

**Fábio Luis Bondezan da Costa**

**Identificação de fungos isolados de cavidades naturais  
subterrâneas do Parque Estadual do Sumidouro.**

**Belo Horizonte  
Fevereiro - 2015**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA**

**Identificação de fungos isolados de cavidades naturais subterrâneas do  
Parque Estadual do Sumidouro.**

**FÁBIO LUIS BONDEZAN DA COSTA**

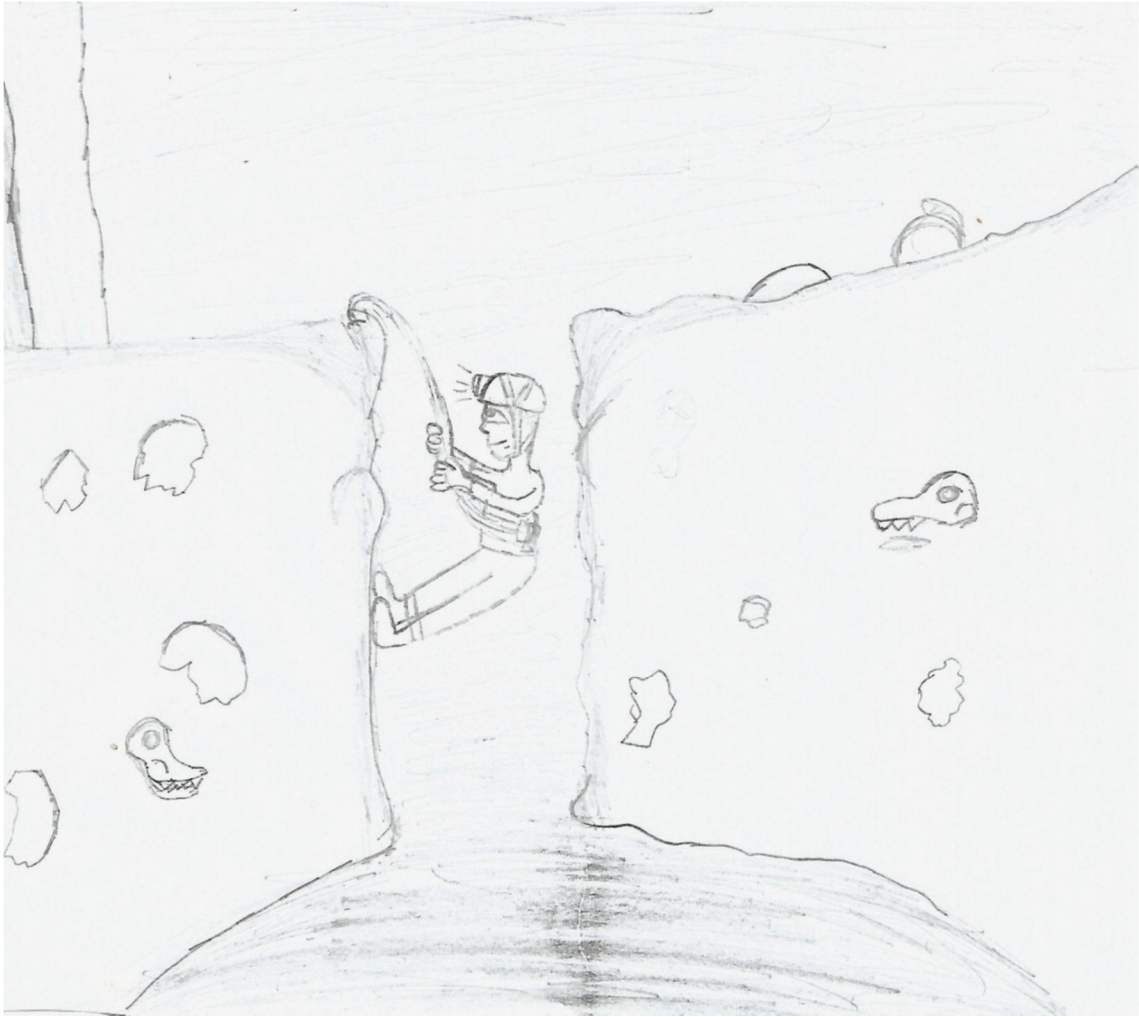
Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Microbiologia.

**Fábio Luis Bondezan da Costa**

**Orientadora** – Dra. Viviane Alves Gouveia  
(Departamento de Microbiologia – ICB - UFMG)

**Co-orientadora** – Dra. Maria Aparecida de Resende Stoianoff  
(Departamento de Microbiologia – ICB - UFMG)

**Belo Horizonte  
Fevereiro – 2015**



O pai bioespeleólogo  
Desenho feito por minha filha Bianca, agora com 11 anos

## AGRADECIMENTOS

- A Deus, por me dar saúde para que possa finalizar mais essa etapa em minha vida.
- A minha esposa Liége Discacciati, por seu amor incondicional, sua dedicação, preocupação, carinho... TE AMO!
- A meus filhos Bianca e Bernardo por me mostrar o verdadeiro sentido da vida.
- A meus pais por terem investido em minha educação, acreditado em meu potencial e compreenderem meus delírios cavernícolas.
- A meus irmãos.
- A minha orientadora e amiga Dra. Viviane Alves Gouveia por ter sempre acreditado em meu projeto, pela sua confiança em meu trabalho e por me auxiliar em todos os momentos em que precisei de sua ajuda. Por trás da máscara de malévola existe um grande coração!
- A minha co-orientadora Dra. Maria Aparecida de Resende Stoianoff pelo apoio e dedicação na realização desse trabalho.
- Aos professores Dr. Carlos Augusto Rosa e Dr. Luiz Henrique Rosa pela enorme generosidade, apoio e assistência fornecido durante a realização do trabalho.
- Ao Dr. Jeronimo Ruiz, amigo e pesquisador, pelo enorme suporte, sem o qual ele não seria viável.
- A professora Dra. Vera Lúcia dos Santos pelos ensinamentos que me ajudaram na realização desse trabalho e por todo apoio fornecido.
- Ao professor Dr. Daniel de Assis Santos pelo apoio e pelo fornecimento de material sempre que necessário.
- A professora Dra. Patrícia Silva Cisalpino pelo apoio e preocupação com meu trabalho.
- A professora Dra. Fátima Soares Motta Noronha pelos momentos que passamos juntos, rindo e aprendendo.
- Aos amigos do LBCM, Marco Aurélio, Marliete, Ludmilla, Fernanda, Vanessa e Luciana por toda ajuda e pelos momentos de descontração que fazem com que o trabalho fique mais leve.

- Ao Dr. César Faria Júnior pelo grande apoio e interesse demonstrado pelo meu trabalho.
- Ao Gerente do Parque Estadual do Sumidouro, Sr. Rogério Tavares de Oliveira, por me apresentar o parque e pela preocupação para com a preservação de tão importante patrimônio natural.
- A meu grande amigo Adriano Marques de Souza por grande ajuda, disponibilidade e ensinamentos.
- A bióloga Luiza Cotta do Parque Estadual do Sumidouro por toda a atenção e disponibilidade dispendida durante a realização do trabalho.
- Aos bioespeleólogos Rodrigo Lopes Ferreira e Marconi Souza Silva por me apresentarem o maravilhoso mundo subterrâneo e dar um sentido a meu curso de biologia.
- A meu cunhado Luiz Bicalho pela ajuda na formatação das imagens.
- A bioespeleóloga Erika Linzi Taylor pelo auxílio com artigos e dicas sempre importantes.
- A todas as meninas do laboratório dos Rosa pela ajuda e paciência para suportar todas as brincadeiras feitas por minha pessoa.
- A minha amiga Dalila Mendes Leonardo por toda ajuda fornecida durante a realização dos trabalhos.
- A meu grande amigo Robson Alexandre Gouveia por acreditar em meu projeto e por encher minha bola sempre que possível.
- Ao grande amigo Vicente Maus pela companhia durante os trabalhos de campo.
- Ao programa de Pós-graduação em Microbiologia e a CAPES pelo apoio financeiro para a realização desse projeto.
- A todos aqueles que não foram aqui citados mas que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.

“Quando nos deparamos com a entrada de uma caverna  
somos tomados por um sentimento misto,  
de temor e desejo; temor das trevas,  
do desconhecido e desejo de encontrar ali as chaves  
de mistérios ainda sequer suspeitados.”

Leonardo da Vinci apud Lino (2001)

# SUMÁRIO

I Introdução.....	01
I.1 Ambientes cársticos.....	01
I.2 O Parque Estadual do Sumidouro .....	04
I.3 Fatores impactantes ao ambiente cavernícola .....	08
I.4 Importância da proteção do ambiente cavernícola e seu entorno.....	12
I.5 Os organismos cavernícolas .....	17
I.6 Os fungos .....	20
I.7 Micoses associadas a cavernas .....	22
I.8 O solo e a diversidade fúngica .....	25
I.9 Isolamento e identificação de fungos .....	27
II Justificativa .....	31
III Objetivos .....	33
III.1 Objetivo geral .....	33
III.2 Objetivos específicos .....	33
IV – Materiais & Métodos.....	34
IV.1 Locais de coleta dos fungos cavernícolas .....	34
IV.2 Metodologia de amostragem .....	39
IV.3 Isolamento dos fungos cavernícolas.....	45
IV.4 Identificação molecular de fungos cavernícolas .....	46
IV.4.1 Extração do DNA genômico.....	46
IV.4.2 Amplificação da região ITS .....	47
IV.4.3 Purificação dos amplicons .....	48
IV.4.4 Reações de sequenciamento .....	48
IV.4.5 Análise computacional das sequencias .....	49
IV.5 Identificação morfológica dos fungos cavernícolas.....	50
IV.6 Análises estatísticas.....	50

V – Resultados & Discussão.....	51
V.1 Determinação da abundância fúngica em cavidades do PESU.....	51
V.2 Características físicas e do solo nas cavidades analisadas.....	52
V.3 Isolamento e identificação de fungos filamentosos do PESU.....	60
<i>V.3.1 Isolamento e identificação de fungos filamentosos do PESU</i> <i>após a estação seca (primeira coleta).....</i>	<i>60</i>
<i>V.3.2 Isolamento e identificação de fungos filamentosos do PESU</i> <i>após a estação chuvosa (segunda coleta).....</i>	<i>72</i>
VI – Análise geral do isolamento e identificação de fungos no PESU.....	74
VII – Conclusões.....	90
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	91



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Desenvolvimento do transecto e ponto médio das cavidades amostradas.....	39
Tabela 2 – Dados físicos obtidos durante as 4 coletas realizadas nas cavidades do Parque Estadual do Sumidouro .....	51
Tabela 3 – Pontos de coleta e respectivos números de isolados por cavidade na primeira coleta .....	53
Tabela 4 – Resultados parciais obtidos de isolados da primeira coleta .....	54
Tabela 5 – Pontos de coleta e respectivos número de morfotipos obtidos por cavidade na segunda coleta .....	57
Tabela 6 – Resultados parciais de morfotipos obtidos na segunda coleta .....	62
Tabela 7 – Fungos identificados na primeira coleta.....	69
Tabela 8 – Pontos de coleta e respectivos número de morfotipos obtidos por cavidade na segunda coleta.....	73
Tabela 9 – Fungos identificados na segunda coleta.....	79
Tabela 10 – Resultado de gêneros obtidos por cavidade nas duas coletas.....	85
Tabela 11 – Relação entre gêneros fúngicos com potencial patogênico e não a humanos obtidos por cavidade.....	88

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Vista parcial do Parque Estadual do Sumidouro (PESU).....	06
Figura 2 - Vista parcial da Lagoa do Sumidouro .....	07
Figura 3 – Pintura rupestre presente na entrada da Gruta de Maquiné .....	12
Figura 4 – Região do rDNA com o espaço interno transcrito ITS1 e ITS2 .....	29
Figura 5 – Vista aérea do PESU com o posicionamento de algumas cavidades cadastradas no Plano de Manejo .....	35
Figura 6 – Mapa esquemático da Gruta da Macumba .....	38
Figura 7 – Momento da medição das cavidades para definição do ponto médio .....	42
Figura 8 – Dados da precipitação pluviométrica mensal da estação de Belo Horizonte – Pampulha/MG no período de janeiro de 2012 a junho de 2013.....	43
Figura 9 – Momento de coleta no ponto P3 da Gruta da Lapinha .....	44
Figura 10 – Análise de agrupamento (UPGMA) usando o coeficiente de distância de Bray-Curtis em relação ao nutriente fósforo.....	58
Figura 11 - Análise de agrupamento (UPGMA) usando o coeficiente de distância de Bray-Curtis em relação ao nutriente nitrogênio.....	59
Figura 12 - Exemplo de morfotipos obtidos na primeira coleta nas cavidades do PESU .....	61
Figura 13 – Resolução eletroforética dos fragmentos ITS de exemplares de fungos isolados na primeira coleta .....	63
Figura 14 – Aspectos morfológicos (frente e verso) de isolados crescidos em ágar Sabouraud identificados no nível de gênero e espécie na primeira coleta realizada nas cavidades do PESU.....	65
Figura 15 – Resolução eletroforética dos fragmentos ITS de exemplares de fungos isolados na segunda coleta .....	75
Figura 16 - Exemplos de morfotipos obtidos na terceira coleta das cavidades do PESU .....	76

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APA – Área de Proteção Ambiental  
BLASTn - Basic Local Alignment Search Tool  
BDA – Meio de cultura Batata-Ágar Dextrose  
CECAV – Centro Nacional de Pesquisas e Conservação de Cavernas  
CTAB – Brometo de Cetil Trimel Amônio  
DATUM – do latim “dado”  
D.L – Desenvolvimento Linear  
DNA – Ácido desoxirribonucleico  
DNTP - Desoxirribonucleotídeos Fosfatados  
EDTA – ácido Etilenodiamino Tetra-Acético  
EIA – Estudo de Impacto Ambiental  
EPA – Espeleogrupos Pains  
FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz  
IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis  
ICB – Instituto de Ciências Biológicas  
IEF – Instituto Estadual de Florestas  
IEPHA – Instituto Estadual do Patrimônio Histórico e Artístico de Minas Gerais  
IGS – Intergenic Spacer  
ITS – Espaçador Interno Transcrito  
LBEMUFMG – Laboratório de Biodiversidade e Evolução Molecular da Universidade Federal de Minas Gerais  
M - Molar  
MG – Minas Gerais  
NaCl – Cloreto de Sódio  
NCBI – National Center of Biotechnology Information  
Pb – Pares de Bases  
PCR – Reação em Cadeia pela Polimerase (“Polymerase Chain Reaction”)  
P.M – Ponto Médio de Coleta em Cavidade  
PESU – Parque Estadual do Sumidouro  
P/V – Peso por Volume

RIMA – Relatório de Impacto Ambiental  
RMBH – Região Metropolitana de Belo Horizonte  
RNA – Ácido Ribonucleico (“Ribonucleic acid”)  
rRNA – RNA ribossômico (“ribosomal ribonucleic acid”)  
SB – Ágar Sabouraud  
SDS – Dodecil Sulfato de Sódio (“sodium dodecyl sulfate”)  
T.A – Temperatura ambiente  
Taq – Taq Polimerase  
TBE – Tris Borato  
T.E. – Tampão Tris Borato EDTA  
UFCs – Unidades Formadoras de Colônias  
UFLA – Universidade Federal de Lavras  
UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais  
UC – Unidade de Conservação  
UIS – União Internacional de Espeleologia  
X - Vezes  
µL - Micromolar

## RESUMO

As cavernas são ambientes propícios para o desenvolvimento de fungos em função de suas características físicas, pois representam ambientes com alta umidade, ausência permanente de luz, temperatura representada pela média das temperaturas médias anuais externas e alta estabilidade ambiental. O solo por sua vez pode ser considerado um habitat microbiano por excelência, local de vida de inúmeras e variadas populações de todos os tipos de microrganismos e mesmo como reservatório final de grande diversidade genética. O uso de técnicas moleculares, por meio da análise de DNA, possui a vantagem de ser um processo rápido e altamente sensível, e tem sido amplamente utilizado para identificação de microrganismos ambientais cultiváveis ou não, isoladamente ou em associação com as técnicas clássicas de identificação. Este trabalho insere-se na temática da ampliação do conhecimento sobre o ambiente cavernícola e seus organismos, com ênfase no isolamento e identificação de fungos já que os estudos nesta área ainda escassos nas regiões tropicais e subtropicais. Desta forma, este trabalho teve como objetivo o isolamento e identificação de fungos do solo de cavidades naturais subterrâneas situadas no Parque Estadual do Sumidouro/MG, utilizando métodos morfológicos e moleculares. As análises foram realizadas nas cavidades Gruta da Lapinha, Gruta da Macumba, Gruta dos Túneis e Gruta DOC, situadas na área do Parque Avaliou-se as características físicas das cavidades (temperatura/umidade/teor de fosforo e nitrogenado solo). Utilizando metodologia previamente descrita na literatura, foram isolados 806 fungos filamentosos, agrupados em 38 gêneros distintos. Os fungos foram identificados pela sequência da região interna transcrita (ITS1-5.8S-ITS2) do gene do rRNA e por suas características macro e microscópicas por meio de chaves de identificação. Dos 38 gêneros identificados, nove deles ainda não haviam sido descritos no ambiente cavernícola (*Ceriporia*, *Cochliobolus*, *Cytospora*, *Eutypella*, *Haplosporangium*, *Metacordyceps*, *Myriodontium*, *Ninograna*, *Verticicladium*). Foram identificados 24 gêneros (36,8%) que incluem espécies de fungos patogênicos e potencialmente patogênicos, sendo a Gruta da Lapinha aquela que possui o maior número de representantes

(65%) com potencial de causar doença no homem. A Gruta DOC pode ser considerada a de maior risco potencial para infecção, pois possui 55% dos gêneros fúngicos potencialmente patogênicos e é uma cavidade de pequenas dimensões, resultando em maior contato onde o visitante com esporos. De maneira geral, os resultados obtidos neste estudo contribuem para ampliar o conhecimento a respeito da comunidade de fungos presentes em cavernas brasileiras.

Palavras-chave: Cavernas, Fungos Filamentosos, Parque Estadual do Sumidouro

## ABSTRACT

Caves are favorable environments for fungal growth due to their physical characteristics that include high humidity, permanent absence of light, temperatures representing the average of annual external temperatures, and high stability. Additionally, the soil is considered a primordial microbial habitat where numerous and variable microorganisms populations can coexist representing a genetic diversity reservoir. Molecular biology techniques are quick and highly sensitive and has been widely used to identify environmental microorganisms. These techniques can be used alone or in association with morphology-based methods for identification purposes. This work aimed the isolation and identification of soil fungi from natural caves located at Parque Estadual do Sumidouro/MG, using morphological and molecular methods, to expand the knowledge about cave environments in tropical and subtropical regions. The analyses were performed in 4 caves: Lapinha, Macumba, Túneis and DOC. Physico-chemical characteristics (temperature/humidity/ nitrogen and phosphorus soil's content) were evaluated and we could not determine a direct link between them and fungal abundance. Using methodologies previously described in the literature, 806 filamentous fungi colonies were isolated and grouped into 38 distinct genera. The fungi were identified by sequencing the internal transcribed region (ITS1-5.8 S-ITS2) of the rRNA gene and by morphologic characteristics analysis. We show that 9 identified genera have not been yet described in cave environments (Ceriporia, Cochliobolus, Cytospora Eutypella, Haplosporangium, Myriodontium, Ninograna, Metacordyceps, Verticicladium). Twenty-four genera (36.8%) include pathogenic and potentially pathogenic species and these are overrepresented in the Lapinha's cave (65%) when compared to the other caves. Based in our results, the DOC cave can be considered a high risk environment to fungal diseases since it contains 55% of all potentially pathogenic genera and is a small cavity. These characteristics could result in visitor's increased risk contact with fungal spores. In summary, our results contribute to the knowledge about the fungal community in Brazilian caves and as suggested by other authors, point to the need of extensive studies focusing on the microbial populations of these environments to preserve and increase the source of bioprospection studies.

Key-words: cave, filamentous fungi, Parque estadual do sumidouro



# I. Introdução

## I.1 Ambientes cársticos

O termo carste tem origem de uma área no leste da Eslovênia, divisa com o norte da Itália, chamada “krs” e significa paisagem nua, pedregosa, sem água (FORD & WILLIAMS, 1989; JONES *et al.*, 2003). A paisagem cárstica possui feições distintas das desenvolvidas em outros tipos de rochas, as quais incluem surgências, sumidouros, dolinas, torres, lapiás e cavernas, entre outras formas de relevo (WHITE, 1988; LOBO *et al.*, 2007). Cerca de 10 a 15% da superfície terrestre do planeta compreendem estas regiões, denominadas áreas cársticas (FORD & WILLIAMS, 2007).

Apesar de o carste poder, em teoria, se desenvolver em qualquer tipo de rocha, as ocorrências mais comuns se dão em calcário, dolomito, mármore e gesso (HARDT & PINTO, 2009) cuja principal característica é a fácil dissolução pelo ácido carbônico, um ácido fraco mas eficiente para dissolver seu principal mineral constituinte, o carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ) (LOBO *et al.*, 2007; TRAJANO, 2013).

O exocarste é a região mais externa do carste, com características bem distintas das outras regiões, uma vez que possui produção primária fotossintetizante e variações macro e microclimáticas marcantes. Já o endocarste é a região mais profunda, com características ambientais mais estáveis e bem marcantes, como por exemplo, a alta umidade do ar em regiões profundas das cavidades naturais subterrâneas, que são feições características dessa região (POULSON & WHITE, 1969; MANGIN, 1973; CULVER, 1982; KLIMCHOUK, 2004; CULVER & WHITE, 2005).

As cavidades naturais subterrâneas são definidas como todo ou qualquer espaço subterrâneo acessível pelo ser humano, com ou sem abertura identificada, popularmente conhecidas como caverna, gruta, lapa, toca, abismo, furna ou buraco, incluindo seu ambiente, conteúdo mineral e hídrico, a fauna e a flora ali encontrados e o corpo rochoso onde os mesmos se inserem, desde

que tenham sido formados por processos naturais, independentemente de suas dimensões ou tipo de rocha encaixante (BRASIL, 2008).

Extrapolando essa visão antropocêntrica, o meio subterrâneo ou hipógeo, compreende o conjunto de espaços interconectados do subsolo, de dimensões variáveis, preenchidos por água ou ar, e formados preferencialmente por rochas de alta solubilidade como os carbonatos (JUBERTHIE, 2000). De acordo com suas dimensões estes espaços podem ser classificados como microcavernas, menores que 0,1 cm de diâmetro; mesocavernas, com tamanhos entre 0,1 e 20 cm, e macrocavernas, maiores que 20 cm (ZAMPAULO, 2010). Estas últimas são consideradas uma importante “janela” para a realização de estudos nos ambientes subterrâneos (HOWARTH, 1981; HOWARTH, 1983; TRAJANO, 2013).

No Brasil, estima-se que podem existir mais de 100.000 cavernas em todo o território, sendo cadastradas apenas pouco mais de 9.000 (AULER *et al.*, 2001). Desse total, aproximadamente 500 cavernas já foram inventariadas biologicamente (TAYLOR, 2009).

O ambiente cavernícola possui algumas peculiaridades, tais como a sua alta estabilidade ambiental, ausência permanente de luz natural, umidade elevada que tende a saturação e a temperatura que, principalmente em áreas afastadas de sua entrada, é em geral, constante e semelhante às médias anuais do ambiente externo circundante (POULSON & WHITE, 1969; CULVER, 1982; CULVER & WHITE, 2005). Em cavernas extensas, a temperatura e a umidade quase não variam em locais mais distantes da entrada (HOWARTH, 1983). Entretanto, cavernas de pequena extensão apresentam oscilações mais evidentes, que são reflexos diretos das variações no ambiente epígeo (POULSON & WHITE, 1969).

Em cavernas suficientemente grandes, podem ser caracterizadas quatro zonas ambientais distintas, de acordo com sua distância e contatos com o exterior: zona de entrada, onde se encontram os ambientes epígeo e subterrâneo; zona de penumbra, onde a luz diminui progressivamente; zona de transição, totalmente afótica, mas ainda sob alguma influência do meio externo; e a zona profunda, onde o ambiente é relativamente estável e a evaporação é negligenciável (HOWARTH, 1980). Em cavernas menores, este zoneamento não é observado de forma definida e, de uma maneira geral, nas cavernas

brasileiras observa-se uma fauna característica de zona de entrada e proximidades (zona de entrada + penumbra) e uma fauna da região afótica (zona de transição + zona profunda) (TRAJANO, 1987).

Em relação aos recursos alimentares, grande parte ou quase a totalidade da produção nos ecossistemas cavernícolas é de origem secundária, baseada em cadeia de detritívoros que atuam sobre os recursos provenientes do meio externo. Em algumas poucas cavernas, a base da produção primária pode ser a quimioautotrofia, realizada principalmente por bactérias (SARBU *et al.*, 1996). Esses organismos são capazes de utilizar compostos inorgânicos presentes no ambiente como fonte de energia, em substituição a energia solar. Desta forma, tais microrganismos podem exercer papel de grande importância para a manutenção das comunidades subterrâneas (CULVER, 1982; SARBU *et al.*, 1996; PORTER *et al.*, 2009).

Entretanto, poucos casos de ecossistemas subterrâneos mantidos por produção primária quimioautotrófica são conhecidos (SARBU *et al.*, 1996). Desta maneira, geralmente as cavernas são consideradas ambientes oligotróficos, sem produtividade primária oriunda da fotossíntese, e onde a matéria orgânica presente é carregada, de forma contínua ou temporariamente, por eventos físicos e/ou agentes biológicos (CULVER, 1982; CULVER & PIPAN, 2009; TRAJANO, 2013).

Recursos alimentares alóctones mantêm populações de organismos de todos os níveis tróficos nos ecossistemas subterrâneos e o tipo, qualidade e forma de disseminação dos recursos no sistema são determinantes para a composição e estrutura das comunidades cavernícolas (CULVER, 1982; HOWARTH, 1983).

Diferentemente, em muitos casos, cavernas em regiões tropicais apresentam quantidades maiores de recursos alimentares em virtude da alta produtividade dos ecossistemas epígeos. Desta forma, muitos modelos elaborados e propostos a partir de sistemas subterrâneos temperados devem ser readequados as condições dos sistemas tropicais (ZAMPAULO, 2010).

De acordo com Trajano (2000), encontrar alimento é um problema de grande relevância para os animais cavernícolas e, em especial, para aqueles que nunca saem das cavernas, pois esse, em geral, é escasso e efêmero. Os recursos podem ser transportados para o meio hipógeo através da água, vento

ou por animais que frequentam esse ambiente. Segundo Ferreira (1998), em várias cavernas secas, o principal recurso é o guano, formado pela deposição das fezes de morcegos, pássaros ou grilos que podem formar grandes poças logo abaixo do local onde as colônias se encontram.

O guano representa muitas vezes o mais importante recurso alimentar, tanto para a fauna terrestre quanto aquática, o que pode ser melhor observado em cavernas tropicais. Por outro lado, o guano de morcegos tem se mostrado como uma fonte importante de infecção para humanos e animais, sendo rico em nutrientes que favorecem a manutenção, por exemplo, do fungo *Histoplasma capsulatum* na natureza (TAVARES *et al.*, 2006).

## **I.2 O Parque Estadual do Sumidouro**

O Parque Estadual do Sumidouro (PESU) é uma unidade de conservação (UC) que foi criada para preservar o patrimônio cultural e natural inserido no contexto da Área de Proteção Ambiental Carste de Lagoa Santa (MACEDO, 2011; EVANGELISTA-PINTO & TRAVASSOS, 2013). O Parque, localizado a aproximadamente 50 km ao norte de Belo Horizonte/MG, está inserido em áreas caracterizadas por ambientes cársticos desenvolvidos em rochas carbonáticas, que possui atualmente 52 cavernas cadastradas somando-se a um total de 400 cavidades inseridas na região (SCHOBENHAUS *et al.*, 2002; IEF, 2005; INIESTA *et al.*, 2012).

Coordenado pelo Instituto Estadual de Florestas (IEF-MG) o parque foi criado em 1980 pelo Decreto Estadual de Nº 20.375 de 3 de janeiro de 1980, inicialmente sob o nome de Parque Ecológico do Vale do Sumidouro (MINAS GERAIS, 1980) como uma compensação ambiental pela construção do Aeroporto Metropolitano de Confins, uma vez que a obra de grande porte poderia afetar de maneira irreversível o desenvolvimento da região, com um aumento significativo na economia, o que também provocaria grande impacto sobre o meio ambiente (IEF, 2005). Sua posição geográfica diferenciada e variedade de elementos notáveis do patrimônio geomorfológico favoreceram sua criação (EVANGELISTA-PINTO & TRAVASSOS, 2013).

Em 03 de novembro de 2008, por meio do Decreto número 44.935, os limites da UC foram redefinidos, abrangendo então uma área total de 2004 ha, sendo formalmente reconhecida como Parque Estadual do Sumidouro (MINAS GERAIS, 2008).

O Parque Estadual do Sumidouro abrange uma superfície de 2004 ha, localizados ao norte do município de Lagoa Santa (55,73 %) e no extremo sudeste de Pedro Leopoldo (44,27%), na porção centro norte da Região Metropolitana de Belo Horizonte e no centro leste da APA Carste de Lagoa Santa. Os principais limites naturais são: ao norte, a lagoa do Sumidouro, a nordeste, o rio das Velhas, a leste e sudeste o córrego do Jaques e a oeste e noroeste o córrego Samambaia ou Poções. Localizado sobre rochas carbonáticas, o Parque guarda um patrimônio natural de grande relevância científica e cultural no cenário nacional e internacional (GASTELOIS *et al.*, 2003; EVANGELISTA-PINTO & TRAVASSOS, 2013).

Do ponto de vista cultural, a presença do parque é fundamental, pois ele engloba o maciço onde está situada a Gruta da Lapinha, uma das mais belas cavidades naturais abertas à visitação no Brasil, além de outras grutas próximas. Guarda também a Lapa do Sumidouro, de grande importância arqueológica, além de vários sítios de importância paleontológica (PILÓ *et al.*, 2004).

O Parque Estadual do Sumidouro (Figura 1) está inserido no bioma do Cerrado, apresentando vegetação predominantemente composta de Floresta Estacional Semidecidual (BERBERT-BORN *et al.*, 1998) com afloramentos calcários de grande beleza cênica, com altitudes variando entre 700 e 780 metros.



**FIGURA 1 - Vista parcial do Parque Estadual do Sumidouro (PESU)**

Fonte: Foto do próprio autor

Podemos encontrar nas matas secas que recobrem os maciços calcários, madeiras de lei, como aroeiras, angicos, braúnas, jacarandás, além de ipê amarelo, ipê roxo, moreira, aroeirinha, jatobá do campo, gabioba, manjoba, mutamba e faveiro. Nas margens de rios, córregos e lagoas encontramos a mata ciliar, fundamental para a preservação dos cursos de água.

Sobre a avifauna presente no parque, Rodrigues & Michelin (2005) citam o registro de 27 espécies de aves aquáticas, distribuídas em 12 famílias. Das 27 espécies registradas 12 foram consideradas residentes ou prováveis residentes e oito visitantes. Uma das espécies, *Platalea ajaja linnaeus* é considerada ameaçada de extinção no estado de Minas Gerais, enquanto outras duas *Mycteria americana* Linnaeus, 1758 e *Ciconia maguari* são consideradas raras.

De acordo com o Instituto Estadual de Florestas (IEF, 2005) estão presentes no parque dentre os mamíferos, mico estrela, raposa, tatu galinha, tatu peba, coelho, gambá, veado catingueiro, gato do mato, lontra, tamanduá

colete, os répteis, jibóia, cascavel, jararaca e as aves codorna, garcinha, biguá, urubu, gavião, irerê, seriema, rolinha, beija-flor, andorinha e pica pau branco.

No interior do parque há a Lagoa do Sumidouro (Figura 2) e a Lapa do Sumidouro. Nas épocas mais secas do ano a lagoa pode extinguir-se totalmente, voltando o volume normal na época das chuvas. Peter Lund, famoso naturalista Dinamarquês visitou a Lapa do Sumidouro em 1839, 1840 e 1841, mas foi entre 29 de agosto e 10 de setembro de 1843, aproveitando uma forte estiagem que ocasionou o esvaziamento da Lagoa do Sumidouro que teve a oportunidade de efetuar uma escavação mais sistemática (PILÓ *et al.*, 2004).



**FIGURA 2 - Vista parcial da Lagoa do Sumidouro**

Fonte: Foto do próprio autor

Os achados e estudos arqueológicos e paleontológicos, aí realizados pelo dinamarquês Peter W. Lund e equipe, outorgaram-lhe uma importância ímpar no contexto arqueológico e paleontológico mundial. Foi nessa região que Dr. Peter Lund encontrou o material arqueológico e paleontológico que lhe permitiu estudar e identificar o “homem de Lagoa Santa” e correlacionar a

presença do mesmo com a fauna extinta da região, o que torna a região de Lapa do Sumidouro de grande relevância, devendo assim ser, oficial e formalmente, protegida e valorizada. (GASTELOIS *et al.*, 2003).

A importância histórica do Parque Estadual do Sumidouro e da Lapa do Sumidouro, presente junto a Lagoa do Sumidouro, é extremamente relevante, sendo inclusive tombada pelo IEPHA de acordo com Gastelois *et al.* (2003), através do Decreto Estadual de N°17729/76. No aspecto histórico, científico e cultural, a Lapa do Sumidouro, localizada junto ao maciço e a lagoa de mesmo nome, reveste-se de uma importância que transcende, e muito, uma significância nacional, posto que a mesma constitui uma forte e importante referência do patrimônio arqueológico americano.

Apesar de toda a importância do parque para a preservação do patrimônio nacional, ele só recebeu a devida atenção do governo no ano de 2007, já que sua criação foi há 33 anos e somente em 2007 ocorreu a sua efetivação.

### **I.3 Fatores impactantes ao ambiente cavernícola**

Sistemas cársticos em todo o mundo têm experimentado os impactos da crescente população humana em seus arredores. Os recursos minerais, por constituírem insumos essenciais a praticamente todos os ramos no setor industrial e terem distribuição irregular na crosta terrestre, tem ao mesmo tempo uma enorme dimensão econômica e caráter internacional. Assim, é natural o interesse governamental em pesquisa, exploração e regulação do setor mineral (RUCHKYS & MACHADO, 2013)

Os impactos que ocorrem em uma caverna podem ter origem humana ou natural, sendo que esses impactos podem ocorrer em partes do ambiente cavernícola ou até mesmo na caverna como um todo (FERREIRA & HORTA, 2001; JONHSTON *et al.*; 2011, SOUZA-SILVA, *et al.*, 2014).

Infelizmente, a maior parte dos impactos atualmente são provocados por atuação antrópica. O longo período de pesquisas e descobertas foi aos poucos sendo trocado pela destruição e perda do patrimônio espeleológico, causado



tanto pelo crescimento das áreas urbanas, expansão da fronteira agrícola e pela geração de grandes demandas do setor da construção civil, que encontra no calcário a matéria-prima para fabricação do cimento e derivados para obras de alvenaria (MARRA, 2001). Os valores se modificam em nome do consumismo e a degradação ambiental é impulsionada em favor do lucro. A degradação dos ambientes cavernícolas segue esse padrão em função do próprio consumismo, relacionado ao uso de recursos naturais pelo homem (LACERDA, 2005).

De acordo com Souza-Silva (2014) o principal impacto observado nas cavernas da Mata Atlântica Brasileira consiste no desmatamento das áreas circundantes, que certamente refletem a alta fragmentação histórica sofrida por este bioma. O desmatamento pode intensificar o estado oligotrófico das cavernas, que pode alterar significativamente a estrutura e composição das comunidades cavernícolas (SOUZA-SILVA *et al.*, 2014; TAYLOR *et al.*, 2013).

Somado a esse quadro, o crescimento do setor minerário brasileiro, com a exploração do calcário e do minério de ferro, e o avanço da indústria madeireira com a descaracterização das nossas matas nativas, sobretudo da mata atlântica, proporcionaram às cavernas a perda de suas principais características. Tais perdas estão associadas a várias modalidades de impactos, muitos desses vinculados a destruição de suas feições por explosão da rocha calcária, da contaminação de águas superficiais e subterrâneas, gerando despejo dos rejeitos nos leitos dos rios, pelo extermínio da cobertura vegetal essencial para sobrevivência, e ainda pelo descaso de governos municipais por efeito da colocação de lixo urbano e radioativo nas cavernas, fazendo deste quadro um problema de dimensões consideráveis (MARRA, 2001).

Já que a maior parte do recurso alimentar do ambiente hipógeo resulta do ambiente epígeo, os fatores que degradam o lado externo geram impactos do lado interno. O grau desses impactos pode resultar em alterações graves no nível populacional dos seres cavernícolas, e levar até a extinção de espécies.

Em virtude da beleza cênica e cultural, as cavernas têm importante destaque na atividade econômica de diversas regiões. Devido aos variados tipos de espeleotemas, rios subterrâneos, lagos, fósseis, pinturas e outros elementos arqueológicos, cavernas são muito atraentes do ponto de vista de

um turista (NOVAKOVA *et al.*, 2012). Muitas dessas, como a Gruta da Lapinha (Lagoa Santa - MG), Gruta de Maquiné (Cordisburgo - MG) e Gruta Rei do Mato (Sete Lagoas - MG) são abertas para o turismo em massa, promovendo assim empregos diretos ou indiretos em função da visitação. Tal prática também levou a algumas modificações estruturais das cavidades para melhor atender aos visitantes (INIESTA, 2012; NOVAKOVA *et al.*, 2012).

A própria visitação a uma caverna, por mais inocente e cheia de boas intenções que seja, pode provocar impactos ou até mesmo acidentes. Podemos usar como exemplo a limpeza que ocorre em algumas cavidades utilizadas para o turismo que pode provocar mudanças imprevistas na biodiversidade, e subsequentes re-colonização que pode produzir surto indesejável de bactérias e fungos (TRAJANO, 2000; JURADO, 2009). A exploração de cavernas pode gerar a introdução alóctone de nitrogênio, por exemplo, com a urina dos exploradores, que pode ter impacto dramático sobre a estrutura da comunidade microbiana em tais ecossistemas, resultado do excesso deste nutriente, normalmente limitado nesse tipo de ambiente (JOHNSTON *et al.*, 2011).

O turismo pode causar mudanças na diversidade e na distribuição de microrganismos em uma cavidade em função da introdução de novas espécies e alterações do microclima provocados pelos visitantes. Os turistas também introduzem uma variedade de substâncias, como cabelos, células cutâneas mortas, fibras têxteis e óleos que são nutrientes potenciais para os microrganismos (JABLONSKY *et al.*, 1993; BARTON, 2006; IKNER *et al.*, 2007; NOVAKOVA *et al.*, 2012; TAYLOR *et al.*, 2013). A erradicação de microrganismos em cavernas parece ser um processo perigoso porque a comunidade microbiana original pode promover uma vantagem natural controlando os agentes biológicos (JURADO, 2009). Taylor *et al.* (2013) também cita que a visitação em cavernas pode gerar o enriquecimento do ambiente pela matéria orgânica e inorgânica deixadas pelos visitantes, a mudança de clima primitiva, com alterações na temperatura, concentração de dióxido de carbono e umidade, além do pisoteio sobre a fauna e a microbiota, e compactação do solo.

A combinação de diferentes métodos de análise permite aos cientistas detectar a extensão das mudanças induzidas por humanos, confirmando que

isso pode ser muito perigoso em certas áreas das cavernas que previamente pareciam não estar influenciadas por distúrbios humanos, seja pela distância da entrada dos visitantes ou pela brevidade das visitas (SAIZ-JIMENES, 2012).

Em todo o território brasileiro, existem menos de 200 cavernas que reconhecidamente apresentam algum tipo de visitação turística, com ou sem regulamentação. Dessas, apenas quarenta apresentam algum tipo de controle diário de visitação (LOBO *et al.*, 2008). No caso da Gruta da Lapinha, por exemplo, foram feitas instalações de redes elétricas, modificações no piso (degraus), instalação de escadas metálicas com corrimões, portões em entradas, dentre outras. Modificações como estas podem influenciar a riqueza e a distribuição das espécies em cavernas, especialmente quando são estabelecidas sem um adequado planejamento e manejo (FERREIRA, 2004; BOGGIANI *et al.*, 2007)

De forma agravante os próprios visitantes podem não ter noção do impacto existente nesse tipo de ambiente, pois, para eles, o impacto causado por a o antrópica não   percebido durante uma visitação a uma caverna turística. Esse fato pode ser comprovado no trabalho de pesquisa realizado por Goulart & Santos (2005), na Gruta da Lapinha. Em rela o   vegeta o clorofilada existente no interior da cavidade, impacto proveniente da presença de luz artificial, influenciou pouco na qualidade da visita e 39% dos visitantes pesquisados consideraram a situa o atual aceitável. Nota-se que este aspecto pouco influencia para 22% dos entrevistados e apenas 2% consideraram como péssima a situa o observada (GOULART & SANTOS, 2005).

A visita o humana   sim um fator impactante para o ambiente cavernícola, mas também não podemos privar a popula o da visita o a algumas cavernas que possam ser consideradas como turísticas após a realiza o dos estudos necessários a sua viabiliza o, pois uma caverna que não tenha sido avaliada por especialistas pode trazer problemas aos visitantes como acidentes e riscos a saúde (TRAJANO, 2000).

#### **I.4 Importância da proteção do ambiente cavernícola e seu entorno**

A defesa do patrimônio geológico deve se dar não só pela conservação, mas também pela sua valorização e divulgação de sua importância para a sociedade (RUCHKYS, 2009). Proteger as cavernas é proteger todo um patrimônio que já é utilizado pelo homem há milhares de anos, desde o tempo em que elas serviam como abrigo. Atualmente vivemos em casas que, na maioria das vezes, possuem como matéria prima o calcário e o minério de ferro, ou seja, indiretamente continuamos a depender das cavernas para nossa proteção e abrigo.

Há milhares de anos atrás, quando o homem utilizava cavernas como principal forma de abrigo, o mesmo deixava marcas em suas paredes. Estas marcas são denominadas “pinturas rupestres” (Figura 3).



**FIGURA 3 - Pintura rupestre presente na entrada da Gruta de Maquiné**

Fonte: Foto de Adriano Marques de Souza

Essas pinturas resistiram ao tempo e são fundamentais para decifrar como era aquele modo de vida. Silva (1993) retrata muito bem a importância das pinturas rupestres: “Arte rupestre é a representação gráfica do homem pré-histórico expressa nos desenhos feitos nos paredões das grutas. Retrata o cotidiano através de cenas familiares de animais, cenas de caça e apresenta também representações complexas de formas geométricas. Através dela, o homem primitivo retratou também o mito e a magia”.

Ainda sob o ponto de vista da antropologia, preservar as cavernas significa preservar informações de grande valia sobre o surgimento e o desaparecimento de populações humanas em diferentes épocas. Silva (1993) demonstra essa importância no trecho em que retrata a famosa raça de Lagoa Santa, encontrada por Lund nas cavernas da região: “Essa população pré-histórica veio a caracterizar a conhecida raça de Lagoa Santa, classificada por Lund desde o século passado. Esta população teria vivido em franca idade da pedra pois não há indícios de que soubessem confeccionar implementos de ferro ou bronze.”

Sobre a importância da preservação do ambiente cavernícola e de seu entorno sob a ótica ambiental, podemos citar o que foi explicado por Ferreira & Horta (2001): “Cavernas são importantes para o equilíbrio do ecossistema em sua área de ocorrência. As interferências no ambiente físico causadas por ação humana ou por fenômenos naturais refletem diretamente nas cavernas localizadas nas áreas no qual esses impactos ocorrem. A alteração da estrutura original do ambiente cavernícola causados por diferentes impactos pode causar um distúrbio no ambiente externo provocando um stress que desequilibraria um determinado ecossistema”.

Do ponto de vista educacional, proteger cavernas significa dar oportunidade para que esse ambiente seja explorado pelos educadores de maneira a aumentar o conhecimento dos estudantes, desenvolver o interesse pelo patrimônio natural, contribuir para a socialização, dentre outros; já como demonstrado por Costa (2007), que o interesse dos alunos pelo ambiente cavernícola ultrapassa os 90%.

Lino (2001) também enfatiza a importância das cavernas: “Turisticamente as cavernas representam atrativos de alto valor, não apenas em termos contemplativos pela beleza e dimensões de seus espaços e

ornamentações, mas também pelo mistério e aventura que caracterizam sua visitação. É ainda uma forma de turismo de alto potencial educativo se realizado de maneira adequada. Caso contrário pode ser, como demonstram inúmeros exemplos, uma das formas mais agudas de dilapidação e destruição desse patrimônio”.

Segundo Marra (2001): “A principal importância para preservação e conservação das cavernas, sítios espeleológicos e suas respectivas áreas de influência, é a manutenção dos sistemas ecológicos, sensíveis e únicos. Nas cavernas é possível o desenvolvimento de estudos científicos, da investigação minuciosa e sistemática em diversos campos do conhecimento, a fim de proporcionar a sociedade a melhor opção de crescimento social e econômico através do adequado uso desse frágil ecossistema”.

Marra (2001) enumera oito motivos para a proteção do ambiente cavernícola:

1. Podem funcionar como opções de lazer, recreativas, de contemplação da beleza cênica de seu interior, desde que devidamente manejados
2. Exercem importante função de armazenar estratégicos reservatórios de água e de recarga de aquíferos para abastecimento, bem como às análises e pesquisas sobre o comportamento hídrico local e regional
3. Possibilitam adequada utilização, com vistas a exercer o papel de importante fonte de atividade economicamente viável, tais como o turismo, esporte, e seus benefícios associados
4. Guardam importantes informações nos sítios geológicos, possibilitando pesquisar o conjunto da origem, da formação e das sucessivas transformações da litologia ali instalada e do paleoclima outrora ocorrido na região
5. Protegem e conservam minerais raros ou formações geológicas inigualáveis

6. Conservam de forma eficiente interessantes informações da vida pretérita através dos sítios fossilíferos e arqueológicos, através dos quais é possível identificar, catalogar e pesquisar espécies de animais e vegetais fósseis, bem como o estudo cultural dos povos do passado, onde documentos, monumentos e objetos compõem importantes registros dos hábitos vividos de uma determinada sociedade
7. Propiciam eficiente abrigo para conservação de habitats de espécies endêmicas e ameaçadas de extinção, tanto da fauna como da flora
8. Podem desempenhar a função de locais reservados a manifestações sociais

Segundo o termo de referência para o plano de manejo espeleológico de cavernas com atividades turísticas implantadas, publicado em 2006 pelo IBAMA/CECAV, o estudo das áreas com potencial espeleológico visa:

- Promover o conhecimento do potencial espeleológico das áreas de estudo;
- Proteger a caverna e a fauna associada;
- Proteger o sistema hidrológico e hidrogeológico de áreas cársticas ou pseudo-cársticas, principalmente áreas de recarga;
- Proteger áreas ou locais que possuem atributos de valor naturais, sociais e culturais;
- Definir a área de influência da cavidade, com base em estudos técnicos específicos;
- Apresentar o zoneamento espeleológico com base em estudos técnicos específicos, como instrumento de gestão;
- Disciplinar o uso de áreas cársticas e pseudo-cársticas definindo parâmetros a serem utilizados, no controle de acesso e na implantação de infraestrutura de uso turístico;

- Propor medidas de controle de efeitos negativos advindos da ação antrópica, bem como alternativas de recuperação das áreas degradadas;
- Estimular a prática de educação ambiental.

Em relação à proteção da fauna, é fundamental salientar, de acordo com Trajano (2000), a fragilidade dos organismos cavernícolas, em especial a dos troglóbios. Esta fragilidade deve-se a alguns fatores, dentre eles a pequena diversidade dos seres, a dependência dos recursos importados do meio externo e a suscetibilidade a variações climáticas.

Proteger cavernas é proteger todo um conjunto de seres vivos que em alguns casos só podem viver nesse ambiente: vários troglóbios possuem pequena distribuição geográfica e populações pequenas, em função da escassez de recurso alimentar, em consequência essas populações são extremamente vulneráveis e sua dificuldade em recuperar perdas populacionais é muito superior aos seres que habitam o ambiente epígeo (TRAJANO, 2000).

A proteção do ambiente cavernícola poderia se basear somente na presença desses seres em função do seu alto risco de extinção. Mas, além desse fator, deve ser considerada também a importância geológica, histórica e arqueológica desse ambiente.

Antagonicamente, a presença de microrganismos e seus mecanismos de dispersão são geralmente ignorados no manejo de cavernas (SAIZ-JIMENES, 2012). Cada vez mais cavernas brasileiras vêm sendo exploradas pela expansão crescente do turismo e pelo desenvolvimento de atividades mineradoras sem que as mesmas tenham sido pesquisadas. Considerando este fato e que os estudos microbiológicos do ambiente cavernícola são muito limitados no país, muita informação pode estar sendo perdida nestes processos. A investigação de tais microrganismos pode fornecer novos detalhes sobre a composição e o funcionamento do ecossistema cavernícola (TAYLOR *et al.*, 2009).



## I.5 Os organismos cavernícolas

A bioespeleologia é a ciência que estuda os organismos que vivem nas cavernas e suas relações com o ambiente físico. No Brasil, trabalhos sistemáticos ocorreram a partir da década de 80, sendo realizados vários levantamentos regionais e descritas novas espécies cavernícolas, além de estudos de ecologia, comportamento, morfologia e fisiologia de diversas populações (DESSEN *et al.*, 1980; CHAIMOWICZ, 1984; CHAIMOWICZ, 1986; GODOY, 1986; ROCHA, 1994; ROCHA, 1995; TRAJANO, 1987; TRAJANO & GNASPINI, 1991; TRAJANO & MOREIRA, 1991; ZAMPAULO, 2010). Anterior a essa data, trabalhos esporádicos foram publicados, também com a descrição de várias espécies, já demonstrando o enorme potencial que o país apresenta em relação ao desenvolvimento da bioespeleologia.

As peculiaridades do ambiente cavernícola fazem com que esse local torne-se especial para alguns grupos de seres vivos, que passaram então a viver em seu interior há milhares de anos e que, em alguns casos, encontram-se tão especializados que são incapazes de viver fora deste *habitat*. Em relação a esses organismos, podemos observar um variado grau de especialização que permitiu a adaptação ao ambiente (ZAMPAULO, 2010).

Apesar dos ambientes subterrâneos serem historicamente considerados pobres em termos de biodiversidade e biomassa, uma grande variedade de táxons está representado nestes ecossistemas, o que inclui desde bactérias, algas e fungos, até grupos vegetais (restritos a regiões eufóticas), invertebrados e vertebrados. Entretanto, a maioria destes grupos consiste de espécies pré-adaptadas às condições prevalentes nestes sistemas. Sendo assim, grupos que apresentam preferências por habitats úmidos, sombreados e que possuem uma nutrição generalista estão potencialmente aptos a colonizar e se estabelecer nestes ambientes (GIBERT *et al.*, 1994).

Em relação à condição ecológico-evolutiva, os organismos cavernícolas não se apresentam de maneira homogênea, sendo representados por táxons muito variados. Segundo Holsinger & Culver (1988), modificado do sistema Schiner-Racovitza, os organismos cavernícolas podem ser classificados em três categorias:

1. Troglóxenos: organismos regularmente encontrados no ambiente subterrâneo, mas que periodicamente se deslocam para o ambiente epígeo geralmente em busca de alimento e/ou para completar seu ciclo de vida, como exemplo os morcegos. Em geral, ocorrem nas porções mais próximas à entrada, mas populações eventualmente também podem ocorrer em zonas mais distantes. Muitos desses organismos são responsáveis pela importação de recursos alimentares provenientes do meio epígeo, sendo muitas vezes os principais responsáveis pelo fluxo energético, como em cavernas permanentemente secas.

2. Troglófilos: organismos facultativos no ambiente subterrâneo capazes de completar seu ciclo de vida de forma independente no meio epígeo ou hipógeo. No epígeo, tanto os troglóxenos quanto os troglófilos geralmente ocorrem em ambientes úmidos e sombreados.

3. Troglóbios: organismos restritos ao ambiente cavernícola que em geral podem apresentar diversos tipos de especializações morfológicas, fisiológicas e comportamentais que provavelmente evoluíram em resposta às pressões seletivas presentes em cavernas e/ou à ausência de pressões seletivas típicas do meio epígeo. Frequentemente estes organismos apresentam redução das estruturas oculares, despigmentação e alongamento de apêndices. Além disso, geralmente apresentam distribuição geográfica restrita, baixa densidade populacional, baixa tolerância às flutuações ambientais e estratégia reprodutiva do tipo K (POULSON & WHITE, 1969; CULVER, 1982), ovos maiores e em menor quantidade, crescimento individual lento e maturidade retardada, maior longevidade e baixa taxa de mortalidade dos adultos, o que os torna potencialmente ameaçados de extinção frente às alterações de seu ambiente (CULVER, 1982; TRAJANO, 2000).

Vale ressaltar, que embora o sistema de Shinner-Racovitza contemple somente três categorias, existe uma quarta categoria de organismos que podem ser frequentemente encontrados nestes ambientes. Tais organismos, denominados acidentais, compreendem espécies que normalmente não são encontradas em cavernas, mas que involuntariamente penetram nestes ambientes, seja por quedas em entradas verticais ou ainda veiculadas pela água ou vento. Esses organismos, embora não consistam de seres efetivamente cavernícolas, apresentam uma importância ecológica nítida, uma

vez que suas fezes e principalmente seus cadáveres servem de alimento para outros organismos presentes nestes ambientes (LERUTH, 1939; ZAMPAULO, 2010).

Em relação aos microrganismos cavernícolas, estes estão envolvidos em diversos processos geológicos (GALDENZI *et al.*, 2008, GUNDE-CIMERMAN, 1998; NOTHUP & LAVOIE, 2001), desde a deposição de espeleotemas quanto ao alargamento das cavernas (BARTON, 2006), e ecológicos (FERREIRA *et al.*, 2000; NIEVES-RIVERA, 2003; NOVÁKOVÁ, 2009) nos ecossistemas subterrâneos, entretanto a literatura existente sobre comunidades microbianas nos ambientes subterrâneos é esparsa e muitas vezes limitada a poucas cavernas, em contraste com a literatura sobre ambientes terrestres e marinhos. Mais raros ainda são os estudos abrangentes sobre as comunidades microbianas de cavernas, a identificação de espécies comuns ou abundantes, ou o seu papel nos ciclos biogeoquímicos (SAIZ-JIMENES, 2012).

A colonização das cavernas por microrganismos é um processo natural e elas possuem características ambientais únicas para seu desenvolvimento (SAIZ-JIMENES, 2012; TAYLOR *et al.*, 2014). Cavernas que ainda serão descobertas ou aquelas já expostas a visitantes são colonizadas por microrganismos (SCHABEREITER-GURTNER *et al.*, 2004). A maioria dos fungos no ar provenientes do ambiente externo penetram nas cavernas através da entrada, reforçando o papel da atmosfera como um veículo para o transporte e a dispersão de microrganismos no ar e nutrientes par dentro das cavernas (SAIZ-JIMENES, 2012). .

Os microrganismos podem habitar transitoriamente ou ser residentes das cavernas. Os residentes sobrevivem exclusivamente dos nutrientes que estão distribuídos na caverna, diferentemente dos transitórios que se desenvolvem apenas em função da disponibilidade de matéria orgânica, penetrando nas mesmas por meio de correntes de ar, fluxo de água, fluxo de sedimentos, em insetos, morcegos ou trazidos pelo homem (BARTON & NORTHUP 2007; ENGEL, 2007).

## I.6 Os Fungos

Fungos são organismos eucarióticos, heterotróficos e são encontrados sob dois tipos morfológicos, leveduras (unicelulares) e micélios compostos por hifas (multicelulares). As paredes celulares das leveduras, hifas e esporângios contêm vários polissacarídeos como quitinas e glucanas, que compõem o arcabouço estrutural (BUCKLAY, 2008). A absorção de nutrientes pelos fungos se dá através da produção e secreção de enzimas, seguida de absorção dos nutrientes presentes em diferentes substratos (GRIFFIN, 1994).

A distribuição geográfica dos fungos é ampla, ocorrendo em praticamente todos os ecossistemas. Apesar de uma dada espécie poder ser encontrada em uma grande variedade de habitats, outras apresentam distribuição extremamente limitada por fatores ambientais e tendem a ser endêmicos em um nicho ecológico específico (PEDRO & BONONI, 2007). De acordo com Shapiro (2010), pesquisas ao longo do planeta têm demonstrado que o grupo mais comum de fungos presentes nas cavernas são os Ascomycota.

Estudos sobre diversidade fúngica (micobiota) de cavernas são escassos em nosso país, sendo consenso entre os pesquisadores de todo o mundo a importância de se conhecer a diversidade dos fungos nos países tropicais e subtropicais, onde encontra-se grande número das espécies ainda desconhecidas pela ciência (HAWKSWORTH, 2001a, b; RINALDI *et al.*, 2008). Entre 80.000 a 120.000 espécies de fungos foram descritas até o momento, embora o número total de espécies seja estimado em cerca de 0,8 a 5,1 milhões (HAWKSWORTH, 2001a; WEBSTER & WEBSTER, 2007; MACLAUGHLIN *et al.*, 2009; TEDERSO, 2014). Hawksworth (2001a) relata que, entre os anos 1990-1999, cerca de 60% das novas espécies descritas foram originárias de áreas tropicais e subtropicais. À luz do conhecimento de que nosso país detém a maior diversidade de espécies do planeta, Lewinsohn & Prado (2005) estimaram cerca de 14.000 espécies de fungos e as pesquisas direcionam para um número superior a 200.000 espécies brasileiras. Colocando-se como contraponto, em uma lista publicada mais recentemente,

Forzza *et al.* (2010) englobaram 3.608 espécies de fungos para o Brasil, o que diminui o grande número publicado por Lewinsohn & Prado (2005).

Nas cavernas os fungos são responsáveis pela reciclagem de nutrientes em seu interior, abrigam bactérias que alimentam-se de micélios e esporos, além de nematódeos e outros organismos que se alimentam dos corpos frutíferos. Eles, portanto, constituem um elo crucial na cadeia alimentar (CULVER, 1982; PEDRO & BONONI, 2007).

Fungos usualmente formam complexas associações microbianas com outros microrganismos. Por exemplo, na diversa biota bacteriana que cobre a superfície de rochas em cavernas já foram identificadas *Penicillium* sp. e *Aspergillus* sp. (MULEC, 2008). Ocorre também entre fungos relações de competição com a produção de substâncias antifúngicas ou toxinas que inibem o crescimento de outros fungos sobre o substrato (WICKLOW, 1992). Ainda, como apresentado por Jurado *et al.*, (2009) e Saiz-Jimenez (2011), os fungos podem afetar qualquer material orgânico ou inorgânico introduzido em uma caverna.

Além de participar da formação de relações microbianas com outros microrganismos, como citado acima, e do processo de decomposição da matéria orgânica alóctone, os fungos podem muitas vezes também servir de alimento para outros organismos, especialmente invertebrados (SARBU *et al.*, 1996; VLASCEANU *et al.*, 1997; PORTER, 2009).

Os Fungos também atuam com agentes causadores de mudanças geológicas em cavidades naturais subterrâneas (BURFORD *et al.*, 2003), envolvendo-se na precipitação de carbonato de cálcio (NORTHUP & LAVOIE, 2001; BARTON, 2006) bem como na degradação do calcário. Muitos deles produzem compostos ácidos e pigmentos que causam corrosão de substratos (SIMONOVICOVA *et al.*, 2004; BASTIAN *et al.*, 2010).

## I.7 Micoses associadas a cavernas

Aproximadamente 200 espécies de fungos têm sido associadas com o corpo humano, seja como agentes patogênicos ou como comensais, sendo que em torno de uma dúzia representam os patógenos mais comuns (BUCKLAY, 2008). Fungos, vírus e bactérias são microrganismos encontrados em cavernas, mas dentre eles os fungos são de longe os mais preocupantes devido à sua alta taxa de produção de esporos e disseminação (JURADO, 2010; SAIZ-JIMENES, 2012). Os fungos encontrados no ambiente cavernícola podem ser patógenos oportunistas para os seres humanos (RESENDE-STOIANOFF *et al.*, 2012) e outros seres vivos.

Cavernas com alta taxa de visitação ou povoadas por animais, em especial os morcegos, são reservatórios de microrganismos patogênicos. Nos últimos anos, grande número de microrganismos que vivem no interior de cavidades vem sendo reportados como patógenos para humanos e demais animais, sendo que esse fato é particularmente perigoso nas regiões tropicais (JURADO, *et al.*, 2010).

Dentre os problemas de saúde que uma pessoa pode adquirir numa visita a cavidades subterrâneas podemos citar a histoplasmose, provocada pela espécie fúngica *Histoplasma capsulatum* e a Criptococose, causada pelo fungo *Cryptococcus neoformans*. Em ambos os casos, a infecção ocorre através da inalação de esporos em suspensão.

Dentre os microrganismos mais bem estudados em cavernas brasileiras podemos destacar o fungo da família Gymnoascaceae *Histoplasma capsulatum*, causador da histoplasmose, micose endêmica nos Estados Unidos, América Latina, parte da Ásia e África (CURY *et al.*, 2001; ROSSINI & GOULART, 2006). A histoplasmose foi descrita pela primeira vez a pouco mais de um século por um médico americano, Samuel Darling, que estava trabalhando na zona do Canal do Panamá (LACAZ *et al.*, 2002; KAUFFMAN, 2007).

O fungo dimórfico vive como uma forma de Saprófita no solo, especialmente em condições alcalinas (pH 5 a 10) e temperaturas entre 20 a 30 graus (ROCHA-SILVA, 2014). Solos que contém grande quantidade de

guano de aves e morcegos podem possuir grande quantidade do fungo (CANO, 2001; KURY *et al.*, 2001), sendo que especialmente cavernas com guano de morcego podem se encontrar extremamente contaminadas (LOTTENBERG *et al.*, 2007; FERREIRA & BORGES, 2009).

A infecção geralmente ocorre pela inalação dos microconídios dispersos pelo ar durante atividades laborais ou recreativas que envolvam solos contaminados com fezes de morcego ou de aves em prédios antigos, pontes ou cavernas (GURNEY, 1996; CURY *et al.*, 2001; KAUFFMAN, 2007; SHAPIRO, 2010). No Brasil, o fungo pode ser encontrado em vários estados, como no Rio Grande do Sul, Rio de Janeiro, São Paulo, Minas Gerais, Mato Grosso (SEVERO, *et al.*, 2001; UNIS & SEVERO, 2005; FERREIRA *et al.*, 2009). Surto da doença foram observados na cidade de Ouro Preto, no ano de 1976, onde vários espeleólogos foram infectados, em Pedro Leopoldo, no ano de 1997 e um caso sem data especificada (aparentemente na década de 80) foi reportado na Gruta do Tamboril, em Unaí, sendo todos os casos relatados pertencentes ao estado de Minas Gerais. (LINO, 2001; CURY, 2001; ROCHA-SILVA, 2014).

O espectro clínico da doença varia de uma infecção pulmonar aguda a infecção pulmonar crônica e inclui histoplasmose disseminada. A forma disseminada da doença afeta principalmente pacientes imunocomprometidos (SANTOS, *et al.*, 2009). A infecção sintomática aguda é observada em menos de 1% dos pacientes infectados, na maioria dos pacientes pode ser assintomática ou apresentar sintomas leves que são mais tarde detectados para ser relacionado com a histoplasmose.

Em relação a outros fungos, existem relatos de pessoas que foram infectadas pelo fungo *Penicillium marneffe* em função da exposição regular em solos de bat caves contaminados com esporos desse fungo, sendo que a infecção pelo ar foi provavelmente a rota de aquisição da enfermidade (SKOULIDIS *et al.*, 2004).

Os dermatófitos *Microsporum gypseum* e *Trichophyton mentagrophytes* também foram isolados de solos de cavernas habitadas por morcegos (KAJIHIRO, 1965). E várias espécies de fungos do gênero *Trichosporon* foram recentemente encontradas em cavernas de Malaga, Espanha (STOMEIO, 2008).

No Brasil são poucos os estudos referentes a presença de fungos patogênicos e oportunistas em cavernas. Como destaque temos os trabalhos de Taylor (TAYLOR, 2009, 2014) que identificou espécies com potencial patogênico dos gêneros *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Purpureocillium*, *Rhizopus*, *Thricoderma*, *Mucor* e *Fusarium*.

Em relação as doenças relacionadas a outros seres vivos, destaca-se sem sombra de dúvidas nos últimos anos a presença da white-nose syndrome que vem causando uma enorme devastação entre morcegos na região nordeste dos Estados Unidos, sendo que a doença vem se espalhando rapidamente.

O agente causador dessa nova síndrome é um novo fungo identificado como *Geomyces destructans*. O fungo cresce em tecidos expostos de morcegos em hibernação, como hifas delicadas nos focinhos e membranas das asas, aparentemente causando despertar precoce, comportamento aberrante e perda prematura da reserva de gordura crítica. A perda de morcegos nos hibernáculos infectados tem variado entre 30 a 90%, com uma média regional de 73% de óbitos (GARGAS *et al.*, 2009; JURADO, *et al.*, 2010; FRICK, *et al.*, 2010)

O fungo *G. destructans* também foi identificado no Canadá e em alguns países na Europa mas a mortalidade em massa observada nos Estados Unidos não foi documentada nesses países, sendo que tal fato pode se dever a algum tipo de resposta imune ou comportamento do hospedeiro (VANDERWOLF *et al.*, 2013).

O fungo *Paecilomyces lilacinus*, utilizado com agente de controle biológico para o taxa nematoda, foi identificado em cavernas da caatinga brasileira (SANTIAGO *et al.*, 2006; TAYLOR, 2009). De acordo com Taylor (2009) o fato de esse fungo ter sido encontrado em caverna mostra mais uma vez a necessidade de se conhecer melhor a microbiota e distribuição dos microrganismos em ambientes cavernícolas, uma vez que já foram relatados registros de Nematoda em algumas cavernas, e estes fungos podem potencialmente estar participando de processo de controles populacionais de alguns organismos, exercendo, desta forma, certa pressão seletiva nestes.



## I.8 O solo e a diversidade fúngica

O solo é um componente crítico na biosfera terrestre, funcionando na manutenção da qualidade ambiental com efeito local e regional, podendo ser caracterizado como um corpo natural organizado, vivo e dinâmico que desempenha inúmeras funções no ecossistema terrestre (REINERT, 1993). Em função de suas propriedades químicas, físicas e biológicas, pode absorver e liberar nutrientes e outros compostos químicos, reter e liberar água para as plantas e corpos hídricos, promover e sustentar o crescimento radicular, proporcionar hábitat favorável aos organismos como bactérias, fungos, protozoários e invertebrados, e armazenar e deixar fluir calor e gases (LETEY, 1985; GILLER *et al.*, 2005).

O solo pode ser considerado um habitat microbiano por excelência, local de vida de inúmeras e variadas populações de todos os tipos de microrganismos e mesmo como reservatório final de grande diversidade genética. A população microbiana é um componente crítico dos ecossistemas naturais ou manipulados pelo homem, uma vez que atua na decomposição da matéria orgânica, alterando a disponibilidade de nutrientes para as plantas e influenciando as propriedades físicas do solo, como a estabilidade dos agregados, sendo que os fungos do solo são responsáveis por cerca de 90% da atividade da biomassa (MOREIRA & SIQUEIRA, 2002; PRADE, 2007; ESPÓSITO & AZEVEDO, 2010).

As atividades dos microrganismos baseiam-se na sua notável diversidade metabólica e adaptabilidade genética (KURTBOKE *et al.*, 2004), tornando-os importante fonte de recursos genéticos para o avanço biotecnológico e o desenvolvimento sustentável. Portanto, para uma boa qualidade do solo é importante manter a diversidade microbiana (BORNEMAN *et al.*, 1996). Sob o ponto de vista ecológico, o maior interesse nas populações microbianas do solo está situado em sua função, nicho ecológico dentro do ecossistema e nas interações que possam ocorrer entre elas (CARDOSO, 1992; GLIESSMANN, 2000; RICKLEFS, 2003).

Os fungos são encontrados no solo com comunidades variando de 10 a 1000 microrganismos por grama de solo, assim como são predominantes em

solos ácidos onde sofrem menor competição, porém o valor ótimo de pH varia conforme a espécie (BRANDÃO, 1992).

O aporte de matéria orgânica pode ser considerado um dos principais elementos para a manutenção da comunidade fúngica no solo, no que se refere a formação dos macroagregados, visto que estes microrganismos produzem substâncias diretamente envolvidas na estabilização dos agregados, e agem diretamente pelo entrelaçamento de hifas nas partículas do solo (MILLER & JASTROW, 1990).

De acordo com Garret (1963), os fungos do solo podem ser agrupados, na seguinte classificação ecológica: fungos que colonizam raízes, como os micorrízicos dos gêneros *Bloteus*, *Amanita*, *Telephora*, *Pisolithus*, *Rhizoctonia*, *Glomuse*, *Gigaspora*. Os parasitas especializados do gênero *Armillara*, *Fomes* e *Ophiobolus*, fungos que habitam o solo como parasitas não especializados. Saprófitas fracos como os dos gêneros *Phytium*, *Rhizoctonia* e *Fusarium*, saprófitas obrigatórios, destacando-se os Zigomicetos e Deuteromicetos, os quais utilizam açúcares solúveis. Fungos celulolíticos dos gêneros *Trichoderma* e *Penicillium*. Fungos lignolíticos destacando-se os basidiomicetos, fungos coprófilos *Pilobolus*, *Ascodesmus*, *Sordaria* e *Coprinus*, e fungos predatórios, que capturam e parasitam amebas e nematóides, como exemplares das ordens Zoophagales (Oomicetos) e Moniliales (Deuteromicetos).

Para Cardoso (1992), os microrganismos, como os fungos do solo apresentam um grande número de microhabitats, que diferem entre si, e cada microhabitat do solo oferece certa quantidade de nichos à comunidade microbiana. Quanto mais simples o habitat, menor será o número de nichos disponíveis. Para a autora, a própria atividade microbiana pode contribuir para ampliar os nichos disponíveis através da decomposição enzimática de certos compostos, fornecendo novos substratos a outros grupos, imobilizando o nitrogênio mineral, consumindo todo o oxigênio disponível através da rápida oxidação da matéria orgânica ou excretando substâncias acidificantes.

## I.9 Isolamento e identificação de fungos

Um grama de solo pode conter 10 bilhões de microrganismos, representando milhares de espécies (ROSSELÓ-MORA & AMANN, 2001). Porém, a diversidade é tão vasta quanto desconhecida. Na última década, estudos com diversidade microbiana do solo têm sido bastante discutidos devido ao grande avanço dos estudos moleculares que favoreceram a avaliação em amostras ambientais (TIEDJE *et al.*, 2001).

A identificação taxonômica tradicional de fungos filamentosos é baseada nas características micro e macromorfológicas, como a morfologia das culturas, as características da colônia e da coloração em um meio de cultura específico, tamanho, forma, desenvolvimento de esporos sexuais e assexuais e suas estruturas de formação, e ou características fisiológicas como a habilidade de usar vários componentes como nitrogênio e carbono (GLASS, 1995; ROMANELLI *et al.*, 2014).

Para a identificação de isolados de um nível complexo de espécies, por exemplo os fungos do gênero *Aspergillus*, bem como a colocação de uma espécie dentro de um complexo, os micologistas tem historicamente recorrido a avaliação das características macro e microscópicas (BALAJEE, 2009). No entanto, estudos recentes tem demonstrado que a identificação de espécies diferentes dentro de cada um dos complexos de espécies de *Aspergillus* é problemática por causa da sobreposição das características morfológicas desses organismos (BALAJEE, 2007).

Vários podem ser os problemas existentes na identificação morfológica de morfotipos fúngicos, por exemplo, a identificação de espécies do gênero *Colletotrichum* com base em características morfológicas tem sido assolada por confusão desde os primórdios (LUBBE, *et al.*, 2004). Os principais obstáculos à identificação são os meios de cultura, a luz que influencia a produção de conidiomata, a variação na cor dos micélios e a forma e tamanho dos conídios (SUTTON, 1980; NIRENBERG *et al.*, 2002; ROMANELLI *et al.*, 2014).

A identidade dos seres vivos é determinada pela composição e sequencia do material genético (MENEZES *et al.*, 2010). O uso de técnicas moleculares, por meio da análise de DNA, possui a vantagem de ser um

processo rápido e altamente sensível. Essas técnicas não estão sujeitas a variações fenotípicas, à ação do ambiente, ao estágio de desenvolvimento do fungo e a outros fatores que possam alterar a morfologia do organismo (MANSO & TENENTE, 1984).

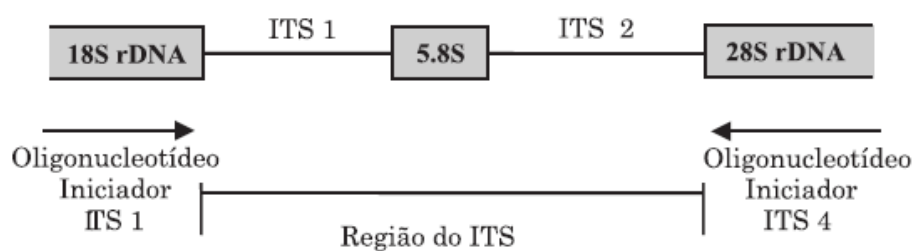
O advento dos métodos moleculares tem suplementado os métodos taxonômicos tradicionais com ferramentas baseadas em DNA com as quais se examina a sistemática e a filogenética dos fungos (GLASS, 1995). O grande avanço da biologia molecular na identificação de novas espécies, permite hoje a descrição de espécies a partir de uma porção de substrato do qual o DNA foi isolado sem, no entanto, ser necessária a identificação do microrganismo pelos métodos tradicionais dependentes de cultivo (HIBBETT & TAYLOR, 2013). No entanto, tais abordagens há muito tempo têm sido dificultadas pela presença de potentes inibidores da PCR em culturas fúngicas e dificuldades inerentes em quebrar paredes de células fúngicas (BORMAN *et al.*, 2008).

Os estudos de diversidade microbiana por meio de técnicas moleculares geralmente envolvem o sequenciamento de um trecho do DNA que seja informativo, como genes contendo sequências conservadas para o desenho de oligos iniciadores e ao mesmo tempo contendo sequências variáveis do ponto de vista filogenético (CANNAVAN, 2007). As regiões mais utilizadas em sistemática são as que transcrevem os RNA ribossomais (rDNA), porque organizam-se em sequência e com grande número de repetições em “tandem”, além de não sofrerem seleção, comportando-se como elementos genômicos neutros, e desta forma permitem estimar o tempo da divergência entre táxons (PRADE, 2007).

A análise do DNA fornece informação sobre a composição de espécies ou estruturas de comunidades. Embora, a princípio, qualquer gene possa ser usado nas análises, o gene 16S rRNA em procariotos e o 18S rRNA em eucariotos são os mais utilizados como moléculas marcadoras para este propósito, uma vez que estão presentes em todos os organismos; apresentam regiões conservadas e regiões variáveis, tornando possível o desenho de *oligonucleotídeos iniciadores* e sondas com diferentes níveis de especificidade; têm informação de sequência suficiente para inferência filogenética e estão presentes em grande número de células, o que facilita sua detecção. Além

disso, cerca de 800.000 sequências estão disponíveis atualmente em bases de dados de livre acesso, tais como Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

No diagnóstico, vêm sendo utilizadas as regiões do rDNA, pelo grande número de cópias e pelo grande número de espécies que possuem suas sequências em bancos de dados. Essas regiões são caracterizadas pela alternância de sequências transcritas e não transcritas. As regiões não transcritas são a ITS e a IGS. Uma técnica muito utilizada para a taxonomia de fungos é a amplificação da região ITS do rDNA por PCR (MENEZES, 2010). A região ITS (Figura 4) possui duas regiões denominadas de ITS1, amplificadas pelos oligonucleotídeos universais ITS1 e ITS2, que se encontram entre o 18S e o 5.8S; já a ITS2, que encontra-se entre o 5.8S e o 25-28S, é amplificada pelos iniciadores ITS3 e ITS4 (ROMANELLI *et al.*, 2014).



**FIGURA 4 - Região do rDNA com o espaço interno transcrito ITS1 e ITS2.**

O fragmento total do ITS é obtido pelo uso do ITS1 e ITS4, amplificando juntamente toda a região 5.8S, variando de 600 a 800 pares de bases. As características que marcam esta região como conveniente para a identificação molecular são: Toda a região ITS apresenta frequentemente entre 600 a 800 pb e pode ser amplificada com oligonucleotídeos universais, multicópias naturais de repetição de rDNA tornam ITS uma região fácil para amplificação e estudos têm demonstrado que regiões ITS são frequentemente variáveis que permitem a distinção de espécies fungicas (GARDES & BRUNS, 1993). Como consequência de seu uso generalizado, muitas sequências ITS já estão disponíveis, fornecendo um banco de dados de grande referência para identificação taxonômica (MONARD *et al.*, 2013).

Além da identificação de fungos, as regiões ITS vêm sendo utilizadas para estudos de filogenia. Nos ascomicetos, a morfologia e similaridade de sequencia estão diretamente relacionadas na maioria das classes, mas a similaridade pode envolver grupos não relacionados. Na PCR, com o uso de oligonucleotídeos específicos para as regiões ITS, é possível promover novas fontes de dados para a reconstrução filogenética deste grupo de fungos. Algumas regiões do gene de rDNA 26S são pouco conservadas e frequentemente com grandes mutações, esta região tem servido como marcadores potenciais para diferenciar fungos e populações (TAN *et al.*, 1996).

Além disso, outras regiões têm sido utilizadas para a identificação de grupos complexos como por exemplo espécies dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Pestalotiopsis*. A “International Society for Human and Animal Mycology-sponsored *Aspergillus* Working Group” recomendou o uso de um método de identificação baseado no sequenciamento comparativo que usa a região ribossomal do espaçador transcrito interno (ITS) e uma região codificante de proteína, tais como região  $\beta$ -tubulina, para a identificação de espécies dentro do complexo, para a identificação de espécies de *Aspergillus* (BALLAJE *et al.*, 2007). Nesse contexto, a  $\beta$ -tubulina demonstrou ser altamente polimórfica (GLASS & DONALDSON, 1995) e mais discriminativa do que a região ITS em determinados casos (CHRZAVZEZ, 1995).

## II Justificativa

A fauna cavernícola brasileira começou a ser relativamente bem estudada apenas nas últimas três décadas (DESSEN *et al.*, 1980; CHAIMOWICZ, 1984; CHAIMOWICZ, 1986; GODOY, 1986; TRAJANO, 1987; TRAJANO & GNASPINI, 1991; TRAJANO & MOREIRA, 1991; ROCHA, 1994; ROCHA, 1995; ZAMPAULO, 2010). Entretanto, até o momento, poucas cavernas foram extensivamente pesquisadas sendo a maior parte delas calcárias (FERREIRA & POMPEU, 1997; BICHUETTE & SANTOS, 1998; FERREIRA & MARTINS, 1998; SOUZA-SILVA, 2003; FERREIRA, 2005; PROUS, 2005; TRAJANO, 2007, CORDEIRO, 2008).

Existem aproximadamente 800 cavidades inventariadas no país e deste total apenas uma pequena fração pode ser considerada bem conhecida do ponto de vista biológico, e grande parte destes estudos foram realizados dentro de unidades de conservação, que são áreas legalmente protegidas (ZAMPAULO, 2010). Dentre tais unidades destacam-se o Parque Estadual Turístico do Alto Ribeira e Parque Estadual de Intervalos, ambos localizados no estado de São Paulo, o Parque Nacional Cavernas do Peruaçu, localizado no norte de Minas Gerais e o Parque Nacional da Serra da Bodoquena localizado no estado do Mato Grosso do Sul (GNASPINI *et al.*, 1994; TRAJANO, 2000; FERREIRA & HORTA, 2001; FERREIRA, 2003).

Desta forma, a maioria dos estudos bioespeleológicos brasileiros encontram-se fragmentados e concentram-se em áreas cársticas de algumas poucas regiões do país. Mesmo assim, vários estudos têm revelado uma elevada diversidade e endemismos da fauna subterrânea em algumas regiões do Brasil (GNASPINI & TRAJANO, 1994; ROCHA, 1995; FERREIRA, 2004; TRAJANO, 2000; FERREIRA, 2005b; SOUZA-SILVA, 2008; PROUS & FERREIRA, 2009).

Quando se trata dos microrganismos, nosso conhecimento da diversidade microbiana de cavernas é, em geral, limitado e particularmente no Brasil, estudos sobre a diversidade microbiana são escassos. Assim, o potencial existente para a descoberta de novos microrganismos e mesmo de microrganismos já conhecidos com atividades que permitiram sua adaptação

às cavernas é muito grande, permitindo sua utilização, por exemplo, na bioprospecção (ESPÓSITO & AZEVEDO, 2010).

Bactérias e fungos que habitam cavernas são importantes por várias razões. Devido ao seu longo isolamento em relação à superfície e pelo seu crescimento em ambientes com baixa concentração de nutrientes, alguns microrganismos presentes em cavernas parecem ter evoluído para a produção de biomoléculas especializadas, ou toxinas, que são antagônicas a outros. Estas biomoléculas microbianas podem ser úteis aos humanos no combate a doenças e/ou poluição (KAMBESIS 2007; PORTILLO *et al.*, 2008). Podemos também encontrar novas espécies de fungos com potencial patogênico que serão isoladas, identificadas e potencialmente caracterizadas quanto à sua utilização biotecnológica.

O objetivo de medir a diversidade além de trazer conhecimentos à teoria ecológica, é contar com parâmetros que nos permitam tomar decisões ou emitir recomendações a favor de táxons ou áreas ameaçadas, ou ainda monitorar o efeito de perturbações do ambiente. Medir a abundância relativa de cada espécie permite identificar aquelas espécies que por sua escassa representatividade na comunidade são mais sensíveis às perturbações ambientais (MAGURRAN, 1988).

Considerando o que foi exposto anteriormente, o isolamento e identificação a de fungos cavernícolas do solo mostra-se relevante como etapa inicial da caracterização da diversidade fúngica de cavernas.



## **III Objetivos**

### **III.1 Objetivo geral**

Este trabalho teve como objetivo geral, isolar e identificar, utilizando métodos morfológicos e moleculares, fungos do solo em cavidades naturais subterrâneas situadas no Parque Estadual do Sumidouro – Minas Gerais.

### **III.2 Objetivos específicos**

1. Isolar fungos cultiváveis presentes no solo de ambientes cavernícolas.
2. Realizar a identificação molecular e/ou morfológica dos morfotipos cultiváveis até o menor nível taxonômico possível.
3. Verificar a presença de possíveis fungos com potencial patogênico.
4. Verificar a diversidade de gêneros fúngicos entre diferentes pontos amostrais de uma mesma cavidade.
5. Comparar a diversidade de gêneros fúngicos entre cavernas com diferentes graus de antropização.

## **IV Materiais & Métodos**

### **IV.1 Locais de coleta dos fungos cavernícolas**

As coletas foram realizadas em 4 cavidades situadas na área do Parque Estadual do Sumidouro (Figura 5). As cavidades foram selecionadas sob o enfoque de possibilitar uma amostragem de áreas que sejam mais ou menos impactadas por influência antrópica. O desenvolvimento e o nível de isolamento, em relação ao ambiente epígeo da região final de cada uma das cavidades, assim como o uso turístico e a intensidade desse uso também foram observados para a seleção.

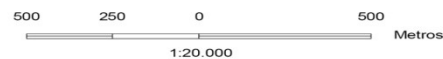


**Legenda**

- Cavernas cadastradas em Pedro Leopoldo
- Cavernas cadastradas em Lagoa Santa
- Parque Estadual do Sumidouro
- Corredor Ecológico
- Cursos d'água
- Estradas
- Limite Intermunicipal

**Dados Técnicos**

Projeção Universal Transversa de Mercator - UTM  
 Meridiano Central: 51° WGR  
 Datum Vertical: Local  
 Datum Horizontal: SAD 69  
 Imagem Ikonos



Execução: Gheosfera Consultoria Ambiental  
 jun/2010

**Localização no Estado**



Pedro Leopoldo e Lagoa Santa - MG

**FIGURA 5 – Vista aérea do PESU com o posicionamento de algumas cavidades cadastradas no Plano de Manejo. A linha amarela delimita a área do parque. Os pontos azuis e amarelos determinam a localização das cavidades naturais subterrâneas.**  
 Fonte – Plano de Manejo do Parque Estadual do Sumidouro (2010).

As cavidades selecionadas para amostragem foram as que se seguem:

1- Gruta da Lapinha que possui aproximadamente 600 metros de desenvolvimento, cavidade turística conhecida internacionalmente e de fácil acesso. No caso da Gruta da Lapinha foram feitas instalações de redes elétricas, modificações no piso (degraus), instalação de escadas metálicas com corrimãos, portões em entradas, dentre outras (INIESTA, 2012). A cavidade possui duas entradas acessíveis ao turista, sendo ambas antropizadas, com presença de escadas, grades, iluminação artificial e supressão da vegetação do entorno.

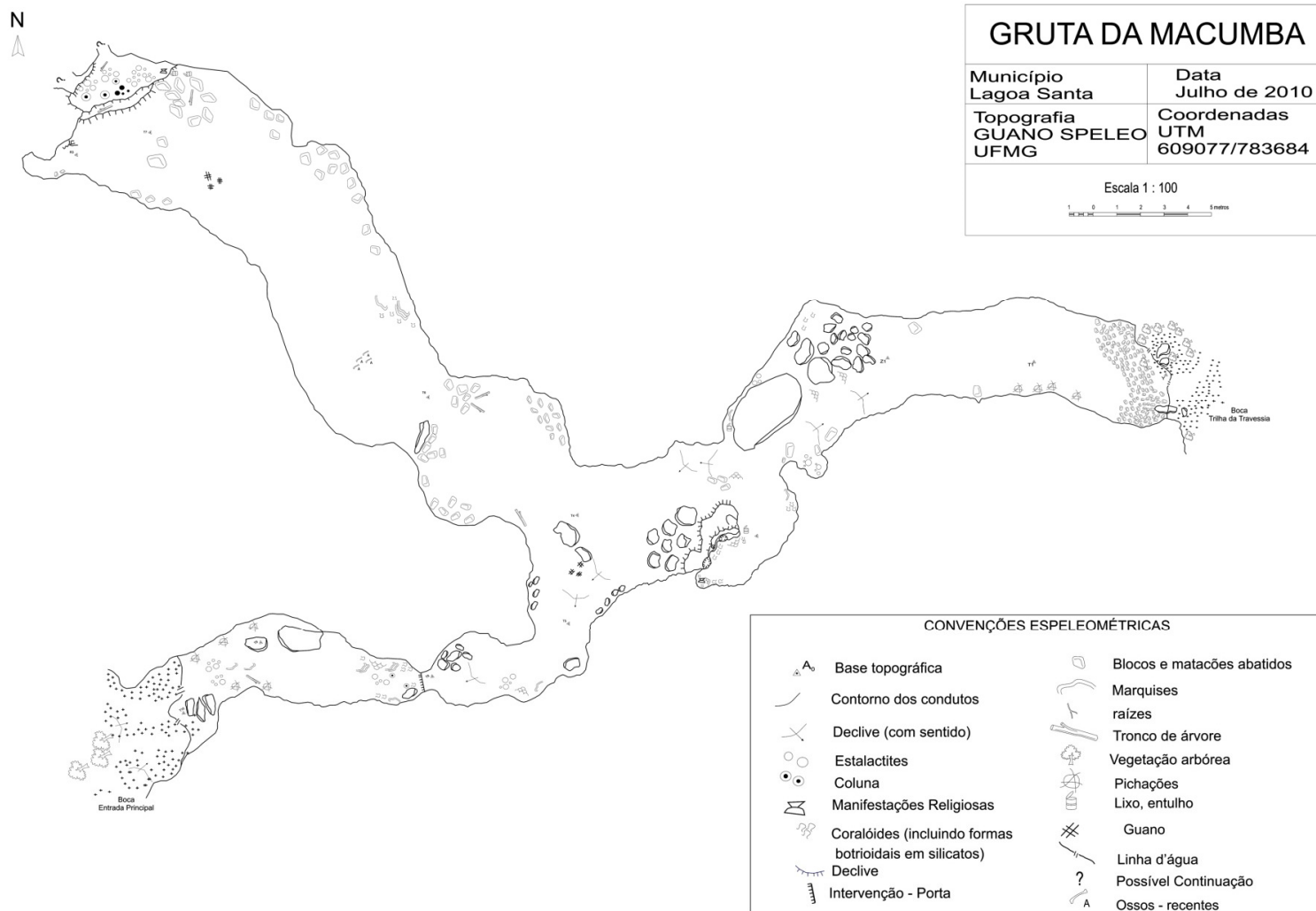
2- A Gruta da Macumba (Figura 6), cavidade de fácil acesso que apresenta duas entradas que servem como passagem para os turistas que irão fazer o percurso da trilha do sumidouro que termina na Lagoa do Sumidouro. A entrada próxima a Gruta da Lapinha é menor e pode ficar parcialmente alagada na estação chuvosa, fato verificado pelas marcas de água nas paredes e presença de mudcrakers no piso. O entorno se encontra antropizado com a supressão da vegetação, construção de escadarias e a presença do Museu do Castelinho nas proximidades. A segunda entrada é maior e um pouco mais preservada em relação a primeira, mas apresentando também sinais de antropização como a presença de trilha para acesso dos turistas. Na gruta da Macumba foram encontrados restos de velas em diferentes pontos, foi também encontrada uma “porta” separando dois condutos e alguns altares para santos nas paredes.

3 – A Gruta dos Túneis com aproximadamente 1.000 metros de D.L, cavidade com uso turístico restrito e com grau médio de dificuldade de acesso. A cavidade é utilizada para atividades de espeleoturismo, uma prática puramente esportiva e recreativa realizada em cavernas (INIESTA, 2012). A entrada principal da cavidade está impactada com a presença de trilha e supressão de vegetação, mas se encontra em melhores condições do que as duas grutas citadas anteriormente. A cavidade possui outras entradas e claraboia em seu interior, sendo que essas se encontram em melhor grau de

conservação em função do menor uso por turistas pela maior dificuldade de acesso.

O trabalho de Iniesta (2012) considerou que as Grutas Túneis e Macumba são na verdade uma cavidade única em função da presença de um pequeno conduto que faz a ligação entre as duas. O presente trabalho não realizou essa fusão pelo fato de que o uso das duas cavidades é diferente e aparentemente a influência exercida uma sobre a outra nos pontos de coleta estabelecidos é mínima.

4 - Gruta DOC que recebeu esta denominação por não fazer parte (608959/7836745 – Datum SAD69) do plano de manejo do parque e está localizada em uma área sem acesso ao turismo. A cavidade é pequena e com grau médio de dificuldade de acesso. Dentre todas as cavidades essa é a mais preservada, tendo a manutenção da vegetação de entorno e aparentemente não foram observados vestígios de depredação e utilização em seu interior. A maior dificuldade em se localizar cavidade e o tamanho reduzido da entrada podem ser fatores que favoreceram a preservação da mesma.



**FIGURA 6 – Mapa esquemático da Gruta da Macumba.**  
 Fonte – Grupo Guano Speleo UFMG



## IV.2 Metodologia de amostragem

O desenvolvimento do transecto para definição dos pontos de amostragem foi obtido com a realização da medição da cavidade desde sua entrada principal até o ponto final, seguindo-se o conduto principal e/ou o caminho preferencialmente utilizado pelos turistas que acessam a cavidade, sendo o valor obtido dividido por dois e marcado assim o ponto médio de cada uma das cavidades de acordo com a tabela abaixo (Tabela 1).

**TABELA 1 – Desenvolvimento do transecto e ponto médio das cavidades amostradas**

<b>Cavidade</b>	<b>Desenvolvimento do transecto</b>	<b>Ponto Médio (P.M)</b>
<b>Gruta da Lapinha</b>	160,93 m	80,46 m
<b>Gruta da Macumba</b>	60,77 m	30,38 m
<b>Lapa dos Túneis</b>	225,37 m	112,68 m
<b>Gruta DOC</b>	19,43 m	9,71 m

Os pontos amostrais (Figura 7) foram definidos como sendo o Ponto 1, aquele que se encontra na entrada principal da cavidade, na região da linha de pingueira. O Ponto 2 é o que se localiza equidistante em relação a entrada e a região final do transecto e o Ponto 3 a região final do transecto.

Segue abaixo breve descrição dos pontos de coleta:

### Gruta da Lapinha

P1 – Entrada principal da cavidade, antropizada com a presença de escadaria e solo recoberto por piso cimentado em sua maior parte. Na lateral direita presença de solo com presença de matéria orgânica.

P2 – Localizado no salão central da cavidade, com piso formado por sedimento fino e impactado pelas obras de reforma da iluminação, onde é possível a

observação de brita e restos de material elétrico. Nesse ponto ocorre a parada dos turistas pelos monitores para que sejam feitas explicações sobre a cavidade.

P3 – Ponto localizado em zona afótica onde atualmente não é permitida a presença de turistas. É a região mais profunda da cavidade e o piso é formado por sedimento terrígeno com presença de detritos e mancha de guano antigo.

#### Gruta da Macumba

P1 – Ponto localizado em entrada na base de paredão em fundo de dolina. Encontra-se impactado pela presença de trilhas e pode ficar alagado na estação chuvosa. O solo é predominantemente argiloso com presença de “mudcrakers”, que são estruturas formadas por sedimento lamacento que seca e se contrai.

P2 – Ponto localizado entre as duas entradas, com solo formado por sedimento extremamente fino e aparentemente sem recurso. Possui maior influência da segunda entrada em função do tamanho da boca e de corrente de ar proveniente desta. Esse ponto é caracterizado pela presença de região de penumbra.

P3 – Ponto localizado na segunda entrada e mais preservado em relação à primeira. Possui teto alto e suas laterais apresentam vegetação e solo com maior percentual de matéria orgânica e raízes. Encontra-se em nível superior quando comparada a primeira entrada.

#### Gruta dos Túneis

P1 – Entrada em base de paredão com piso inclinado para o ambiente hipógeo. Possui solo com presença de matéria orgânica vegetal particulada e raízes. Se encontra protegida em região de diaclase.



P2 – Ponto localizado em região de penumbra forte e com aparente baixa influência da primeira entrada. Possui piso plano com sedimento fino e pouca matéria orgânica visível.

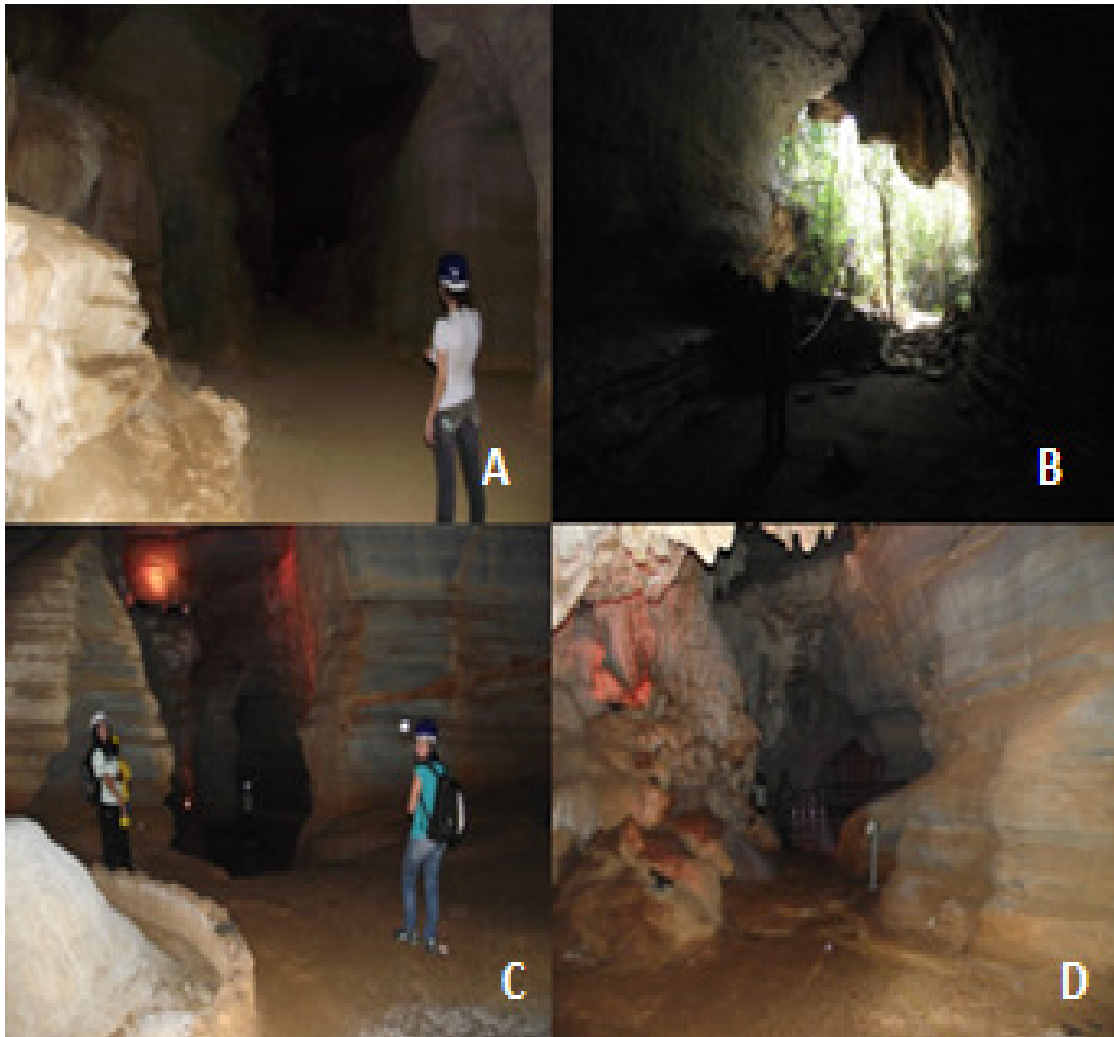
P3 – Ponto em zona afótica e com menor influência do ambiente epígeo dentre todas as cavidades. Piso formado por sedimento fino e com presença de mancha antiga de guano de morcego hematófago nas proximidades.

#### Gruta DOC

P1 – Ponto localizado na única entrada da cavidade, que é formada por teto baixo em base de paredão. Encontra-se aparentemente preservado, com solo formado por sedimento terrígeno com boa quantidade de matéria orgânica vegetal e raízes. Presença de vegetação arbustiva e árvores no entorno.

P2 – Ponto localizado em região formada por conduto estreito com piso formado por sedimento argiloso com presença de mudcrakers. Possui marcas de alagamento nas paredes e aparentemente baixa quantidade de matéria orgânica disponível. Presença de região afótica.

P3 – Ponto em região afótica com piso formado por sedimento terrígeno, pedras e pequenos blocos. Presença de detritos e matéria orgânica vegetal particulada.

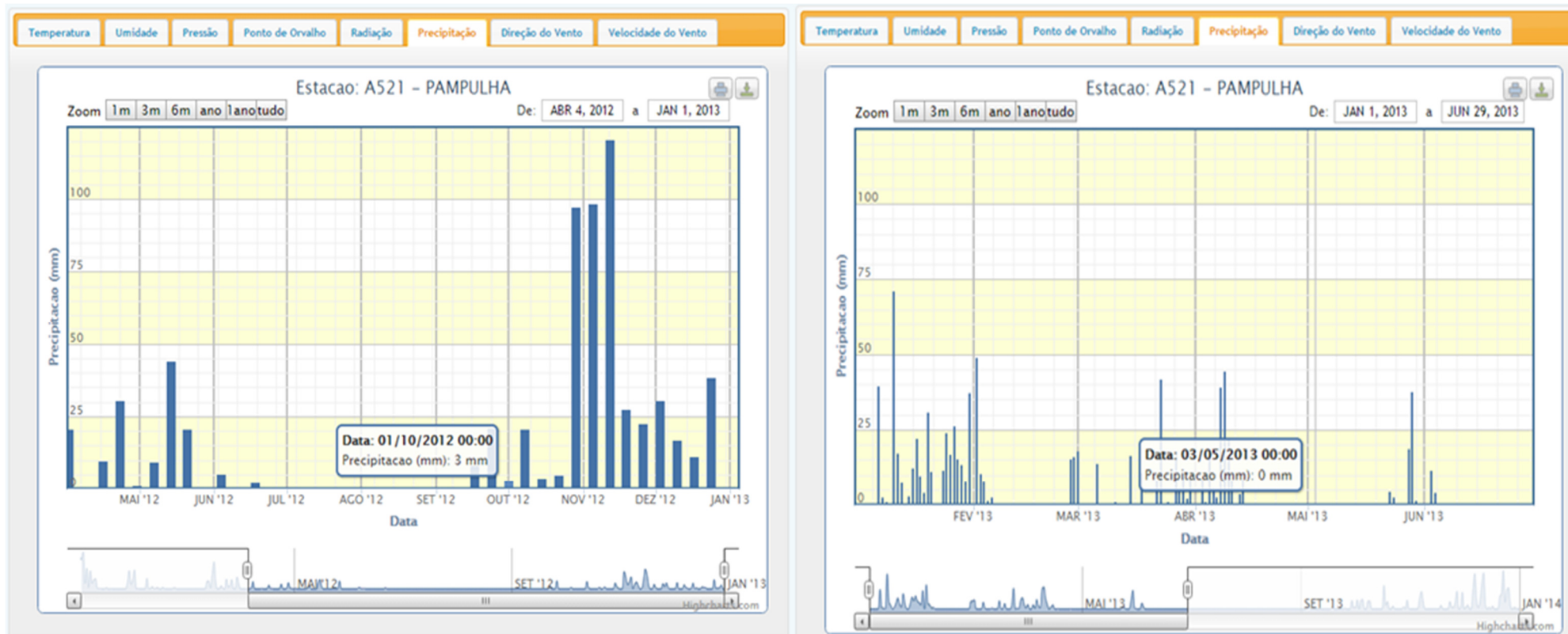


**FIGURA 7 – Momento da medição das cavidades para definição de ponto médio.**

(A) Medição da região mediana da Lapa dos Túneis; (B) Segunda entrada da Gruta da Macumba, considerada o ponto 3 da cavidade; (C) Região do ponto médio da Gruta da Lapinha (D) Trilha turística da Gruta da Lapinha utilizada para a obtenção do D.L

Fonte – Do próprio autor

As amostras de solo foram coletadas em duas campanhas, procurando-se coletar no final de cada estação (seca e chuvosa) de acordo com as informações observadas na Estação pluviométrica de Belo Horizonte – MG (Figura 8). As duas coletas foram realizadas no dia 08/10/12 e a segunda no dia 03/05/13.



**FIGURA 8 – Dados da precipitação pluviométrica mensal da estação de Belo Horizonte – Pampulha/MG no período de janeiro de 2012 a junho de 2013.** Fonte -[http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=home/page&page=rede\\_estacoes\\_conv\\_graf](http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=home/page&page=rede_estacoes_conv_graf). Acesso em 30/01/2015

Em cada ponto foram coletadas 3 amostras de solo, sendo duas próximas a cada uma das paredes da cavidade e uma na região mediana em relação as duas paredes. Foram obtidos em cada local de coleta os dados relativos a umidade relativa, luminosidade e temperatura utilizando-se o termohigroanemoluxímetro ICEL WM-1850 calibrado em 08 de fevereiro de 2012 com certificado número 93879-12 INSTRUTEMP. Cada medida foi obtida após a estabilização do aparelho próximo ao solo por um período de 3 minutos após ligado no ponto de coleta.

A coleta foi realizada com a retirada de uma camada de até 5 centímetros de profundidade usando material plástico esterilizado (Figura 9). Cada amostra foi colocada em um tubo de polipropileno estéril. Para a coleta foram utilizadas luvas de borracha e em cada novo local de coleta foi utilizado um novo par. Foram anotados a data, hora e local amostrado, com observações locais do ponto.



**FIGURA 9 – Momento de coleta no ponto P3 da Gruta da Lapinha.**  
Fonte – Foto de Vicente Maus

As amostras foram transportadas sob refrigeração para o Laboratório de Biologia Celular de Microrganismos – ICB/UFMG e processadas em um período máximo de 24h após a coleta. O restante do solo coletado foi enviado para o Laboratório de Análises do Solo da Universidade Federal de Lavras (UFLA) para obtenção dos valores percentuais de nitrogênio, matéria orgânica e fósforo disponível em cada um dos pontos de coleta.

### **IV.3 Isolamento dos fungos cavernícolas**

O isolamento e identificação dos fungos foi realizado no Laboratório de Biologia Celular de Microrganismos– ICB/UFMG. Para o isolamento dos fungos do solo foram pesados 5 g de cada uma das amostras de cada ponto e colocadas em um tubo de polipropileno estéril de 50 ml denominado tubo Mix. Após homogeneização, 1g de material do tubo mix foi submetido à diluição seriada na base 10, em água destilada estéril, em volume final de 10 ml em tubos de polipropileno estéreis de 15 ml. Foram realizadas as seguintes diluições:  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  e  $10^{-4}$ .

Após a realização de uma amostragem piloto optou-se por utilizar as diluições  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$  nas análises em função da quantidade de UFC obtidas em cada uma delas.

Uma alíquota de 0,1 ml das amostras nas diluições de trabalho, indicadas anteriormente, foi plaqueada em duplicata em meio ágar Sabouraud – Sb (peptona 1,0%(p/v), extrato de levedura 0,5%(p/v), glicose 1,0% (p/v) e ágar 2,0%(p/v), adicionado de 0,01% (p/v) de cloranfenicol). As placas foram incubadas em aerobiose por até quinze dias a temperatura de 28°C sem restrição de luminosidade natural. As colônias de fungos filamentosos obtidas nestas condições foram agrupadas de acordo com as seguintes características macromorfológicas: cor da colônia (frente e verso), textura da superfície (frente e

verso) e aspecto da borda. Os diferentes isolados de fungos filamentosos foram quantificados, purificados, codificados sequencialmente e preservados.

Para preservação, 5 discos de 5mm da parte marginal das colônias foram cortadas e armazenadas em frascos de penicilina contendo água destilada estéril de acordo com a técnica proposta por Castellani (CASTELLANI, 1967).

Os isolados obtidos durante o estudo serão depositados ao final deste trabalho na Coleção de Fungos do Laboratório de Ecologia e Biotecnologia de Leveduras do Departamento de Microbiologia (ICB/ UFMG), sob curadoria do Dr. Carlos Augusto Rosa.

#### **IV.4 Identificação molecular de fungos cavernícolas**

A identificação molecular dos isolados foi realizada por meio do sequenciamento da região transcrita interna ITS (ITS1-5.8S-ITS2) do DNA ribossomal.

##### ***IV.4.1 Extração de DNA genômico***

Para a extração de DNA total foram retirados fragmentos das colônias fúngicas crescidos por até 15 dias em ágar Sabouraud. Os fragmentos foram colocados em tubo de polipropileno de 1,5mL e adicionou-se 400 µL de tampão de lise (Tris-HCl 100mM pH 8,0, EDTA – 50mM e SDS 1%). Os tubos foram então incubados a -20°C por aproximadamente 10 minutos. A suspensão foi triturada de 3 a 4 vezes durante 5 min cada (Bullet Blender™ 24, Uniscience, Laboratório de Sistemática e Biomoléculas de Fungos). A fase aquosa foi recuperada, transferida para um novo tubo e adicionada de 357 µL de acetato de amônio (7,0M, pH 7,0).

A suspensão foi então incubada durante 5 minutos a 65°C. Adicionou-se 500 µl de clorofórmio, vortexou-se e as amostras foram centrifugadas durante 2 min a 13.000 rpm a temperatura ambiente em microcentrífuga. O DNA presente no sobrenadante foi precipitado pela adição de 1 ml de isopropanol e incubado durante 5 min à temperatura ambiente, seguida de centrifugação a 13000 rpm durante 5 min a TA. O DNA foi lavado com 1 ml de etanol 70%, centrifugado a 13000 rpm durante 2 min a TA e ressuspenso em 50 µL de TE.

A quantidade e pureza do ácido nucléico obtido foi determinada por leitura espectrofotométrica a 260 e 280 nm (espectrofotômetro ND-1000, NanoDrop, EUA).

#### ***IV.4.2 Amplificação da região ITS***

Os oligonucleotídeos iniciadores ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) e ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) foram utilizados para amplificação da região ITS do rDNA, conforme descrito por White *et. al.* (1990). A PCR foi realizada em um volume final de 50 µL contendo de 1,0 a 5,0 µL de DNA (variando de acordo com a concentração do DNA, sendo o ideal em torno de 150ng), 1,0 µL de cada iniciador ITS1 e ITS4 10 µmol (Invitrogen), 5,0 µL de tampão de PCR 10X (Pht), 1,5µL de MgCl<sub>2</sub> 25mM, 2,0 µL de dNTP mix 3mM, 0,24µL de Taq DNA polimerase (Pht) e o volume final completado com água nuclease-free. As reações de PCR foram realizadas utilizando o termociclador Mastercycler gradient (Eppendorf). O programa consistiu de uma desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguido por 35 ciclos de 1 minuto de desnaturação a 94°C, 1 minuto de anelamento a 55°C e 1 minuto de extensão a 72°C, e uma extensão final por 5 minutos a 72°C. Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose 1,5%, em tampão TBE 0,5X resolvidos a 100 V. Após a resolução eletroforética, os produtos de PCR obtidos foram visualizados sob luz ultravioleta e fotografados pelo sistema de fotodocumentação de gel (MultiDoc-It Digital Imaging System, UVP™).

#### ***IV.4.3 Purificação dos amplicons***

Os amplicons obtidos nas PCRs utilizando oligos iniciadores para a região ITS foram purificados para sequenciamento. Para cada 10  $\mu\text{L}$  de produto de PCR adicionou-se 1  $\mu\text{L}$  de acetato de potássio 3M pH 5.2 e 30  $\mu\text{L}$  de etanol absoluto. Incubou-se a  $-80^\circ\text{C}$  durante 15 minutos. As amostras foram centrifugadas a 13000 rpm durante 15 minutos à temperatura ambiente e o sobrenadante foi descartado. Adicionou-se 30  $\mu\text{L}$  de etanol 70% e as amostras foram centrifugadas a 13000 rpm durante 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet seco a  $50^\circ\text{C}$  durante 5 min. O DNA foi então ressuspensão em 5  $\mu\text{L}$  de água nuclease-free e estocado a  $-20$ .

#### ***IV.4.4 Reações de sequenciamento***

O sequenciamento das amostras foi realizado no Centro de Pesquisas Rene Rachou/FIOCRUZ em colaboração com Dr. Jerônimo Conceição Ruiz. O método de Sanger, procedimento tradicional, foi utilizado para o sequenciamento do produto de PCR das amostras amplificadas. Para tal foi utilizado o sequenciador ABI 3730 DNA Analyzer (Life Technology™) que possui tecnologia baseada no método de sequenciamento de Sanger, realizado através de eletroforese capilar, sendo capaz de gerar sequências de boa qualidade próximas a 1 kb de tamanho.

O produto da PCR já purificado foi submetido a reação de sequenciamento pelo método dideoxy-terminator e o kit BigDye® Terminator v3.1 CycleSequencing foi utilizado nesse procedimento. Para um volume total de 10  $\mu\text{L}$  por amostra, aplicou-se 1  $\mu\text{L}$  do produto da PCR (concentração: 10ng para fragmentos entre 200-500 pares de base, 20ng para os fragmentos entre 500-1000 pb e 30 ng para os fragmentos maiores que 1000 pb), 1  $\mu\text{L}$  de iniciador F ou R (5pmol/ $\mu\text{L}$ ), 1  $\mu\text{L}$  de Big Dye®, 1  $\mu\text{L}$  de tampão de corrida e o volume final completado com água



DNase RNase free Invitrogen®. As amostras em triplicatas foram amplificadas por PCR e o seguinte programa foi utilizado: 96°C por 1 minuto, 96°C por 15 segundos, n°C por 15 segundos (onde n representa a temperatura de anelamento específica de cada primer), 60°C por 4 minutos, 35 ciclos.

Após a reação o DNA foi precipitado em placa MicroAmp com a adição de 1 µL de EDTA 125mM, 1 µL de acetato de amônio 7,5M, 50 mL de etanol 100% (MERCK®) e em seguida selada e homogeneizada em vortex por 30 segundos. Posteriormente as amostras foram incubadas por 15 minutos a T.A., livre de luz, e centrifugadas por 45 minutos a 3700 rpm, T.A. Ao final a placa foi vertida para o descarte do sobrenadante, adicionou-se 100 µL de etanol 70% e a placa foi centrifugada por mais 15 minutos a 3700 rpm, T.A. Novamente descartou-se o sobrenadante e a placa foi centrifugada invertida por 30 segundos (spin). O DNA foi ressuspensionado com formamida HI-DI™ (Applied Biosystems®) e procedeu-se com o sequenciamento.

#### ***IV.4.5 Análise computacional das sequencias.***

A sequências de DNA correspondentes aos genes de interesse foram analisadas utilizando-se o programa BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool – versão 2.2.15 do BLAST 2.0) disponível no portal NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>) desenvolvido pelo National Center For Biothecnology (ALTSCHUL *et al*, 1997). Os isolados com sequência de identidade maior ou igual a 99% foram consideradas a mesma espécie. Para sequencias com 98% de identidade o gênero e espécies foram aceitos sendo utilizado o termo cf (latim – compara-se com) para indicar que o espécime assemelha-se, mas possui características sutis não encontradas na comparação com a espécie-referencia. Já para as sequencias apresentando entre 95 e 97% de identidade, somente o gênero foi considerado (GONÇALVES *et al.*, 2012).

#### **IV.5 Identificação morfológica dos fungos cavernícolas**

De acordo com a necessidade, morfotipos de fungos foram identificados de acordo com suas características macro e micromorfológicas. As observações macroscópicas foram feitas no Laboratório de Biologia Celular de Microrganismos com o registro fotográfico (NIKON™ COOLPIX L820) das colônias (frente e verso) e a observação das seguintes características macromorfológicas: cor da colônia (frente e verso), textura da superfície (frente e verso) e aspecto da borda.

Para a análise microscópica os fungos isolados foram crescidos em meio BDA durante 15 dias de acordo com a técnica de microcultivo proposta por Ridell (1950). Após esse período as lâminas foram montadas com uma gota de azul de algodão/lactofenol e observadas no Laboratório de Micologia em microscópio óptico (NIKON™ ECLIPSE E200) para identificação das estruturas reprodutivas dos fungos com uso de chaves de identificação (BARNETT & HUNTER, 1972, 1986).

#### **IV.6 Análises estatísticas**

Para verificar se as alterações na temperatura, umidade, concentrações de nitrogênio e fósforo foram significativas entre os períodos amostrais foi realizado, primeiramente, um teste de normalidade por meio do programa gratuito BioStat ® 5.3.5 para escolha do teste estatístico compatível. Após essa análise, utilizamos o test t-Student constante no mesmo programa para verificar se essas alterações entre as variáveis analisadas foram significativas ou não.

## V Resultados & discussão

### V.1 Determinação da abundância fúngica em cavidades do PESU

A fim de determinar a abundância fúngica no solo das cavernas amostrados, utilizando a abordagem descrita anteriormente, foi determinado o número de UFCs (unidades formadoras de colônia) obtidos em cada um dos pontos amostrais das cavidades que estão diretamente relacionados ao número de esporos de fungos cultiváveis nas condições descritas neste trabalho (Tabela 2).

**Tabela 2 – Unidades formadoras de colônia (UFCs) obtidas por ponto amostral (P1, P2 e P3) em cada cavidade nas duas coletas.**

	LAPINHA		MACUMBA		TÚNEIS		DOC	
	1a Coleta	2a Coleta	1a Coleta	2a Coleta	1a Coleta	2a Coleta	1a Coleta	2a Coleta
<b>P1</b>	58	44	15	49	54	9	143	84
<b>P2</b>	20	20	4	26	81	17	4	18
<b>P3</b>	9	14	14	35	25	8	32	23

Verificou-se que as UFCs obtidas para a Gruta da Lapinha seguem o padrão proposto pelos estudos de Fernandez-Cortes *et al.*, (2011) e Taylor *et al.*, (2014) que demonstraram decréscimo na deposição de esporos nas cavidades na medida em que regiões mais profundas são acessadas. Esta característica na Gruta da Lapinha deve-se provavelmente a suas características físicas como o grande desenvolvimento, e também à circulação de turistas nos pontos P1 e P2.

Nas Grutas da Macumba e DOC a menor concentração de UFCs foi obtida no ponto P2. No caso da Gruta da Macumba o resultado era esperado pois a cavidade possui duas entradas e o ponto P2 fica situado em região mais interna em relação aos pontos P1 e P3. Na Gruta DOC esperava-se um decréscimo de UFCs dos pontos P1 ao P3, como observado para a Gruta da Lapinha mas os

resultados obtidos demonstram que outros fatores podem estar envolvidos na deposição e presença de esporos nessa cavidade.

No que se refere às UFCs isoladas na Gruta dos Túneis verificou-se maior concentração nos pontos P2 e P3. Tal abundância pode ser explicada devido a existência de uma entrada para a cavidade próxima ao ponto P2, cuja continuação do conduto termina no ponto P3, mais distante da entrada, justificando assim uma diminuição de UFCs entre esses pontos.

Foi realizada análise estatística (teste t-student) para verificar se a diferença no número de UFCs encontradas nos pontos P1, P2 e P3 das grutas foram significativas no que se refere aos valores encontrados na coleta de dados da estação seca (1ª coleta) e chuvosa (2ª coleta). Verificou-se que para as grutas da Macumba e Túneis houve diferença significativa entre os valores de UFCs encontrados durante o período seco e chuvoso ( $p = 0.0127$  e  $0.0457$  respectivamente). A Gruta da Macumba e a Gruta dos Túneis são, do ponto de vista geológico, a mesma cavidade e se comportaram como tal em relação a significativa diferença de UFCs em cada uma das coletas (tabela 2), sendo que na primeira ocorreu um aumento no número de UFCs e na segunda uma diminuição. As grutas da Lapinha e DOC não apresentaram diferenças significativas ( $p = 0.3252$  e  $0.2457$ , respectivamente).

## **V.2 Características físicas e do solo das cavidades analisadas**

Os dados físicos das cavidades foram obtidos semestralmente, em quatro visitas, procurando-se obtê-los no final de cada estação (seca e chuvosa): a primeira no dia 28/05/12, a segunda no dia 08/10/12, a terceira no dia 03/05/13 e a quarta e última no dia 11/10/13. Em cada ponto de coleta foram obtidos dados relativos à umidade relativa do ar, luminosidade e temperatura utilizando-se o termohigroanemoluxímetro ICEL WM-1850, representados na tabela a seguir (tabela 3):

**TABELA 3 – Dados físicos obtidos durante as 4 coletas de dados realizadas nas cavidades do Parque Estadual do Sumidouro**

Gruta da Lapinha												
	Temperatura (C)				Umidade (%)				Lux			
	Coleta 1	Coleta 2	Coleta 3	Coleta 4	Coleta 1	Coleta 2	Coleta 3	Coleta 4	Coleta 1	Coleta 2	Coleta 3	Coleta 4
Ponto 1	24,9 C	22,3 C	22,9 C	29,0 C	69,9%	53,2%	70,6%	42,6%	339	822	684	1956
Ponto 2	23,9 C	22,1 C	22,8 C	25,6 C	72,7%	55,8%	69,4%	51,6%	02	02	0	0
Ponto 3	24,2 C	22,7 C	22,1 C	21,6 C	71,6%	55,6%	70,0%	51,1%	0	0	0	0
Gruta da Macumba												
	Temperatura				Umidade				Lux			
	Coleta 1	Coleta 2	Coleta 3	Coleta 4	Coleta 1	Coleta 2	Coleta 3	Coleta 4	Coleta 1	Coleta 2	Coleta 3	Coleta 4
Ponto 1	25,1 C	22,7 C	23,1 C	22,0 C	70,5%	56,7%	72,8%	57,0%	145	1802	430	511
Ponto 2	25,3 C	22,9 C	22,1 C	22,4 C	69,5%	57,4%	71,3%	57,2%	0	0	0	0
Ponto 3	24,4 C	22,0 C	22,0 C	22,2 C	72,2%	58,3%	71,2%	56,2%	242	322	210	1298
Gruta dos Túneis												
	Temperatura				Umidade				Lux			
	Coleta 1	Coleta 2	Coleta 3	Coleta 4	Coleta 1	Coleta 2	Coleta 3	Coleta 4	Coleta 1	Coleta 2	Coleta 3	Coleta 4
Ponto 1	25,9 C	23,4 C	21,3 C	22,6 C	71,1%	58,9%	72,2%	57,3%	752	680	97	1490
Ponto 2	25,2 C	22,0 C	21,9 C	22,6 C	71,0%	60,6%	71,4%	56,1%	0	0	0	0
Ponto 3	25,5 C	22,4 C	22,1 C	22,7 C	69,8%	60,3%	74,2%	63,4%	0	0	0	0
Gruta DOC												
	Temperatura				Umidade				Lux			
	Coleta 1	Coleta 2	Coleta 3	Coleta 4	Coleta 1	Coleta 2	Coleta 3	Coleta 4	Coleta 1	Coleta 2	Coleta 3	Coleta 4
Ponto 1	22,8 C	24,7 C	20,8 C	23,9 C	77,5%	54,8%	71,1%	50,3%	112	560	8	23
Ponto 2	23,2 C	22,6 C	21,1 C	24,0 C	76,9%	59,4%	70,0%	52,0%	0	0	0	0
Ponto 3	23,7 C	22,7 C	20,5 C	23,5 C	77,1%	62,5%	70,6%	58,2%	0	0	0	0

Para verificar se as alterações na temperatura e umidade foram significativas entre os períodos amostrais, foi realizado um teste de normalidade utilizando-se o programa BioStat ® para seleção do teste estatístico compatível. Constatou-se que os dados possuem distribuição normal e, desta forma, foi escolhido o teste t-Student com nível de significância de 5% (BUSSAB & MORETTIN, 2006) para avaliar relevância estatística dos dados encontrados.

Os dados estatísticos (t-student) da tabela 4 demonstram que no que se refere às temperaturas registradas nos dois períodos distintos (estação seca e chuvosa), somente na Gruta DOC ocorreu diferença significativa ( $p = 0.022498$ ). Diferentemente, a variável umidade apresentou diferença significativa para todas as grutas avaliadas.

**Tabela 4 – Resultado da análise da diferença sazonal da temperatura e umidade nas grutas avaliadas.**

<b>Gruta da Lapinha</b>	
<b>Temperatura</b>	<b>Umidade</b>
p= 0.48998	p= 0.00088812
<b>Gruta da Macumba</b>	
<b>Temperatura</b>	<b>Umidade</b>
p= 0.78012	p= 0.00039
<b>Gruta dos túneis</b>	
<b>Temperatura</b>	<b>Umidade</b>
p= 0.1974	p= 0.0005
<b>Gruta DOC</b>	
<b>Temperatura</b>	<b>Umidade</b>
p= 0.022498	p= 0.03266

De acordo com a literatura clássica sobre o ambiente cavernícola, este possui algumas peculiaridades, tais como a sua alta estabilidade ambiental, ausência permanente de luz natural, umidade elevada que tende a saturação e a temperatura que, principalmente em áreas afastadas de sua entrada, é em geral, constante e semelhante às médias anuais do ambiente externo circundante (POULSON & WHITE, 1969; CULVER, 1982; CULVER & WHITE, 2005). Com

base nos dados obtidos neste trabalho foi possível observar que nas cavidades estudadas podem estar presentes a zona de entrada, influenciada diretamente pelo ambiente epígeo, a zona de penumbra e a zona de transição, totalmente afótica, mas ainda sob alguma influência do meio externo. Em nenhuma delas foi possível observar nos pontos de coleta a presença de uma zona profunda, onde o ambiente é relativamente estável e a evaporação é negligenciável (HOWARTH, 1980) em função da diferença significativa obtida na variável umidade em todas as cavidades.

Com base nos dados físicos a Gruta da Lapinha não apresentou presença de uma região de alta estabilidade ambiental dentre os pontos de coleta. O ponto 1 é uma região de entrada, em contato direto com o ambiente epígeo e portanto sujeito a suas variações. O ponto 2 encontra-se em região mediana da cavidade e frequentemente utilizada por turistas, conta ainda com a presença de uma entrada secundária em sua proximidade e iluminação artificial, sendo portanto influenciado por esses fatores. O ponto 3 poderia representar o local de maior estabilidade da cavidade, já que se encontra em região afótica e profunda, mas também demonstrou variabilidade no que refere principalmente à umidade que mostrou grande oscilação em coletas distintas. A ausência de resultados significativos em relação ao número de UFCs nas duas coletas sugere que a sazonalidade aparentemente não interfere na quantidade de UFCs observadas na cavidade, mesmo ocorrendo diferença significativa em relação a umidade nas duas coletas.

Como observado para a Gruta da Lapinha a Gruta da Macumba também não se enquadra na categoria de uma cavidade clássica em função da ausência de zona afótica. Apesar do Ponto 2 apresentar lux 0, esta região possui zona de penumbra e alta influência do ambiente epígeo. Lux (E) representa a unidade de medida da luminância, que é a quantidade de luz ou fluxo luminoso que atinge uma unidade de área de uma superfície por segundo. Um lux equivale a 1 lúmen por metro quadrado ( $\text{lm}/\text{m}^2$ ). Os pontos 1 e 3 dessa cavidade estão situados em regiões de entrada, e como esperado apresentaram variação de temperatura e umidade nas diferentes épocas do ano avaliadas. O ponto 2 também apresentou oscilações decorrentes das variações no ambiente externo, comprovando a

influência direta deste sobre a cavidade. A presença de resultados significativos em relação a quantidade de UFCs ( $p= 0.00088812$ ), demonstra como esperado que umidade interfere positivamente na quantidade de UFCs observadas na cavidade.

A Gruta dos Túneis é a mais extensa da região, com desenvolvimento total superior a 1.000 metros. Em todos os pontos foi possível observar que ocorre uma variação significativa em função das alterações ambientais do ambiente epígeo, sendo que alterações ambientais obtidas no ponto P1 refletiam-se nos demais pontos de coleta da cavidade. Esperava-se uma maior estabilidade do ponto 3 em função de sua distância com relação à entrada mais próxima mas ele se relacionou positivamente com os outros pontos de coleta. Assim como ocorreu na Gruta da Macumba, a elevada umidade também relacionou-se diretamente à quantidade de UFCs nas duas coletas.

A Gruta DOC é uma cavidade pequena, portanto esperava-se que os resultados obtidos nos pontos 2 e 3 acompanhassem as alterações presentes no ponto 1 apesar da presença de zona afótica nos dois pontos, como observado na tabela 2. Cavernas menores em extensão apresentam oscilações mais evidentes, que são reflexos diretos das variações no ambiente epígeo (POULSON & WHITE, 1969; TRAJANO, 1987) e a gruta DOC seguiu o padrão previsto, alterações significativas tanto da temperatura quanto da umidade em função das modificações ocorridas na ambiente epígeo. Apesar desse resultado não houve alteração significativa em relação a quantidade de UFCs em cada estação, sendo um indício de que a sazonalidade não interfere na dispersão de esporos pela cavidade, podendo esse resultado estar ligado a outros fatores, como por exemplo a presença de macronutrientes.



O solo das cavidades foi coletado e enviado para o Laboratório de Análises do Solo da Universidade Federal de Lavras (UFLA) para medição da concentração de nitrogênio (N) e fósforo (P) que são componentes essenciais para o funcionamento celular adequado. Os componentes celulares que contêm fósforo são compostos de alta energia, tais como ATP e ADP, nucleotídeos como a nicotinamida, NAD e FAD, ácidos nucleicos e fosfolipídeos (ESPÓSITO E AZEVEDO, 2010).

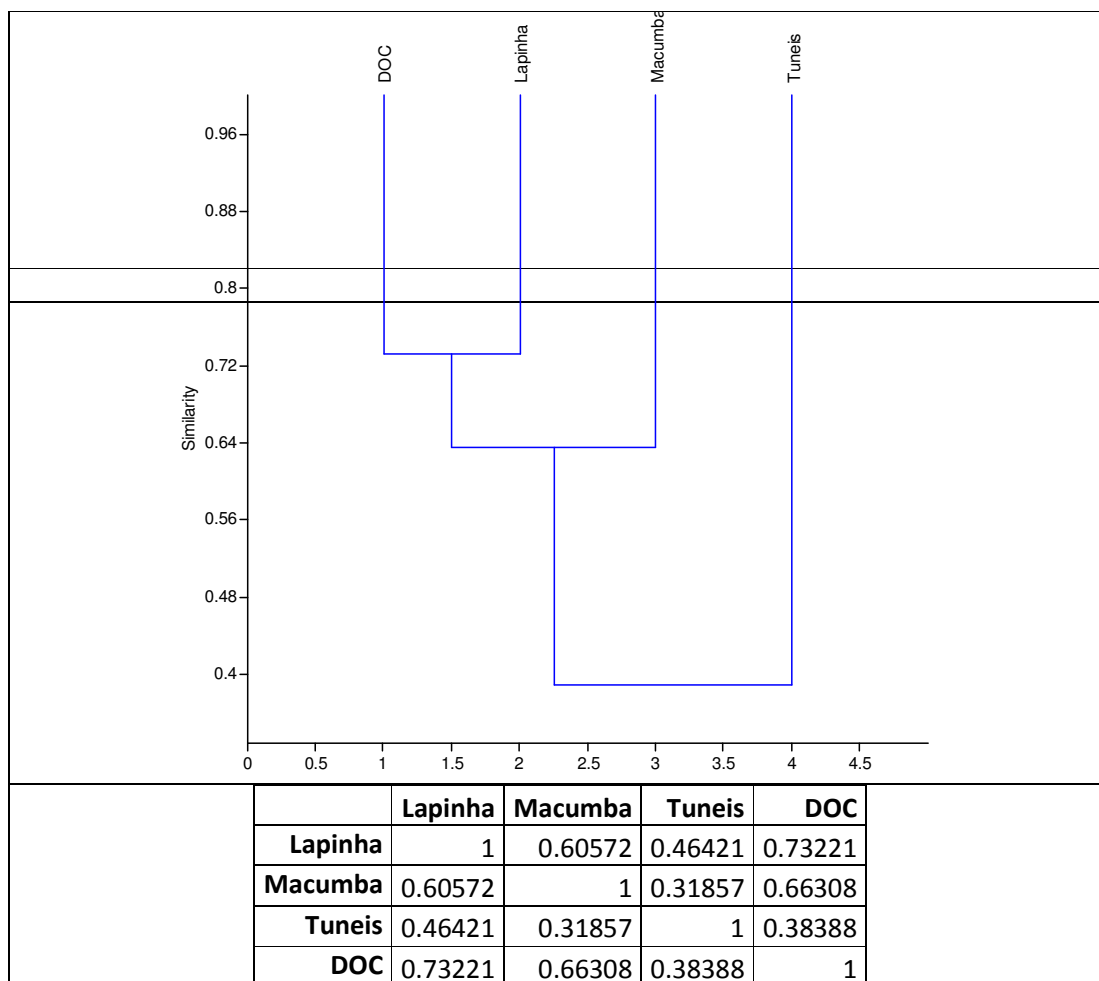
No que se refere aos dados de Fósforo (mg/dm<sup>3</sup>) e Nitrogênio (g/Kg) do substrato de cada ponto amostral, realizamos uma análise de agrupamento (UPGMA) usando o coeficiente de distância de Bray-Curtis (KREBS, 1989) com intuito de verificar a similaridade entre esses substratos, levando em consideração a semelhança quantitativa das variáveis avaliadas (P e N).

Os resultados obtidos podem ser observados na tabela abaixo:

**Tabela 5 – Análise da concentração de Fósforo e Nitrogênio por ponto amostral em cada uma das cavidades analisadas**

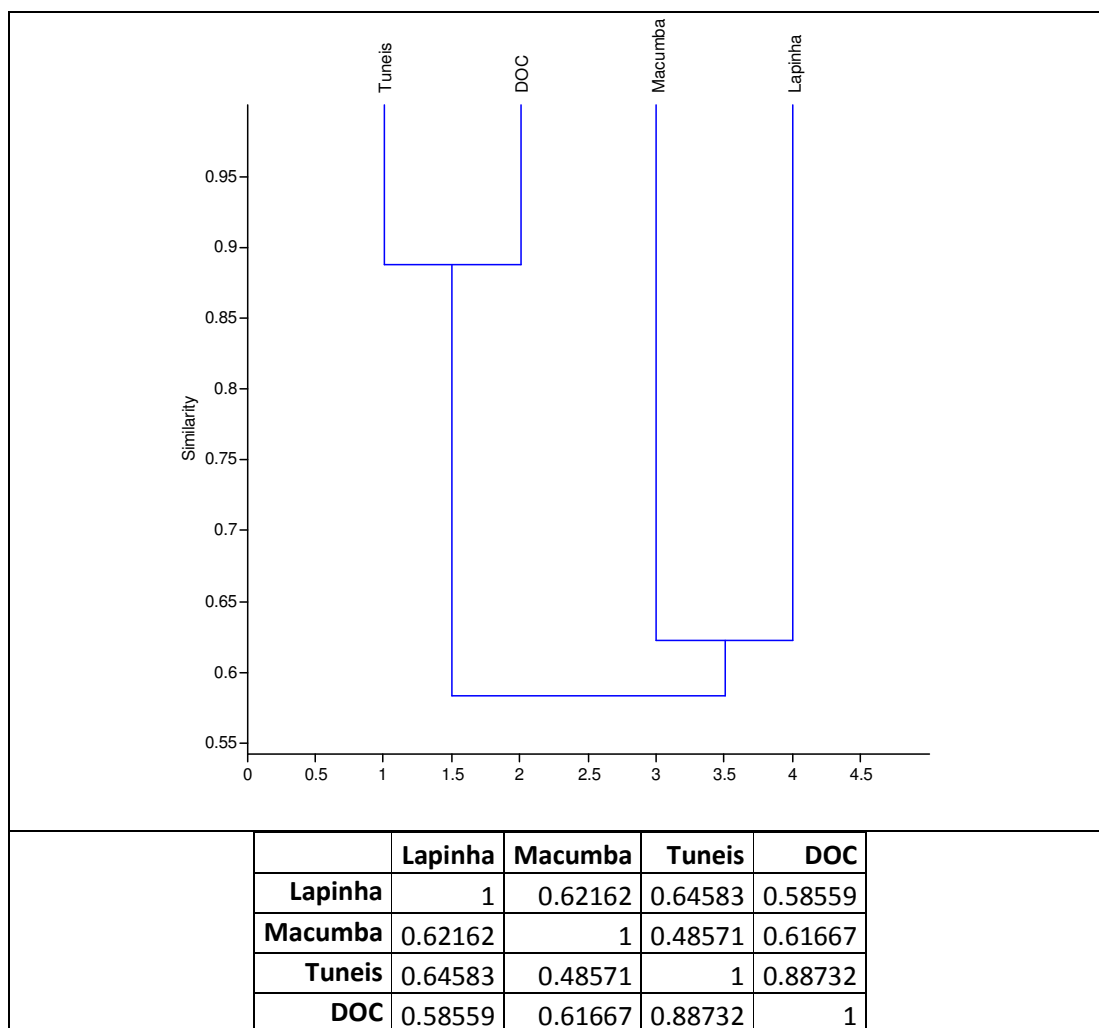
	FÓSFORO mg/dm <sup>3</sup>				NITROGÊNIO g/Kg			
	Lapinha	Macumba	Túneis	DOC	Lapinha	Macumba	Túneis	DOC
<b>P1</b>	57,37	35,03	35,65	109,67	3,7	1,8	9,4	9,3
<b>P2</b>	138,91	44,19	95,46	65,97	1,8	2,9	1,5	3,7
<b>P3</b>	80,24	40,91	502,95	66,57	1	3,6	1,8	2,7

Os dados apresentados na tabela 5 demonstram que as grutas DOC e Lapinha apresentaram maior similaridade na concentração de fósforo e dissimilaridade com a Gruta Túneis. A Gruta da Macumba mostrou maior similaridade com as grutas DOC e Lapinha (FIGURA 10). A maior similaridade entre as cavidades Gruta da Lapinha que é caracterizada como a de maior impacto pelo turismo e Gruta DOC onde não ocorrem visitas, sinaliza que o uso turístico não influencia na concentração deste macroelemento em uma cavidade.



**FIGURA 10 – Análise de agrupamento (UPGMA) usando o coeficiente de distância de Bray-Curtis em relação ao nutriente fósforo (P).**

Nas análises observou-se dois grupos distintos no que se refere à similaridade de concentração de Nitrogênio nas amostras avaliadas (FIGURA 11). A Gruta dos Túneis e DOC foram mais similares (formando um grupo) enquanto as grutas Macumba e Lapinha mostraram mais similares. Esses grupos foram formados devido à grande diferença nas concentrações entre as grutas.



**FIGURA 11 – Análise de agrupamento (UPGMA) usando o coeficiente de distância de Bray-Curtis em relação ao nutriente nitrogênio (N)**

O resultado obtido sugere que o turismo pode influenciar na concentração de nitrogênio no interior das cavidades já que a formação dos dois grupos distintos pode estar relacionada com a intensidade do uso turístico. O primeiro grupo representa as cavidades com menor uso turístico e o segundo as de maior uso, sendo que trabalhos dados obtidos corroboram o estudo de Johnston *et al.*, (2012) que demonstrou, por exemplo, que a urina humana é um importante carreador de nitrogênio para o interior do sistema cavernícola.

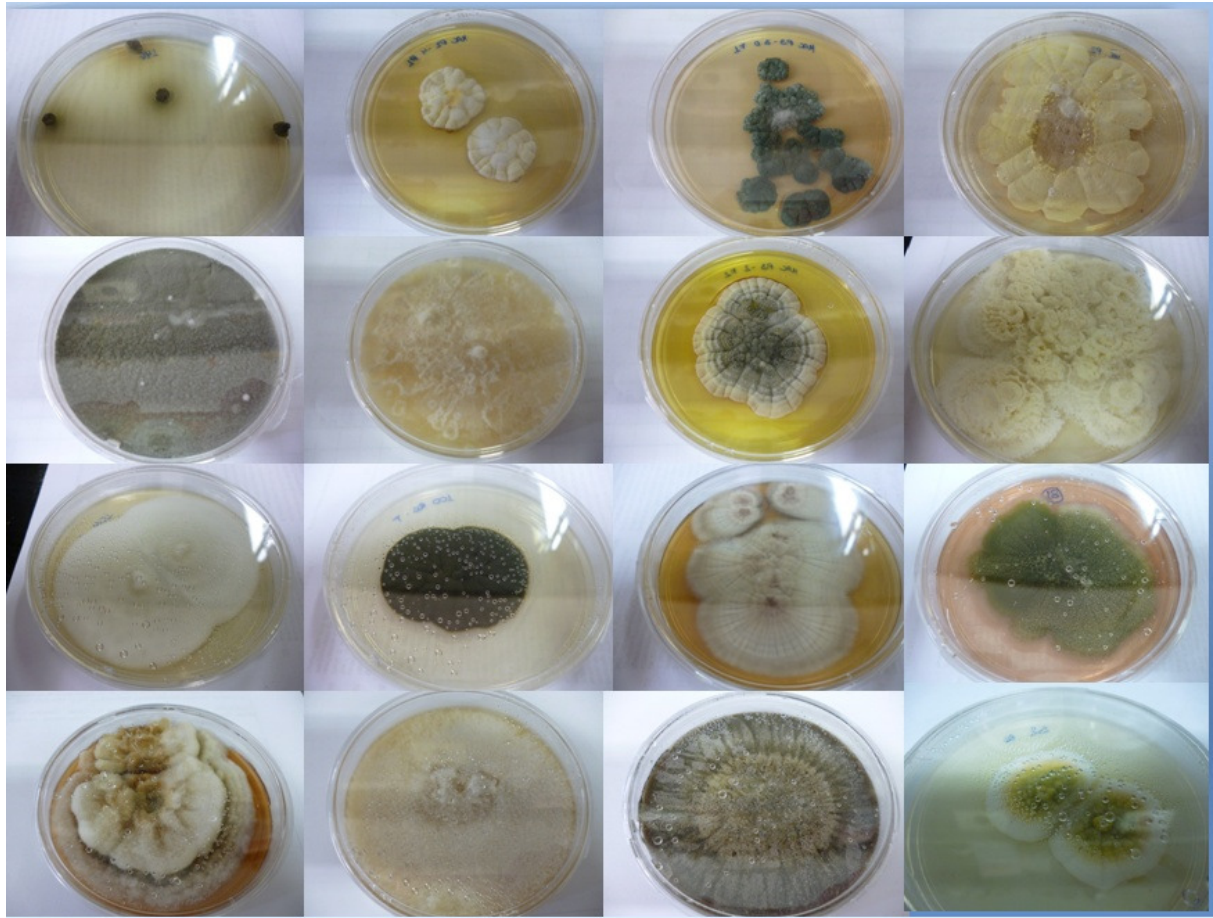
Utilizamos o Coeficiente de Correlação de Pearson para verificar a relação entre as UFCs (por coleta) com os níveis de Fósforo e Nitrogênio das amostras. O

resultado obtido apresentou, na maioria das grutas avaliadas, uma ausência de correlação direta do fósforo e nitrogênio na quantidade de UFCs obtidas entre os pontos das cavidades. Portanto, aparentemente as concentrações obtidas para esses dois elementos não justificam a variação na quantidade de UFCs obtidas por ponto de coleta.

### **V.3 Isolamento e identificação de fungos filamentosos do PESU**

#### ***V.3.1 Isolamento e identificação de fungos filamentosos do PESU após a estação seca (primeira coleta)***

Os fungos filamentosos cultiváveis foram isolados em ágar Sabouraud como descrito anteriormente. Após 15 dias de crescimento à temperatura ambiente, foi observado o crescimento de 459 colônias que foram agrupadas de acordo com suas características macromorfológicas: cor da colônia (frente e verso), textura da superfície (frente e verso) e aspecto da borda em 147 morfotipos (Figura 12), e representaram os fungos cavernícolas da coleta no final da estação seca.



**FIGURA 12 – Exemplos de morfotipos obtidos na primeira coleta das cavidades do PESU**

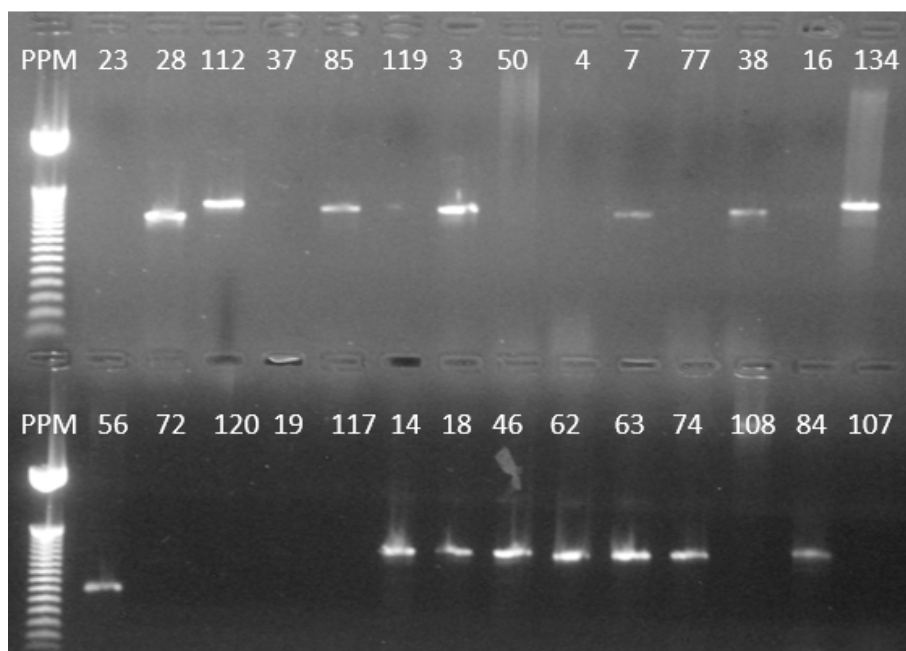
A distribuição dos morfotipos nas cavidades e seus respectivos pontos de coleta estão representados na tabela abaixo (Tabela 6):

**TABELA 6 – Pontos de coleta e número de morfotipos obtidos por cavidade na primeira coleta.** (P1 – Ponto 1 de coleta, P2 – Ponto 2 de coleta, P 3 – Ponto 3 de coleta)

<b>Gruta da Lapinha</b>			
<b>Pontos de coleta</b>	<b>P1</b>	<b>P2</b>	<b>P3</b>
<b>Morfotipos</b>	27	12	11
<b>Gruta da Macumba</b>			
<b>Pontos de coleta</b>	<b>P1</b>	<b>P2</b>	<b>P3</b>
<b>Morfotipos</b>	10	3	10
<b>Gruta dos Túneis</b>			
<b>Pontos de coleta</b>	<b>P1</b>	<b>P2</b>	<b>P3</b>
<b>Morfotipos</b>	16	16	9
<b>Gruta DOC</b>			
<b>Pontos de coleta</b>	<b>P1</b>	<b>P2</b>	<b>P3</b>
<b>Morfotipos</b>	17	4	16

O maior número de morfotipos foi observado na Gruta da Lapinha, seguida pela Gruta dos Túneis, sendo estas duas as maiores cavidades amostradas. A região de entrada da Gruta da Lapinha, considerada a mais antropizada, foi a que apresentou o maior número de morfotipos entre as cavidades estudadas.

Para identificação molecular foi realizada a extração e amplificação da região ITS de todos os 147 morfotipos isolados (Figura 13) para posterior identificação dos fungos por sequenciamento de Sanger.



**FIGURA 13 – Resolução eletroforética dos fragmentos ITS de exemplares de fungos isolados na primeira coleta.** Gel de agarose 1,5% (p/v) em TBE. PPM – Ladder 100 pb (Promega). Os números indicam os isolados fúngicos dos quais foi amplificado a sequência alvo, utilizando os iniciadores ITS1 e ITS4.

Utilizando a metodologia descrita anteriormente foi possível amplificar os fragmentos alvo de 90 fungos filamentosos isolados. Para 30 fungos houve falha do sequenciamento e/ou baixa qualidade das sequências obtidas. A partir de 60 isolados foi possível a identificação de 11 gêneros distintos: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Gliocladiopsis*, *Fusarium*, *Cochliobolus*, *Beauveria*, *Pestalotiopsis*, *Cytospora*, *Cordyceps*, *Curvularia* e *Engyodontium*.

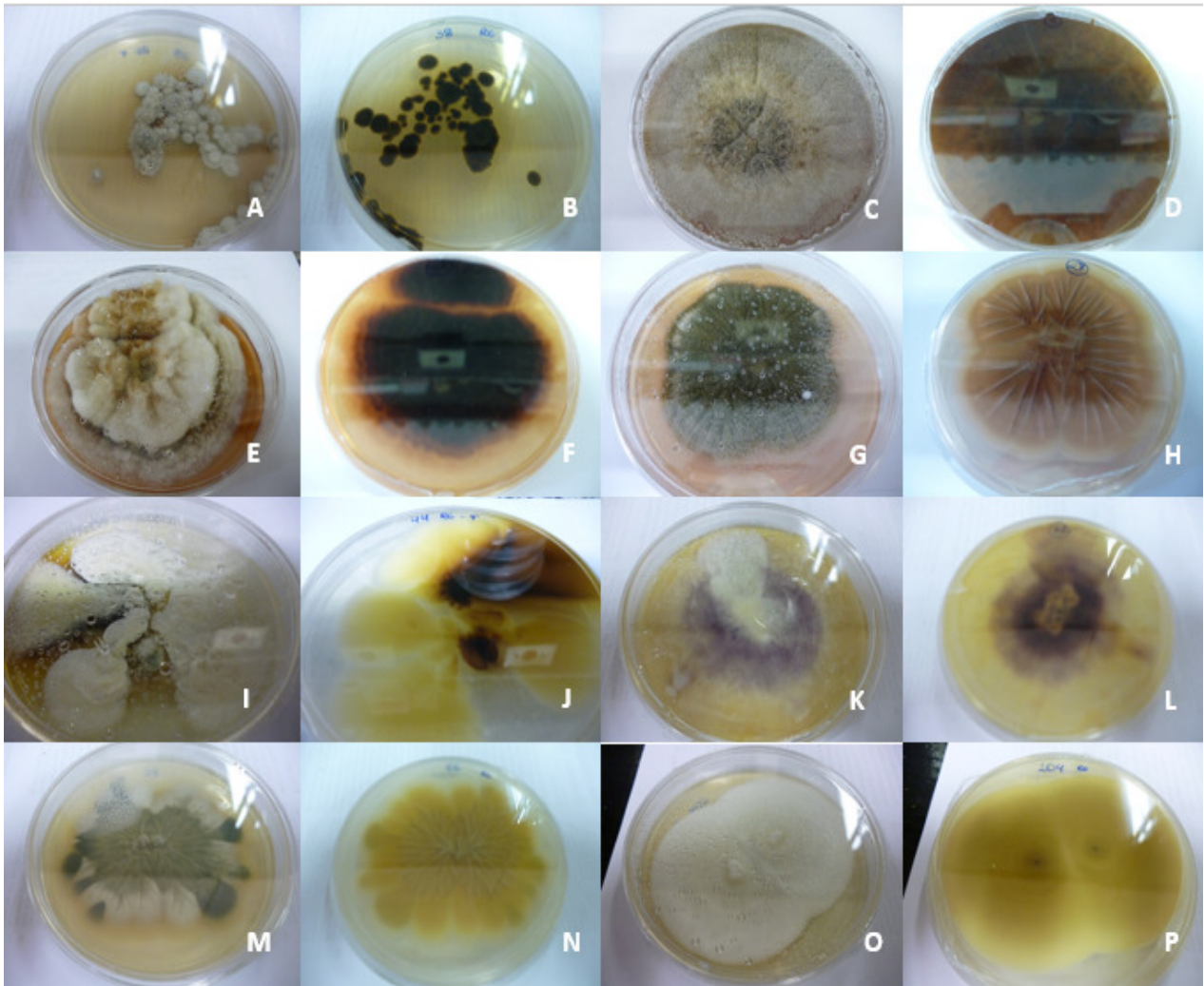
Os fungos que não obtiveram resultado positivo para a amplificação da região ITS foram identificados até o menor nível taxonômico possível com a análise de suas características macro e micro morfológicas (figura 14). Para tanto os fungos foram reativados sendo transferidos fragmentos das culturas para placas de Petri contendo ágar Sabouraud. As placas foram incubadas em aerobiose por até 15 dias a temperatura de 28°C sem restrição de luminosidade

natural. Neste procedimento houve perda de 30,61% dos isolados com a utilização da técnica proposta por Castellani (1967), valor que foi considerado elevado.

Estudos demonstram que culturas de fungos do gênero *Aspergillus* e de interesse médico reativadas após o uso da técnica de Castellani podem ter um percentual de contaminação em torno de 30%. Desse percentual é possível a recuperação dos exemplares após técnicas de purificação feitas por sucessivos repiques, sendo que no final do processo em torno de 1% a 10% das amostras são consideradas inviáveis (RODRIGUES *et al.*, 1992; SOUZA *et al.*, 2010).

A partir dos isolados reativados foi possível a identificação de 16 gêneros diferentes dos obtidos com a identificação molecular: *Auxartron*, *Botrytis*, *Cladosporium*, *Crysosporium*, *Coprinellus*, *Dictyoartririum*, *Galactomyces*, *Menemoniella*, *Mucor*, *Paecilomyces*, *Pyrenochaeta*, *Purpureocillium*, *Scopulariopsis*, *Sphaerosporium*, *Streptomyces* e *Trichoderma*.





**FIGURA 14 – Aspectos morfológicos (frente e verso) de isolados crescidos em ágar Sabouraud identificados no nível de gênero e espécie na primeira coleta realizada nas cavidades do PESU. (A e B) *Penicillium* sp., (C e D) *Beauveria* sp., (E e F) *Gliocladiopsis elghollii*, (G e H) *Aspergillus versicolor*, (I e J) *Cordyceps brongniatii*, (K e L) *Penicillium* sp., (M e N) *Penicillium brasilianum* e (O e P) *Auxarthron pseudoreticulatus*.**

Alguns dos gêneros observados na primeira coleta não foram relatados na literatura relacionada ao ambiente cavernícola disponível, demonstrando a relevância dos dados obtidos (KAJIHIRO, 1965; ZALAR *et al.*, 1999; HSU & AGORAMOORTHY, 2001; MULEC *et al.*, 2002; NIEVES-RIVERA, 2003; PEDRO & BONONI, 2005; MULEC, 2008; BASTIAN *et al.*, 2009; NIEVES-RIVERA *et al.*, 2009; NOVAKOVA, 2009; TAYLOR *et al.*, 2009; BASTIAN, *et al.*, 2010; SHAPIRO & PRINGLE, 2010; JURADO *et al.*, 2010b ; DOCAMPO, 2011; ADETUTU *et al.*, 2011; VAUGHAN, *et al.*, 2011; SAIZ-JIMENES, 2012; MULEC, 2012; KARKUN, *et al.*, 2012; TAYLOR *et al.*, 2013; VANDERWOLF *et al.*, 2013; PAULA, 2014; TAYLOR *et al.*, 2014). Os gêneros *Cochliobolus* e *Cytospora* identificados pela primeira vez no ambiente cavernícola exemplificam a relevância deste trabalho, contribuindo com dados inéditos, bem como demonstram necessidade de maior investimento em análises de biodiversidade da microbiota cavernícola brasileira.

O fungo *Cochliobolus lunatus*, teleomorfo da espécie *Curvularia lunata* além de ser uma espécie ainda não descrita em cavidades naturais, trata-se de um conhecido patógeno de plantas e seres humanos. (RIZNER & WHEELER, 2003). Trata-se de um fungo melanizado e é sabido que a melanina é um importante fator de virulência para fungos patogênicos de plantas e animais (CASADEVALL, *et al.*, 2000; REVANKAR, *et al.*, 2002)

Dentre as espécies identificadas, algumas, como os *Fusarium oxysporum* e *Aspergillus versicolor*, estão relacionadas a infecções oportunistas. Estes gêneros já foram relatados em cavidades naturais distribuídas mundialmente (GUNDE-CIMERMAN, *et al.*, 1998; NIVES-RIVERA, 2003; NIEVES-RIVERA *et al.*, 2010). O genero *Fusarium* possui espécies potencialmente patogênicas e com casos descritos de doenças invasivas (MARTINS-DINIZ *et al.*, 2005). A espécie *Aspergillus versicolor*, comumente identificada em onicomicoses é descrita como pouco comum em estudos ambientais e como contaminante de espécies em laboratório (TORRES-RODRIGUEZ, *et al.*, 1998). No presente trabalho foi possível observar a presença da espécie em cavidades, aumentando portanto sua área de estudo.

No gênero *Aspergillus*, algumas espécies como *Aspergillus fumigatus* e *A. niger* merecem destaque já que são os principais agentes de aspergilose pulmonar (LACAZ *et al.*, 2002; MORAES *et al.*, 2008; KOUSHA *et al.*, 2011; TAYLOR, *et al.*, 2014), o fato é de suma importância já que as cavernas utilizadas no presente estudo possuem vários níveis de visitação e o risco potencial de infecção deve ser levado em consideração. Ainda, espécies do gênero podem estar envolvidas com outros tipos de doenças fúngicas, como por exemplo o eumicetoma causado pela espécie *Aspergillus amstelodami*, com lesões que comprometem quase exclusivamente os pés (MORAES *et al.*, 2008) e cuja prevenção seria o uso de calçados fechados durante a visitação em cavernas que representaria uma determinação importante para a segurança dos turistas. Também o *Aspergillus sclerotiorum* está relacionado a casos de otomicose (HARIMA *et al.*, 2004).

A espécie *Purpureocillium lilacinus*, identificada no presente trabalho, é um organismo sapróbio que pode ser observado em vários ambientes como: solo, no ar em ambientes fechados e infectando insetos, nematódeos e o homem. Uma característica da espécie é sua capacidade de infectar indivíduos imunocomprometidas (LUANGSA-ARD *et al.*, 2011).

Fungos do gênero *Scopulariopsis*, tal como ocorre no gênero *Aspergillus* também estão relacionados a onicomioses e foram observados na gruta DOC. Portanto a presença de pessoas com baixa imunidade em ambientes fechados como cavernas, onde podem ser encontrados esporos desta espécie caracteriza risco.

O gênero *Mucor* também observado nesta análise, também pode ser responsável por otomicoses, afecções frequentes mas pouco registradas na literatura em função de sua benignidade (MORAES *et al.*, 2008).

O gênero *Cladosporium* inclui espécies relacionadas a dermatomicoses, sendo uma delas causadora da Tinea nigra. A Tinea ou “Tinha” caracterizam-se pela presença de manchas negras principalmente na planta dos pés e palma das mãos. No gênero também existem espécies saprófitas relacionadas a cromoblastomicose, doença encontrada em várias partes do mundo, sendo a

maior incidência nos EUA, Canadá, Inglaterra, Austria, França, Venezuela, Japão e África. O gênero também pode ser responsável pela micose cerebral, sendo que lesões cerebrais por fungos pigmentados são consideradas excepcionais. No Brasil existem até hoje apenas dois casos documentados (MORAES *et al.*, 2008).

O gênero *Paecilomyces* está entre os mais recentes fungos relatados como oportunistas em pacientes imunocomprometidos (PASTOR & GUARRO, 2006), sendo que o número de vem crescendo. *P. lilacinus*, *P. varioti*, e *P. marquandii* são as espécies mais encontradas, estando *P. lilacinus* e *P. varioti* associadas com doenças (CHAN-TACK *et al.*, 1999). Walsh *et al.* (2004) afirmam que estes fungos são encontrados no ar e podem ser resistentes às técnicas de esterilização.

Os fungos *Cordyceps brongniartii* e *Beauveria bassiana*, também identificados na presente coleta merecem destaque em função de seu potencial entomopatogênico, sendo o segundo utilizado inclusive como pesticida biológico no controle de pragas da agricultura (SHIMAZU *et al.*, 1988; PEDRO & BONONI, 2005). Em cavernas fungos entomopatogênicos podem contribuir para o controle de invertebrados em seu interior (GUNDE-CIMERMAN, *et al.*, 1998; YODER, *et al.*, 2009).

O gênero *Pestalotiopsis* é um grupo as espécies podem ser saprófitas, patógenos de plantas ou endofíticos (JEEWON *et al.*, 2006). No Brasil o gênero é um dos causadores da podridão branca em florestas de eucaliptos em vários estados (ALONSO *et al.*, 2007). No estado de Pernambuco, mudas de visgueiro, muito utilizado para plantio em áreas degradadas, apresentaram queda de folíolos provocada por espécies do gênero (ROSA & CAVALCANTE, 2005). Existem relatos da produção de metabólitos secundários pelo gênero com aplicabilidades medicinais e biotecnológicas como o taxol, reconhecido pelo combate ao câncer (STROBEL *et al.*, 1998; LI *et al.*, 2005).

A tabela a seguir (tabela 7) representa um panorama geral dos resultados obtidos para a primeira coleta:

**TABELA 7 – Fungos identificados na primeira coleta.**

<b>ID do isolado</b>	<b>Ponto da cavidade</b>	<b>Identificação (Blast)</b>	<b>% ID</b>	<b>E-value</b>	<b>Número BLAST</b>
1	LAP P1	<i>Aspergillus</i> sp.			
3	LAP P1	<i>Penicillium buchwaldii</i>	99	0	KJ775610.1
5	LAP P1	<i>Penicillium parviterrucosum</i>	96	0	KM580054.1
6	LAP P1	<i>Sphaerosporium</i> sp.			
7	LAP P1	<i>Gliocladiopsis elghollii</i>	99	0	JQ666054.1
8	LAP P1	<i>Cytospora</i> sp.	99	1,00E-79	KP050691.1
9	LAP P1	<i>Aspergillus</i> sp.			
11	LAP P1	<i>Penicillium parviterrucosum</i>	96	0	KM580054.1
12	LAP P1	<i>Aspergillus</i> sp.			
13	LAP P1	<i>Dictyoartrinium</i> sp.			
15	LAP P1	<i>Fusarium keratoplasticum</i>	100	0	KC254052.1
16	LAP P1	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	100	0	KC345689.1
17	LAP P1	<i>Curvularia aerea</i>	99	0	KP131930.1
18	LAP P1	<i>Cochliobolus lunatus</i>	100	0	HQ607991.1
20	LAP P1	<i>Penicillium</i> sp.			
21	LAP P1	<i>Gliocladiopsis elghollii</i>	99	0	JQ666054.1
22	LAP P1	<i>Aspergillus versicolor</i>	100	0	KM063209.1
23	LAP P1	<i>Cytospora</i> sp.	100	3,00E-157	KF746102.1
24	LAP P1	<i>Purpureocillium lilacinus</i>			
25	LAP P1	<i>Fusarium keratoplasticum</i>	100	0	KC254052.1
26	LAPP2	<i>Aspergillus</i> sp.			
27	LAP P2	<i>Aspergillus versicolor</i>			
28	LAP P2	<i>Aspergillus</i> sp.			
31	LAP P2	<i>Aspergillus sclerotiorum</i>	100	0	AY373866.1
32	LAP P2	<i>Aspergillus versicolor</i>	100	0	KP131640.1
35	LAP P2	<i>Aspergillus</i> sp.			
37	LAP P3	<i>Engyodontium album</i>	100	0	KM036091.1
38	LAP P3	<i>Penicillium</i>	99	1,00E-	KM580054.1

		<i>parviterrucosum</i>		79	
39	LAP P3	<i>Penicillium concentricum</i>	99	0	EU551180.1
40	LAP P3	<i>Penicillium</i> sp.			
41	LAP P3	<i>Aspergillus</i> sp.			
42	LAP P3	<i>Penicillium</i> sp.	100	4,00E-156	EU142896.1
44	LAP P3	<i>Cordyceps brongniartii</i>	100	0	DQ153039.1
45	LAP P3	<i>Aspergillus</i> sp.			
46	LAP P1	<i>Beauveria bassiana</i>	100	0	KM580046.1
49	LAP P2	<i>Aspergillus sclerotiorum</i>	100	0	AY373866.1
48	LAP P3	<i>Aspergillus versicolor</i>	100	0	KP131640.1
50	DOC P1	<i>Aspergillus versicolor</i>	99	0	KP131640.1
51	DOC P1	<i>Penicillium parviterrucosum</i>	96	0	KM580054.1
52	DOC P1	<i>Penicillium parviterrucosum</i>	96	0	KM580054.1
53	DOC P1	<i>Fusarium keratoplasticum</i>	100	0	KP132215.1
55	DOC P1	<i>Penicillium parviterrucosum</i>	96	0	KM580054.1
56	DOC P2	<i>Galactomyces geotrichum</i>	100	5,00E-146	
57	DOC P2	<i>Penicillium parviterrucosum</i>	96	0	KM580054.1
58	DOC P2	<i>Penicillium</i> sp.	100	0	HQ997376.1
59	DOC P2	<i>Penicillium hirayamae</i>	98	3,00E-70	KM979606.1
60	DOC P1	<i>Penicillium parviterrucosum</i>	96	0	KM580054.1
61	DOC P1	<i>Fusarium oxysporum</i>	100	0	KC428399.1
62	DOC P1	<i>Penicillium</i> sp.	96		
64	DOC P1	<i>Streptomyces</i> sp.			
65	DOC P1	<i>Aspergillus</i> sp.			
66	DOC P1	<i>Fusarium oxysporum</i>	99	0	KC428399.1
68	DOC P3	<i>Fusarium oxysporum</i>	100	4,00E-141	KC870055.1
70	DOC P3	<i>Fusarium oxysporum</i>	100	0	KM817208.1
71	DOC P3	<i>Penicillium</i> sp.		0	
72	DOC P3	<i>Aspergillus</i> sp.			
74	DOC P3	<i>Fusarium oxysporum</i>	99	5,00E-109	KM588224.1
75	DOC P3	<i>Cryosporium</i> sp.			
76	DOC P3	<i>Scopulariopsis</i> sp.			

80	DOC P3	<i>Penicillium</i> sp.			
81	DOC P3	<i>Aspergillus</i> sp.			
83	TU P1	<i>Penicillium virgatum</i>	100	0	KM458824.1
84	TU P1	<i>Trichoderma</i> sp.			
85	TU P1	<i>Aspergillus sclerotiorum</i>	100	0	AY373866.1
86	TU P1	<i>Penicillium brasilianum</i>	99	0	AB455514.2
87	TU P1	<i>Penicillium brasilianum</i>	99	0	AB455514.2
88	TU P2	<i>Penicillium chrysogenum</i>	100	8,00E+8 1	KP280084.1
89	TU P2	<i>Cladosporium</i> sp.			
90	TU P2	<i>Penicillium chrysogenum</i>	100	1,00E- 89	KP280083.1
91	TU P2	<i>Aspergillus</i> sp.			
93	TU P3	<i>Aspergillus versicolor</i>	100	5,00E- 119	KP050684.1
97	TU P1	<i>Aspergillus wentii</i>	99	0,00E+0 0	AY373884.1
98	TU P1	<i>Penicillium</i> sp.			
100	TU P1	<i>Penicillium parviverrucosum</i>	96	0	KM580054.1
102	TU P2	<i>Auxarthron</i> sp.			
103	TU P2	<i>Botrytis</i> sp.			
104	TU P2	<i>Auxarthron</i> sp.			
105	TU P1	<i>Aspergillus</i> sp.			
107	TU P1	<i>Sphaerosporium</i> sp.			
108	TU P1	<i>Trichoderma</i> sp.			
111	TU P2	<i>Aspergillus</i> sp.			
112	TU P2	<i>Mucor</i> sp.			
113	TU P2	<i>Penicillium concentricum</i>	99	0	EU551180.1
114	TU P3	<i>Penicillium paxilli</i>	100	0	JN617709.1
115	TU P3	<i>Beauveria bassiana</i>	100	2,00E- 76	KM580046.1
116	TU P3	<i>Pyrenochaeta</i> sp.			
117	TU P3	<i>Aspergillus</i> sp.			
118	TU P3	<i>Auxarthron ostraviense</i>	100	0	HE974452.1
119	TU P3	<i>Aspergillus</i> sp.			
121	MAC P1	<i>Penicillium chrysogenum</i>	100	0	KP280083.1
122	MAC P1	<i>Penicillium confertum</i>	99	0	KC411684.1
123	MAC P1	<i>Beauveria bassiana</i>	99	3,00E- 142	KM580046.1
124	MAC P1	<i>Menemoniella</i> sp.			

125	MAC P1	<i>Paecilomyces</i> sp.			
126	MAC P1	<i>Purpureocillium</i> sp.			
128	MAC P2	<i>Aspergillus sclerotiorum</i>	100	0	AY373866.1
129	MAC P2	<i>Aspergillus versicolor</i>	100		KP131640.1
130	MAC P1	<i>Penicillium</i> sp.			
134	MAC P1	<i>Aspergillus sclerotiorum</i>	88	0	AY373866.1
137	MAC P3	<i>Aspergillus</i> sp.			
139	DOC P1	<i>Penicillium parviterrucosum</i>	96	0	KM580054.1
140	DOC P1	<i>Penicillium parviterrucosum</i>	98	2,00E-92	KM580054.1
144	TU P2	<i>Coprinellus</i> sp.	96	8,00E-174	AB597782.1
147	TU P2	<i>Penicillium</i> sp.	96	7,00E-103	KM979606.1

### V.3.2 Isolamento e identificação de fungos filamentosos do PESU após a estação chuvosa (segunda coleta)

Como realizado para o isolamento de fungos filamentosos na primeira coleta, após quinze dias de crescimento em ágar Sabouraud, foi observado o desenvolvimento de 347 colônias de fungos filamentosos que foram agrupadas em 163 morfotipos (Figura 18). O número de morfotipos obtidos nesta coleta contrasta com o resultado obtido na primeira coleta, onde foram obtidas 459 colônias, representando assim um decréscimo de 24,4% em relação a coleta anterior. No que se refere ao número de morfotipos obtidos a segunda coleta teve um crescimento de 9,81% quando comparada a segunda coleta. Bernardi *et al.* (2006) demonstra em seu estudo que a maior concentração de fungos anemófilos ocorre no outono e com maiores valores percentuais de umidade, corroborando com os resultados obtidos no presente trabalho.



A distribuição dos morfotipos nas cavidades e seus respectivos pontos de coleta estão representados na tabela abaixo (tabela 8):

**TABELA 8 – Pontos de coleta e respectivo número de morfotipos obtidos por cavidade na segunda coleta.** Entre parênteses os resultados obtidos na primeira coleta.

<b>Gruta da Lapinha</b>			
<b>Pontos de coleta</b>	<b>P1</b>	<b>P2</b>	<b>P3</b>
<b>Morfotipos</b>	23 (27)	6 (12)	5 (11)
<b>Gruta da Macumba</b>			
<b>Pontos de coleta</b>	<b>P1</b>	<b>P2</b>	<b>P3</b>
<b>Morfotipos</b>	22 (10)	11 (3)	17 (10)
<b>Gruta dos Túneis</b>			
<b>Pontos de coleta</b>	<b>P1</b>	<b>P2</b>	<b>P3</b>
<b>Morfotipos</b>	5 (16)	10 (16)	7 (9)
<b>Gruta DOC</b>			
<b>Pontos de coleta</b>	<b>P1</b>	<b>P2</b>	<b>P3</b>
<b>Morfotipos</b>	27 (17)	12 (4)	16 (16)

(P1 – Ponto 1 de coleta, P2 – Ponto 2 de coleta, P 3 – Ponto 3 de coleta)

A presença do maior número de morfotipos no ponto P1 se manteve em quase todas as cavidades. O aporte de fungos por vento e por atividades turísticas é reconhecido na literatura (Barton, 2006). Tal fato, principalmente as correntes de ar podem servir como justificativa para a presença do maior número de morfotipos no ponto 1 da maioria das coletas nas cavidades

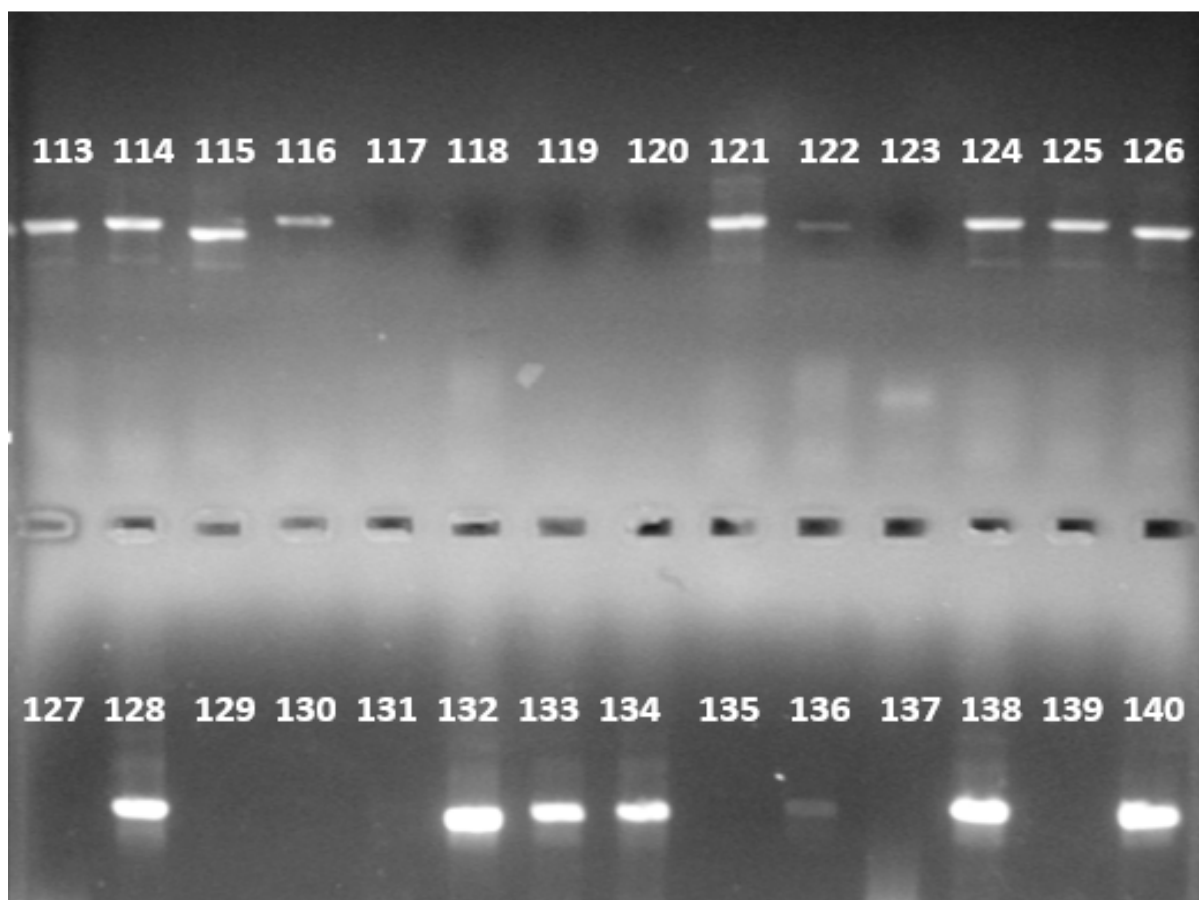
Vale destacar o maior número de morfotipos obtido no ponto P3 da Gruta dos Túneis em relação ao ponto P1. Uma das possíveis explicações para esse fato é a presença esporádica de morcegos próximos a esse ponto que podem carrear esporos para essa região da cavidade.

A Gruta da Lapinha manteve o padrão esperado, com diminuição gradual de morfotipos a medida que se afasta da região de entrada da cavidade. A Gruta

da Macumba também manteve o padrão anterior, com um maior número de isolados nas regiões de entrada e a diminuição no ponto médio nas duas coletas.

Esperava-se o padrão da diminuição de morfotipos do ponto P1 ao P3 para a Gruta DOC em função da presença de apenas uma entrada, mas o padrão de maior diversidade de morfotipos nos pontos P1 e P3 se manteve. A visitação turística não pode aparentemente ser usada como justificativa, já que a cavidade está localizada em uma área do parque restrita ao turismo. Nas duas campanhas não foram observados morcegos, mas existem estudos que apontam o aporte de esporos veiculados por invertebrados, como por exemplo aranhas, o que pode ser uma possível justificativa para a presença de esporos no ponto P3 (YODER *et al.* 2009). Apesar de a cavidade possuir apenas uma entrada, a movimentação do ar pode ocorrer em seu interior como consequência da diferença de densidade entre o ar exterior e o ar subterrâneo, determinado pela temperatura das massas gasosas correspondentes (Lino, 2001), sendo outra possibilidade para a presença de esporos na região final da cavidade.

Como na primeira coleta, foi realizada a extração de DNA e posterior amplificação da região ITS (Figura 15) de todos os 163 morfotipos isolados para posterior identificação dos fungos por meio do sequenciamento dos fragmentos de DNA obtidos.

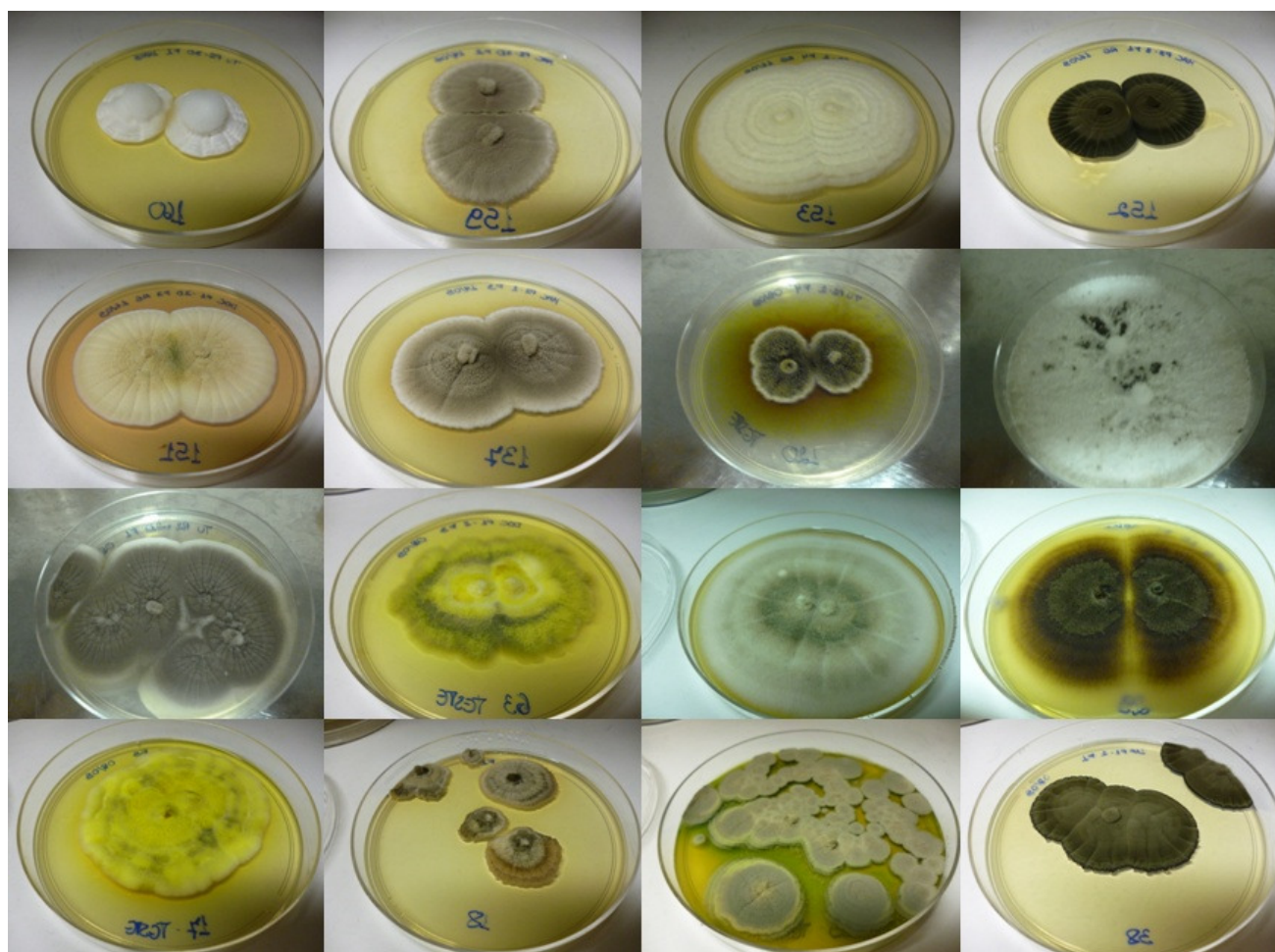


**FIGURA 15 – Resolução eletroforética dos fragmentos ITS de exemplares de fungos isolados na segunda coleta.** Gel de agarose 1,5% (p/v) em TBE. PPM – Ladder 100 pb (Promega). Os números indicam os isolados fúngicos dos quais foi amplificado a sequência alvo, utilizando os iniciadores ITS1 e ITS4.

Utilizando a metodologia descrita foi possível a amplificação do fragmento alvo em 75 isolados. Para 32 fungos houve falha do sequenciamento e/ou baixa qualidade das sequências obtidas. A partir de 43 isolados foi possível a identificação de 13 gêneros distintos: *Aspergillus*, *Ceriporia*, *Cladosporium*, *Eupenicillium*, *Eutypella*, *Mortierella*, *Ninograna*, *Myriodontium*, *Penicillium*, *Phoma*, *Pyrenochaeta*, *Talaromyces* e *Volutella*. Os fungos que não obtiveram resultado positivo para a amplificação da região ITS foram identificados até o menor nível taxonômico possível com a análise de suas características macro e

micro morfológicas, como descrito para a primeira coleta. Para tanto os fungos foram reativados, sendo que houve uma perda de 23,9% dos isolados com a utilização da técnica proposta por Castellani, redução menor que aquela observada para a primeira coleta, mas que também foi considerado elevado.

A partir dos isolados reativados foi possível a identificação de 14 gêneros diferentes dos obtidos com a identificação molecular: *Acremonium*, *Bionectria*, *Botrytis*, *Fusarium*, *Haplosporangium*, *Humicola*, *Metacordyceps*, *Myrothecium*, *Purpureocillium*, *Rhizomucor*, *Sphaerosporium*, *Sporotrix*, *Syncephalastrum* e *Verticicladium*.



**FIGURA 16 – Exemplos de morfotipos obtidos na segunda coleta nas cavidades do PESU**

Dos 27 gêneros identificados na segunda coleta, 19 não foram registrados na primeira, dentre esses, os gêneros *Ceriporia*, *Eutypella*, *Haplosporangium*, *Metacordyceps*, *Myriodontium*, *Ninograna* e *Verticicladium* não foram observados na literatura relacionada ao ambiente cavernícola, ressaltando novamente a relevância deste trabalho e contribuindo com dados inéditos (KAJIHIRO, 1965; ZALAR *et al.*, 1999; HSU & AGORAMOORTHY, 2001; MULEC *et al.*, 2002; NIEVES-RIVERA, 2003; PEDRO & BONONI, 2005; MULEC, 2008; BASTIAN *et al.*, 2009; NIEVES-RIVERA *et al.*, 2009; NOVAKOVA, 2009; TAYLOR *et al.*, 2009; BASTIAN, *et al.*, 2010; SHAPIRO & PRINGLE, 2010; JURADO *et al.*, 2010b ; DOCAMPO, 2011; ADETUTU *et al.*, 2011; VAUGHAN, *et al.*, 2011; SAIZ-JIMENES, 2012; MULEC, 2012; KARKUN, *et al.*, 2012; TAYLOR *et al.*, 2013; VANDERWOLF *et al.*, 2013; PAULA, 2014; TAYLOR *et al.*, 2014).

Dentre os fungos com potencial patogênico para humanos destaca-se o gênero *Sporothrix*, fungo cosmopolita, é responsável por lesões que podem ser gomosas, ulceradas, dermoepidérmicas e, na maioria dos casos, francamente inflamatórias e exudativas (MORAES *et al.*, 2008; SHAKRABARTI *et al.*, 2014). A partir do sequenciamento de genes demonstrou-se que a espécie *S. schenckii* constitui um complexo que é composto das seguintes espécies crípticas: *Sporothrix albicans*, *Sporothrix brasiliensis*, *Sporothrix globosa*, *Sporothrix luriei*, *Sporothrix mexicana* e *S. schenckii* (CRUZ, 2013). O gênero é saprófito, sendo que na quase totalidade dos casos a introdução do microrganismo é feita através de ferimentos produzidos por farpas de madeira, unhas e mordidas de animais (MORAES *et al.*, 2008; RODRIGUES *et al.*, 2014). A exploração ou visitação de cavidades naturais com roupas e EPI's adequados (macacões, botas, luvas, perneiras) pode proteger significativamente o visitante dessa enfermidade.

O gênero *Ceriporia* tem uma ampla distribuição, totalizando 36 espécies registradas em todo o mundo. A identificação das espécies desse gênero é considerada difícil, porque há apenas alguns caracteres taxonômicos estáveis e uma única espécie pode ter várias superfícies em cores distintas (JIA *et al.*, 2013). Existem casos de infecção pulmonar por esse Basidiomiceto, sendo adquirida pela inalação de esporos do ar. Aparentemente a infecção em pacientes saudáveis é

insignificante, mas em pacientes debilitados não pode ser excluída (CHOWDHARY *et al.*, 2013).

O gênero *Myriodontium* já foi relacionada com um caso de sinusite em humanos e também já foi isolado em touros, gatos e mussaranhos. Aparentemente o gênero é bem difundido na natureza, especialmente em locais onde a queratina está presente (MARAN *et al.*, 1985).

Espécies do gênero *Acremonium* normalmente vivem no solo ou plantas em decomposição mas existem relatos de infecção oportunista no homem e animais (MIYAKIS *et al.*, 2006). Nos últimos anos o número e a diversidade de infecções causadas por espécies de *Acremonium* têm aumentado, sendo que pacientes imunossuprimidos e com abuso de drogas intravenosas apresentam amplo espectro clínico. (FINCHER *et al.*, 1990; BRAZ *et al.*, 2009; TUON, *et al.*, 2010).

O genero *Rhizomucor* também possui espécies causadoras de micoses oportunistas. O fungo pode causar infecções fúngicas sistêmicas que são de grande preocupação em imunocomprometidos pois estas infecções são muitas vezes fatais. (LUKACS *et al.*, 2004; HADASCHIK *et al.*, 2012).

Fungos do genero *Syncephalastrum* são encontrados no solo e em restos de plantas em decomposição e são considerados patógenos incomuns ou secundários de unhas, e alguns autores não o incluem definitivamente como causadores de infecção humana (SCHLEBUSCH & LOOKE, 2005; PAVLOVIC & BULAJIC, 2006).

Dentre os patógenos de animais, se enquadra o gênero *Haplosporangium*, responsável pela morte de Toupeiras nos anos de 1947 e 1953 em função de um surto de pneumonia (DOWDING, 1947; MACDIARMIND, 1954). Os gêneros *Metacordyceps* e *Bionectria* que se caracterizam por ser patógenos de invertebrados e fungos respectivamente (SCHOERS, 2001; KEPLER *et al.*, 2012).

Dentre os patógenos de plantas podemos citar os gêneros *Eutypella*, que infecta videiras. O gênero *Phoma* infecta várias partes do cafeeiro e pode causar dano elevado a plantações em condições ambientais propícias. Espécies do gênero *Volutella* infectam plantas do gênero *Pachysandra*, planta ornamental conhecida vulgarmente como diamante, dentre outras. O gênero *Botrytis* é o

responsável pela podridão cinzenta que afeta culturas de várias espécies, dentre elas plantas oleráceas, frutíferas e ornamentais (FEIGE & ALE-AGHA, 2004; SHOCHER *et al.*, 2007; CATAL *et al.*, 2007; NOJOSA *et al.*, 2009; TOFOLI *et al.*, 2011).

Em relação ao potencial biotecnológico, fungos do gênero *Mortierella*, observados nas cavidades DOC e Macumba possuem alta produção de óleos compostos de triacilglicerol com grande quantidade de ácido araquidônico, que são utilizados em dietas com baixa quantidade de gorduras. (WANG *et al.*, 2011). Já fungos do gênero *Humicola* são considerados excelentes modelos para o estudo de enzimas extracelulares (CAMPOS & FELIX, 1995).

A tabela 9 representa um panorama geral dos resultados obtidos para a segunda coleta:

**TABELA 9 – Fungos identificados na segunda coleta.**

<b>ID do isolado</b>	<b>Ponto da cavidade</b>	<b>Identificação</b>	<b>Percentual ID</b>	<b>Número BLAST</b>	<b>Erro</b>
1	TU P3	<i>Penicillium</i> sp.			
2	TU P2	<i>Penicillium</i> sp.			
3	DOC P2	<i>Rhizomucor</i> sp.			
4	MAC P3	<i>Verticicladium</i> sp.			
6	DOC P2	<i>Rhizomucor</i> sp.			
8	MAC P1	<i>Penicillium</i> sp.			
10	MAC P1	<i>Penicillium</i> sp.			
11	TU P2	<i>Aspergillus sclerotiorum</i>	99	AY373866. 1	0
12	TU P2	<i>Aspergillus sclerotiorum</i>	98	AY373866. 1	2,00E- 139
13	MAC P1	<i>Aspergillus ustus</i>	100	AY373873. 1	0
14	MAC P1	<i>Aspergillus</i> sp.			
16	MAC P1	<i>Cladosporium</i> sp.			
17	MAC P3	<i>Mycelia sterila</i>			
20	DOC P3	<i>Purpureocillium</i> sp.			
21	DOC P1	<i>Penicillium</i> sp.			
22	DOC P3	<i>Purpureocillium lilacinus</i>			
23	DOC P3	<i>Mortierella</i> sp.	98	HQ710542.	5,00E-

				1	135
24	MAC P1	<i>Mortierella alpina</i>	99	KJ469841.1	4,00E-171
25	MAC P1	<i>Penicillium</i> sp.			
26	LAP P2	<i>Fusarium</i> sp.			
27	LAP P2	<i>Aspergillus versicolor</i>	98	KP050684.1	1,00E-105
28	LAP P1	<i>Sphaerosporium</i> sp.			
29	LAP P1	<i>Phoma</i> sp.	99	KM454881.1	9
31	LAP P1	<i>Syncephalastrum</i> sp.			
32	MAC P3	<i>Haplosporangium</i> sp.			
34	LAP P1	<i>Penicillium</i> sp.			
36	LAP P1	<i>Phoma macrostoma</i>	100	KF293857.1	0
37	MAC P1	<i>Penicillium</i> sp.			
39	LAP P1	<i>Humicola</i> sp.			
40	MAC P3	<i>Aspergillus fumigatus</i>	100	GU183175.1	0
41	MAC P3	<i>Cladosporium</i> sp.			
42	LAP P1	<i>Cladosporium</i> sp.			
43	LAP P1	<i>Penicillium</i> sp.			
44	LAP P1	<i>Purpureocillium</i> sp.			
45	LAP P1	<i>Penicillium</i> sp.			
47	LAP P3	<i>Botrytis</i> sp.			
48	MAC P3	<i>Penicillium</i> sp.			
49	DOC P3	<i>Bionectria</i> sp.			
50	TU P1	<i>Penicillium</i> sp.			
51	MAC P1	<i>Aspergillus ustus</i>	99	AY373879.1	0
52	LAP P3	<i>Aspergillus ustus</i>	99	AY373879.1	0
53	LAP P3	<i>Syncephalastrum</i> sp.			
54	TU P2	<i>Penicillium</i> sp.			
55	DOC P3	<i>Aspergillus flavipes</i>	99	GU566238.1	0
56	DOC P1	<i>Aspergillus</i> sp.			
57	DOC P2	<i>Penicillium</i> sp.			
58	DOC P2	<i>Aspergillus flavipes</i>	99	KF624764.1	3,00E-178
59	DOC P3	<i>Metacordyceps chlamydosporia</i>			
60	DOC P2	<i>Myriodontium</i> sp.	99	JX243811.1	3,00E-168
61	MAC P3	<i>Aspergillus</i> sp.			



62	DOC P1	<i>Mycelia sterila</i>			
64	DOC P1	<i>Penicillium buchwaldii</i>	99	JX313153.1	0
65	DOC P1	<i>Aspergillus</i> sp.			
67	DOC P1	<i>Penicillium olsonii</i>	100	AY373925.1	0,00E+00
68	DOC P1	<i>Penicillium</i> sp.			
69	DOC P1	<i>Aspergillus versicolor</i>	100	KP050684.1	1,00E-176
70	DOC P1	<i>Penicillium virgatum</i>	96	JF327816.1	9,00E-102
73	MAC P1	<i>Penicillium</i> sp.			
75	MAC P1	<i>Penicillium</i> sp.			
77	DOC P3	<i>Penicillium chermesinum</i>	98	KM405640.1	5,00E-130
78	DOC P3	<i>Purpureocillium</i> sp.			
79	DOC P1	<i>Pyrenochaeta</i> sp.	97	EU750693.1	2,00E-123
80	DOC P1	<i>Penicillium</i> sp.			
81	DOC P1	<i>Penicillium olsonii</i>	100	KM265447.1	0
83	LAP P3	<i>Acremonium</i> sp.			
84	LAP P3	<i>Penicillium</i> sp.	100	KM013699.1	5,00E-140
86	MAC P3	<i>Sporotrix</i> sp.			
87	MAC P3	<i>Penicillium</i> sp.			
88	MAC P1	<i>Myrothecium</i> sp.			
89	LAP P2	<i>Aspergillus</i> sp.			
90	LAP P2	<i>Aspergillus</i> sp.			
91	LAP P2	<i>Aspergillus</i> sp.			
94	DOC P2	<i>Aspergillus</i> sp.			
95	DOC P2	<i>Sporotrix</i> sp.			
97	DOC P2	<i>Purpureocillium</i> sp.			
98	DOC P1	<i>Penicillium</i> sp.			
99	DOC P1	<i>Purpureocillium</i> sp.			
100	DOC P1	<i>Aspergillus versicolor</i>	100	KM396917.1	0
101	DOC P1	<i>Penicillium brevicompactum</i>	99	JX156371.1	0
102	DOC P1	<i>Aspergillus sclerotiorum</i>	99	KC478519.1	0
103	DOC P3	<i>Ceriporia</i> sp.	100	KJ831944.1	0
104	LAP P1	<i>Purpureocillium</i> sp.			
106	MAC P3	<i>Sporotrix</i> sp.			
107	MAC P1	<i>Sphaerosporium</i> sp.			

108	TU P3	<i>Verticicladium</i> sp.			
109	TU P3	<i>Aspergillus</i> sp.			
110	MAC P3	<i>Penicillium</i> sp.			
112	TU P2	<i>Eutypella</i> sp.	98	JN615244.1	2,00E-138
113	TU P2	<i>Aspergillus tenesseensis</i>	100	KJ413375.1	0
114	MAC P1	<i>Talaromyces albobiverticillius</i>	100	KJ775711.1	0
115	MAC P1	Ascomycete			
116	MAC P2	<i>Aspergillus sclerotiorum</i>	100	AY373866.1	0
118	LAP P1	<i>Acremonium</i> sp.			
119	LAP P1	<i>Penicillium</i> sp.			
120	TU P2	<i>Aspergillus</i> sp.			
121	DOC P2	<i>Aspergillus sclerotiorum</i>			
122	DOC P3	<i>Penicillium</i> sp.			
123	DOC P2	<i>Sphaerosporium</i> sp.			
124	TU P3	<i>Aspergillus</i> sp.	98	HQ832844.1	0
125	MAC P2	<i>Aspergillus sclerotiorum</i>			
126	LAP P1	<i>Penicillium neocrassum</i>	99	NR_121321.1	0
127	DOC P1	<i>Penicillium</i> sp.			
128	DOC P1	<i>Penicillium sumatrense</i>			
132	TU P1	<i>Pyrenochaeta</i> sp.	99	EU750693.1	0
133	MAC P1	<i>Volutella</i> sp.	99	EF029211.1	0
134	DOC P3	<i>Penicillium</i> sp.			
136	MAC P1	<i>Penicillium raphiae</i>			
138	MAC P2	<i>Aspergillus versicolor</i>	100	DQ093658.1	0
139	MAC P2	<i>Sporotrix</i> sp.			
140	PAL P1	<i>Ninograna machinnonii</i>	98	KC288117.1	0
142	DOC P3	<i>Eupenicillium cinnamopurpureum</i>	96	AF033414.1	0
149	MAC P3	<i>Cladosporium</i> sp.	100	HQ608074.1	0
150	DOC P1	<i>Penicillium</i> sp.			
151	DOC P1	<i>Aspergillus versicolor</i>	100	KM396917.1	0
152	MAC P3	<i>Cladosporium</i>	100	JQ693401.1	0

<i>cladosporoides</i>					
<b>153</b>	DOC P2	<i>Myriodontium</i> sp.	99	JX243811.1	0
<b>154</b>	DOC P1	<i>Penicillium</i> <i>virgatum</i>	100	KM458824.	0
<b>157</b>	TU P3	<i>Aspergillus carneus</i>	99	KM458808.	0
				1	

## **VI Análise geral do isolamento e identificação de fungos no PESU**

A relação entre os gêneros obtidos distribuídos pelos diferentes pontos amostrais das cavidades nas duas coletas pode ser observada na tabela à seguir:

**TABELA 10 – Resultados de gêneros obtidos por cavidade nas duas coletas. Os gêneros grafados em negrito podem possuir espécies com potencial patogênico.**

Primeira coleta			Segunda Coleta		
<b>Gruta da Lapinha</b>					
<b>Ponto P1</b>	<b>Ponto P2</b>	<b>Ponto P3</b>	<b>Ponto P1</b>	<b>Ponto P2</b>	<b>Ponto P3</b>
<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Acremonium</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Acremonium</i>
<i>Acremonium</i>		<i>Cordyceps</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Fusarium</i>	<i>Aspergillus</i>
<i>Beauveria</i>		<i>Engyodontium</i>	<i>Basipetospora</i>		<i>Botrytis</i>
<i>Cladosporium</i>		<i>Penicillium</i>	<i>Cladosporium</i>		<i>Penicillium</i>
<i>Cochliobolus</i>			<i>Humicola</i>		<i>Syncephalastrum</i>
<i>Curvularia</i>			<i>Ninograna</i>		
<i>Cytospora</i>			<i>Penicillium</i>		
<i>Dictyoartrinium</i>			<i>Phoma</i>		
<i>Fusarium</i>			<i>Purpureocillium</i>		
<i>Gliocladiopsis</i>			<i>Sphaerosporium</i>		
<i>Purpureocillium</i>			<i>Syncephalastrum</i>		
<i>Penicillium</i>					
<i>Pestalotiopsis</i>					
<i>Sphaerosporium</i>					
<b>Gruta da Macumba</b>					
<b>Ponto P1</b>	<b>Ponto P2</b>	<b>Ponto P3</b>	<b>Ponto P1</b>	<b>Ponto P2</b>	<b>Ponto P3</b>
<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus</i>
<i>Beauveria</i>			<i>Cladosporium</i>	<i>Sporotrix</i>	<i>Cladosporium</i>
<i>Menemoniella</i>			<i>Mortierella</i>		<i>Haplosporangium</i>
<i>Paecilomyces</i>			<i>Myrothecium</i>		<i>Penicillium</i>
<i>Penicillium</i>			<i>Penicillium</i>		<i>Sporotrix</i>
<i>Purpureocillium</i>			<i>Sphaerosporium</i>		<i>Syncephalastrum</i>
			<i>Talaromyces</i>		<i>Verticicladium</i>
			<i>Volutella</i>		
<b>Gruta dos Túneis</b>					
<b>Ponto P1</b>	<b>Ponto P2</b>	<b>Ponto P3</b>	<b>Ponto P1</b>	<b>Ponto P2</b>	<b>Ponto P3</b>
<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus</i>
<i>Penicillium</i>	<i>Auxarthron</i>	<i>Auxarthron</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Eutypella</i>	<i>Penicillium</i>
<i>Sphaerosporium</i>	<i>Botrytis</i>	<i>Beauveria</i>	<i>Pyrenochaeta</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Verticicladium</i>
<i>Trichoderma</i>	<i>Cladosporium</i>	<i>Penicillium</i>			
	<i>Coprinellus</i>	<i>Pyrenochaeta</i>			
	<i>Mucor</i>				
	<i>Penicillium</i>				
<b>Gruta DOC</b>					
<b>Ponto P1</b>	<b>Ponto P2</b>	<b>Ponto P3</b>	<b>Ponto P1</b>	<b>Ponto P2</b>	<b>Ponto P3</b>
<i>Aspergillus</i>	<i>Galactomyces</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus</i>
<i>Fusarium</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Cryosporium</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Myriodontium</i>	<i>Bionectria</i>
<i>Penicillium</i>		<i>Fusarium</i>	<i>Pyrenochaeta</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Ceriporia</i>
<i>Streptomyces</i>		<i>Penicillium</i>	<i>Purpureocillium</i>	<i>Purpureocillium</i>	<i>Eupenicillium</i>
		<i>Scopulariopsis</i>		<i>Rhizomucor</i>	<i>Metacordyceps</i>
				<i>Sphaerosporium</i>	<i>Mortierella</i>
				<i>Sporotrix</i>	<i>Penicillium</i>
					<i>Purpureocillium</i>

No total foram identificados 38 gêneros distintos de fungos nas cavidades do Parque Estadual do Sumidouro, sendo que a maior diversidade de gêneros foi observada na Gruta da Lapinha (23 gêneros), seguido pela Gruta DOC (18 gêneros), Gruta da Macumba (16 gêneros) e Gruta dos Túneis (13 gêneros). A composição de comunidades microbianas pode ser significativamente afetada pelas visitas turísticas (NOVAKOVA, 2012), o que poderia explicar a maior diversidade de morfotipos na Gruta da Lapinha. Não é possível afirmar que existam fungos exclusivamente cavernícolas, pois de acordo com os dados obtidos nenhum ponto de coleta é estável em seus aspectos físicos.

Dos 38 gêneros identificados, 24 deles (36,8%) podem conter espécies de fungos patogênicos oportunistas. Nos pontos P1 das cavidades, todos os fungos identificados possuem potencial patogênico, fato que pode ser amenizado em função de que o local é um ambiente aberto, com circulação de ar e maior possibilidade de dispersão dos esporos. Nos demais pontos, os gêneros com potenciais espécies patogênicas também estão presentes, sendo portando importante o uso de medidas preventivas ao se realizar uma visita ao ambiente cavernícola, como por exemplo o fornecimento de máscaras e obrigatoriedade do uso de sapatos fechados pelos visitantes. No que diz respeito aos riscos, não existe uma segurança operacional absoluta em atividades como o ecoturismo, mas é importante que eles sejam mantidos no nível mais baixo possível (LIMA, 2013).

O gênero *Aspergillus* esteve ausente em apenas um dos pontos de coleta avaliados, esse resultado corrobora os dados da literatura que indicam que os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* possuem os esporos mais abundantes e frequentes tanto em ambientes abertos quanto fechados (PORTNOY *et al.*, 2001; DOCAMPO *et al.*, 2010). Fungos do gênero *Aspergillus* são capazes de crescer mesmo sob condições de deficiência nutricional (KORPI *et al.*, 1997) e, devido ao pequeno tamanho de seus esporos, muitos deles podem penetrar os alvéolos pulmonares (REPONEN, 1995; RICHARDSON & WARNOCK, 2003), e esta envolvido em um amplo espectro de doenças respiratórias (LACAZ *et al.*, 2002; MORAES *et al.*, 2008; DOCAMPO *et al.*, 2010; Kousha *et al.*, 2011; TAYLOR *et*

*al.*, 2014). Em indivíduos hígidos a inalação de esporos geralmente não provoca doença (CARREIRA *et al.*, 2011) mas em pessoas asmáticas, com fibrose cística ou imunodeprimidos pode causar doenças pulmonares que vão desde a inflamação local das vias aéreas até infecções graves e com risco de morte, tais como aspergilose broncopulmonar alérgica e aspergilose invasiva (MARTINS *et al.*, 2005; MURRAY *et al.*, 2006; BEISSWENGER *et al.*, 2012). Considerando os fatos acima, as cavidades analisadas e especificamente os pontos de coleta dos quais *Aspergillus* foi isolado representam risco potencial à saúde humana.

O fungo *Histoplasma capsulatum*, causador da histoplasmose, não foi identificado em nenhum dos pontos de coleta desta análise. Cavernas com guano de morcego podem se encontrar extremamente contaminadas (LOTTENBERG *et al.*, 2007; FERREIRA & BORGES, 2009) e em nenhum dos pontos de coleta foi observada a presença de grande mancha de guano. A presença desse microrganismo seria um agravante ao uso das cavidades em função do risco da inalação de seus esporos, levando a uma doença que pode ser fatal. No caso da identificação do fungo em alguma das cavidades seria sugerido o fechamento imediato na mesma em função do risco de inalação de conídios (GURNEY, 1996; CURY *et al.*, 2001; KAUFFMAN, 2007; SHAPIRO, 2010) e monitoramento da dispersão dos esporos pela cavidade. Destaca-se que o *Histoplasma* é um fungo termodimórfico, difícil de ser cultivado *in vitro* (PERROTTA *et al.*, 2001; WOODS, 2002; WOODS *et al.*, 2002; TIAN & SHEARER, 2002) não podendo portanto afirmar que ele não esteja presente em alguma das cavidades.

O valor percentual de gêneros não potencialmente patogênicos a humanos em relação aos potencialmente patogênicos está apresentado na tabela à seguir.

**TABELA 11 – Relação entre gêneros fúngicos com potencial patogênico e não patogênico a humanos obtidos por cavidade.**

CAVIDADE	GÊNEROS POTENCIALMENTE PATOGÊNICOS	GÊNEROS NÃO PATOGÊNICOS	VALOR PERCENTUAL	TOTAL DE GÊNEROS
Gruta da Lapinha	15	8	65/35	23
Gruta DOC	10	8	55/45	18
Gruta da Macumba	9	7	56/44	16
Gruta dos Túneis	6	7	46/54	13

Na coluna Valor Percentual, o primeiro valor representa o total percentual de gêneros potencialmente patogênicos obtidos na cavidade e o segundo representa o percentual de gêneros não patogênicos.

A Gruta da Lapinha possui o maior número de gêneros fúngicos potencialmente patogênicos ou não, sendo que 65% dos fungos podem potencialmente infectar seres humanos.

As Grutas da Macumba e DOC tiveram valores aproximados em relação à presença de fungos com potencial patogênico, sendo que considera-se a Gruta DOC mais propícia a infecções em função de suas pequenas dimensões, aumentando a possibilidade de contato com esporos.

A Gruta dos Túneis possui uma relação inversa pois o percentual de gêneros de fungos não oportunistas é menor do que os patogênicos oportunistas. A cavidade também possui a menor diversidade de gêneros entre as outras cavernas estudadas.

Apesar da maior diversidade de gêneros de patogênicos oportunistas observados na Gruta da Lapinha, não se pode considerar a gruta como potencialmente perigosa a visita pois o ponto P2, local onde os turistas poderiam ter contato com maior quantidade de esporos, possui como possíveis patogênicos apenas dois gêneros (*Aspergillus* e *Fusarium*). Pessoas em bom estado de saúde dificilmente terão problemas ao visitar a cavidade (CARREIRA *et al.*, 2011). Ao contrário, a Gruta DOC pode ser considerada a de maior potencial a



possível infecção, pois possui 55% dos gêneros fúngicos como possíveis patogênicos oportunistas e é uma cavidade de pequenas dimensões, onde o visitante pode ter maior contato com esporos.

## VII Conclusões

- A temperatura e a umidade, demonstrados na literatura como fatores determinantes e diretamente ligados a dispersão de esporos fúngicos, de maneira geral, não apresentaram padrão de influência que possa ser correlacionado ao número UFCs obtidos neste estudo.
- Não foi possível demonstrar correlação entre os componentes presentes no solo, fosforo e nitrogênio, e a quantidade de UFCs obtidas nas cavidades.
- Este trabalho demonstrou pela primeira vez a presença dos gêneros *Cochliobolus*, *Cytospora*, *Ceriporia*, *Eutypella*, *Haplosporangium*, *Metacordyceps*, *Myriodontium*, *Ninograna* e *Verticicladium* no ambiente cavernícola, ressaltando a importância de se estudar detalhadamente este ambiente, para expansão do conhecimento, proteção e aumento de fontes para estudos de bioprospecção.
- De acordo com os resultados obtidos nesse trabalho é possível afirmar que cavidades naturais subterrâneas podem ser, em função da presença de vários grupos de fungos potencialmente patogênicos e oportunistas, locais de risco a visitantes, principalmente para indivíduos imunossuprimidos. Consequentemente, medidas profiláticas deverão ser tomadas para visitação.
- Cavidades utilizadas para fins turísticos devem possuir programas de monitoramento para verificação da dispersão de esporos fúngicos em seu interior.

## Referências Bibliográficas

ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C.W.; BLACKWELL, M. Introductory Mycology. 4th ed. New York, John Wiley & Sons, 869p, 1996.

ALONSO, S. K.; SILVA, A. G.; KASUYA, M. C. M. *et al.* Isolamento e seleção de fungos causadores da podridão-branca da madeira em florestas de *Eucalyptus* spp. com potencial de degradação de cepas e raízes. Revista Árvore, v.31, n.1, p145-155, 2007.

ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHAFFER, A. A.; ZHANG, J. ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Research. v. 25. p3389-3402, 1997.

AULER, A. S.; RUBBIOLI, E.; BRANDI, R. As grandes cavernas do Brasil. Grupo Bambuí de Pesquisas Espeleológicas. 227p, 2001.

ATLAS, R.M.; BARTHA, R. Microbial evolution and biodiversity: the origins of life. In: ATLAS, R.M.; BARTHA, R. (Ed.). Microbial ecology: fundamentals and applications. 4th.ed. Menlo Park: Book News, p37-39, 1997.

BALAJEE, S. A. J.; HOUBRAKEN, P. E.; VERWEIJ, S. B.; HONG, T.; YAGHUCHI, J.; VARGA, and R. A. SAMSON. *Aspergillus* species identification in the clinical setting. Studies Mycol. 59:p39–46, 2007.

BALAJEE, S. A.; KANO, R.; BADDLEY, J. W.; MOSER, S. A.; MARR, K. A.; ALEXANDER, B.D.; ANDES, D.; KONTOYIANNIS, D. P.; PERRONE, G.; PETERSON, S.; BRANDT, M. E.; PAPPAS, P.; G. CHILLER, T. Molecular identification of *Aspergillus* species collected for the transplant-associated infection surveillance network. J. Clin. Microbiol. 47 (10) 3138, 2009.

BARNETT, H. L.; HUNTER, B. B. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. Burgess Publishing Company. 3third Edition, 241p, 1972.

BARNETT, H. L.; HUNTER, B. B. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. Burgess Publishing Company. 4third Edition, 218p, 1986.

BARTON, H. A. Introduction to cave microbiology a review the non – specialist. Journal of Cave and Karst Studies, v. 68, n.2, p43-54, 2006.

BARTON, H. A.; NORTHUP, D. E. Geomicrobiology in cave environments: past, current and future perspectives. Journal of Cave and Karst Studies, v. 69, p163–178, 2007.

BASTIAN, F.; ALABOUVETTE, C.; SAIZ-JIMENES, C. The impact of arthropods on fungal community structure in Lascaux Cave. Journal of Applied Microbiology, v. 106, p1456-1462, 2009.

BASTIAN, F.; JURADO, V.; NOVAKOVA, A.; ALABOUVETTE, C. The microbiology of Lacaux Cave. Microbiology. 156, p644-652, 2010.

BEISSWENGER, C.; HESS, C.; BALS, R. *Aspergillus fumigatus* conidia induce interferon- $\beta$  signalling in respiratory epithelial cells. European Respiratory Journal, v. 39, p411–418, 2012.

BERBERT-BORN, M. Carste de Lagoa Santa - berço da paleontologia e da espeleologia brasileira. In: SCHOBENHAUS, C.; CAMPOS, D. A.; QUEIROZ, E. T.; WINGE, M.; BERBERT-BORN, M. Sítios Geológicos e Paleontológicos do Brasil. Brasília: DNPM/CPRM - Comissão Brasileira de

Sítios Geológicos e Paleobiológicos (SIGEP), v. 1, 430 pp. 2002. Disponível em: <http://sigep.cprm.gov.br/sitio015/sitio015>. Acesso em 17 junho. 2013-06-17.

BERNARDI, E.; NASCIMENTO, J.S. Fungos anemófilos na praia do Laranjal, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil. Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo, v.72, n.1, p93-97, 2006.

BICHUETTE, M. E.; SANTOS, F. H. S. Levantamento e dados ecológicos da fauna de invertebrados da gruta dos Paiva, Iporanga, SP. O Carste, Belo Horizonte, v. 10, n. 1, p14-19, 1998.

BOGGIANI, P. C.; SILVA, O. J. DA; GESICKI, A. L. D.; GALLATI, E. A. B.; SALES L. de O.; LIMA, M. M. E. R. Definição de capacidade de carga turística das cavernas do Monumento Natural Gruta do Lago Azul (Bonito, MS). Geociências, v. 26, n. 4, p333-348, 2007.

BONONI, V.L.R. Zigomicetos, Basidiomicetos e Deuteromicetos: noções básicas de taxonomia e aplicações biotecnológicas. São Paulo: Instituto de Botânica, Secretaria de Estado e Meio Ambiente. 184p, 1998.

BORMAN, A. M.; LINTON, C. J.; MILES, S.; JOHNSON, E. M. Molecular identification of pathogenic fungi. J. Antimicrob. Chemother. 61 (suppl 1): i7-i12, 2008.

BRANDÃO, E. M. Os componentes da comunidade microbiana do solo. In: Cardoso,E.J.B.N., Microbiologia do solo. Campinas, Soc. Brasileira de Ciência do Solo, p1-16, 1992.

BRASIL. Decreto no. 6.640, de 7 de novembro de 2008. Dá nova redação aos arts. 1, 2, 3, 4 e 5 e acrescenta os arts. 5-A e 5-B ao Decreto n. 99.556, de 1 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, 2008.

BRAZ, S. C. M. *et al.* Viabilidade, confirmação taxonômica e detecção enzimática de espécies de *Acremonium* preservadas sob óleo mineral na Coleção de Culturas University Recife Mycology. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., Uberaba, v. 42, n. 1, 2009.

BUCKLAY, M. The fungal kingdom: diverse and essential roles in Earth ecosystem. American Academy of Microbiology, 2008.

BURFORD, E.; KIERANS, M.; GADD, G. M. Geomycology: fungi in mineral substrata. Mycologist. 17: p98-107, 2003.

BUSSAB, W. O.; MORETTIN, P. A. Estatística Básica. 5ª edição, Saraiva, p. 364-365, 2006.

CAMPOS, L.; FELIX, C. L. Purification and Characterization of a Glucoamylase from *Humicola grisea*. Applied and environmental microbiology. 2436–2438, 1995.

CANNAVAN, F. S. Diversidade das comunidades bacterianas em solos de Terra Preta Antropogênica da Amazônia Central e Oriental. 115 p. Dissertação. (Mestrado em Ecologia Aplicada). Universidade de São Paulo. Piracicaba, 2007.

CANO, M.; HAJJEH, R. A. The epidemiology of histoplasmosis: a review. Semin. Respir. Infect. 16:p109-118, 2001.

CARDOSO, E. J. B. N. Microbiologia do solo. Campinas, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo. 60p, 1992.

CARREIRA, S.; LOPES, A.; BASTO, R. P.; FARIA, I.; DA MATA, J. P. Aspergilose pulmonar necrotizante: a propósito de dois casos clínicos. Rev Port Pneumol. 17(2), p80-84, 2011.

- CASTELLANI, A. Maintenance and cultivation of common pathogenic fungi in distilled water. *The Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 42, p181-184, 1967.
- CASADEVALL, A.; ROSAS, A. L.; NOSANCHUK, J. D. Melanin and virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Curr. Opin. Microbiol.* 3: p354–358, 2000.
- CHAIMOWICZ, F. Levantamento bioespeleológico em algumas grutas de Minas Gerais. *Espeleo-Tema*, São Paulo, v. 14, n. 1, p97-107, 1984.
- CHAIMOWICZ, F. Observações preliminares sobre o ecossistema da gruta Olhos d'Água, Itacarambi, MG. *Espeleo-Tema*, São Paulo, v. 15, n. 1, p65-77, 1986.
- CHAKRABARTI, A.; BONIFAZ, A.; GUTIERREZ-GALHARDO, M. A.; MOCHIZUKI, T.; LI, S. Global epidemiology of sporotrichosis. *Medical Mycology*, 00, p1–12, 2014.
- CHAN-TACK, K.M. *et al.* *Paecilomyces lilacinus* fungemia in an adult bone marrow transplant recipient. *Medical Mycology*, New York, V., n. 1, p57-60, 1999.
- CHOWDHARY, A; AGARWAL, K; KATHURIA, S; SINGH, P. K; ROY, P; GAUR, S. N; HOOG, G. S; MEISD, J. F. Clinical Significance of Filamentous Basidiomycetes Illustrated by Isolates of the Novel Opportunist *Ceriporia lacerata* from the Human Respiratory Tract. *Journal of Clinical Microbiology*. V. 51 (2), p585–590, 2013.
- CHRZAVZEZ, E. Detection de champignons contaminants de *Pyrenophora teres* populations determined with RAPD produits a` base de fruits: e`tude du polymorphisme et de`termi- markers. *Can. J. Botany* 72, p915–923, 1995.
- CATAL, M; JORDAN, S. A; BUTTERWORTH, S. C; SCHILDER, A. M. C. Detection of *Eutypa lata* and *Eutypella vitis* in Grapevine by Nested Multiplex Polymerase Chain Reaction. *The American Phytopathological Society*. V. 97, No. 6, p737, 2007.
- CHOQUER, M. FOURNIER, E. KUNZ, C. LEVIS, C. PRADIER, J. M; SIMON, A; VIAUD, M. *Botrytis cinerea* virulence factors: new insights into a necrotrophic and polyphageous pathogen. *FEMS Microbiol Lett.* 277: p1-10. Review, 2007.
- CORDEIRO, L. M. Fauna cavernícola da Serra da Bodoquena: revisão bibliográfica e um estudo de ecologia de comunidades. 118 p. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Conservação) - Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2008.
- CORREA, M. P. S. Criptococose em crianças no estado do Paraná, Brasil. *Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. Uberaba. 32 (5): p505-508, 1999.
- COSTA, F. L. B.; SABINO, C. V. S.; MATOS, S. A. Levantamento do conhecimento prévio sobre cavernas em duas escolas particulares de Belo Horizonte, Minas Gerais. In: *Anais. XXIX Congresso Brasileiro de Espeleologia*, 1997.
- CRUZ, L. C. H. Complexo *Sporothrix schenckii*. Revisão de parte da literatura e considerações sobre o diagnóstico e a epidemiologia. *Vet. e Zootec.* 20, p08-28, 2013.
- CULVER, D. C. *Cave life: evolution and ecology*. London: Harvard University, 189 p. 1982.
- CULVER, D. C.; WHITE, W. B. *Encyclopaedia of caves*. Elsevier Academic Press, Burlington, California, USA, London, UK, 654p, 2005.

CULVER, D.C.; PIPAN, T. The biology of caves and other subterranean habitats. Library of congress 412 cataloging in publication data. Oxford University Press, Oxford, 2009.

CURY, G. C.; FILHO, A. D.; COSTA E CRUZ, A. G.; HOBAIKA, A. B. S.; Surto de Histoplasmose em Pedro Leopoldo, Minas Gerais, Brasil. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 34 (5), p483-486, 2001.

DESSEN, E. M. B.; ESTON, V. R.; SILVA, M. S.; TEMPERINI-BECK, M. T.; TRAJANO, E. Levantamento preliminar da fauna de cavernas de algumas regiões do Brasil. Ciência e Cultura, Campinas, v. 32, n. 6, p714-725, 1980.

DOCAMPO, S.; TRIGO, M. M.; RECIO, M.; MELGAR, M.; GARCÍA-SÁNCHEZ, J.; CALDENON-EZQUERRO, M. C.; CABEZUDO, B. High incidence of *Aspergillus* and *Penicillium* spores in the atmosphere of the cave of Nerja (Malaga, southern Spain). Aerobiologia. 26, p89-98, 2010.

DOCAMPO, S.; TRIGO, M. M.; RECIO, M.; MELGAR, M.; GARCÍA-SÁNCHEZ, J.; CABEZUDO, B. Fungal spore content of the atmosphere of the Cave of Nerja (southern Spain): Diversity and origin. Science of the Total Environment. 409, p835-843, 2011.

DOWDING, E. S. The pulmonary fungus, *Haplosporangium parvum*, and its relationship with some humans pathogens. *Canadian Journal of Research*. 25 (5), p195-206, 1947.

ENGEL, A. S. Observations on the biodiversity of sulfidic karst habitats. *Journal of Cave and Karst Studies*, v.69, p187-206, 2007.

EPA. A lexicon of cave and Karst terminology with special reference to environmental Karst hydrology. Washington, DC U.S. Environmental Protection Agency EPA, 2002. Disponível em <http://cfpub.epa.gov/nceacfmrecordisplay.cfm?deid=54964>.

ESPÓSITO, E.; AZEVEDO, J. L. FUNGOS: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia. 2ª ed. Ed. Educ. 638 p, 2010.

EVANGELISTA-PINTO, V.K.; TRAVASSOS, L.E.P. Inventariação, caracterização e proposta de valorização do patrimônio geomorfológico do Parque Estadual do Sumidouro, Minas Gerais. In: RASTEIRO, M.A.; DUARTE, L.M. (orgs.) CONGRESSO BRASILEIRO DE ESPELEOLOGIA, 32, 2013. Barreiras. Anais... Campinas: SBE, 2013. p.23-30. Disponível em: <[http://www.cavernas.org.br/anais32cbe/32cbe\\_023-030.pdf](http://www.cavernas.org.br/anais32cbe/32cbe_023-030.pdf)>. Acesso em: 03/01/15.

FEIGE, G. B.; ALE-AGHA, N. Mycodiversity on a dead stem of the giant hogweed--*Heracleum mantegazzianum* Sommer et Levier. *Commun Agric Appl Biol Sci*. 69(4), p479-87, 2004.

FERNANDEZ-CORTÉS, A.; CUEZVA, S.; SANCHEZ-MORAL, S.; CAÑAVÉRAS, J. C.; PORCA, E.; JURADO, V.; MARTIN-SANCHEZ, P. M.; SAIZ-JIMENEZ, C. Detection of human-induced environmental disturbances in a show cave. *Environmental Science and Pollution Research*. V. 18, p1037-1045. 2011.

FERREIRA, M.S.; BORGES, A.S. Histoplasmosis. *Rev Soc Bras Med Trop*. 42(2), p192-198, 2009.

FERREIRA, R. L.; POMPEU, P. S. Riqueza e diversidade da fauna associada a depósitos de guano na gruta Taboa, Sete Lagoas, Minas Gerais, Brasil. *O Carste*, Belo Horizonte, v. 9, n. 2, p30-33, 1997.

FERREIRA, R. L.; MARTINS, R. P. Diversity and distribution of spiders associated with bat guano piles in Morrinho cave (Bahia State, Brazil). *Diversity and Distributions*. 4, p235-241, 1998.

FERREIRA, R. L. *et al.* Riqueza e abundância de fungos associados a guano de morcegos na gruta da Lavoura. *O Carste*, v. 12, n. 1, p46-51, 2000.

FERREIRA, R. L.; HORTA, L. C. S. Natural and human impacts on invertebrate communities in Brazilian caves. *Revista Brasileira de Biologia*, São Carlos, v. 61, n. 1, p7-17, 2001.

FERREIRA, R. L. Subsídios para o estabelecimento do manejo bioespeleológico e paleontológico em algumas cavernas do Parque Nacional Cavernas do Peruaçu. Belo Horizonte: Parque Nacional Cavernas do Peruaçu, 140p, 2003.

FERREIRA, R. L. A medida da complexidade ecológica e suas aplicações na conservação e manejo de ecossistemas subterrâneos. Tese (Doutorado em Ecologia, Conservação e Manejo de Vida Silvestre) Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 161p, 2004.

FERREIRA, R. L. Caracterização de ecossistemas subterrâneos do complexo Mina do Pico (Itabirito, MG): estudo bioespeleológico das cavidades visando o licenciamento necessário ao aproveitamento do minério de ferro. Belo Horizonte: Minerações Brasileiras Reunidas, 31p, 2005a.

FERREIRA, R. L. A vida subterrânea nos campos ferruginosos. *O Carste*, Belo Horizonte, v. 17, n. 3, p106-115, 2005b.

FERREIRA, R. L.; NONAKA, E.; ROSA, C. Riqueza e abundância de fungos associados a guano de morcegos na gruta da Lavoura. *O Carste*, v. 12, n.1, p46-51, 2000.

FINCHER, R. M.; FISCHER, J. F.; LOVELL, R. D.; NEWMAN, C. L.; ESPINEL-INGROFF, A.; SHADOMY, H. J. Infection due to the fungus *Acremonium* (cephalosporium). *Medicine* 70 (6), p398-409, 1991.

FORD, D.; WILLIAMS, P. *Karst geomorphology and hydrology*. London: Unwin Hyman, 1989.

FORD, D. C.; WILLIAMS, P. W. *Karst hydrogeology and geomorphology*. London: J. Wiley, 601 p, 2007.

FORZZA, R.C. *et al.* Introdução. Lista de Espécies da Flora do Brasil. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2010.

FRICK, W. F.; POLLOCK, J. B.; HICKS, A. C.; LANGWIG, K. E.; REYNOLDS, D. S.; TURNER, G. G.; BUTCHKOSKI, C. M.; KUNZ, T. H. An Emerging Disease Causes Regional Population Collapse of a Common North American Bat Species. *Science*, 329. p679-682, 2010.

GALDENZI, S.; COCCHIONI, L.; MORICHETTI, V.; AMICI, V.; SCURI, S. Sulfidic ground-water chemistry in the Frasassi Caves. *Journal of Cave and Karst Studies*, v.70., n.2., p94-107, 2008.

GARDES, M.; BRUNS, T. D. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology*, Oxford, v. 2, p.113-118, 1993.

GARGAS, A.; TREST, M. T.; CHRISTENSEN, M.; VOLK, T. J.; BLEHERT, D. S. *Geomyces destructans* sp. nov. associated with bat white-nose syndrome. *Mycotaxon*, 108, p147-154, 2009.

GARRETT, S.D. *Soil fungi and soil fertility*. Pergamon Press, Elmsford, New York, 165p, 1963.

GASTELOIS, B. R. J.; GASTELOIS, I. L.; DUARTE, J. C. Relatório Final: Memorial descritivo da área, cadastro de proprietários e propriedades, anexo fotográfico e descrição das atividades relativas ao Parque Estadual do Sumidouro (Meta A6) projeto "Proteção e conservação dos recursos naturais na RMBH no estado de Minas Gerais". Secretaria de Estado de Meio Ambiente e Desenvolvimento

Sustentável de Minas Gerais – SEMAD Programa Nacional do Meio Ambiente – PNMA II Unidade de Coordenação Estadual – UCE/MG, 2003.

GIBERT, J.; DANIELPOL, D. L.; STANFORD, J. A. Groundwater ecology. New York: Academic, 571p, 1994.

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. 61 (4), 1323, 1995.

GILLER, K. E.; BEARE, M. H.; LAVELLE, P.; IZAC, A. M. N.; SWIFT, M. G. Agricultural intensification, soil biodiversity and agroecosystem function. Applied Soil Ecology, V.6, p3-22, 2005.

GLIESSMAN, S. R. Agroecologia: processos ecológicos em agricultura sustentável. Porto Alegre: Ed. Universidade, 653p, 2000.

GNASPINI, P.; TRAJANO, E. Brazilian cave invertebrates, with a checklist of troglomorphic taxa. Revista Brasileira de Entomologia, Curitiba, v. 38, n. 3/4, p549-584, 1994.

GODOY, N. M. Nota sobre a fauna cavernícola de Bonito, MS. Espeleo-Tema, São Paulo, v. 15, n. 1, p79-91, 1986.

GONÇALVES, V. N.; VAZ, A. B. M.; ROSA, C. A.; ROSA, L. H. Diversity and distribution of fungal communities in lakes of Antarctica. FEMS Microbiol. Ecol. p1-12, 2012.

GRIFFIN, D.H. Fungal physiology. 2.ed., Wiley Liss, New York. 427p, 1994.

GUNDE-CIMERMAN, N.; ZALAR, P.; JERAM, S. Mycoflora of cave cricket *Troglophilus neglectus* cadavers. Mycopathologia. v. 141, p111-114, 1998.

GUNN, J. Encyclopaedia of Cave and Karst Science. 2<sup>nd</sup> ed. Fitzroy Dearborn, Chicago and London, 902p, 2004.

GURNEY, J. W.; CONCES, D. J. Pulmonary histoplasmosis. Radiology. 199 (2), p297-306, 1996.

HADASCHIK, E; KOSCHNY, R; WILLINGER, B; HALLSCHEIDT, P; ENK, A; HARTSCHUH, W. Pulmonary, rhino-orbital and cutaneous mucormycosis caused by *Rhizomucor pusillus* in an immunocompromised patient. Clin Exp Dermatol. 37(4), p355-357, 2012.

HAGESKAL, G.; LIMA, N.; SKAAR I. The study of fungi in drinking water. Mycological Research, v. 113, p165–172, 2009.

HARDT, R.; PINTO, S. A. F. Carste em litologias não carbonáticas. Revista Brasileira de Geomorfologia - v. 10, nº 2, 2009.

HARIMA, N.; INOUE, T.; KUBOTA, T.; OKADA, O.; ANSAI, S.; MANABE, M.; ICHINOE, M.; KASAI, T. A Case of Otomycosis Caused by *Aspergillus sclerotiorum*. The Journal of Dermatology. 31 (11), p949–950, 2004.

HAWKSWORTH, D. L. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. Mycological Research, n. 105, p1422-1434, 2001a.

HAWKSWORTH, D. L. Mushrooms: the extent of the unexplored potential. Int. J. Med. Mushrooms n. 3, p333–337, 2001b.



- HIBBETT, D. S.; TAYLOR, J. W. Fungal systematic: is a new age of enlightenment at hand Nature Reviews – Microbiology. Vol. 11, February, P 129-133.2013.
- HOLSINGER, R.; CULVER, D. C. The invertebrate cave fauna of Virginia and a part of eastern Tennessee: Zoogeography and ecology. *Brimleyana*, 14. 1-162, 1988.
- HSU, M. J.; AGORAMOORTHY, G. Occurrence and diversity of thermophilus soil microfungi in forest and cave ecosystem of Taiwan. *Fungal Diversity*. p27-33, 2001.
- HOWARTH, F. G. The zoogeography of specialized cave animals: a bioclimatic model. *Evolution* 34 (2), p394-406, 1980.
- HOWARTH, F. B. Hawaii. In: JUBERTHIE, C.; DECU, V. (Ed.). *Enciclopedia biospeologica*. Moulis: Société Internationale de Biospéologie. v. 3, p2175-2181, 2001.
- HOWARTH, F. G. Ecology of cave arthropods. *Annual Review of Entomology*, Stanford, v. 28, p365-389, 2005.
- HU, H.; JEEWON, R.; ZHOUN, D.; ZHOU, T.; HYDE, K. D. Phylogenetic diversity of endophytic *Pestalotiopsis* species in *Pinus armandii* and *Ribes* spp.: evidence from rDNA and  $\beta$ tubulin gene phylogenies. *Fungal Diversity*, 2006.
- RUCHKYS, U. A. Geoparques e a Musealização do Território: um Estudo Sobre o Quadrilátero Ferrífero. *Geol. USP, Publ. espec. São Paulo*, v. 5, p35-46, 2009.
- RUCHKYS, U. A.; MACHADO, M. M. M. Patrimônio geológico e mineiro do Quadrilátero Ferrífero, Minas Gerais – Caracterização e iniciativas de uso para educação e geoturismo. *Boletim Paranaense de Geociências*. 70, p120–136, 2013.
- IKNER, L.; TOOMEY, R.; NOLAN, G.; NEILSON, J.; PRYOR, B.; MAIER, R. Culturable microbial diversity and the impact of tourism in Kartchner Caverns, Arizona. *Microb Ecol* 53, p30–42, 2007.
- INIESTA, L. F. M.; ÁZARA, L. N.; SOUZA-SILVA, M.; FERREIRA, R. L. Biodiversidade em seis cavernas do Parque Estadual do Sumidouro (Lagoa Santa, MG). *Revista Brasileira de Espeleologia*. v. 2, n.2, 2012.
- JABLONSKY, P.; KRAMER, S.; YETT, B. 1993. Lint in caves. In: Pate DL, ed. *Proceedings. National Cave Management Symposium*, Carlsbad, NM. American Cave Conservation Association. p73–81, 1993.
- JIA, B.; ZHOU, L.; CUI, B.; RIVOIRE, B.; DAI, Y. Taxonomy and phylogeny of Ceriporia (Polyporales, Basidiomycota) with an emphasis of Chinese collections. *Mycol Progress*, 2013.
- JOHNSTON, M. D.; MUENCH, B. A.; BANKS, E. D.; BARTON, H. A. Human urine in Lechuguilla Cave: The microbiological impact and potential for bioremediation. *Journal of Cave and Karst Studies*, v. 74, n. 3, p278–291, 2011.
- JONES, W. K.; HOBBS, H. H.; WICKS, C. M.; CURRIE, R. R.; HOSE, L. D.; KERBO, R. C.; GOODBAR, J. R.; TROUT, J. Recommendations and guidelines for managing caves on protected lands. Charles Town: Karst Waters Institute. (Special Publication 8), 2003.
- JUBERTHIE, C. B. The diversity of the karstic and pseudokarstic hypogean habitats in the World. In: WILKENS, H.; CULVER, D. C.; HUMPHREYS, W. F. (Ed.). *Ecosystems of the world: 30, subterranean ecosystems*. Amsterdam: Elsevier Science, p17-39, 2000.

JURADO, V.; FERNANDEZ-CORTES, A.; CUEZVA, S.; LAIZ, L.; CANAVERAS, J. C.; SANCHEZ-MORAL, S.; SAIZ-JIMENES, C. The fungal colonization of rock art caves. *Naturwissenschaften*. p1027-1034, 2009.

JURADO, V.; LAIZ, L.; RODRIGUEZ-NAVA, V.; BOIRON, P.; HERMOSIN, B. SANCHEZ-MORAL, S.; SAIZ-JIMENEZ, C. Pathogenic and opportunistic microorganisms in caves. *International Journal of Speleology*. 39 (10), p15-24, 2010a.

JURADO, V.; PORCA, E.; CUEZVA, S.; FERNANDEZ-CORTES, A.; SANCHEZ-MORAL, S.; SAIZ-JIMENEZ, C. Fungal outbreak in a show cave. *Sci Total Environ*. 408 (17), p3632-3638, 2010b.

KAJIHIRO, E.S. Occurrence of dermatophytes in fresh bat guano. *Applied Microbiology*, 13, p720-725, 1965.

KARKUN, A.; TIWARI, K. L.; JADAY, S. K. Fungal Diversity of Mandeepkhol Cave in Chhattisgarh, India. *Advances in bio research*. Vol 3 (2) p119-123, 2012.

KAUFFMAN, C. A. "Histoplasmosis: a Clinical and Laboratory Update." *Clinical Microbiology Reviews*. 20.1, p115–132, 2007.

KAMBESIS, P. The importance of cave exploration to scientific research. *Journal of Cave and Karst Studies*, v.69, p46–58, 2007.

KEPLER, R. M; SUNG, G. H; BAN, S; NAKAGIRI, A; CHEN, M. J; HUANG, B; LI, Z; SPATAFORA, J. W. New teleomorph combinations in the entomopathogenic genus *Metacordyceps*. *Mycologia*, 104(1), p182–197, 2012.

KLIMCHOUK, A. B. Towards defining, delimiting and classifying Epikarst: Its origin, processes and variants of geomorphic evolution. *Speleogenesis and Evolution of Karst Aquifers*. v. 2, n.1, p.1-13, 2004.

KORPI, A.; PASANEN, A. L.; PASANEN, P.; & KALLIOKOSKI, P. Microbial growth and metabolism in house dust. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 40, p19–27, 1997.

KOUSHA, M.; TADI, R.; SOUBANI, A. O. Pulmonary aspergillosis: a clinical review. *European Respiratory Review*. 20 (121), p156-174, 2011.

KREBS, C.J. *Ecological methodology*. Harper & Hall, New York, US, 1989.

KURTBOKE, D. I.; SWINGS, J.; STORMS, V. *Microbial genetic resources and biodiscovery*. United Kingdom, WFCG Publ, 400 p, 2004.

LACAZ, C. S.; PORTO.; MARTINS, J. E. C., *Micologia Médica*. São Paulo. Editora Sarvier, 2002.

LETEY, J. Relationship between soil physical conditions and crop production. *Adv. Soil Science*, New York, p277-293, 1985.

LEWINSOHN, T.M.; PRADO, P.I. How many species are there in Brazil? *Cons. Biol.*, n. 19, p. 619–624, 2005.

LI, H.; QING, C.; ZHANG, Y.; ZHAO, Z. Screening for endophytic fungi with antitumour and antifungal activities from Chinese medicinal plants. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, v. 21, p1515–1519, 2005.

LIECKFELD E.; MEYER W.; BONER T. Rapid identification and differentiation of yeasts by DNA and PCR fingerprinting. *J. Basic Microbiol*. 33, p413–426, 1993.

LIMA, D. A. Avaliação de risco na atividade de espeleoturismo. In: RASTEIRO, M. A.; MORATO, L. (orgs.) CONGRESSO BRASILEIRO DE ESPELEOLOGIA, 32, 2013. Barreiras. Anais... Campinas: SBE, 2013. p.1-5. Disponível em: <[http://www.cavernas.org.br/anais32cbe/32cbe\\_001-005.pdf](http://www.cavernas.org.br/anais32cbe/32cbe_001-005.pdf)>. Acesso em: 01/11/14.

LOBO, H. A. S.; VERÍSSIMO, C. U. V.; FILHO, W. S.; FIGUEIREDO, L. A. V.; RASTEIRO, M.A. Potencial geoturístico da paisagem cárstica. Periódico de Turismo. v. 3, n2, 2007.

LOBO, H.A.S.; PERINOTTO, J.A.; BOGGIANI, P.C. Espeleoturismo no Brasil: Panorama Geral e Perspectivas de Sustentabilidade. Revista Brasileira de Ecoturismo, São Paulo, v. 1, n. 1, p 62-83, 2008.

LOTTENBERG, O., R.; WALDMAN, H.; AJELLO, L.; HOFF, G. L.; BIGLER, W.; ZELLNER, S. R. Pulmonary histoplasmosis associated with exploration of a bat cave. Am. J. Epidemiol. 110, p156-161, 1979.

LUANGSA-ARD, J.; HOUBRAKEN, J.; DOORN, T. V.; HONG, S.; BORMAN, A. M.; HYWEL-JONES, N. L.; SAMSON, R. A. *Purpureocillium*, a new genus for the medically important *Paecilomyces lilacinus*. FEMS Microbiol Lett 321, p141–149, 2011.

LUBBE, C. M.; DENMAN, S.; CANNON, P. F.; GROENEWALD, J. Z.; LAMPRECHT, S. C.; CROUS, P. W. Characterization of *Cholletotrichium* species associated with diseases of Proteaceae. Mycologia. 96 (6), p1268-1279, 2004.

LUKACS, G.; PAPP, T.; NYILASI, I.; NAGY, E.; VAGVOLGYI, C. Differentiation of *Rhizomucor* Species on the Basis of Their Different Sensitivities to Lovastatin. Journal of Clinical Microbiology. 42(11), p5400-5402, 2004.

LERUTH, R. La biologie du domaine souterrain et la faune cavernicole de la Belgique. Ordre Collemboles. Mémoires du Musée Royal d'Histoire Naturelle de Belgique. Mémoire. v.87, p194-201, 1939.

MACDIARMIND, A. Occurrence of *Haplosporangium parvum* in the lungs of the mole (*Talpa europaea*). Nature. 4435, 843, 1954.

MCLAUGHLIN, D.; HIBBETT, D. S.; LUTZONI, F.; SPATAFORA, J. W.; VILGALYS, R. The search for the fungal tree of life. Evolutionary Microbiology. Trends in Microbiology. v.17, n.11, 2009.

MADIGAN, M. I.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V.; CLARK, D. P. Microbiologia de Brock. Artmed. 12.ed. Porto Alegre, 1160p, 2010.

MADISON, W. P.; MADDISON, D. R. MacClade version 4.05 OSX. 2002. In; <http://macclade.org/index.html>. Acesso em 22/11/2010.

MAGURRAN, A. E. Ecological diversity and its measurement. Princeton University Press, Princeton, New Jersey, 179p, 1988.

MANGIN, A. Sur la dynamique des transferts en aquifer karstique. Proceedings of the 6th International Congress of Speleology, Olomouc. v.4, p157-162, 1973.

MANSO, S. B. G.; TENENTE, R. C. V. Nematóides (*Heterodera glycines* Ichinohe) formador do cisto da soja. Brasília. Embrapa, 5p. (Comunicado técnico), 1984.

MARAN, A. G.; KWONG, K.; MILNE, L. J.; LAMB, D. Frontal sinusitis caused by *Myriodontium keratinophilum*. British Medical Journal. 290 (6463):207, 1985.

MARTINS, J. E. C.; MELO, N. T.; HEINS-VACCARI, E. M. Atlas de Microbiologia Médica, Copyright, Editora Manole Ltda, p39-45, 2005.

MARTINS-DINIZ, J.N. *et al.* Monitoramento de fungos anemófilos e de leveduras em unidade hospitalar. Revista de Saúde Pública, São Paulo, 39(3), p398-405, 2005.

MEHL, L. M.; EPSTEIN, L. *Fusarium solani* species complex isolates conspecific with *Fusarium solani* f. sp. cucurbitae race 2 from naturally infected human and plant tissue and environmental sources are equally virulent on plants, grow at 37°C and are interfertile. Environmental Microbiology. 9(9), p2189–2199, 2007.

MENEZES, J. P.; LUPATINI, M.; ANTONIOLLI, Z. I.; BLUME, E.; JUNGES, E.; MANZON, C. G. Variabilidade genética na região ITS do rDNA de isolados de *Trichoderma* spp. (BIOCONTROLADOR) e *Fusarium oxysporum* f. sp *Chrysanthemi*. Ciênc. Agrotec. V. 34, n. 1, p132-139, 2010.

MILLER, R. M.; JASTROW, J. D. Hierachy of root and mycorrhizal fungal interactions with soil aggregation. Soil Biology Biochemistry. p.579-584, 1990.

MINAS GERAIS. Decreto-Lei n. 20.375, de 03 de janeiro de 1980. Cria o Parque Ecológico do Vale do Sumidouro e dá outras providências. Diário do Executivo – Minas Gerais – 04-01-1980.

MINAS GERAIS. Decreto-Lei n. 44.935, de 03 de novembro de 2008. Amplia o Parque Estadual do Sumidouro localizado nos Municípios de Lagoa Santa e Pedro Leopoldo e declara a área de ampliação de utilidade pública e interesse social para fins de desapropriação. Diário do Executivo – Minas Gerais – 04-01-2008.

MONARD, C.; GANTNER, S.; STENLID, J. Utilizing ITS1 and ITS2 to study environmental fungal diversity using pyrosequencing. FEMS Microbiol Ecol 84, p165–175, 2013.

MORAES, R. G.; LEITE, M. I. C.; GOULART, E. G. Parasitologia e micologia humana. 5. ed. Ed. Guanabara Koogan. 608p, 2008.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. Microbiologia e bioquímica do solo. Lavras: UFLA, 626p, 2002.

MULEC, J.; ZALAR, P.; HAJNA, N. H.; RUPNIK, M. Screening for culturable microorganisms from cave environments (Slovenia). Acta Carsologica. 31/2, 8, p177-187, 2002.

MULEC, J. Microorganisms in hypogean: examples from slovenian karst caves. Acta Carsologica. 37/1, p153-160, 2008.

MURRAY, P. R.; ROSSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. Microbiologia Médica, 5ª edição, Elsevier Editora Ltda, p770-773, 2006.

MIYAKIS, S. *et al.* Invasive *Acremonium strictum* infection in a bone marrow transplant recipient. The Pediatric Infectious Disease Journal, Dallas, V. 25, n. 3, p273-265, 2006.

NIEVES-RIVERA, A. M. Mycological Survey of Río Camuy Caves Park, Puerto Rico. Journal of Cave and Karst Studies. v. 65, n. 1, p23-28, 2003.

NIEVES-RIVERA A. M.; SANTOS-FLORES C.J.; DUGAN F.M.; MILLER T.E. Guanophilic fungi in three caves of southwestern Puerto Rico. International Journal of Speleology. v. 38, n.1, p61-70, 2009.

- NILSSON, R. H.; RYBERG, M.; ABARENKOV, K.; KVIST, E. S.; KRISTIANSOON, E. The ITS region as a target for characterization of fungal communities using emerging sequencing technologies. *FEMS Microbiol Lett.* v. 296, p97–101, 2009.
- NIRENBERG, H. I.; FEILER, U.; HAGEDORN, G. Description of *Colletotrichum lupini* comb. nov. in modern terms. *Mycologia.* 94. p307-320, 2002.
- NISHIKAWA, M. M *et al.* Serotyping of 467 *Cryptococcus neoformans* isolates from clinical and environmental sources in Brazil: Analysis of host and regional patterns. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 41, p73-77, 2003.
- NOJOSA, G. B. A.; RESENDE, M. L. V.; BARGUIL, B. M.; MORAES, S. R. G.; VILASBOAS, C. H. Efeito de indutores de resistência em cafeeiro contra a mancha de Phoma. *Summa Phytopathol. Botucatu*, v. 35, n. 1, p60-62, 2009.
- NORTHUP, D. E.; LAVOIE, K. H. Geomicrobiology of caves: A review. *Geomicrobiology Journal*, v.18, n.3, p199-220, 2001.
- 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, p71-82, 2009.
- NOVÁKOVÁ, A.; HUBKA, V.; SAIZ-JIMENEZ, C.; KOLARIK, M. *Aspergillus baeticus* sp. nov. and *Aspergillus thesauricus* sp. nov., two species in section Usti from Spanish caves. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62, p2778–2785, 2012.
- PACE, N.R.A Molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science*, Washington, v. 276, p734-740, 1997.
- PAULA, C. C. P. Estudos da microbiota edáfica da área cárstica de São Desidério-BA e avaliação do seu potencial celulolítico para possíveis aplicações em microbiologia ambiental. dissertação (Mestrado do programa de pós graduação em ecologia e recursos naturais) -Universidade Federal de São Carlos, São Paulo. 108p, 2014.
- PASTOR, F. J; GUARRO, J. Clinical manifestations, treatment and outcome of *Paecilomyces lilacinus* infections. *Clinical Microbiology and Infection*, Basel, 12, p. 948–960, 2006.
- PAVLOVIC, M. D.; BULAJIC, N. Great toenail onychomycosis caused by *Syncephalastrum racemosum*. *Dermatol Online J.* 27, 12(1), 7, 2006.
- PEDRO, E. G.; BONONI, V. L. R. Fungos cavernícolas. *Informativo SBE.* N.91. p32-35, 2005.
- 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 VI*, 1-2. p65-78, 2007.
- PERROTTA, D.; ABRANTES, R.; CANTEROS, C.; RODERO, L.; DAVEL G. Molecular characterization of isolates of *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* by RAPD-PCR in Argentina. *Revista Argentina de Microbiologia*, v.33(3), p.160- 166, 2001.
- PILÓ, L. B. Revisitando a Lapa do Sumidouro: Marco paleo-antropológico do quaternário americano. *Revista Brasileira de Paleontologia*7 (3), p337-348, 2004.
- PORTNOY, J. M; FLAPPAN, S; BARNES, C. S. A procedure for evaluation of the indoor environment. *Aerobiologia*, 17, p43–48, 2001.
- POULSON, T. L.; WHITE, W. B. The cave environment. *Science*, Volume 165, Issue 3897, p971-981, 1969.

PORCA, E.; JURADO, V.; MARTIN-SANCHES, P. M.; HERMOSIN, B.; BASTIAN, F.; ALABOUVETTE, C.; SAIZ-JIMENEZ, C. Aerobiology: an ecological indicator for early detection and control of fungal outbreaks in caves. *Ecol Indic.* 11: p1594-1598, 2011.

PORTER, M. L.; ENGEL, A. S.; KANE T. C.; KINKLE, B. K. Productivity-Diversity relationships from chemolithoautotrophically based sulfidic karst systems. *Int. J. Speleol.* 38(1), p27-40, 2009.

PORTILLO, M. C.; GONZALEZ, J. M.; SAIZ-JIMENEZ, C. Metabolically active microbial communities of yellow and grey colonizations on the walls of Altamira Cave, Spain. *J. of Applied Microbiology*, v.104, p681– 691, 2008.

PRADE, C. A. Aspectos ecológicos da comunidade fúngica do solo em ambientes ripários com diferentes formas de manejo. Tese (Doutorado no programa de pós-graduação em botânica) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 91p, 2007.

PREFEITURA MUNICIPAL DE FLORIANÓPOLIS. Coleta de amostras para microbiologia do ar. 2009.

PRINGLE, A.; ADAMS, R. I.; CROSS, H. B.; BRUNS, T. D. The ectomycorrhizal fungus *Amanita phalloides* was introduced and expanding its range on the westcoast of North America, *Molec. Ecology.* 18, p817-833, 2009.

PROUS, X. Entradas de cavernas: interfaces de biodiversidade entre ambientes externos e subterrâneos, distribuição dos artrópodes da Lapa do Mosquito, Minas Gerais. Dissertação (Mestrado em Ecologia em Conservação e Manejo da Vida Silvestre) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 112p, 2005.

PROUS, X.; FERREIRA, R. L. Estrutura das comunidades cavernícolas na Caatinga: subsídios para a conservação. In: ENCONTRO BRASILEIRO DE ESTUDOS DO CARSTE. São Carlos. Resumos... São Carlos: Redespeleo Brasil, p62-63, 2009.

REINERT, D. J. Recuperação da agregação pelo uso de leguminosas e gramíneas em solo Podzólico Vermelho- Amarelo. Campinas, 65p, 1993.

REPONEN, T. Aerodynamic diameters and respiratory deposition estimates of viable fungal particles in mold problem dwellings. *Aerosol Science and Technology*, 22, p11–23, 1995.

RESENDE-STOIANOFF, M. A.; DA SILVA, D. L.; TAYLOR, E. L.; REIS, M. F.; MAGALHAES, T. F. F.; MARTINS, C. V. B.; DA SILVA, D. M.; SANTOS, D. A.; DE FÁTIMA, A. Activity of aldimines against *Fusarium solani* isolated from bat guano in a neotropical touristic cave. *Mycoses.* 55 (1), p102-103, 2012.

REVANKAR, S. G.; PATTERSON, J. E.; SUTTON, D. A.; PULLEN, R.; RINALDI, M. G. Disseminated phaeohyphomycosis: review of an emerging mycosis. *Clin. Infect. Dis.* 34, p467–476, 2002.

REZENDE, C. C.; DUARTE, D. C.; FILIÚ, W. F. O. Pesquisa de *Cryptococcus neoformas* e *Histoplasma capsulatum* na Gruta Lago Azul, Bonito-MS. In: Anais do XXVII Congresso Brasileiro de Espeleologia. Januaría. MG, 2003.

RICHARDSON, M. D.; WARNOCK, D. W. *Fungal Infection Diagnosis and Management*, 3th edition. Victoria, Blackwell Publishing Asia Pty Ltd, 2003.

RICKLEFS, R. A. *Economia da Natureza*. 5ª ed. New York, Ed. Guanabara Koogan, 503p, 2003.

- RIEDEL, R. W. Permanent Stained Mycological Preparations Obtained by Slide Culture. *Mycologia*. Vol. 42, No. 2, p265-270, 1950.
- RINALDI, A. C.; COMADINI, O.; KUYPER, T. W. Ectomycorrhizal fungal diversity: separating the wheat from the chaff. *Fungal Divers*, n. 33, p1– 45, 2008.
- RIZNER, T. L.; WHEELER, M. H. Melanin biosynthesis in the fungus *Curvularia lunata* (teleomorph: *Cochliobolus lunatus*). *Can. J. Microbiol.* 49, p110–119, 2003.
- ROCHA, R. P. da. Invertebrados cavernícolas da porção meridional da Província Espeleológica do Vale do Ribeira, sul do Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia*, Curitiba, v. 2, n. 12, p229-255, 1994.
- ROCHA, R. P. da. Sinopse da fauna cavernícola do Brasil (1907-1994). *Papéis Avulsos de Zoologia*, São Paulo, v. 39, n. 6, p61-163, 1995.
- ROCHA-SILVA, F.; FIGUEIREDO, S. M.; SILVEIRA, T. T. S.; ASSUNÇÃO, C. B.; CAMPOLINA, S. S.; PENA-BARBOSA, J. P. P; ROTONDO, A.; CALIGIORNE, R. B. Histoplasmosis outbreak in Tamboril cave—Minas Gerais state, Brazil. *Medical Mycology Case Reports* 4, p1–4, 2014.
- RODRIGUES, E. G.; LACAZ, C. S.; LÍRIO, V. S.; Preservação de fungos e actinomicetos de interesse médico em água destilada. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*. 34(2), p159-165, 1992.
- RODRIGUES, M.; MICHELIN, V. B. Riqueza e diversidade de aves aquáticas de uma lagoa natural no sudeste do Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia* 22(4), p928-953, 2005.
- RODRIGUES, A. A.; CARRIM, A, J, I.; SAYDOMA, G.; VIEIRA, J. D. G. Potencialidades Biotecnológicas de *Bacillus cereus* Isolado em uma Caverna. *Anais: XXX Congresso Brasileiro de Espeleologia*. 2009.
- RODRIGUES, A. M.; BAGAGLI, E.; CAMARGO, Z. P.; BOSCO, S. M. G. *Sporothrix schenckii* sensu stricto Isolated from Soil in an Armadillo's Burrow. *Mycopathologia*, 2014.
- ROMANELLI, A. M.; FU, J.; HERRERA, M. L.; WICKES, B. L. A universal DNA extraction and PCR amplification method for fungal rDNA sequence-based identification. *Mycosis*, 2014.
- ROSA, R. C. T.; CAVALCANTI, V. A. L. B. Queda de folíolos em *Parkia pendula* causada por *Pestalotiopsis* sp. no Brasil. *Fitopatologia Brasileira*. v.30, n.6, p672-672, 2005.
- ROSA, L. H.; VAZ A. B. M.; CALIGIORNE, R. L. B.; CAMPOLINA, S. A.; ROSA C. A. Endophytic fungi associated with the Antarctic grass *Deschampsia antarctica* Desv. (*Poaceae*). *Polar Biology*, v.32, p161–167, 2009.
- ROSA, L. H.; VIEIRA, M. L. A.; SANTIAGO, I. F.; ROSA, C. A. Endophytic fungi community associated with the dicotyledonous plant *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. (*Caryophyllaceae*) in Antarctica. *FEMS Microbiology Ecology*. v. 73. p178-189, 2010.
- ROSSELÓ-MORA, R.; AMANN, R. The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiology Review*, Amsterdam, v. 25, n. 1, p39-67, 2001.
- ROSSINI, T. F.; GOULART, L.S. Histoplasmoze Clássica Revisão. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*. v. 38 (4), p275-279, 2006.
- SAIZ-JIMENES, C. Microbiological and environmental issues in show caves. *World J Microbiol Biotechnol.* 28, p2453-2464, 2012.

SANTOS, J. W. A.; *et al.* Chronic cavitary pulmonary histoplasmosis. J. bras. pneumol. v.35, n.11, p1161-1164, 2009.

SARBU, S. M.; KANE, T. C.; KINKLE, B. K. A Chemoautotrophically based cave ecosystem. Science, Cambridge, v. 272, n. 4, p1953-1955, 1996.

SCHABEREITER-GURTNER, C.; SAIZ-JIMENEZ, C.; PINAR, G.; LUBITZ, W.; ROLLEKE, S. Altamira cave Paleolithic paintings harbor partly unknown bacterial communities. FEMS Microbiol Lett. 211, p7-11, 2002.

SHINZATO, E. O carste da area de proteção ambiental de Lagoa Santa (MG) e sua influência na formação dos solos. Dissertação. (Mestrado em produção vegetal). Universidade Estadual do Norte Fluminense, 1998.

SCHLEBUSCH, S.; LOOKE, D. F. M. Intraabdominal Zygomycosis Caused by *Syncephalastrum racemosum* Infection Successfully Treated with Partial Surgical Debridement and High-Dose Amphotericin B Lipid Complex. Journal of Clinical Microbiology. 43(11), p5825-5827, 2005.

SCHOERS, H. J. A. Monograph of Bionectria (Ascomycota, Hypocreales, Bionectriaceae) and its *Clonostachys anamorphs*. Studies in Mycology 46, p1-96, 2001.

SKOULIDIS, F.; MORGAN, M. S.; MACLEOD, K. M. *Penicillium marneffe*: a pathogen on our doorstep? Journal of the Royal Society of Medicine, 97, p394-395, 2004.

STOMEIO, F. Análisis de comunidades microbianas presentes en la cueva de Doña Trinidad (Ardales, Málaga) utilizando cultivos y métodos moleculares basados en ADN y ARN. Tese. University of Seville, Spain, 2008.

STROBEL, G. A.; LONG, D. M. Endophytic microbes embody pharmaceutical potential. American Society of Mycology News, v. 64., p263-268, 1998.

SEVERO, L. C.; OLIVEIRA, F. M.; IRION, K.; PORTO, N. S.; LONDERO, A. T. Histoplasmosis in Rio Grande do Sul, Brazil: a 21-year experience. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 43(4), p183-187, 2001.

SHAPIRO, J.; PRINGLE, A. Anthropogenic influences on the diversity of fungi isolated from caves in Kentucky and Tennessee. Am. Midl. Nat. 163, p76-86, 2010.

SHIMAZU, M.; MITSUHASHI, W.; HASHIMOTO, H. *Cordyceps brongniartii* sp. nov., the teleomorph of *Beauveria brongniartii*. Trans. Mycol. Soc. Japan. 29, p323-330, 1988.

SCHOBENHAUS, C. C.; QUEIROZ, D. A.; WINGE, M.; BERBERT-BORN, L. M. C. Sítios Geológicos e Paleontológicos do Brasil. 1 ed. Brasília DNPM-CPRM – Comissão Brasileira de Sítios Geológicos e Paleobiológicos (SIGEP). V. 1, p415-430, 2002.

SIMONOVICOVA, A.; GODYOVÁ, M.; SEVC, J.; Airborne and soil microfungi as contaminants of stone in a hypogean cemetery. Inst Biodeterior Biodegradation. 54, p7-11, 2004.

SOUZA, T. C.; TEIXEIRA, M. F. S.; SILVA, T. A. Eficiência do método de Castellani na preservação de espécies do genero *Aspergillus* depositados na coleção de cultura DPUA/UFAM. 62ª Reunião Anual da SBPC. Anais, 2010.

SOUZA-SILVA, M. Influência da disponibilidade e consumo de detritos na composição e estrutura de mesofauna cavernícola. Dissertação (Mestrado em Ecologia, Conservação e Manejo de Vida Silvestre) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 80p, 2003.



- SOUZA-SILVA, M. Ecologia e conservação das comunidades de invertebrados cavernícolas na mata atlântica brasileira. Tese (Doutorado em Ecologia Conservação e Manejo da Vida Silvestre) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 225p, 2008.
- SOUZA-SILVA, M.; MARTINS, R. P.; FERREIRA, R. L. Cave Conservation Priority Index to Adopt a Rapid Protection Strategy: A Case Study in Brazilian Atlantic Rain Forest. *Environmental Management*, 2014.
- SPRINGER, D. J.; CHATURVEDI, V. Projecting Global Occurrence of *Cryptococcus gattii*. *Emerging Infectious Diseases*, v. 16 (10), p14-20, 2010.
- SUMMERELL, B. A.; SALLEH, B.; LESLIE, J. F. An utilitarian approach to *Fusarium* identification. *Plant Dis.*, 87, p117-128, 2003.
- SUTTON, B. C. The Coelomycetes. Fungi imperfecti with pycnidia, acervuli and stromata. Commonwealth Mycological Institute. Surrey, England. 696p, 1980.
- TAN, M. K.; TIMMER, L. W.; BROADBENT, P.; PRIEST, M.; CAIN, P. Differentiation by molecular analyses of *Elsinoe* spp. causing scab diseases of citrus and ITS epidemiological implications. *Phytopathology*, Sta. Paul, v. 86, n. 10, p1039- 1044, 1996.
- TAVARES, P. M.; GALVÃO-DIAS, M. A.; MUNIZ, M. M.; TABORDA, C. P.; ZANCOPEOLIVEIRA, R. M. Molecular typing of *Histoplasma Capsulatum* isolated from bats captured in São Paulo States, Brazil". American Society for Microbiology. March 13 – 17, Denver – Colorado, 2006.
- TAYLOR, E. L. S.; FERREIRA, R. L.; SILVA, D.; CANESTRI, G. B.; BATISTA, L. R. Levantamento e distribuição mínima de fungos filamentosos em cavernas da caatinga brasileira. *Anais do III Congresso Latino Americano de Ecologia*, 2009.
- 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*, 42 (3), p267-277, 2013.
- 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*. Vol.1 (1), p16-28, 2014.
- TEDERSOO, L.; *et al.* Global diversity and geography of soil fungi. *Science*. v. 346, issue 6213, 2014.
- TIAN, X.; SHEARER, G. Jr. Cloning and analysis of mold-specific genes in the dimorphic fungus *Histoplasma capsulatum*. *Gene*, v.275(1), p.107-114, 2001.
- TIEDJE, J. M.; CHO, J. C.; MURRAY, A.; TREVES, D.; XIA, B.; AHOU, J. Soil teeming with life: new frontiers for soil science. In: REES, R. M.; BALL, B. C.; CAMPEBELL, C. D.; WATSON, C. A. (Org.). Sustainable management of soil organic matter. Walling ford: CAB International, p393-412, 2001.
- TRAJANO, E. Fauna cavernícola brasileira: composição e caracterização preliminar. *Revista Brasileira de Zoologia*, São Paulo, v. 3, n. 8, p533-561, 1987.
- TRAJANO, E.; GNASPINI, P. Composição da fauna cavernícola brasileira, com uma análise preliminar da distribuição dos táxons. *Revista Brasileira de Zoologia*, São Paulo, v. 3, n. 7, p383-407, 1991.

- TRAJANO, E.; MOREIRA, J. R. A. Estudo da fauna de cavernas da província Espeleológica arenítica Altamira-Itaituba, Pará. *Revista Brasileira de Biologia*, Rio de Janeiro, v. 51, n. 1, p13-29, 1991.
- TRAJANO, E. Cave faunas in the Atlantic tropical rain Forest: composition, ecology, and conservation. *Biotropica* 32 (4b), p882-893, 2000.
- TRAJANO, E. *Sistema areias: 100 anos de estudos*. São Paulo: Redespeleo Brasil. 128p, 2007.
- TRAJANO, E. Annual and infra-annual variations in subterranean ecosystems: implications for environmental studies and cave preservation. *Revista da Biologia*. 10(2), p1–7, 2013.
- TOFOLI, J. G.; FERRARI, J. T.; DOMINGUES, R. J.; NOGUEIRA, E. M. C. *Botrytis* sp. em espécies horticolas: Hospedeiros, sintomas e manejo. *Biológico*, São Paulo, v.73, n.1, p11-20, 2011.
- TORRES-RODRIGUEZ, J. M.; MADRENYS-BRUNET, N.; SIDDAT, M.; LOPES-JODRA, O.; JIMENEZ, T. *Aspergillus versicolor* as cause of onychomycosis : report of 12 cases and susceptibility testing to antifungal drugs. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. 11, p25-31, 1998.
- TUON, F. F. *et al.* Recurrent Acremonium infection in a kidney transplant patient treated with voriconazole: a case report. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop. Uberaba*, v. 43, n4, 2010.
- UNIS, G.; SEVERO, L.C. Chronic pulmonary histoplasmosis mimicking tuberculosis. *J Bras Pneumol*. 31(4), p318-24, 2005.
- WALSH, T.J. *et al.* Infections due to emerging and uncommon medically important fungal pathogens. *Clinical Microbiology and Infection*, Basel, 10 (1), p48–66, 2004.
- WANG, L.; Chen, W.; FENG, Y.; *et al.* Genome Characterization of the Oleaginous Fungus *Mortierella alpina*. *Lustig AJ .PLoS ONE*. 6(12), 28319, 2011.
- WEBSTER, J.; WEBSTER, R. W. S. *Introduction to Fungi*. Cambridge University Press, 2007.
- WHITE, W. B. *Geomorphology and hydrology of karst terrains*. New York: Oxford University Press, 1988.
- WICKLOW, D. T. *The Fungal Community: Its Organization and Role in the Ecosystem*. Marcel Dekker, Inc., New York, 855p, 1992.
- WOODS, J.P. *Histoplasma capsulatum*: Molecular genetics, pathogenesis and responsiveness to environment. *Fungal Genetic Biology*, v.35, p.81-97, 2002.
- WOODS, J.P.; CALDERONE, R.A. (ed.); CIHLAR, R.L. Dimorphism in human pathogens. *Fungal pathogenesis: principles and clinical applications*, p.99- 113, 2002.
- 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*. 42 (1), p77-96, 2013.
- VAUGHAN, M. J.; MAIER, R. M.; PRYOR, B. M. Fungal communities on speleothem surfaces in Kartcher Caverns, Arizona, USA. *International Journal of Speleology*. 40 (1), p65-77, 2011.

VLASCEANU, L.; POPA, R.; KINKLE, B. Characterization of *Thiobacillus thioparus*LV43 and its distribution in a chemoautotrophically based groundwater ecosystem. *Applied Environmental Microbiology*. v.63, p3123–3127, 1997.

YODER, J. A.; BENOIT, B. S.; CHRISTENSEN, T. J.; CROXALL, T. J.; H.H. HOBBS, H. H. Entomopathogenic fungi carried by the cave orb weaver spider, *Meta ovalis* (Araneae, Tetragnathidae), with implications for mycoflora transfer to cave crickets. *Journal of Cave and Karst Studies*, v. 71, no. 2, p116–120, 2009.

ZALAR, P.; HOOG, G. S.; GUNDE-CIMERMAN, N. Ecology of halotolerant dothideaceous black yeasts. *Studies in mycology*. 43, p38-48, 1999.

ZAMPAULO, R. A. Diversidade de invertebrados cavernícolas na Província Espeleológica de Arcos, Pains, Doresópolis (MG) – Subsídios para a determinação de áreas prioritárias para conservação. Dissertação. Universidade Federal de Lavras. Lavras, 190p, 2010.