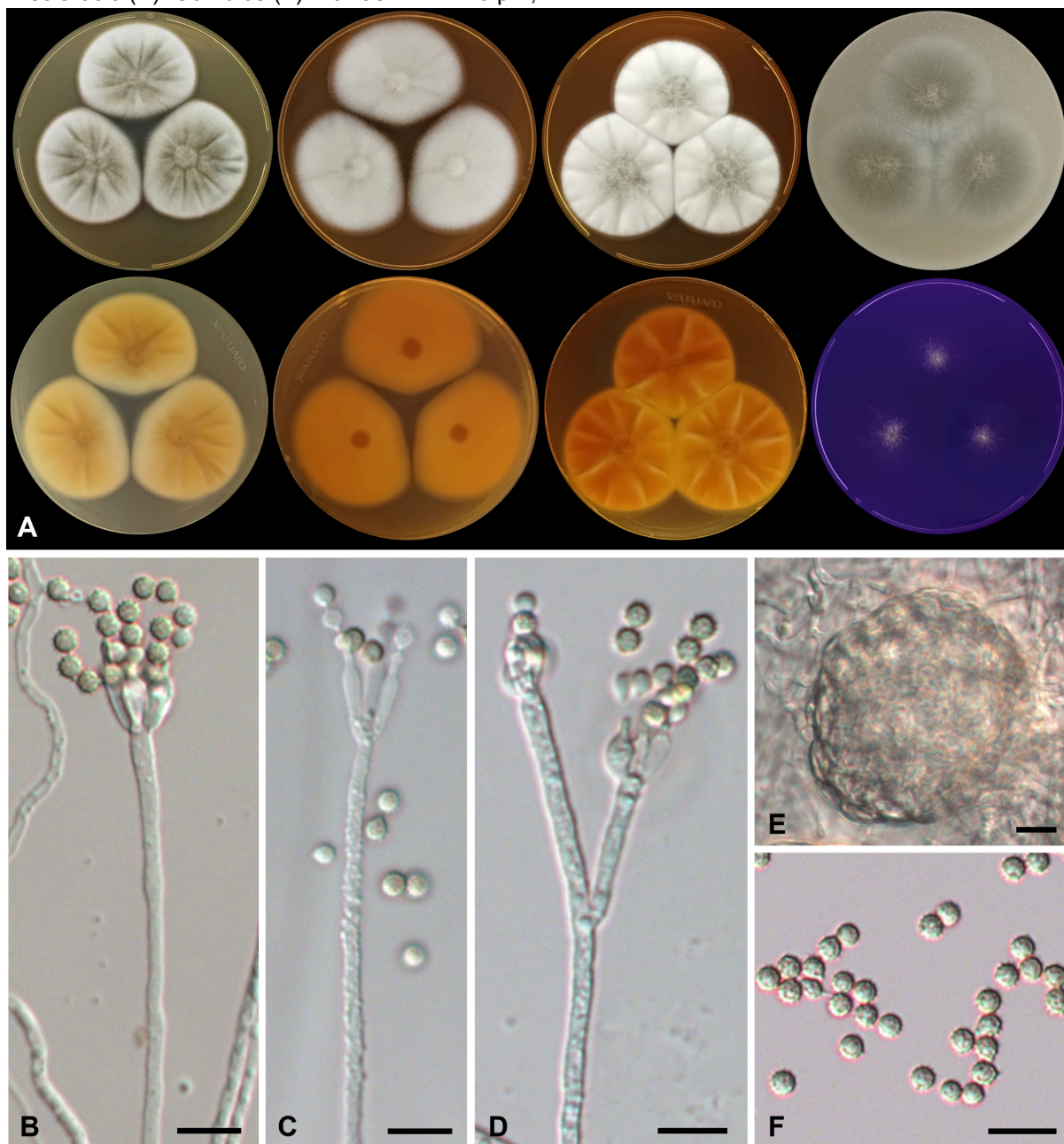
**Características da colônia (25 °C, 7 dias):** CYA: Colônias umbonadas, ligeiramente sulcadas radialmente; margens inteiras; micélio branco; textura aveludada; esclerócios ausentes; esporulação densa a moderada; cor dos conídios em massa *greenish glaucous* (91) a *dull green* (70); exsudato hialino; pigmento solúvel ausente; reverso *luteous* (12). MEA: Colônias levemente umbonadas; margens inteiras; micélio branco; textura aveludada; esclerócio branco; esporulação pobre; cor dos conídios em massa indeterminada; exsudato ausente; pigmento solúvel ausente; reverso *luteous* (12). CYAS: Colônias crateriformes; margens inteiras; micélio branco; textura aveludada; esclerócios ausentes; esporulação densa; cor dos conídios em massa *pale olivaceous grey* (120); exsudato ausente; pigmento solúvel ausente; reverso *hazel* (88). YES: Colônias levemente elevadas, sulcadas radialmente; margens inteiras; micélio branco; textura aveludada; esclerócios ausentes; esporulação moderada a fraca; cor dos conídios em massa *greenish glaucous* (91); exsudato ausente; pigmento solúvel ausente; reverso *ochreous* (44). DG18: Colônias elevadas, sulcadas radialmente; margens inteiras; micélio branco; textura aveludada; esclerócios ausentes; esporulação esparsa; cor dos conídios em massa *greenish glaucous* (91) a *dull green* (70); exsudato ausente; pigmento solúvel ausente; reverso *salmon* (41). OA: Colônias planas; margens inteiras; micélio branco; textura aveludada; esclerócios ausentes; esporulação moderada; cor dos conídios em massa *dark herbage green* (69); exsudato ausente; pigmento solúvel ausente; reverso branco. CZ: Colônias levemente umbonadas; margens inteiras; micélio *olivaceous buff* (89); textura aveludada; esclerócios ausentes; esporulação fraca; cor dos conídios em massa *grey olivaceous* (107) a

*smoke grey* (105); exsudato ausente; pigmento solúvel ausente; reverso *hazel* (88).  
CREA: crescimento pobre; produção de ácido ausente.

**Características microscópicas:** conidióforos monoverticilados ou biverticilados, ocasionalmente divaricata, estipe liso a rugoso, 20-250 × 2-3 µm, não vesiculado; métulas 2 por estipe, 10-20 × 2,5-3,5 µm; fiálides obovadas a ampuliformes, 1-4 por estipe/métula, 7-13 × 2,5-5 µm; conídios globosos com parede rugosa, 2,5 × 3,5 µm; esclerócios subglobosos ou elipsoidais, 50-100 × 40-80;

**Notas:** Esta nova espécie está classificada na seção *Lanata-Divaricata* série *Simplicissima* relacionada filogeneticamente a um clado com as espécies *P. alagoense*, *P. brasilianum*, *P. onobense*, *P. paraherquei*, *P. skrjabinii* e *P. uttarakhandense*. Espécies da série *Simplicissima* normalmente apresentam conidióforos rugosos, conídios levemente ásperos ou de parede rugosa e esclerócios geralmente não são observados em cultura (HOUBRAKEN *et al.* 2020), porém *Penicillium* sp. 6 produz esclerócios em MEA, diferente das demais espécies citadas.

Figura 16 – Características morfológicas de *Penicillium* sp. 6, cultura URM 8920. Culturas com 7 dias de crescimento em CYA, MEA, YES (verso e reverso), OA e CREA (A). Conidióforos (B-D). Esclerócio (E). Conídios (F). Barras: B-F = 10 µm;



Fonte: A autora (2024).

## 7 DISCUSSÃO

### 7.1 ABUNDÂNCIA DE FUNGOS EM CAVERNAS

Este é um dos raros estudos que foram realizados em ambientes cavernícolas no bioma amazônico, e esta pesquisa é uma das primeiras a conhecer a microbiota de cavernas no estado do Pará. O sedimento presente na caverna Vale da Lua apresentou uma alta diversidade de fungos, tanto em riqueza quanto em abundância. Ao todo foram contabilizadas quase 700 UFCs. Em estudos com cavernas no bioma da Caatinga, Alves *et al.* (2022) obtiveram cerca de 3.178 UFCs do sedimento da caverna Abrigo do Letreiro, no Rio Grande do Norte. E em um estudo em Minas Gerais, Taylor *et al.* (2014) contaram uma abundância de 4.549 de colônias fúngicas do sedimento de caverna, uma quantidade significativamente maior da obtida neste estudo.

O gênero *Penicillium* apresentou uma abundância significativa, resultado já observado em cavernas pelo mundo, como na Malásia, onde o gênero ocupava praticamente metade da abundância total encontrada tanto no espeleotema quanto no guano de morcego (WASTI *et al.* 2021). E em uma caverna na Eslováquia, Ogórek *et al.* (2016) observaram uma abundância dominante de apenas uma espécie de *Penicillium* tanto no ar como no guano de morcegos.

*Blastobotrys* foi o segundo gênero mais abundante, mesmo tendo sido identificadas apenas duas espécies do grupo. Leveduras em cavernas já foram documentadas por Taylor *et al.* (2013), onde uma significativa abundância foi encontrada para leveduras (300 UFCs). E em uma caverna na Polônia, Pusz, Król & Zwijacz-Kozica (2018) notaram que a segunda maior concentração de esporos no ar pertencia a leveduras.

No mesmo estudo de Pusz, Król & Zwijacz-Kozica (2018), porém em outra caverna, foi notado que a única espécie de *Trichoderma* identificada apresentava a terceira maior abundância de esporos, resultado semelhante ao encontrado neste estudo. *Talaromyces* apresentou uma abundância maior que de *Aspergillus*, o qual teve apenas a quinta maior abundância de UFCs, o que é raro de se observar, visto que na maioria dos estudos, *Penicillium* e *Aspergillus* ocupam a maior porcentagem de esporos presentes em cavernas (DOCAMPO *et al.* 2010). Entretanto, Wasti *et al.* (2021) encontraram uma abundância expressiva de *Talaromyces* no guano de morcegos, atrás apenas do quantitativo de *Penicillium*.

Também foi observada uma abundância maior no ponto mais próximo da entrada da caverna, resultado semelhante a outros estudos, como os relatados por Vanderwolf *et al.* (2013), onde foi notada uma diminuição da diversidade e biomassa conforme era coletado em direção a áreas mais profundas da caverna, e alguns gêneros de fungos eram mais abundantes na amostra de sedimento coletado na entrada em comparação com outros pontos no interior.

Além disso, estudos encontraram uma maior diversidade de espécies de fungos em solos fora das cavernas em comparação com o interior, e como a maioria dos táxons documentados em cavernas já foram relatados em ambientes não hipógeos, especula-se que a abundância e diversidade seja maior na entrada de cavernas por conta do material fúngico que é transportado pelo vento, visto que o fluxo de ar é frequentemente maior nessas áreas, dependendo da estrutura da caverna (VANDERWOLF *et al.* 2013).

## 7.2 RIQUEZA DE FUNGOS EM CAVERNAS

Entre os 123 isolados fúngicos obtidos do sedimento, foram identificadas 31 espécies pertencentes a 11 gêneros, os quais estão distribuídos em três filos. Estudos em outras regiões do Brasil apresentaram resultados semelhantes quanto a riqueza de fungos em sedimento de cavernas, como no sedimento de uma caverna ferrífera no estado de Minas Gerais em que foram observadas 34 espécies distribuídas em 12 gêneros e dois filos (Ascomycota e Mucoromycota) (TAYLOR *et al.* 2014). Na caverna Abrigo do Letreiro, no Rio Grande do Norte, foram identificadas 24 espécies, distribuídas em 10 gêneros e dois filos (Ascomycota e Basidiomycota) (ALVES *et al.* 2022).

Neste estudo, o filo Ascomycota foi o grupo de fungos com maior quantidade de espécies representantes (cerca de 90%), o que não foge do observado em cavernas tanto no Brasil como pelo mundo. Em um estudo em 13 cavernas na China, Zhang *et al.* (2021) relataram que 88% das espécies pertenciam ao filo Ascomycota, seguido pelos filos Basidiomycota e Mucoromycota, representando, respectivamente, 8% e 1,9% das espécies isoladas das cavernas. Em uma revisão mundial listando as espécies fúngicas encontradas em cavernas e minas, cerca de 75% das espécies pertencem ao filo Ascomycota, com uma diferença significativa do segundo filo com a maior quantidade de espécies (ZHANG *et al.* 2021).

Considerados fungos cosmopolitas, *Penicillium* e *Aspergillus* também são encontrados em cavernas, isolados praticamente de todos os substratos (VISAGIE *et al.* 2021; VISAGIE *et al.* 2020; ZHANG *et al.* 2021). *Penicillium* foi o gênero mais frequentemente observado neste estudo, tanto em abundância quanto em riqueza, com 11 espécies identificadas (35% do total), e destas, seis são possíveis novas descobertas para a ciência. Espécies novas de *Penicillium* já foram descritas de cavernas, como *P. speluncae*, isolado do corpo de um pequeno roedor (*Peromyscus maniculatus*) encontrado em uma caverna no Canadá (VISAGIE *et al.* 2020).

Quanto à riqueza de *Penicillium*, Kozlova & Mazina (2020) também encontraram uma quantidade expressiva de espécies desse gênero em cavernas na Europa, o que representou 29% do total de táxons de fungos identificados. Em um sistema de cavernas na Eslováquia, Nováková (2009) listou uma grande diversidade de táxons de fungos no sedimento (86), e mesmo com 45 gêneros observados, *Penicillium* se sobressaiu com o maior quantitativo de táxons identificados (7).

Apesar de espécies de *Talaromyces* não serem constantemente encontradas em ambientes cavernícolas como outros representantes da ordem Eurotiales, já foram relatadas mais de 24 espécies do gênero presentes em cavidades subterrâneas pelo mundo (ZHANG *et al.* 2021), e neste estudo, 5 diferentes táxons foram isolados. Diferindo da maioria das pesquisas em que grande parte das espécies encontradas em cavernas pertencem aos gêneros *Penicillium* ou *Aspergillus*, neste estudo, *Talaromyces* foi o segundo grupo com maior riqueza.

Apesar de *Aspergillus* ser um grupo geralmente relatado em maior quantidade de espécies isoladas de cavernas (VANDERWOLF *et al.* 2013; CUNHA *et al.* 2020; ALVES *et al.* 2022), neste estudo não houve um número expressivo de espécies, sendo identificado apenas 4 táxons. Dentre as espécies listadas, todas já foram relatadas em cavernas pelo mundo, como *A. aculaetus* e *A. nomiae*, espécies raramente relatadas em cavernas brasileiras.

Outra espécie encontrada, *A. bertholletiae*, originalmente isolada da castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa*) (TANIWAKI *et al.* 2012), foi apenas relatada no ar da *bat cave* Meu Rei, em Pernambuco (CUNHA *et al.* 2020), o que se pode considerar, então, como este sendo o segundo relato da presença desta espécie em cavernas em geral. Já *A. sydowii* é comumente obtido de diversos substratos de cavernas, seja do sedimento, ar, guano de morcegos, e até em moscas parasitas de

morcegos (*bat flies*) (TAYLOR *et al.* 2013; JIANG, CAI & LIU, 2017; VISAGIE *et al.* 2021; CARVALHO *et al.* 2022).

Leveduras do subfilo Saccharomycotina também foram isoladas neste estudo. Espécies de *Blastobotrys* já foram descritas de amostras de cavernas, como *B. malaysiensis*, levedura originalmente isolada do solo de uma caverna na Malásia, com apenas um registro de distribuição fora do continente asiático, sendo este do sedimento de uma caverna no estado Goiás (SÁ, LEONARDO-SILVA & XAVIER-SANTOS, 2022). Sendo assim, este estudo evidencia um segundo registro da espécie em cavernas na América do Sul.

Em relação ao filo Basidiomycota, apenas a espécie de levedura *Saitozyma podzolica* foi isolada neste estudo. Tal espécie já foi relatada em solo e guano de morcegos em cavernas da China e Japão (SUGITA *et al.* 2005; ZHANG *et al.* 2021), porém, não havia ainda registros da espécie em cavernas brasileiras. Espécies deste filo não costumam ser encontrados abundantemente em ambiente hipógeos, especialmente macrofungos do grupo, isso porque não são facilmente cultiváveis, e muitas vezes precisam estar associados a substratos ricos em nutrientes, como madeira ou outros tipos de matéria orgânica que são escassos nesses ambientes (VANDERWOLF *et al.* 2013).

Quanto ao filo Mucoromycota, gêneros como *Absidia* são considerados fungos encontrados com certa frequência em cavernas, ainda que em baixa abundância (VANDERWOLF *et al.* 2013). Entretanto, em relação a riqueza, apenas 6 táxons do gênero foram relatados em cavernas pelo mundo, e outros gêneros do filo costumam ser isolados desses ambientes, como *Mucor* e *Rhizopus*, tanto em cavernas no Brasil como pelo mundo (ZHANG *et al.* 2021). Para o Brasil, este é o primeiro relato da presença de *Absidia* em cavernas.

### 7.3 FUNGOS PATOGÊNICOS E OPORTUNISTAS

Ainda que tenham sido coletadas pequenas amostras de guano de morcego misturado ao sedimento da caverna, neste estudo não foi isolado nenhum fungo reconhecidamente patogênico aos seres humanos, como *Histoplasma capsulatum*, comumente associado a esse tipo de substrato (JURADO *et al.* 2010). Entretanto, a espécie fúngica oportunista foi encontrada, *Aspergillus nomiae* (sinônimo *A. nomius*),

fungo considerado classe de risco biológico nível 2 pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2022).

*Aspergillus nomiae* é conhecido por produzir substâncias como aflatoxinas e ter um efeito cancerígeno (ESPINOSA *et al.* 2021). Entretanto, infecções causadas diretamente por esta espécie são raras, e tem-se o conhecimento de infecção em apenas cinco pacientes em todo o mundo, os quais se manifestaram em infecções pulmonares, úlcera rinofacial, onicomicose, e outros tipos de apresentação clínica (ZHOU *et al.* 2020). Além disso, a maioria dos pacientes infectados já sofria com algum tipo de imunossupressão ou com fatores predisponentes como leucemia, diabetes e tuberculose (ZHOU *et al.* 2020).

*Aspergillus sydowii* é conhecido por causar uma série de infecções em animais marinhos, e casos de aspergilose em humanos não são amplamente estudados (NAGASHIMA *et al.* 2023). Existem alguns registros de infecções causadas por esta espécie, como infecção pulmonar, de pele e unhas, entretanto, assim como em casos de *A. nomiae*, a maioria dos pacientes eram imunocomprometidos ou apresentavam doenças pré-existentes, como pneumonia ou eram positivo para HIV (BORGOHAIN *et al.* 2019; NAGASHIMA *et al.* 2023).

#### 7.4 NOVOS RELATOS DE ESPÉCIES FÚNGICAS EM CAVERNAS

Sete táxons (22%) dos 31 identificados apenas do sedimento da caverna Vale da Lua estão sendo relatados pela primeira vez em cavernas no mundo todo, sendo estas espécies: *Blastobotrys vanleenenianus*, *Penicillium meliponae*, *P. tanzanicum*, *Sporothrix cf. eucalyptigena*, *Talaromyces albobiverticillius*, *Tolypocladium tropicale* e *Trichoderma strigosum*.

Cunha *et al.* (2020) relataram pela primeira vez para o território brasileiro a microbiota de uma *bat cave*, e revelaram uma diversidade notável, visto que cerca de metade dos táxons descobertos ainda não tinham sido registrados em ambientes cavernícolas pelo mundo. Zhang *et al.* (2017) também demonstraram uma diversidade de fungos cavernícolas ainda desconhecida, onde 59% das espécies identificadas foram relatadas pela primeira vez em ambientes subterrâneos.

Além disso, seis possíveis novas espécies de *Penicillium* foram descritas neste trabalho, e suspeita-se que há outras espécies ainda a serem descobertas. Existem cerca de 140.000 espécies descritas atualmente, e apenas 2.000 espécies,

aproximadamente, foram relatadas em ambientes cavernícolas (ZHANG *et al.* 2021), o que mostra o quão pouco estudada é a microbiota desses locais, o que resulta em estudos constantemente demonstrando novas ocorrências de espécies em cavernas, e até mesmo descrição de novos gêneros e espécies.

## 8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A caverna Vale da Lua apresentou uma notável riqueza e abundância de fungos cultiváveis do sedimento. Grande parte das espécies identificadas já foram registradas em ambientes subterrâneos, entretanto também houve novas ocorrências de espécies de fungos para ambientes cavernícolas no Brasil e mundo, além da descrição de possíveis espécies ainda desconhecidas para a taxonomia.

Tais dados corroboram com afirmações de que cavernas possuem grande potencial para abrigar espécies de fungos ainda desconhecidas, o que reforça a necessidade de políticas e práticas voltadas para a preservação e uso sustentável de cavernas, ainda mais de biomas megadiversos como a Amazônia.

Não foi detectado espécies reconhecidamente patogênicas ao homem por meio das técnicas de isolamento aqui empregadas, entretanto, tais resultados não descartam a presença de tais fungos nesse tipo de ambiente, necessitando assim a utilização de outras metodologias mais abrangentes, como metagenômica, para confirmar a ausência desses fungos.

Estudos complementares estão sendo realizados em outros substratos da caverna Vale da Lua, o que ajudará em uma compreensão mais completa da microbiota presente nesse ambiente. Além disso, tais resultados fornecerão dados micológicos para a elaboração do plano de manejo da caverna, aumentando o apelo pela conservação de cavernas, sobretudo do bioma amazônico.

## REFERÊNCIAS

- ALVES, V. C. S.; LIRA, R. A.; LIMA, J. M. S.; BARBOSA, R. N.; BENTO, D. M.; BARBIER, E.; BERNARD, E.; SOUZA-MOTTA, C.M.; BEZERRA, J. D. P. Unravelling the fungal darkness in a tropical cave: richness and the description of one new genus and six new species. **Fungal Systematics and Evolution**, v. 10, p. 139-167, 2022.
- ARAÚJO, H. R. **Propostas para o desenvolvimento sustentável do espeleoturismo no Brasil**. Estudo comparativo com a experiência portuguesa. 2019. Tese (Doutorado em Turismo) – Universidade de Lisboa, Lisboa, 2019.
- ARRAUT, J. R.; NOBRE, C.; BARBOSA, H. M. J.; OBREGON, G.; MARENGO, J. A. Aerial Rivers and Lakes: Looking at Large-Scale Moisture Transport and Its Relation to Amazonia and to Subtropical Rainfall in South America. **Journal of Climate**, v. 25, n. 2, p. 543-556, 2012.
- BORGOHAIN, P.; BARUA, P.; DUTTA, P. J.; SHAW, D.; RUDRAMURTHY, S. M. Onychomycosis associated with superficial skin infection due to *Aspergillus sydowii* in an immunocompromised patient. **Mycopathologia**, v. 184, n. 5, p. 683–689, 2019.
- BRASIL. Decreto nº 6.640, de 7 de novembro de 2008. Dá nova redação aos arts. 1o, 2o, 3o, 4o e 5o e acrescenta os arts. 5-A e 5-B ao Decreto nº 99.556, de 1º de outubro de 1990, que dispõe sobre a proteção das cavidades naturais subterrâneas existentes no território nacional. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, DF, 10 de novembro de 2008.
- BRASIL. Decreto nº 99.556, de 1 de outubro de 1990. Dispõe sobre a proteção das cavidades naturais subterrâneas existentes no território nacional, e dá outras providências. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, DF, 1 de outubro de 1990.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia, Inovação e Insumos Estratégicos em Saúde. Departamento de Gestão e Incorporação de Tecnologias e Inovação em Saúde. **Classificação de risco dos agentes biológicos**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2022. 76 p.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Resolução Conama nº 347, de 13 de setembro de 2004. Dispõe sobre a proteção do patrimônio espeleológico. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, DF, 13 de setembro de 2004.
- CARVALHO, J. L. V. R.; LIMA, J. M. S.; BARBIER, E.; BERNARD, E.; BEZERRA, J. D. P.; SOUZA-MOTTA, C. M. Ticket to ride: fungi from bat ectoparasites in a tropical cave and the description of two new species. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 53, p. 2077–2091, 2022.
- CASTRILLÓN, A. L.; MORAES, M. A. P.; FURTADO, M. S. S. Isolamento de *Microsporum amazonicum* do solo do estado do Amazonas, Brasil. **Acta Amazônica**, v. 6, p. 487–490, 1976.

CECAV. Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Cavernas. Instituto Chico Mendes De Conservação da Biodiversidade (ICMBio/CECAV). **Anuário estatístico do patrimônio espeleológico brasileiro 2022**. Brasília, n. 5, 2023.

CHEEPHTAM, N. Advances and Challenges in Studying Cave Microbial Diversity. **SpringerBriefs in Microbiology**, v. 1, p. 1–34, 2012.

CROUS, P.W.; LUANGSA-ARD, J. J.; WINGFIELD, M. J. *et al.* Fungal Planet description sheets 785-867. **Persoonia**, v. 41, p. 238–417, 2018.

CRUZ, J. B.; PILÓ, L. B. Fragilidades e impactos ambientais no carste e nas cavernas. *In*: CRUZ, J. B.; PILÓ, L. B. (org.). Espeleologia e Licenciamento Ambiental. Brasília: ICMBio, p. 167-216, 2019.

CTFB. **Catálogo Taxonômico da Fauna do Brasil**. Disponível em: <<http://fauna.jbrj.gov.br/fauna/faunadobrasil/2>>. Acesso em: 10 nov. 2023.

CULVER, D. C.; PIPAN, T. **The biology of caves and other subterranean habitats**. USA: Oxford University Press, 2 ed. 2019. 336 p.

CUNHA, A. O.; BEZERRA, J. D. P.; OLIVEIRA, T. G.; BARBIER, E.; BERNARD, E.; MACHADO, A.R.; SOUZA-MOTTA, C. M. Living in the dark: Bat caves as hotspots of fungal diversity. **PloS ONE**, v. 15, n. 12, p. 1-24, 2020.

DE HOOG, G. S.; VAN DEN ENDE, A. H. G. G. Molecular diagnostics of clinical strains of filamentous Basidiomycetes. **Mycoses**, v. 41, p. 183–189, 1998.

DOCAMPO, S.; TRIGO, M. M.; RECIO, M.; MELGAR, M.; GARCÍA-SÁNCHEZ, J.; CALDERÓN-EZQUERRO, M. C.; CABEZUDO, B. High incidence of *Aspergillus* and *Penicillium* spores in the atmosphere of the cave of Nerja (Malaga, southern Spain). **Aerobiologia**, v. 26, p. 89-98, 2010.

ENGEL, A.S. Microbial diversity of cave ecosystem. *In*: BARTON, L.; MANDL, M.; LOY, A. (eds.). **Geomicrobiology: Molecular and Environmental Perspective**. Springer: Dordrecht, p. 219–238, 2010.

ESPINOSA, K. C. S.; CHÁVEZ, M. A.; DUARTE-ESCALANTE, E.; FLORES, T. I. R.; FRÍAS-DE-LEÓN, M. G.; REYES-MONTES, M. R. Phylogenetic Identification, Diversity, and Richness of *Aspergillus* from Homes in Havana, Cuba. **Microorganisms**, v. 9, n. 1 p. 115, 2021.

FERREIRA, R. L.; NONAKA, E.; ROSA, C. A. Riqueza e abundância de fungos associados ao guano de morcegos hematófagos na Gruta da Lavoura. **O Carste**, v. 12, p. 46–51, 2000.

FONSECA, R. M. P.; PAULA, C. C. P.; BICHUETTE, M. E.; CHAGAS-JÚNIOR A. First record of *Amphoromorpha/Basidiobolus* fungus on centipedes (Geophilomorpha, Geophilidae) from brazilian caves. **Subterranean Biology**, v. 32, p. 61–67, 2019.

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

GARCÍA, M. C. C.; RESTREPO, S. R.; FRANCO-MOLANO, A. E.; TOQUICA, M. C.; ESTUPINAN, N. V. **Biología de hongos**. Bogotá: Universidad de los Andes, Facultad de Ciencia, 2012, 520 p.

GLASS, N. L.; DONALDSON, G. C. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, p. 1323–1330, 1995.

HAWKSWORTH, D.L.; LÜCKING, R. Fungal diversity revisited: 2.2 to 3.8 million species. **Microbiology Spectrum**, v. 5, n. 4, 2017.

HONG, S. B.; CHO, H. S.; SHIN, H. D.; FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A. Novel *Neosartorya* species isolated from soil in Korea. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, p. 477–486, 2006.

HORNICK, B. L. Fungal iron oxidation in Brazilian iron caves. **Honors Research Projects**, v. 432, 2017.

HOUBRAKEN, J.; KOCSUBÉ, S.; VISAGIE C. M.; YILMAZ, N.; WANG, X. C.; MEIJER, M.; KRAAK, B.; HUBKA, V.; BENSCH, K.; SAMSON, R. A.; FRISVAD, J. C. Classification of *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces* and related genera (Eurotiales): an overview of families, genera, subgenera, sections, series and species. **Studies in Mycology**, n. 95, p. 5-169, 2020.

HOUBRAKEN, J.; LÓPEZ-QUINTERO, C. A.; FRISVAD, J. C.; BOEKHOUT, T.; THEELEN, B.; FRANCO-MOLANO, A. E.; SAMSON, R. A. *Penicillium araracuarensis* sp. nov., *Penicillium elleniae* sp. nov., *Penicillium penarajense* sp. nov., *Penicillium vanderhammenii* sp. nov. and *Penicillium wotroi* sp. nov., isolated from leaf litter. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, n. 61, p. 1462–1475, 2011.

IBGE. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/geociencias/informacoes-ambientais/vegetacao/15842-biomassas>>. Acesso em: 14 nov. 2023.

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

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

JIANG, J. R.; CAI, L.; LIU, F. Oligotrophic fungi from a carbonate cave, with three new species of *Cephalotrichum*. **Mycology**, v. 8, p. 164–177, 2017.

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

KATOH, K.; STANDLEY, D. M. MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, p. 772–780, 2013.

KENDRICK, B. **The Fifth Kingdom: An Introduction to Mycology**. USA: Hackett Publishing Company, 4. ed. 2017. 512 p.

KOSZNIK-KWAŚNICKA, K.; GOLEC, P.; JAROSZEWICZ, W.; LUBOMSKA, D.; PIECHOWICZ, L. Into the Unknown: Microbial Communities in Caves, Their Role, and Potential Use. **Microorganisms**, v. 10, n. 2, p. 222, 2022.

KOZLOVA, E. V.; MAZINA, S. E. Biodiversity of Fungi in the photic and aphotic zones of Montenegro caves. **Aerobiologia**, v. 36 p. 589–604, 2020.

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. **Molecular Biology and Evolution**, v. 33, p. 1870–1874, 2016.

LOBO, A. S. L.; PERINOTTO, J. A. J.; BOGGIANI, P. C. Espeleoturismo no Brasil: panorama geral e perspectivas de sustentabilidade. **Revista Brasileira de Ecoturismo**, v. 1, n. 1, p. 62-83, 2008.

MAN, B.; WANG, H.; XIANG, X.; WANG, R.; YUN, Y.; GONG, L. Phylogenetic diversity of culturable fungi in the Heshang Cave, central China. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 1158, 2015.

MARENCO, J. A.; ESPINOZA, J. C. Extreme seasonal droughts and floods in Amazonia: causes, trends and impacts. **International Journal of Climatology**, v. 36, p. 1033-1050, 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*: CONGRESSO BRASILEIRO DE ESPELEOLOGIA, n. 33., 2015, Eldorado. **Anais [...]**. Campinas: Sociedade Brasileira de Espeleologia, 2015. p.161-168.

MASCLAUX, F.; GUEHO, E.; DE HOOG, G. S.; CHRISTEN, R. Phylogenetic relationships of human-pathogenic *Cladosporium* (Xylohypha) species inferred from partial LS rRNA sequences. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 33, p. 327–338, 1995.

MILLER, M.A.; PFEIFFER, W.; SCHWARTZ, T. The CIPRES science gateway: enabling high-impact science for phylogenetics researchers with limited resources. *In*: STEWART, C. (ed.). **Proceedings of the 1st Conference of the Extreme Science and Engineering Discovery Environment: Bridging from the extreme to the campus and beyond**. USA: Association for Computing Machinery, p. 1-8, 2012.

NAGASHIMA, A.; NAGATO, T.; KOBORI, T.; NAGI, M.; OKOCHI, Y. Uncommon Occurrence of Pulmonary Aspergillosis Caused by *Aspergillus sydowii*: A Case Report. **Cureus**, v. 15, n. 12, p. e51353, 2023.

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

OGÓREK, R.; DYLAG, M.; KOZAK, B.; VISNOVSKÁ, Z.; TANCINOVÁ, D.; LEJMAN, A. Fungi isolated and quantified from bat guano and air in Harmanecká and Driny Caves (Slovakia). **Journal of Cave and Karst Studies**, v. 78, n. 1, p. 41-49, 2016.

OGÓREK, R.; LEJMAN, A.; MATKOWSKI, K. Influence of the external environment on airborne fungi isolated from a cave. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 23, n. 2, p. 435–440, 2014.

PAULA, C. C. P.; MONTOYA, Q. V.; RODRIGUES, A.; BICHUETTE, M. E.; SELEGHIM, M. H. R. Terrestrial filamentous fungi from Gruta do Catão (São Desidério, Bahia, Northeastern Brazil) show high levels of cellulose degradation. **Journal of Cave and Karst Studies**, v. 78, p. 208–217, 2016.

PEDRO, E. G.; BONONI, V. L. R. Cave fungi of the karst region of the State Touristic Park of the Upper Ribeira Valley (PETAR) in the state of São Paulo in Brazil. **Focus**, v. 1, n. 2, p. 6578, 2007.

PEREIRA, M. L. S.; CARVALHO, J. L. V. R.; LIMA, J. M. S.; BARBIER, E.; BERNARD, E.; BEZERRA, J. D. P.; SOUZA-MOTTA, C. M. Richness of *Cladosporium* in a tropical bat cave with the description of two new species. **Mycological Progress**, v. 21, p. 345–357, 2022.

PILÓ, L. B.; AULER, A. S. Geoespeleologia das cavernas em rochas ferríferas da Região de Carajás, PA. *In*: CONGRESSO BRASILEIRO DE ESPELEOLOGIA, n. 30., 2009, Montes Claros. **Anais [...]**. Montes Claros: Sociedade Brasileira de Espeleologia, 2009. p. 181-186.

PILÓ, L. B.; AULER, A. S. Introdução à espeleologia. *In*: CRUZ, J. B.; PILÓ, L. B. (org.). *Espeleologia e Licenciamento Ambiental*. Brasília: ICMBio, p. 9-38, 2019.

PIRES, J. M.; PRANCE, G. T. The vegetation types of the Brazilian Amazon. *In*: PRANCE, G. T.; LEVEJOY, T. E. (eds.). **Key Environments: AMAZONIA**. New York: Pergamon Press, p. 109-145, 1985.

PUIG, H. **A Floresta Tropical Úmida**. São Paulo: UNESP, 2008. 496p.

PUSZ, W.; KRÓL, M.; ZWIJACZ-KOZICA, T. Airborne fungi as indicators of ecosystem disturbance: an example from selected Tatra Mountains caves (Poland). **Aerobiologia**, v. 34, p. 111-118, 2018.

RAMBAUT A. **FigTree, version 1.4.3**. Edinburgh, Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh, 2016.

RAYNER, R. W. **A mycological colour chart**. London: Commonwealth Mycological Institute, 1970.

REEDER, D. M.; MOORE, M. S. White-Nose Syndrome: A Deadly Emerging Infectious Disease of Hibernating Bats. **Bat Evolution, Ecology, and Conservation**, p. 413-434, 2013.

ROGERS, A. L.; BENEKE, E. S. Human pathogenic fungi recovered from Brazilian soil. **Mycopathologia et mycologia applicata**, v. 22, p. 15–20, 1963.

SÁ, A. S. F.; LEONARDO-SILVA, L.; XAVIER-SANTOS, S. Expanding the geographical distribution of *Blastobotrys malaysiensis* (Saccharomycetales) beyond the Asian continent – a cave fungus first reported in the Americas. **Biodiversity Data Journal**, v. 10, p. e80226, 2022.

SAIZ-JIMENEZ, C. Microbiological and environmental issues in show caves. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, p. 2453-2464, 2012.

SCULLY, M. C.; BADDLEY, J. W. Epidemiology of Histoplasmosis. **Current Fungal Infection Reports**, v. 12, n. 1, p. 51–58, 2018.

SILVA, J. M. P. **Território e Mineração em Carajás**. Belém: GAFTA/UFBA, 1 ed., 2013. 275 p.

SKIRY CZ, A.; CASTILHO, A.; CHAPARRO, C.; CARVALHO, N.; TZOTZOS, G.; SIQUEIRA, J. O. Canga biodiversity, a matter of mining. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, p. 1-9, 2014.

SMITH, G. Some new and interesting species of microfungi. **Trans. Br. Mycol. Soc.**, n. 40, p. 481-488, 1957.

STAMATAKIS A. RAxML Version 8: A tool for Phylogenetic Analysis and Post-Analysis of Large Phylogenies. **Bioinformatics**, v. 30, p. 1312-1313, 2014.

STAMATAKIS A. RAxML Version 8: A tool for Phylogenetic Analysis and Post-Analysis of Large Phylogenies. **Bioinformatics**, v. 30, p. 1312-1313, 2014.

SUGITA, T.; KIKUCHI, K.; MAKIMURA, K.; URATA, K.; SOMEYA, T.; KAMEI, K.; NIIMI, M.; UEHARA, Y. *Trichosporon* species isolated from guano samples obtained from bat-inhabited caves in Japan. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, p. 7626-7629, 2005.

TANIWAKI, M. H.; PITT, J. I.; IAMANAKA, B. T.; SARTORI, D.; COPETTI, M. V.; BALAJEE, A.; FUNGARO, M. H. P.; FRISVAD, J. C. *Aspergillus bertholletius* sp. nov. from Brazil Nuts. **PLoS ONE**, v. 7, n. 8, p. e42480, 2012.

TAYLOR, E. L. S.; FERREIRA, R. L.; CARDOSO, P. G.; STOIANOFF, M. A. R. Cave entrance dependent spore dispersion of filamentous fungi isolated from various sediments of iron ore cave in Brazil: a colloquy on human threats while caving. **Ambient Science**, v. 1, p. 16–28, 2014.

TAYLOR, E. L. S.; RESENDE-STOIANOFF, M. A.; FERREIRA, R. L. Mycological study for a management plan of a Neotropical show cave (Brazil). **International Journal of Speleology**, v. 42, p. 267–277, 2013.

TEIXEIRA, M. F. S.; SILVA, T. A.; PALHETA, R. A.; CARNEIRO, A. L. B.; ATAYDE H. M. **Fungos da Amazônia: uma riqueza inexplorada**: Aplicações Biotecnológicas. Manaus: Edua, 2011. 255 p.

TRAJANO, E.; BESSI, R. A classificação Shiner-Racovitza dos organismos subterrâneos: uma análise crítica, dificuldades para aplicação e implicações para conservação. **Espeleo-Tema**, v. 28, n. 1, p. 87-102, 2017.

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**, v. 42, p. 77–96, 2013.

VILGALYS, R.; HESTER, M. Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. **Journal of Bacteriology**, v. 172, n. 8, p. 4238–4246, 1990.

VISAGIE, C. M.; GOODWELL, M.; NKWE, D. O. *Aspergillus* diversity from the Gcwihaba Cave in Botswana and description of one new species. **Fungal Systematics and Evolution**, v. 8, p. 81–89. 2021.

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, 2020.

WASTI, I. G.; KHAN, F. A. A.; BERNARD, H.; HASSAN, N. H.; FAYLE, T.; SEELAN, J. S. S. Fungal communities in bat guano, speleothem surfaces, and cavern water in Madai cave, Northern Borneo (Malaysia). **Mycology**, v. 12, n. 3, p. 188-202, 2021.

WEBSTER J.; WEBER, W. S. **Introduction to Fungi**. Cambridge: Cambridge University Press, 3 ed., 2007. 875 p.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, L. Amplification and direct sequencing of fungal RNA genes for phylogenetics. *In*: INNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; SNINSKY, J.J.; WHITE, T. J. (eds.). **PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications**. San Diego: Academic Press, 1990, p. 315–322.

WHITE, W. B.; CULVER, D. C. **The Encyclopedia of Caves**. Elsevier Academic Press, San Diego, 2012. 654 p.

WIJAYAWARDENE, N. N.; HYDE, K. D.; AL-ANI, L. K. T. *et al.* Outline of Fungi and fungus-like taxa. **Mycosphere**, v. 11, n. 1, p. 1060-1456, 2020.

XU, J. Fungal species concepts in the genomics era. **Genome**, v. 63, p. 459–468, 2020.

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.

ZHANG, Z. F.; ZHAO, P.; CAI, L. Origin of cave fungi. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 1407, 2018.

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**, v. 106, p. 29–136, 2021.

ZHOU, Y. B.; LI, D. M.; HOUBRAKEN, J.; SUN, T. T.; DE HOOG, G. S. Fatal Rhinofacial Mycosis Due to *Aspergillus nomiae*: Case Report and Review of Published Literature. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 595375, 2020.