



TCCE ICMBio / VALE
COMPENSAÇÃO ESPELEOLÓGICA

RELATÓRIO TÉCNICO FINAL

Nº 4

TCCE Nº 01/2018:
Diversidade de organismos do solo, em cavernas em formação ferrífera no Quadrilátero
Ferrífero, Minas Gerais, Brasil, com uso de DNA *metabarcoding*.

04/2024

Termo de compromisso



Coordenação Executiva



Gestão Operacional





TCCE ICMBio / VALE
COMPENSAÇÃO ESPELEOLÓGICA

A/C

Instituto Brasileiro de Desenvolvimento e Sustentabilidade - IABS SRTV Quadra 701,
Conjunto L, Lote 38, Bloco 1, Sala 704, Parte A96, Brasília/DF, 70.340-906

Prezados(as),

Vimos por meio deste encaminhar o primeiro relatório técnico parcial do projeto aprovado “Diversidade de organismos do solo, em cavernas em formação ferrífera no Quadrilátero Ferrífero, Minas Gerais, Brasil, com uso de DNA *metabarcoding*” referente ao Edital de Chamada Pública nº 01/2021 “Geossistemas Ferruginosos concernentes aos componentes 1 e 3 do Programa Nacional de Conservação do Patrimônio Espeleológico” no âmbito do TCCE Nº 01/2018 – ICMBio a fim de comprovar a execução física-financeira dos recursos recebidos até o presente momento.

Cordialmente,

Micheline Carvalho Silva.

Micheline Carvalho Silva

Termo de compromisso



Coordenação Executiva



Gestão Operacional





TCCE ICMBio / VALE
COMPENSAÇÃO ESPELEOLÓGICA

DADOS DO PROJETO	
Nome do Projeto: Diversidade de organismos do solo, em cavernas em formação ferrífera no Quadrilátero Ferrífero, Minas Gerais, Brasil, com uso de DNA <i>metabarcoding</i> .	
Data de entrega: 24/04/2024	Periodicidade do relatório: Até março-2024

1) Introdução:

Cavernas são cavidades naturais subterrâneas singulares devido às restrições de luz, estabilidade de temperatura e escassez de nutrientes, o que favorece a colonização por microrganismos únicos e uma flora e fauna adaptadas (GANEN, 2009). Embora as cavernas estejam inseridas no artigo 20 da Constituição Brasileira como bens da União e possuem legislação específica (Resolução nº 05 de 06/08/87, Portaria do IBAMA nº 887 de 15/06/90 e Decreto Federal nº 99.556 de 01/10/90) que estabelecem sua proteção e as formas de uso admitidas, a proteção e conservação das cavernas brasileiras ainda está ameaçada por intervenções antrópicas (WATSON, 1997).

No Brasil, são registradas aproximadamente 20.000 mil cavernas (ICMBio, 2021) com diversas litologias (MARQUES et al., 2015), sendo que 14% desse total, são encontradas em geossistemas ferruginosos, os quais apresentam 2.772 cavidades cadastradas até o ano de 2020 (ICMBIO/CECAV).

As cavernas do Quadrilátero ferrífero de Minas Gerais, estão hospedadas em diferentes contextos litológicos e estágios de alteração envolvendo canga, itabirito (rocha sã) e itabirito intemperizado, e inseridas em diversos contextos megaestruturais (CALUX 2013). São divididas em zonas de entrada, crepúsculo e escuro com base na extensão em que a luz e o clima externo impactam o ambiente da caverna (HUMPHREYS, 2000). No entanto, a crescente expansão urbana, o turismo, o desmatamento para produção agrícola, exploração mineral e a poluição hídrica vem ameaçando a manutenção desses ecossistemas.

Termo de compromisso



Coordenação Executiva



Gestão Operacional





TCCE ICMBio / VALE
COMPENSAÇÃO ESPELEOLÓGICA

Estudos sobre plantas vasculares na entrada de cavernas são raros entretanto estudos sobre a funa já são mais comuns. Embora novas espécies tenham sido recentemente descobertas para as cavernas brasileiras como gastrópodes, artrópodes, aracnídeos, isópodes, entre outros (ÁZARA; FERREIRA, 2013; BASTOS-PEREIRA; FERREIRA, 2015; CAMPOS-FILHO et al. 2014; SALVADOR et al. 2017; VASCONCELOS; FERREIRA, 2016), inventários bioespeleológicos ainda são raros quando tratamos de outros organismos além da fauna em ambientes cavernícolas.

Inicialmente a identificação de organismos de cavernas tem se limitado a aqueles que pudessem ser identificados através dos caracteres morfológicos ou aqueles microrganismos que pudessem ser cultivados o que sugere que uma grande quantidade de microrganismos permanece desconhecidos (BARTON; NORTHUP, 2007).

De forma a minimizar essas limitações, a utilização da técnica de DNA *metabarcoding* de solo tem sido aplicado, com sucesso, para diversos ambientes, incluindo ambientes com organismos extremófilos e negligenciados taxonomicamente (CÂMARA et al., 2021; CARVALHO-SILVA et al., 2021; MORSE et al., 2021, OGAKI et al., 2021; ROSA et al., 2020; THOMPSON et al., 2019). O DNA *metabarcoding* do solo fornece uma visão ampla da diversidade de organismos (FAHNER et al., 2016) e é capaz de revelar táxons não detectáveis através das técnicas tradicionais de taxonomia.

Segundo Czechowski et al. (2017) e Rippin et al. (2018) o uso de ferramentas moleculares revelam, em média, uma diversidade entre 6 e 11 vezes maior do que usando métodos tradicionais de identificação morfológica. A técnica sido aplicada em cavernas para poucos organismos como algas, bactérias, fungos, (BURGOYNE et al., 2021; MORSE et al., 2021; MURRAY et al., 2013, PFENDLER et al., 2018, RAMALHO et al., 2018), e nenhum estudo tem sido realizado de forma ampla, com foco em sete grupos de organismos para o quadrilátero ferrífero. É sabido que o número de cavernas conhecidas no Brasil tem aumentado substancialmente-mais de 2.000 novas descobertas somente entre 2018 e 2019 (ICMBIO, 2021). A caracterização da diversidade de organismos desses ambientes não tem acompanhado essas descobertas e assim, muitas

Termo de compromisso



Coordenação Executiva



Gestão Operacional





TCCE ICMBio / VALE
COMPENSAÇÃO ESPELEOLÓGICA

ainda precisam ser estudadas. Acredita-se que a aplicação da técnica DNA *metabarcoding* pode dar um panorama mais rápido e mais preciso do potencial de organismos existente nas cavernas do Quadrilátero Ferrífero.

2) atividades desenvolvidas x planejadas:

Todas as atividades planejadas foram desenvolvidas durante os dois anos de projeto. Os dados não estão todos publicados, mas estão sendo preparados.

- a) Foram coletadas mais de 660 amostras que estão identificadas e incorporadas no herbário UB. Foram contempladas as Bryophyta, Marchantiophyta, Monilophyta e Lycopphyta além das Angiospermas e Líquens.
- b) Artigo considerando os dados de Angiospermas e Licophyta e monilófitas já foram submetidos para publicação na revista Flora. “Vascular plants diversity of Caves from iron formations in Iron Quadrangle, MinasGerais, Brazil”
- c) Dados sobre Bryophyta e Marchanthiophyta são parte da dissertação de mestrado da aluna do curso de Pós graduação em Botânica da Universidade de Brasília, com previsão de finalização em setembro de 2024.
- d) Dados sobre líquens não serão publicados devido a serem pouco expressivos.
- e) Considerando DNA metabarcoding foram coletadas amostras em seis cavernas em duas estações.
- f) Artigo considerando dados de duas cavernas já foi submetido para publicação na revista Organisms Diversity and Evolution dados sobre DNA metabarcoding de organismos eucariotos exceto fungos .”artigo científico – Novelties on non-fungal eukaryotic communities in Iron Formation caves using ametabarcoding approach”
- g) Dados físicos-químico dos solos, da precipitação, luminosidade e humidade relativa estão sendo utilizados dentro dos artigos científicos.

Termo de compromisso



Coordenação Executiva



Gestão Operacional





TCCE ICMBio / VALE
COMPENSAÇÃO ESPELEOLÓGICA

3) Metodologia:

Amostragem de solo:

Foram realizadas quatro expedições de coletas onde foram amostradas seis cavernas no Quadrilátero Ferrífero de Minas Gerais. As cavernas escolhidas foram GAND006, SG16, SG051 no município de Rio Acima e CCA54, CCB49/50 e CCB 30 no município de Mariana.

Em cada caverna foram coletadas amostras superficiais de solo, a 10 cm de profundidade, sendo três amostras na entrada, três amostras na zona de crepúsculo e três na zona escuro. Também foram coletadas três amostras fora da caverna para comparação e verificação da interferência do exterior com o interior da caverna. As tres amostras de cada zona foram reunidas em uma única amostra composta do solo onde foram analisados quanto às propriedades químicas e texturais, realizadas segundo o protocolo da EMBRAPA (2017). As variáveis de solo obtidas serão: pH; teores de Ca+Mg, Ca, Mg, N, Al, H+Al, K, P, S, Na, Co, Zn, B, Cu, Fe, Mn e Mo; saturação de bases; saturação de Al; matéria orgânica; capacidade de troca catiônica e teores de argila, silte e areia.

Para análises de DNA-metabarcoding, cerca de 250g do solo superficial de cada amostra composta à 5 cm de profundidade foi coletado com auxílio de espátulas estéreis e colocados em sacos esterilizados WhirlPak (Sigma-Aldrich, USA) e então mantidos a -20°C até o processamento. A amostragem foi realizada na estação seca e na estação chuvosa. As coletas foram realizadas nas mesmas localidades em que foram coletadas material para análise de solo. Totalizando doze amostras por caverna.

Em cada zona de cada caverna foram coletados dados de intensidade de luz, com o auxílio de um luxímetro digital, de temperatura e umidade do ar, através de um termo-higrômetro digital de campo.

Amostragem da flora:

Termo de compromisso



Coordenação Executiva



Gestão Operacional





TCCE ICMBio / VALE
COMPENSAÇÃO ESPELEOLÓGICA

Para contabilizar a riqueza de espécies vasculares no entorno das cavernas realizaremos a amostragem florística ao longo de um raio de 100 m de comprimento da entrada da caverna. A amostragem florística também foi realizada no interior das cavernas quando necessário. Registramos as espécies por meio de adaptação ao método de levantamento rápido (RATTER et al., 2003; WALTER, GUARINO, 2006). A área do entorno percorrida e as diferentes espécies visualizadas foram coletadas e identificadas, nas estações seca e chuvosa. Todo o material está depositado no herbário UB.

Extração de DNA e Análise de dados: O DNA ambiental total foi extraído usando o QIAGEN Power Soil Kit (QIAGEN, Carlsbad, USA), seguindo as instruções do fabricante. Todo processo de extração foi feito em ambiente estéril tais como capela de fluxo a fim de evitar contaminação. O Internal Transcribed Spacer 2 (ITS2) do DNA nuclear ribossomal foi usado como barcode para identificação de espécies de Viridiplantae, Chromista, Protista e Fungi (CARVALHO-SILVA et al. 2021; CHEN et al., 2010). Para Bacteria e Archaea, foi usado o gene 16S rRNA (HERLEMANN et al. 2001; KLINDWORTH et al., 2013) e para Metazoa, Cox1 (FOLMER et al., 1994).

O sequenciamento (2 × 300 bp) foi realizado por MiSeq System (Illumina) pela MacroGen Inc. (Coréia do Sul). O software BBDuk v. 38.34 (BBMap – Bushnell B. – sourceforge.net/projects/bbmap/) foi utilizado para controle das sequências. As sequências foram importadas para o QIIME2 v. 2019.10 (<https://qiime2.org/>) para análises de bioinformáticas (BOLYEN et al., 2019). A identificação das espécies encontradas no solo foi realizada por meio do BLASTn (CAMACHO et al., 2009) nos diferentes bancos de dados (GenBank, UNITE, BOLD, MIDORI, PLANTITS2). Detalhes da metodologia pode ser encontrado nos artigos de Câmara et al. (2020), Carvalho-Silva et al. (2021), Ogaki et al. (2021) e Rosa et al. (2020).

Análises de dados: A análise de dados varia para acordo com cada artigo científico.

Termo de compromisso



Coordenação Executiva



Gestão Operacional





TCCE ICMBio / VALE
COMPENSAÇÃO ESPELEOLÓGICA

4) Resultados planejados alcançados e resultados derivados:

- a) Foram formados alunos de Iniciação científica e uma aluna de pos graduação esta ainda em formação.
- b) Artigos científicos estão sendo finalizados para publicação.
- c) Resultados foram apresentados em congressos científicos.
- d) recebimento de Menção honrosa de uma das alunas de PIBIC - Anna Cecilia Maia

(certificado já enviado em relatório anterior.)

- e) Participação e apresentação de 3 resumos científicos no Encontro de Botânicos do Centro -Oeste.

5) Produtos:

- a) Formação de dois alunos de Iniciação científica, 2 PIBIC finalizados (certificado já enviado em relatório anterior.)
- b) Entrega de relatórios de 2 PIBICs e envio de resumos para o **29º Congresso de Iniciação Científica da UnB e 20º Congresso de Iniciação Científica do DF.**
- c) Apresentação de 3 resumos científicos no Encontro de Botânicos do Centro -Oeste. (certificado já enviado em relatório anterior.)
- d) Submissão do artigo científico: "Novelties on non-fungal eukaryotic communities in Iron Formation caves using a metabarcoding approach"
- e) Submissão do artigo científico "Vascular plants diversity of caves from iron formations in Iron Quadrangle, Minas Gerais, Brazil"
- f) Formação de aluno de mestrado, dissertação a finalizar na pos graduação em botânica da Universidade de Brasília. Termino previsto em setembro de 2024.

Termo de compromisso



Coordenação Executiva



Gestão Operacional





TCCE ICMBio / VALE
COMPENSAÇÃO ESPELEOLÓGICA

g) conclusão

Dentre os produtos propostos no projeto original consta:

- Publicação de pelo menos cinco artigos científicos em revistas de alto impacto.
- Formação de alunos de graduação e pós-graduação do Distrito Federal no tema do projeto.

Como resultado deste, dois artigos já foram submetidos e os outros ainda encontram-se em preparação.

Foram formados dois alunos de iniciação científica como bolsa PIBIC oferecida pela Universidade de Brasília e uma futura mestre que finalizara em setembro do corrente ano a qual recebe bolsa CAPES pelo programa de pos graduação em botânica da universidade de Brasília.

Termo de compromisso



Coordenação Executiva



Gestão Operacional

