

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E RECURSOS NATURAIS

**DINÂMICA E DIVERSIDADE DAS
COMUNIDADES MICROBIANAS EM
CAVERNAS TROPICAIS DO BRASIL
CENTRAL**

CAIO CÉSAR PIRES DE PAULA

Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ecologia e Recursos
Naturais da Universidade Federal de São
Carlos, como parte dos requisitos para
obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Mirna Helena Regali Seleglim

**SÃO CARLOS
2018**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado do candidato Caio Cesar Pires de Paula, realizada em 05/10/2018:

Prof. Dra. Mirna Helena Regali Seleglim
UFSCar

Prof. Dra. Odete Rocha
UFSCar

Prof. Dr. Hugo Miguel Preto de Moraes Sarmiento
UFSCar

Prof. Dr. Murilo Andrade Valle
CUFSA

Prof. Dr. Guilherme Corrêa de Oliveira
ITV

Certifico que a defesa realizou-se com a participação à distância do(s) membro(s) Guilherme Corrêa de Oliveira e, depois das arguições e deliberações realizadas, o(s) participante(s) à distância está(ão) de acordo com o conteúdo do parecer da banca examinadora redigido neste relatório de defesa.

Prof. Dra. Mirna Helena Regali Seleglim

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Maria Celeste e meus irmãos, Leonardo e Ana Laura que sempre me apoiaram nessa trajetória;

À Prof^ª. Dr^ª. Mirna Helena Regali Seleglim pelas suas orientações e colaborações ao meu projeto, e pela sua contribuição na minha formação ética e profissional;

À Prof^ª Dr^ª Maria Elina Bichuette que me possibilitou compreender melhor o ambiente subterrâneo e me incentivou nos trabalhos acadêmicos, além de colaborar ativamente na discussão do trabalho;

À Prof^ª Dr^ª Inessa Lacativa e Prof Dr Hugo Miguel P. M. Sarmiento pelos ensinamentos e discussões sobre ferramentas biomoleculares;

À Ramiro Hilario dos Santos por me guiar em todas as cavernas visitadas no PETER e ao casal “Dona Enis” e “Seu Edir” por sempre me receber tão bem em sua morada durante o período de coleta;

A equipe do Laboratório de Ecologia Microbiana (Mayara, Carla, Luciana entre outros) que apoiaram o desenvolvimento desse projeto;

A equipe do Laboratório de Estudos Subterrâneos (Camile Fernandes, Jonas Gallão, Diego Monteiro, Tamires Zepon, entre outros) que contribuíram com este estudo em campo;

A equipe do Laboratório de Processos Microbianos e Biodiversidade (Roberta, Mariana, Michaela, Érick e Vinícius) por me apoiarem e socorrerem nos momentos de maiores aflição ao trabalhar com bioinformática;

Ao Programa de Pós-graduação em Ecologia e Recursos Naturais pela oportunidade de complementar a minha formação profissional;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos concedida ao discente e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo financiamento do projeto (2015/24763-9);

Ao Instituto Chico Mendes de Biodiversidade e à Secretaria do Meio Ambiente e dos Recursos Hídricos pelas licenças de coleta concedidas (licença nº 28992-11 (ICMBio/SISBIO) e nº 14886/2010 (Secima, Goiás));;

Ao Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva da UFSCar por toda a infra-estrutura oferecida;

À técnica do Laboratório de Ecologia de Microrganismos Aquáticos Darci da Consolação Diniz Javaroti por todos os seus ensinamentos que me permitiu evoluir como microbiologista;

Ao técnico José Valdecir de Lucca e Juriti Antônia Machado Milan pelas colaborações nas análises químicas;

Ao Grupo Bambuí de Pesquisas Espeleológicas por disponibilizarem o uso dos mapas das cavernas estudadas nesse trabalho;

Aos amigos biólogos conquistados durante toda a formação acadêmica;

Enfim, a todos aqueles que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho ou que fizeram parte da minha vida neste período.

In memoriam à Darci da Consolação Diniz Javarotti

*“Conhecimento não é aquilo que você sabe, mas o
que você faz com aquilo que você sabe.”*

Aldous Huxley

SUMÁRIO	Pg.
RESUMO	1
ABSTRACT	3
INTRODUÇÃO	5
REFERENCES	10
Capítulo 1: BASE DE DADOS E LEGISLAÇÃO AMBIENTAL PARA CAVERNAS BRASILEIRAS: A VISÃO DE UM MICROBIÓLOGO	13
1.1 Resumo	14
1.2 Cavernas brasileiras <i>versus</i> microbiologia da conservação	14
1.3 Referência	20
Capítulo 2: CAVERNAS TROPICIAS E TEMPERADAS MOSTRAM DIFERENÇAS NA QUANTIDADE E QUALIDADE DA MATÉRIA ORGÂNICA DISSOLVIDA	23
2.1 Resumo	24
2.2 Introdução	25
2.3 Material e Métodos	28
2.3.1 Área cárstica do Alto Ribeira	29
2.3.2 Área cárstica do Peruaçu	29
2.3.3 Área cárstica de Posse	31
2.3.4 Área cárstica de São Domingos	31
2.3.5 Área cárstica de São Desidério	32
2.3.6 Área cárstica da Serra do Ramalho	32
2.3.7 Amostragem	32
2.4 Results	33
2.5 Discussão	37
2.6 Referências	42
Capítulo 3: DIFERENÇAS NAS DINÂMICAS DA BIOMASSA MICROBIANA DE ACORDO COM A DISPONIBILIDADE DE NUTRIENTES EM CAVERNAS TROPICAIS (PARQUE ESTADUAL DE TERRA RONCA, GOIÁS, BRASIL)	49
3.1 Resumo	50
3.2 Introdução	50
3.3 Material e Métodos	52
3.3.1 Local de estudo	52
3.3.2 Amostragem	54
3.3.3 Parâmetros físicos e químicos	54
3.3.4 Parâmetros microbiológicos	55
3.3.5 Análise estatística	59
3.4 Resultados	59
3.5 Discussão	69
3.6 Referências	74

Capítulo 4: O QUE HÁ DEBAIXO DA TERRA?	
DIVERSIDADE MICROBIANA REVELADA EM CAVERNAS TROPICAIS	81
4.1 Resumo	82
4.2 Introdução	83
4.3 Material e Métodos	85
4.3.1 Local de estudo	85
4.3.2 Amostragem	89
4.3.3 Parâmetros físicos e químicos	89
4.3.4 Extração de DNA e sequenciamento	89
4.3.5 Processamento dos dados e análises da comunidade	90
4.4 Resultados	92
4.5 Discussão	105
4.6 Referências	116
Chapter 5: PRIMEIRA EVIDÊNCIA DE DOMINÂNCIA DE <i>HALOBACTERIACEA</i> EM UMA CAVERNA CARBONÁTICA	123
5.1 Resumo	124
5.2 Introdução	125
5.3 Material e Métodos	126
5.3.1 Local de estudo	126
5.3.2 Amostragem	128
5.3.3 Parâmetros físicos e químicos	128
5.4.4 Extração de DNA e sequenciamento	128
5.4.5 Processamento dos dados e análise da comunidade	129
5.5 Resultados	130
5.6 Discussão	138
5.7 Referências	144
CONSIDERAÇÕES FINAIS	149

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA I.** Representação esquemática do processo de dissolução em rochas carbonáticas e formação das cavernas de calcário e paisagens cársticas (modificado de Wood Ronsaville Harlin)..... 6
- FIGURA II.** Desenho esquemático das diferentes vias de entrada de sedimento clástico em um sistema cárstico. (modificado de Bosh & White, 2007)..... 7
- FIGURE 1.1.** Mapa do Brasil destacando as áreas cársticas (áreas em preto) e as cavidades (pontos cinza) registradas no Cadastro Nacional de Informações Espeleológicas (CANIE). 16
- FIGURE 2.1.** Modelo de fluxo de energia (carbono orgânico) no sistema cárstico. Carbono orgânico dissolvido (COD), carbono orgânico particulado (COP), sendo que no meio aquático o COP é classificado como fino (COPF) ou grosso (COPG). Os biofilmes microbianos foram considerados os principais estoques de carbono orgânico no ecossistema subterrâneo. As setas representam os fluxos de energia, com as setas de duas cabeças representando deposição e suspensão (Simon et al., 2007 modificado)..... 26
- FIGURE 2.2.** Distribuição das 54 cavernas estudadas nos artigos revisados. Os números representam as cavernas temperadas e tropicais listadas nas Tabelas 2.I e 2.II. As cavernas brasileiras amostradas neste trabalho estão representadas pelos números de 40 a 54 (Mapa: Diego Monteiro von Schimonsky)..... 30
- FIGURE 2.3.** Valores médios da quantidade de COD (mgC L⁻¹) em cavernas e áreas da superfície localizadas em regiões temperadas e tropicais..... 34
- FIGURE 2.4.** Modelo linear generalizado da quantidade de COD (log transformado) com valores de temperatura (A) e precipitação (B) em cavernas temperadas e tropicais. Cavernas temperadas são representadas por 'x', cavernas tropicais são representadas pelos pontos preenchidos e pontos abertos representam os novos dados das cavernas brasileiras amostradas neste estudo. Os números representam as cavernas listadas na Tabela 2.I. (r = correlação de Pearson) 34

FIGURE 2.5. Modelo linear generalizado da quantidade de nitrogênio (log TN transformado) com valores de temperatura (A) e precipitação (B) em cavernas temperadas e tropicais. Cavernas temperadas são representadas por 'x', cavernas tropicais são representadas pelos pontos preenchidos e pontos abertos representam os novos dados das cavernas brasileiras amostradas neste estudo. Os números representam as cavernas listadas na Tabela 2.II. (r = correlação de Pearson)..... 36

FIGURE 3.1. Planta baixa da caverna Lapa da Angélica. Em destaque (Quadro I) estão apontados os pontos amostrados na Entrada (E), Zona de Penumbra (ZP) e no Subterrâneo (Sub). As imagens apresentam o ambiente superficial (A), vista externa (B) e interna (C) da entrada da caverna (Mapa: Grupo Bambuí de Pesquisas Espeleológicas)... 56

FIGURE 3.2. Planta baixa do Sistema São Bernardo – Palmeiras, com destaque (Quadro I) para a caverna São Bernardo, onde estão apontados os pontos amostrados na Entrada (E), Zona de Penumbra (ZP) e no Subterrâneo (Sub). As imagens apresentam o ambiente superficial (A), vista externa (B) e interna (C) da entrada da caverna (Mapa: Grupo Bambuí e Pesquisas Espeleológicas)..... 57

FIGURE 3.3. Planta baixa do Sistema Terra Ronca – Malhada, com destaque (Quadro I) para as cavernas Terra Ronca I e Terra Ronca II, onde estão apontados os pontos amostrados na Entrada (E), Zona de Penumbra (ZP) e no Subterrâneo (Sub). As imagens apresentam a entrada da caverna Terra Ronca I (A) e a entrada da caverna Terra Ronca II (Mapa: Grupo Bambuí de Pesquisas Espeleológicas) 58

FIGURE 3.4. Valores médios de carbono da biomassa microbiana (CBM) em solo e sedimento das cavernas Angélica (A), São Bernardo (S), Terra Ronca I (T) e Terra Ronca II (TR) nos locais amostrados da superfície (Sf), entrada (E) e subterrâneo (Sb) durante a estação chuvosa (w - Abril/2016, boxplots cinza) e seca (d - Outubro/2016, boxplots escuros). (Boxplots com letras diferentes em locais de uma mesma caverna diferem significativamente ($p \leq 0,05$))..... 61

FIGURE 3.5. Valores médios de nitrogênio da biomassa microbiana (NBM) no solo e sedimento das cavernas Angélica (A), São Bernardo (S), Terra Ronca I (T) e Terra Ronca II (TR) na superfície (Sf), entrada (E) e subterrâneo (Sb) durante a estação chuvosa (w - Abril / 2016, boxplots cinza) e seca (d - Outubro/2016, boxplots escuro). (Boxplots com letras diferentes em locais de uma mesma caverna diferem significativamente ($p \leq 0,05$))..... 63

FIGURE 3.6. Valores médios da taxa de respiração microbiana no solo e sedimento das cavernas Angélica (A), São Bernardo (S), Terra Ronca I (T) e Terra Ronca II (TR) na superfície (Sf), entrada (E) e subterrâneo (Sb) durante a estação chuvosa (w - Abril/2016, boxplots cinza) e seca (d - Outubro/ 2016, boxplots escuro). (Boxplots com letras diferentes em locais de uma mesma caverna diferem significativamente ($p \leq 0,05$))..... 64

FIGURE 3.7. Valores médios do quociente metabólico no solo e sedimento das cavernas Angélica (A), São Bernardo (S), Terra Ronca I (T) e Terra Ronca II (TR) na superfície (Sf), entrada (E) e subterrâneo (Sb) dos locais amostrados durante a estação chuvosa (w - Abril/2016, boxplots cinza) e seca (d - Outubro/2016, boxplots escuro). (Boxplots com letras diferentes em locais de uma mesma caverna diferem significativamente ($p \leq 0,05$))..... 65

FIGURE 3.8. Correlograma, usando coeficiente de correlação de Pearson (barra lateral), entre parâmetros físicos, químicos e microbiológicos (umidade do substrato, pH, temperatura, umidade do ar, nitrogênio total (NT), carbono orgânico dissolvido (COD), carbono da biomassa microbiana (CBM), nitrogênio da biomassa microbiana (NBM) e respiração) nas cavernas Angélica (A) e São Bernardo (S) nas estações chuvosa (abril / 2016) e seca (outubro / 2016)..... 66

FIGURE 3.9. Correlograma, usando coeficiente de correlação de Pearson (barra lateral), entre parâmetros físicos, químicos e microbiológicos (umidade do substrato, pH, temperatura, umidade do ar, nitrogênio total (NT), carbono orgânico dissolvido (COD), carbono da biomassa microbiana (CBM), nitrogênio da biomassa microbiana (NBM) e respiração) nas cavernas Terra Ronca I (T) e Terra Ronca II (TR) nas estações chuvosa (abril / 2016) e seca (outubro / 2016)..... 67

FIGURE 3.10. Análise de componentes principais destacando os parâmetros físicos, químicos e microbiológicos (umidade do substrato, pH, temperatura, umidade do ar, nitrogênio total (NT), carbono orgânico dissolvido (COD), carbono da biomassa microbiana (CBM), nitrogênio da biomassa microbiana (NBM) e respiração) que teve maior efeito nas distribuições dos dados das SUBamostras de cada local amostrado na estação úmida (A) e seca (B). Os vetores representam o peso de cada variável na variância dos dados 68

FIGURE 4.1. Imagens da caverna Angélica destacando o ambiente superficial (A), vista externa (B) e interna (C) da entrada da caverna, e zona afótica da caverna (D)..... 86

FIGURE 4.2. Imagens da caverna São Bernardo destacando o ambiente superficial (A), vista externa (B) e interna (C) da entrada da caverna, e zona afótica da caverna (D). 87

FIGURE 4.3. Imagens da caverna Terra Ronca II destacando o ambiente superficial (A), vista externa (B) e interna (C) da entrada da caverna, e zona afótica da caverna (D).....88

FIGURE 4.4. Distribuição taxonômica (Classes) com as 50 OTUs bacterianas mais abundantes nos locais de amostragem (superfície - Surf, entrada - E - e subterrâneo - Sub) nas cavernas Angélica ("A"), São Bernardo ("SB") e Terra Ronca II ("TR") durante a estação chuvosa e seca.....94

FIGURE 4.5. Distribuição taxonômica (Classe) com as 50 OTUs de fungos mais abundantes nos locais de amostragem (superfície - Surf, entrada - E - e subterrânea - Sub) nas cavernas Angélica ("A"), São Bernardo ("SB") e Terra Ronca II ("TR") durante a estação chuvosa e seca.....95

FIGURE 4.6. Diagrama de Venn com a quantidade de OTUs de bactérias e fungos presentes e compartilhadas nos locais de amostragem (superfície, entrada das cavernas e ambientes subterrâneos) nas cavernas Angélica, São Bernardo e Terra Ronca II. Os números indicam a quantidade de OTUs e as interseções dos círculos mostram o número de OTUs compartilhadas..... 96

FIGURE 4.7. Correlograma de Pearson, usando o coeficiente de Kendall (barra lateral), entre variáveis físicas e químicas (umidade do ar, carbono orgânico dissolvido (DOC), pH, umidade do substrato, temperatura e nitrogênio total (TN)) e OTUs bacterianas mais abundantes das cavernas estudadas nos locais de amostragem (Superfície - surf, Entrada – E, Subterrâneo - Sub) na estação chuvosa (abril / 2016) 100

FIGURE 4.8. Correlograma de Pearson, usando o coeficiente de Kendall (barra lateral), entre variáveis físicas e químicas (umidade do ar, carbono orgânico dissolvido (DOC), pH, umidade do substrato, temperatura e nitrogênio total (TN)) e OTUs bacterianas mais abundantes das cavernas estudadas nos locais de amostragem (Superfície - surf, Entrada – E, Subterrâneo - Sub) na estação seca (Outubro/2016) 101

FIGURE 4.9. Correlograma de Pearson, usando o coeficiente de Kendall (barra lateral), entre variáveis físicas e químicas (umidade do ar, carbono orgânico dissolvido (DOC), pH, umidade do substrato, temperatura e nitrogênio total (TN)) e OTUs dos fungos mais abundantes das cavernas estudadas nos locais de amostragem (Superfície - surf, Entrada – E, Subterrâneo - Sub) na estação chuvosa (Abril/2016)..... 102

FIGURE 4.10. Correlograma de Pearson, usando o coeficiente de Kendall (barra lateral), entre variáveis físicas e químicas (umidade do ar, carbono orgânico dissolvido (DOC), pH, umidade do substrato, temperatura e nitrogênio total (TN)) e OTUs de fungos mais abundantes das cavernas estudadas nos locais de amostragem (Superfície - surf, Entrada – E, Subterrâneo - Sub) na estação seca (Outubro/2016) 103

FIGURE 4.11. Escalonamento multidimensional não-métrico (NMDS) com distância de Bray-Curtis para as OTUs de bactérias e fungos das amostras coletadas nas cavernas (superfície, entrada e ambiente subterrâneo). Cada polígono indica uma caverna designada pela cor (vermelho = caverna Angélica, azul = caverna São Bernardo e verde = caverna Terra Ronca II)..... 106

FIGURE 4.12. Mapa de calor com as OTUs de bactérias mais abundantes com agrupamento dos habitats estudados em cada caverna. A matriz de dissimilaridade foi construída usando a distância de Bray Curtis. Cores mais fortes no mapa de calor indicam uma correlação mais alta da OTU com o local estudado..... 107

FIGURE 4.13. Mapa de calor com as OTUs de fungos mais abundantes com agrupamento dos habitats estudados em cada caverna. A matriz de dissimilaridade foi construída usando a distância de Bray Curtis. Cores mais fortes no mapa de calor indicam uma correlação mais alta da OTU com o local estudado..... 108

FIGURE 5.1. Localização do Parque Estadual de Terra Ronca, com destaque para a planta baixa a caverna Terra Ronca indicando os pontos amostrados na entrada da caverna (E) e no subterrâneo (Sub) (Mapa: Grupo Bambuí de Pesquisas Espeleológicas)..... 127

FIGURE 5.2. Distribuição taxonômica (Classes) das 50 OTUs mais abundantes presentes na superfície, entrada da caverna e no ambiente subterrâneo da caverna Terra Ronca durante a estação chuvosa (Abril / 2016) e seca (Outubro / 2016). Os números nos gráficos representam a proporção das classes mais abundantes. 133

FIGURE 5.3. Diagrama de Venn com a quantidade de OTUs presentes na superfície, entrada da caverna e no ambiente subterrâneo da caverna Terra Ronca durante a estação chuvosa (Abril / 2016) e seca (Outubro / 2016). Os números indicam a quantidade de OTUs e as interseções dos círculos mostram o número de OTUs compartilhadas. 133

FIGURE 5.4. Riqueza, índice de diversidade de Shannon, dominância de Simpson e equitabilidade das comunidades microbianas na superfície, entrada da caverna e no ambiente subterrâneo da caverna Terra Ronca durante a estação chuvosa (Abril/2016) e estação seca (Outubro/2016)..... 134

FIGURE 5.5. Análise Canônica de Coordenadas Principais (CAP) relacionando as OTUs microbianas e os fatores ambientais (salinidade e carbono orgânico dissolvido - COD) nos locais amostrados da caverna Terra Ronca (superfície, entrada da caverna e ambiente

subterrâneo) durante a estação chuvosa (Abril / 2016) e a estação seca (Outubro / 2016) 2016) (w = estação chuvosa; d = estação seca) 135

FIGURE 5.6. Escalonamento multidimensional não-métrico (NMDS) usando a distância de Bray-Curtis para gerar a matriz das comunidades microbianas encontradas nos locais amostrados da caverna Terra Ronca (superfície, entrada da caverna e ambiente subterrâneo) durante a estação chuvosa (Abril / 2016) e a estação seca (Outubro / 2016) (w = estação chuvosa; d = estação seca)..... 136

FIGURE 5.7.A Mapa de calor com todas as OTUs microbianas e agrupamento dos ambientes amostrados. A matriz de dissimilaridade foi construída usando a distância de Bray Curtis. Cores mais fortes no gráfico indicam uma correlação mais alta de OTU com o ambiente estudado (w = estação chuvosa; d = estação seca) 137

FIGURE 5.7.B Mapa de calor com as OTUs abundantes e agrupamento dos ambientes amostrados. A matriz de dissimilaridade foi construída usando a distância de Bray Curtis. Cores mais fortes no gráfico indicam uma correlação mais alta de OTU com o ambiente estudado (w = estação chuvosa; d = estação seca) 137

FIGURE 5.7.C Mapa de calor com as OTUs raras e agrupamento dos ambientes amostrados. A matriz de dissimilaridade foi construída usando a distância de Bray Curtis. Cores mais fortes no gráfico indicam uma correlação mais alta de OTU com o ambiente estudado (w = estação chuvosa; d = estação seca). 138

FIGURE 5.8. Imagens do festival religioso “Bom Jesus da Lapa” em agosto de 2016. A) animais na entrada da caverna e B) religiosos durante a celebração do festival (fonte = Dalvan G. Silva)..... 141

LISTA DE TABELAS

- Table 2.I** Quantidade de carbono orgânico dissolvido na superfície (COD surf) e no subterrâneo (COD sub), temperatura e precipitação das cavernas avaliadas (dados revisados de publicações científicas e novos resultados em cavernas brasileiras). A tabela mostra os nomes das cavernas e cada número corresponde as cavernas mostradas na FIGURA 2.2..... 35
- Table 2.II.** Quantidade de nitrogênio na superfície (N surf) e no subterrâneo (N sub), temperatura e precipitação das cavernas avaliadas (dados revisados de publicações científicas e novos resultados em cavernas brasileiras). A tabela mostra os nomes das cavernas e o número de cada caverna corresponde aos dados mostrados na FIGURA 2.2, junto com a referência usada..... 37
- Table 3.I.** Valores médios e desvio-padrão dos parâmetros físicos (umidade do substrato, temperatura do ar e umidade do ar) nas cavernas Angélica (A), São Bernardo (S), Terra Ronca I (T) e Terra Ronca II (TR) na superfície, entrada e zona afótica (subterrâneo) das amostradas durante a estação chuvosa (abril / 2016) e seca (outubro / 2016)..... 60
- Table 3.II.** Valores médios e desvio-padrão dos parâmetros químicos (pH, nitrogênio total (TN) e carbono orgânico dissolvido (COD)) nas cavernas Angélica (A), São Bernardo (S), Terra Ronca I (T) e Terra Ronca II (TR) nos locais amostrados na superfície, entrada e zona afótica (subterrâneo) das cavernas durante a estação chuvosa (abril / 2016) e seca (outubro / 2016)..... 62
- Table 4.I.** Riqueza, índice de diversidade de Shannon, índice de dominância de Simpson e Equitabilidade de comunidades microbianas (bactérias e fungos) das cavernas Angélica, São Bernardo e Terra Ronca II nas estações chuvosa (abril / 2016) e seca (outubro / 2016). (Surf = superfície, E = entrada das cavernas e Sub = ambientes subterrâneos)..... 97
- Table 4.II.** Valores médios e desvio-padrão dos parâmetros físico (umidade do substrato, temperatura do ar e umidade do ar) e químicos (pH, nitrogênio total (NT) e carbono orgânico dissolvido (COD)) nas cavernas Angélica, São Bernardo e Terra Ronca II em

amostras da superfície (Surf), entrada das cavernas (E) e ambientes subterrâneos (Sub) durante a estação chuvosa (abril / 2016) e seca (outubro / 2016). 98

Table 4.III. Teste de Mantel mostrando as relações significativas entre as matrizes de dissimilaridade da comunidade microbiana (distância de Bray Curtis) e as matrizes de dissimilaridade das variáveis ambientais (distância Euclidiana) nos dois períodos de amostragem (estação chuvosa e seca). r = coeficiente de correlação de Pearson e p = significância estatística. Valores em negrito indicam variáveis com significância estatística.....104

Table 5.I. Média e desvio padrão dos parâmetros físicos (umidade do substrato, temperatura e umidade do ar) e químicos (salinidade, pH, nitrogênio total (NT) e carbono orgânico dissolvido (COD)) na caverna Terra Ronca na superfície, entrada da caverna e no ambiente subterrâneo durante a estação chuvosa (Abril / 2016) e seca (Outubro / 2016).....131



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado do candidato Caio Cesar Pires de Paula, realizada em 05/10/2018:

Prof. Dra. Mirna Helena Regali Seleglim
UFSCar

Prof. Dra. Odete Rocha
UFSCar

Prof. Dr. Hugo Miguel Preto de Moraes Sarmiento
UFSCar

Prof. Dr. Murilo Andrade Valle
CUFSA

Prof. Dr. Guilherme Corrêa de Oliveira
ITV

Certifico que a defesa realizou-se com a participação à distância do(s) membro(s) Guilherme Corrêa de Oliveira e, depois das arguições e deliberações realizadas, o(s) participante(s) à distância está(ão) de acordo com o conteúdo do parecer da banca examinadora redigido neste relatório de defesa.

Prof. Dra. Mirna Helena Regali Seleglim

RESUMO

Ambientes subterrâneos geralmente são considerados oligotróficos extremos e possuem características específicas que determinam a microbiota local, tais como: diferentes condições de umidade, temperatura e natureza dos recursos nutricionais. Embora os estudos sobre diversidade microbiana ambiental têm tido avanços consideráveis, poucos têm investigado a microbiota terrestre em ambientes subterrâneos, principalmente nas regiões tropicais. Considerando que a diversidade e dinâmica dos microrganismos desses ambientes é praticamente inexplorada, este estudo teve como objetivo analisar o cenário atual das políticas conservacionistas em cavernas brasileiras e discutir o nível trófico em cavernas tropicais e temperadas. Ademais, afim de caracterizar as comunidades microbianas em cavernas tropicais, foram estudadas a composição e estrutura da biodiversidade microbiana (bactérias e fungos) e as condições ambientais (físico-químicas) de substratos coletados em três cavidades naturais subterrâneas de uma Unidade de Conservação brasileira (Parque Estadual de Terra Ronca - PETER, São Domingos, GO). A legislação brasileira foi consultada sobre as normas de uso e conservação de cavernas em território nacional. A quantidade de carbono orgânico e nitrogênio total foram mensurados em três cavernas tropicais, além de atributos microbianos (biomassa e respiração), afim de compreender a dinâmica da comunidade microbiana em relação à disponibilidade de matéria orgânica. A composição e estrutura das comunidades microbianas ao longo de um gradiente trófico (superfície > entrada da caverna > subterrâneo) foi avaliada em cada cavidade estudada. Utilizamos o sequenciamento dos genes 16S e ITS (rRNA) para acessar a biodiversidade de fungos e bactérias. O uso de estudos microbianos nas políticas de conservação dos ambientes cavernícolas foi discutido a partir dos dados obtidos nessa pesquisa. Considerando dados publicados e inéditos sobre a quantidade e qualidade da matéria orgânica dissolvida (carbono e nitrogênio) em cavernas tropicais e temperadas, concluímos que é preciso muito cuidado ao considerar todos os ambientes subterrâneos como oligotróficos extremos. *Actinobacteria* e *Proteobacteria* (principalmente *Alpha* e *Gamma*) foram os grupos bacterianos mais frequentes nas cavernas estudadas. Dentre os fungos, grandes proporções de *Actinomicetos* foram observados nos ambientes subterrâneos, principalmente no período seco. Apesar da maior parte das comunidades microbianas serem caracterizadas por microrganismos detritívoros, alguns microrganismos conhecidos pela atividade quimioautotrófica (como *Beggiatoa*) foram observados nesse estudo. Destaca-se o grande número de bactérias incultiváveis e fungos não identificáveis nas cavernas tropicais, indicando o grande potencial desse habitat em abrigar novas espécies de microrganismos. A estrutura e composição das comunidades microbianas nas cavernas estudadas foram mais dissimilares no ambiente

subterrâneo do que no ambiente superficial. Essa dissimilaridade entre as comunidades confere uma singularidade a cada caverna estudada. Por fim, a comunidade bacteriana em uma das cavernas estudadas mostrou evidências do domínio da família *Halobacteriaceae* na entrada da caverna, provavelmente devido às condições ambientais propiciadas, como elevada salinidade do substrato. Os dados gerados nesse estudo enriquecem o conhecimento da biodiversidade microbiana, clarificam o conhecimento sobre a estrutura e dinâmica das comunidades microbianas em cavernas tropicais e contribuirá para futuras propostas de conservação dos ambientes cavernícolas.

ABSTRACT

Subterranean environments are generally considered extreme oligotrophic and have specific characteristics that determine the local microbiota, such as: different humidity conditions, temperature and nature of nutritional resources. Although studies on environmental microbial diversity have made considerable advances, few researches have investigated the terrestrial microbiota of subterranean environments, mainly in tropical regions. Considering that the diversity and dynamics of the microorganisms of these environments is practically unexplored, this study had as aim to analyze, firstly, the current scenario of conservationist policies in Brazilian caves and to discuss the trophic level in tropical and temperate caves. In addition, in order to characterize microbial communities in tropical caves, the composition and structure of microbial biodiversity (bacteria and fungi) and environmental conditions (physicochemical parameters) were evaluated in all samples sampled in three caves of a Brazilian Conservation Unit (State of Terra Ronca - PETER, São Domingos, GO). Brazilian legislation was consulted on the use and conservation of caves, concentrations of organic carbon and total nitrogen were measured in tropical caves, as well as microbial attributes (biomass and respiration) to understand the dynamics of the microbial community in relation to the availability of organic matter. Composition and structure of microbial communities along a trophic gradient (surface > cave entrance > subterranean) was evaluated in each cave studied. We used the sequencing of 16S and ITS (rRNA) genes to access the biodiversity of fungi and bacteria. The use of microbial studies in the conservation policies of cave dwellers environments was discussed from the data obtained in this research. Considering published and new data on the quantity and quality of dissolved organic matter (carbon and nitrogen) in tropical and temperate caves, much care is needed when considering all the subterranean environments as extreme oligotrophic. *Actinobacteria* and *Proteobacteria* (mainly *Alpha* and *Gamma*) were the most frequent bacterial groups in the caves studied. Among the fungi, large proportions of *Actinomycetes* were observed in subterranean environments, mainly in dry period. Although most microbial communities are characterized by detritivorous microorganisms, some microorganisms known for chemoautotrophic activity (such as *Beggiatoa*) were observed in this study. The large number of uncultured bacteria and unidentified fungi in tropical caves is remarkable, indicating the great potential of this habitat to house new species of microorganisms. Structure and composition of the microbial communities in the studied caves were more dissimilar among them in subterranean environments than in surface environments. This dissimilarity among the microbial communities confers a singularity to each cave studied. Finally, microbial community in one of the studied caves showed evidence of the *Halobacteriaceae* family dominance in

entrance cave, probably due to its environmental conditions, such as high salinity of the substrate. The data obtained in this study enrich the knowledge of microbial biodiversity, clarify knowledge about the structure and dynamics of microbial communities in tropical caves and contribute to future proposals for cave environments conservation.

INTRODUÇÃO

As cavernas são ambientes subterrâneos caracterizados por sua alta estabilidade ambiental, ou seja, fatores abióticos como temperatura e umidade sofrem poucas variações em determinadas regiões da mesma (Culver, 1982; Taylor et al., 2013). As cavernas, em sua maioria, estão inseridas em paisagens cársticas, locais com afloramentos de rochas carbonáticas (calcárias) e sob ação da dissolução química pela água, caracterizadas por apresentarem sumidouros e ressurgências de rios, vales cegos, fendas, cavidades e dolinas (Culver & Pipan, 2009). O processo de formação de uma caverna calcária é resultante da ação do ácido carbônico (H_2CO_3) em contato com o carbonato de cálcio (CaCO_3), um processo diferente da erosão, formando as paisagens cársticas (FIGURA I). A atmosfera e o solo da superfície rico em matéria orgânica contêm dióxido de carbono (CO_2) em abundância. Quando a água da chuva passa por eles, se enriquece deste dióxido e torna-se bastante ácida, dando origem ao ácido carbônico (H_2CO_3). A água acidulada penetra pelas fendas da rocha calcária, dissolve o carbonato de cálcio e produz bicarbonato de cálcio ($\text{Ca}(\text{HCO}_3)_2$), solúvel e facilmente transportado pela água. Conforme o carbonato é dissolvido pela água, as fendas se alargam e criam vazios e condutos que se ampliam no interior do maciço rochoso, originando as cavernas.

No Brasil, cerca de 2,8% do território nacional apresentam regiões cársticas com um grande potencial espeleológico (Sallun Filho e Karmann, 2012). Apesar de algumas dessas áreas estarem inseridas em Unidades de Conservação, pesquisadores brasileiros evidenciam as falhas na legislação ambiental sobre uso e conservação dos ambientes cavernícolas (Gallao & Bichuette, 2015). Essas críticas são direcionadas principalmente ao decreto 6640/2088, seguido pela Instrução Normativa MMA N° 02/2009 (atualizada pela Instrução Normativa MMA N° 02/2017), os quais definem os critérios que norteiam a classificação das cavernas brasileiras de acordo com o grau de relevância. Esse procedimento é atualmente aplicado para determinar se uma caverna pode ser explorada comercialmente, bem como as medidas de compensação ambiental pelo recurso natural explorado. Nesse contexto o 'Capítulo 1' (*Base de dados e legislação ambiental para cavernas brasileiras: a visão de um microbiólogo*) desse manuscrito discute as políticas públicas na conservação das cavernas brasileiras e, segundo a visão

de um microbiólogo, como a comunidade microbiana poderia contribuir na conservação ambiental dos ambientes subterrâneos.

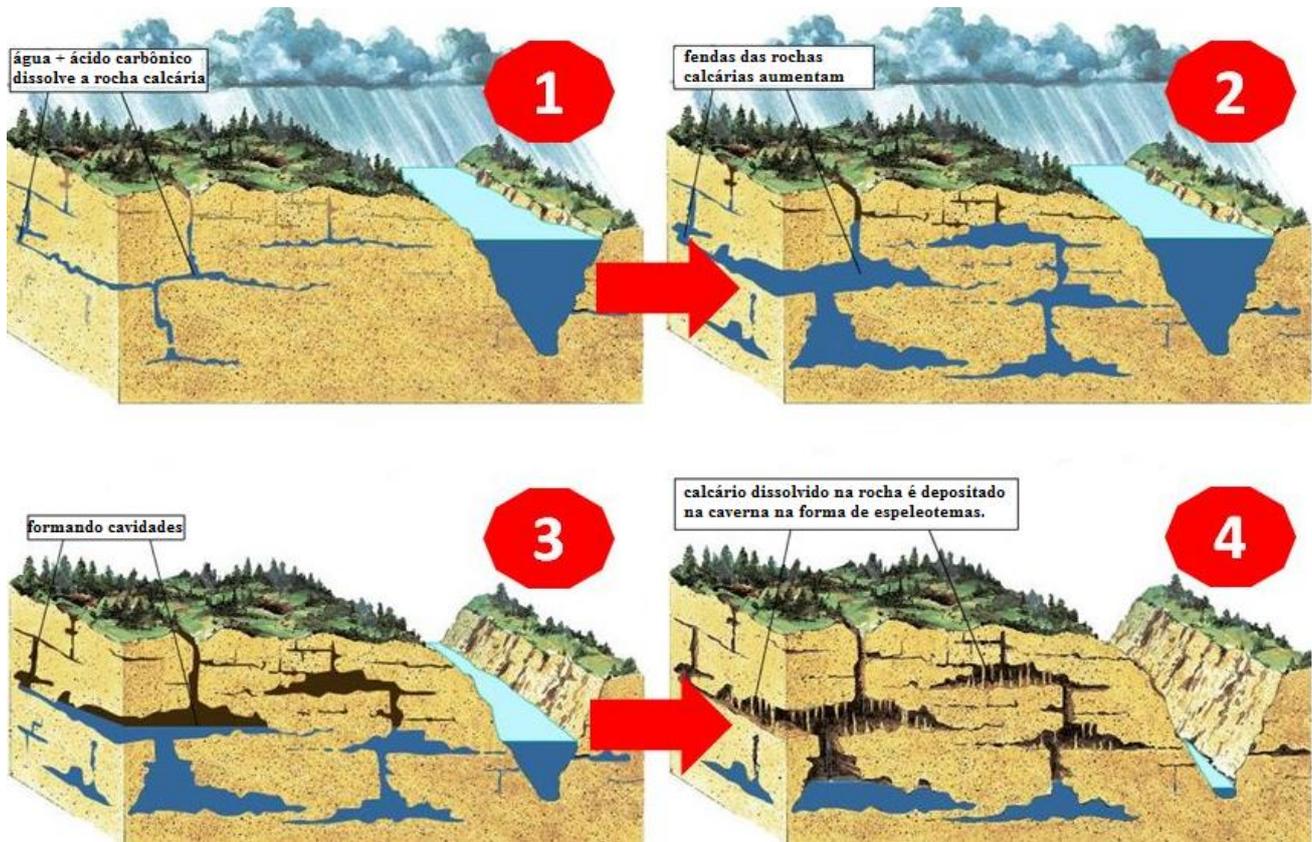


FIGURA I. Representação esquemática do processo de dissolução em rochas carbonáticas e formação das cavernas de calcário e paisagens cársticas (modificado de Wood Ronsaville Harlin).

Devido as características da drenagem hídrica nas paisagens cársticas, as cavernas recebem a entrada de sedimentos clásticos que se depositam em seus condutos, formando bancos de sedimento seco o qual é utilizado pelos organismos da comunidade terrestre como habitat. Dentre as várias vias de entrada de sedimento destacamos o fluxo contínuo de solo carregado através de fendas e fraturas nas rochas, considerada uma importante via para a deposição desse substrato nos condutos da caverna (Figura II) (Bosh & White, 2007).

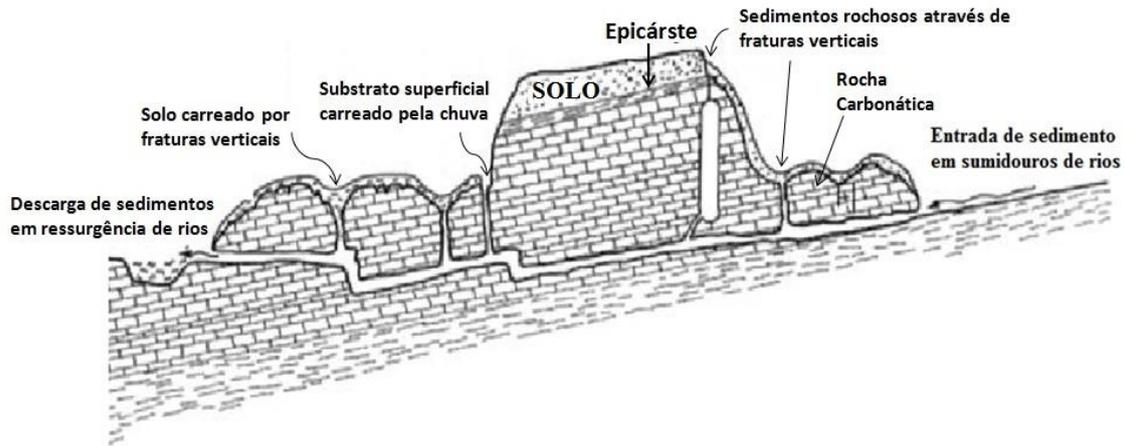


FIGURA II. Desenho esquemático das diferentes vias de entrada de sedimento clástico em um sistema cárstico. (modificado de Bosh & White, 2007)

Em alguns casos as cavernas podem ser consideradas como ambientes oligotróficos extremos e que proporcionam nichos ecológicos altamente especializados. Nelas, a concentração de carbono orgânico normalmente fica abaixo de 0,5 mg por litro de água (Engel, 2007). A ausência parcial ou total de luz, em zonas mais afastadas da entrada junto com a limitação de recursos colaboram para a singularidade desses locais, principalmente do ponto de vista biológico, como a ausência de organismos fototróficos. Esse conjunto de características suportam indiretamente evidências sobre a presença de características típicas de organismos que habitam o ambiente subterrâneo como maior longevidade e reduzida taxa metabólica, segundo a hipótese de limitação de recursos defendida por alguns autores (Huppopp, 2000). Entretanto pouco é conhecido sobre o fluxo de nutrientes em sistemas subterrâneos (Gilbert, 1986; Simon et al., 2003; Simon et al., 2007), restringindo a discussão sobre a limitação de recursos nesse ecossistema. Muitas vezes as cavernas podem receber uma grande entrada de matéria orgânica através de água de gotejamento, enchentes dos rios subterrâneos, pela entrada de animais de ambientes externos e de suas excretas (Jurado et al., 2010).

Gilbert (1986) publicou um estudo pioneiro avaliando o fluxo de nutrientes no sistema subterrâneo, observando um maior fluxo de carbono orgânico dissolvido (COD) em relação ao carbono orgânico particulado (COP) e destacando a comunidade microbiana como chave para mediar o fluxo de carbono nesse ecossistema. Em seguida, Simon et al (2007) propuseram um modelo de fluxo de energia em um sistema cárstico, destacando as diferentes vias de entrada de carbono orgânico e considerando carbono

orgânico dissolvido (COD), carbono orgânico particulado (COP = fino, COPF < 1,0mm + grosso, CPPG > 1,0mm) e biofilmes microbianos como os principais estoques de energia nesse ecossistema. No modelo elaborado por Simon et al. (2007) a composição do COD é uma mistura complexa de moléculas orgânicas. Portanto há diferenças na qualidade (composição do COD) desses complexos orgânicos presentes no epicarste e áreas subterrâneas em relação ao meio epígeo (superfície). A dependência de matéria orgânica alóctone, incluindo a variada composição da matéria orgânica, em conjunto com a presença de pontos difusos de entrada de nutrientes nos ecossistemas subterrâneos promovem uma distribuição heterogênea desses nutrientes (carbono e nitrogênio) ao longo dos condutos de uma caverna. Considerando a ausência de estudos sobre a disponibilidade de carbono e nutrientes em cavernas tropicais, o 'Capítulo 2' (*Cavernas tropicais e temperadas mostram diferenças na quantidade e qualidade da matéria orgânica dissolvida*) apresenta dados novos e outros já publicadas na literatura científica sobre o nível trófico em cavernas tropicais e temperadas.

Uma considerável variedade de microrganismos pode ser encontrada em cavernas, dentre eles, fungos filamentosos (principalmente em decorrência da alta umidade destes locais e temperatura praticamente estável); bactérias heterotróficas (que exigem compostos orgânicos de carbono e nitrogênio como fontes de energia) e bactérias autotróficas (que utilizam exclusivamente o CO₂ como fonte de carbono ou oxidam substâncias minerais como única fonte de energia para o seu desenvolvimento) (Northup & Lavoie, 2001; Nováková, 2009; Jurado et al., 2010). Os microrganismos colonizam uma diversidade de substratos nas cavernas, entre eles o substrato de solo ou sedimento seco. Sabemos que os microrganismos são os principais agentes atuantes em características físicas-químicas-biológicas do solo, dos ciclos biogeoquímicos e da sustentabilidade do ecossistema terrestre (Prosser, 2015). No entanto a compreensão da ecologia dos microrganismos em ambiente terrestre, das variáveis que afetam a comunidade microbiana e das respostas dessa comunidade às mudanças ambientais é ainda obscura devido ao alto grau de heterogeneidade espacial e diversidade biológica do solo e sedimento (Reynold & Numan, 2014).

Alguns estudos evidenciam o quanto o turismo afeta a comunidade microbiana nos ambientes cavernícolas. Tais pesquisas revelam que visitas turísticas acarretam em um aporte de matéria orgânica, suportando o crescimento de bactérias e fungos

exógenos ao ambiente subterrâneo, eliminando espécies nativas e reduzindo a biodiversidade (Pulido-Bosh et al., 1997, Lavoie & Northup, 2006). Alguns indicadores sensíveis podem ser utilizados para monitorar as alterações em ambientes subterrâneos como a atividade enzimática, a biomassa e a respiração microbiana (Kennedy & Papendick, 1995; Matsuoka et al., 2003), uma vez que a comunidade microbiana terrestre é responsável pela decomposição de resíduos orgânicos e ciclagem de nutrientes. A dinâmica da biomassa microbiana em cavernas tropicais é apresentada no 'Capítulo 3' (*Diferenças nas dinâmicas da biomassa microbiana de acordo com a disponibilidade de nutrientes em cavernas tropicais (Parque Estadual de Terra Ronca, Goiás, Brasil)*), onde discutimos a relação de atributos microbianos (biomassa e respiração) com a disponibilidade de carbono e nitrogênio.

Pouco é conhecido sobre a distribuição, dinâmica populacional e bioquímica dos microrganismos em cavernas (Northup & Lavoie, 2006, Barton et al., 2007). Em cavernas tropicais, como as encontradas no Brasil, esse conhecimento ainda é mais incipiente (Vanderwolf et al., 2013). Até o momento, todos os estudos microbiológicos em cavernas brasileiras utilizaram técnicas dependentes de cultivo, avaliando cerca de 1% do total de microrganismos (Mandal et al., 2014). Nos últimos anos foram desenvolvidos novos métodos para detectar os microrganismos no ambiente. As ferramentas moleculares, como a eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE) e as livrarias de clones, foram usadas por muitos pesquisadores para caracterizar microrganismos não cultiváveis (Adetu et al., 2012). No entanto essas ferramentas não fornecem uma boa cobertura da total diversidade microbiana. Desde o surgimento do Sequenciamento de Nova Geração (NGS), o pool genético presente no ambiente pode ser sequenciado e avaliado, corroborando para uma ampla descrição da comunidade microbiana, além de possibilitar inferências sobre a sua diversidade funcional avaliando a presença de genes funcionais previamente descritos (Thomas et al., 2012). Em cavernas poucos estudos têm avaliado a comunidade microbiana utilizando ferramentas de NGS, como o sequenciamento da região 16S rRNA para analisar a comunidade bacteriana (Barton et al. 2007, Ortiz et al., 2013). Além disso, a maioria dos trabalhos se limitaram a estudar um único ponto da caverna ou em apenas uma única ocasião de amostragem, limitando as informações sobre a estrutura da comunidade microbiana ao longo da caverna durante um ciclo hidrológico (Ortiz et al., 2014). Portanto destacamos que não há

nenhum estudo da diversidade e distribuição da comunidade microbiana em cavernas tropicais aplicando técnicas de NGS. Afim de contribuir com o conhecimento científico sobre a bioversidade microbiana em ambientes subterrâneos o 'Capítulo 4' (*O que há debaixo da terra? Diversidade microbiana revelada em cavernas tropicais*) apresenta a estrutura e composição das comunidades microbianas (bactérias e fungos) em três cavernas tropicais do Parque Estadual de Terra Ronca. Para complementar o 'Capítulo 5' (*Primeira evidência de dominância de Halobacteriaceae em uma caverna carbonática*) mostra evidências sobre a dominância de microrganismos do grupo *Archaea* em uma caverna tropical localizada na mesma Unidade de Conservação.

O conhecimento sobre o mundo microbiano em geral é limitado e o conhecimento da diversidade microbiana de cavernas é ainda mais limitado (Vanderwolf et al., 2013). O estudo da biodiversidade em habitats considerados extremos devido a sua limitação por recursos (nutrientes) pode revelar mecanismos de adaptação a tais condições e conseqüentemente aumentar a nossa compreensão da relação entre os organismos e seu ambiente. Além de colaborar com o conhecimento da biodiversidade subterrânea brasileira, os resultados obtidos nesse estudo darão suporte para futuros planejamentos em ambientes subterrâneos, os quais poderão ser incorporados em futuros planos de manejos e ponderados nas políticas de uso e conservação das áreas mais fragilizadas do ponto de vista microbiológico. Esse estudo poderá auxiliar no planejamento e uso sustentável dos ambientes cavernícolas, contribuindo assim com a conservação dos ecossistemas subterrâneos e colaborando para mitigar impactos ambientais no funcionamento desse ecossistema.

REFERÊNCIAS

Adetutu E.M., Thorpe K., Shahsavari E., Bourne S., Cao X., Fard R.M.N., Ball A.S. (2012) *Bacterial community survey sediments at Naracoorte Caves, Australia*. International Journal Speleology, 41(2), 137-147.

Barton H.A., Taylor N.M., Kreate M.P., Springer A.C., Oehrle S.A., Bertog J.L. (2007) *The impact of host rock geochemistry on bacterial community structure in oligotrophic cave environments*. International Journal of Speleology, 36, 93-104.

Bosch R.F., White W.B. (2004) *Lithofacies and transport of clastic sediments in karstic aquifers*. In: Studies of cave sediments. Springer US, pp. 1-22.

- Culver D.C. (1982) *Cave life, evolution and ecology*. Cambridge: Harvard University Press.
- Culver D.C., Pipan T. (2009) *The biology of caves and other subterranean habitats*. Oxford University Press.
- Engel A.S. (2007) *Observations on the biodiversity of sulfidic karst habitats*. Journal of Cave and Karst Studies, 69, 187–206.
- Gallao J.E., Bichuette M.E. (2015) *Taxonomic distinctness and conservation of a new high biodiversity subterranean area in Brazil*. Anais da Academia Brasileira de Ciências, 87(1), 209-217.
- Gibert J. (1986) *Ecologie d'un systeme karstique jurassien. Hydrogéologie, dérive animale, transits de matie`res, dynamique de la population de Niphargus (Crustace` Amphipode)*. Memoires de Biospeologie, 13, 1–379.
- Huppok K. (2000) *How do cave animals cope with the food scarcity in caves?* In: Wilkens H, Culver DC & Humphreys WF, eds., Elsevier, Amsterdam, Subterranean Ecosystems., p. 159–188.
- Jurado V., Laíz L., Rodriguez-Nava V., Boiron P., Hermosin B., Sanchez-Moral S., Saiz-Jimenez C. (2010) *Pathogenic and opportunistic microorganisms in caves*. International Journal of Speleology, 39(1), 15-24.
- Kennedy A.C., Papendick R.I. (1995) *Microbial characteristics of soil quality*. Journal of Soil and Water Conservation, 50(3), 243-248.
- Lavoie K.H., Northup D.E. (2006) *Bacteria as indicators of human impact in caves*. In: Proceedings of the 17th National Cave and Karst Management Symposium, Albany, New York. October - November, pp. 40-47.
- Mandal S., Sanga Z., Nachimuthu S.K. (2014) *Metagenomic analysis of bacterial community composition among the cave sediments of Indo-Burman biodiversity hotspot region*. PeerJ PrePrints, 2, e631v1.
- Matsuoka M., Mendes I.C., Loureiro M.F. (2003) *Biomassa microbiana e atividade enzimática em solos sob vegetação nativa e sistemas agrícolas anuais e perenes na região de Primavera do Leste (MT)*. Revista Brasileira de Ciência do Solo, 27, 425-433.
- Northup D.E., Lavoie K.H. (2001) *Geomicrobiology of caves: a review*. Geomicrobiology Journal; 18, 199-222.
- Novaková A. (2009) *Microscopic fungi isolated from the Domica Cave system (Slovak Karst National Park, Slovakia): a review*. International Journal of Speleology, 38(1), 71-82.

Ortiz M, Neilson WM, Legatzki A, Byrne A, Yu Y, Wing RA, Soderlund CA, Pryor BM, Pierson III LS, Maier RM (2012) *Profiling bacterial diversity and taxonomic composition on speleothem surfaces in Kartchner caverns, AZ*. *Microbial Ecology*, 65(2), 371-383.

Prosser JI (2015) Dispersing misconceptions and identifying opportunities for the use of 'omics' in soil microbiology. *Nature Reviews Microbiology*, 13 : 439 – 446.

Pulido-Bosch A., Martin-Rosales W., Lopez-Chicano M., Rodriguez-Navarro C.M., Vallejos A. (1997) Human impact in a tourist karstic cave (Araceña, Spain). *Environmental Geology*, 31 (3/4), 142-149.

Raynaud X & Nunan N (2014) Spatial ecology of bacteria at the microscale in soil. *PloS one*, 9(1) : 1-9.

Sallun Filho W., Almeida L.H.S., Boggiani P.C., Karmann I. (2012) *Characterization of quaternary tufas in the Serra do André Lopes karst, southeastern Brazil*. *Carbonates and evaporites*, 27(3-4), 357-373.

Simon K.S., Benfield E.F., Macko S.A. (2003) Food web structure and the role of epilithic films in cave streams. *Ecology*, 84, 2395–2406.

Simon K.S., Pipan T., Culver D.C. (2007) A conceptual model of the flow and distribution of organic carbon in caves. *Journal of Cave and Karst Studies*, 69(2), 279–284.

Taylor E.L.S., Stoianoff M.A.R., Ferreira R.L. (2013) *Mycological study for a management plan of a neotropical show cave (Brazil)*. *International Journal of Speleology*, 42(3), 267-277.

Thomas T., Gilbert J., Meyer F. (2012) *Metagenomics-a guide from sampling to data analysis*. *Microbial Informatics and Experimentation*, 2(3), 1-12.

Vanderwolf K.J., Malloch D., Mcalpine D.F., Forbes J. (2013) *A world review of fungi, yeasts, and slime mold in caves*. *International Journal of Speleology*, 42(1), 77-96.

CAPÍTULO 1:

BASE DE DADOS E LEGISLAÇÃO AMBIENTAL PARA CAVERNAS BRASILEIRAS: A VISÃO DE UM MICROBIÓLOGO

1.1 RESUMO

O potencial espeleológico brasileiro é alto e o país possui duas bases de dados para registros de cavernas (Cadastro Nacional de Informações Espeleológicas e Cadastro Nacional de Cavernas) que possuem divergências nas suas informações. Diferentes metodologias utilizadas pelas bases de dados criam um problema na organização do patrimônio espeleológico e contribuem para a fragilidade da conservação das cavernas. Além disso, o Decreto 6640/2008, sobre a conservação de ambientes naturais subterrâneos, regulamenta se uma cavidade natural subterrânea pode ser impactada e/ou extinta e devido à fragilidade na fiscalização da legislação ambiental esses ambientes sempre estão em constante risco. Este decreto foi elaborado baseado em metodologias inapropriadas, baixo números de estudos prévios e os parâmetros usados como indicadores, afim de avaliar o grau de relevância de uma caverna, foram escolhidos com uma rasa consulta à literatura científica e aos pesquisadores espeleólogos. Não há nenhuma exigência de estudos microbianos no Decreto 6640/2008 para a classificação das cavernas brasileiras. As comunidades microbianas em cavernas possuem papéis fundamentais nas dinâmicas destes habitats, assim como mostram um grande potencial em abrigar novas espécies e na produção de novos medicamentos e produtos biotecnológicos. Estudos prévios da comunidade microbiana podem fornecer uma rápida resposta sobre a fragilidade e singularidade de uma caverna. Assim a inclusão de parâmetros microbiológicos nas medidas conservacionistas permitiria a manutenção das cadeias tróficas, a quais suportam toda a comunidade subterrânea, e a dinâmica do equilíbrio ecológico nesses habitats subterrâneos.

1.2 CAVERNAS BRASILEIRAS versus MICROBIOLOGIA DA CONSERVAÇÃO

O Brasil possui um território com um enorme potencial espeleológico, considerando tanto as áreas cársticas quanto não cársticas. As paisagens cársticas geralmente são caracterizadas como áreas onde ocorre o intemperismo químico, por meio da dissolução da rocha matriz (Ford & Williams, 1989; Jones et al., 2003). As cavernas localizadas em áreas cársticas podem estar presentes em diferentes litologias, não limitando apenas às rochas carbonáticas. As cavernas também podem ser

encontradas em rochas como arenitos, quartzitos, gnaisses, micaxistos, basaltos, formações ferruginosas e rochas vulcânicas alcalinas (Travassos, 2014). Em litologias não carbonáticas a gênese da caverna não é seguramente relacionada à processos de dissolução, pois nas cavernas em rochas siliclásticas, por exemplo, predominam os processos mecânicos (Freire et al., 2017).

Aproximadamente 2.368.000 km² (cerca de 2.8%) do território nacional é coberto por afloramentos de rochas carbonáticas (Sallun Filho & Karmann, 2012). O cárste brasileiro é caracterizado por regiões extensas, áreas amplas de calcário horizontal, os quais apresentam sistemas de drenagem com rios de baixo gradiente. Além disso, o cárste pode ser dividido em três zonas: exocarste (ou zona externa), epicarste (ou zona de contato da rocha com o solo) e endocarste (ou zona subterrânea) (Ford & Willians, 1989; Jones et al., 2003). Nessa divisão as cavernas são encontradas no endocarste e são consideradas habitats que compõe parte do ecossistema subterrâneo.

Desde 1997, o governo brasileiro criou o CECAV (Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Cavernas), como o órgão oficial de proteção dos ambientes cavernícolas, ligado ao IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Em 2009, o CECAV tornou-se parte da estrutura organizacional do ICMBio – Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. Até Março/2018, a base de dados do CECAV (CANIE - Cadastro Nacional de Informações Espeleológicas) apresentava 17.488 cavernas registradas (FIGURA 1.1). De todas as cavernas registradas, 9.537 estão em rochas carbonáticas, sendo que a maioria se encontra fora de áreas protegidas (Sallun Filho & Karmann 2012). Cavernas carbonáticas estão amplamente distribuídas nas regiões brasileiras: Sudeste (54.8%), Nordeste (19.8%), Central (15.6%), Norte (7.5%) e Sul (2.3%). Os estados com o maior número de cavernas registradas são Minas Gerais (4601 cavernas), Bahia (993 cavernas) e Goiás (869 cavernas). Embora as estimativas cheguem a centenas de milhares de cavernas no Brasil, menos do que 5% das cavidades naturais subterrâneas brasileiras são conhecidas (Piló & Auler, 2011), evidenciando que o Brasil precisa avançar na prospecção e conhecimento do seu patrimônio espeleológico. Pesquisadores sugerem a adoção de um modelo de referência para o potencial espeleológico no Brasil (baseado nos dados estimados). Este modelo consideraria a relação entre o número de cavernas conhecidas nas principais litologias em conjunto com o provável potencial espeleológico ainda não conhecido

nessas litologias. Usando este modelo, o número de cavernas carbonáticas no Brasil seria >150.000.

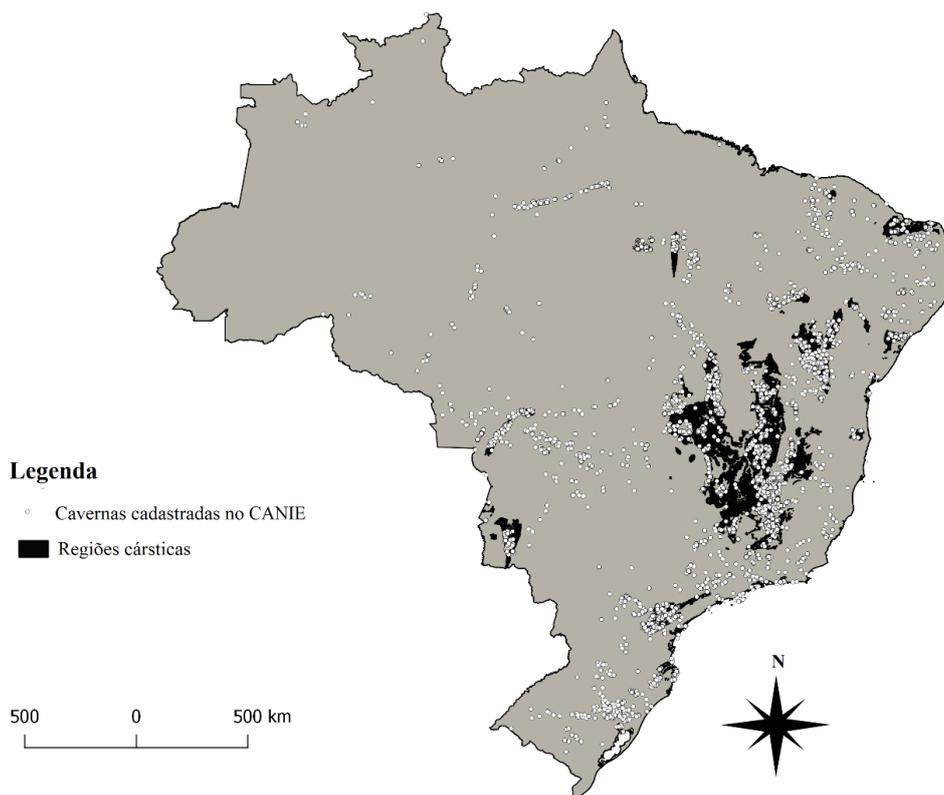


FIGURA 1.1. Mapa do Brasil destacando as áreas cársticas (áreas em preto) e as cavidades (pontos cinza) registradas no Cadastro Nacional de Informações Espeleológicas (CANIE).

Por outro lado, a Sociedade Brasileira de Espeleologia (SBE) possui outra base de dados (CNC – Cadastro Nacional de Cavernas), a qual possui 6.660 cavernas registradas e dentre essas 4.283 são cavernas carbonáticas. Existem diferenças no número de cavernas registradas nas bases de dados (CANIE e CNC). As bases de dados possuem suas próprias metodologias que diferem em diversos aspectos. O CNC permite alterar e excluir cavernas, inserir informações geomorfológicas e localização geográfica. Os dados do CECAV são obtidos em outras bases de dados (SBE / CNC and RedeSpeleo / Codex). A metodologia do CECAV permite que uma mesma caverna possa ser registrada mais de uma vez com nomes diferente porque não há nenhum tipo de confirmação das informações em campo. Este cenário constitui um problema para o adequado manejo ambiental dessas áreas e ilustra o nível de conhecimento do patrimônio espeleológico nacional. A falta de bases de dados coerentes indica a ausência de uma organização do

patrimônio espeleológico e contribui para a fragilidade na legislação ambiental nesses habitats subterrâneos.

Em 1980, o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) começou a elaborar normas visando preservar o patrimônio espeleológico no Brasil, e desde então, diversos instrumentos regulatórios foram instituídos. Em 1988, prescrito pelo Decreto 99.556/1990, a proteção do patrimônio espeleológico foi incluída na Constituição Federal definindo cavernas como patrimônio cultural, garantindo sua proteção e preservação ambiental para a atual e futuras gerações (Brasil, 1988). Em 2008, o Decreto 6.640, seguido pela Instrução Normativa MMA N° 2/2009, estabeleceram uma classificação das cavernas dentro de níveis de relevância de acordo com critérios baseados na presença de atributos únicos (Brasil, 2008). A legislação brasileira determina 70 parâmetros que devem ser considerados na avaliação da significância das cavernas. Esses parâmetros requerem estudos em diversas áreas, baseados em dados geológicos e bioespeleológicos, mas pouco é mencionado sobre estudos microbiológicos e ciclagem de nutrientes em ambientes subterrâneos (Paula et al. 2016). Quatro classes de relevância das cavernas foram designadas: cavernas de *Máxima Relevância* devem ser protegidas, junto com uma zona de amortecimento de 250 m; cavernas de *Alta Relevância* podem ser comercialmente exploradas, desde que duas cavernas similares e com igual significância (preferencialmente na mesma unidade geológica), sejam permanentemente protegidas; cavernas de *Média Relevância* podem ser comercialmente exploradas, mas é exigido uma compensação espeleológica, e cavernas de *Baixa Relevância* podem ser comercialmente exploradas sem a necessidade de uma compensação ambiental (Auler & Piló, 2015, Auler et al., 2018).

A pesquisa em áreas subterrâneas brasileiras teve um avanço significativo nas últimas décadas. Algumas áreas subterrâneas brasileiras podem ser consideradas bem conhecidas porque esses habitats têm sido frequentemente estudados, tais como Alto do Ribeira, no estado de São Paulo e Paraná, e diversas áreas cársticas no estado de Minas Gerais (Peruaçu/Itacarambi, Cordisburgo), Bahia (Serra do Ramalho, Chapada Diamantina), Mato Grosso do Sul (Serra da Bodoquena e Bonito) e Goiás (São Domingos) (Trajano & Bichuette, 2010). Muitas dessas áreas cársticas são classificadas como Área Subterrânea de Alta Biodiversidade (Gallão & Bichuette, 2015). Todos os anos novas

informações sobre a ecologia das cavernas brasileiras destacam as suas singularidades e a importância em conservar esses ambientes.

Espeleologistas brasileiros argumentam que os critérios e normas impostos pela legislação ambiental nacional não são apropriados para a conservação das cavernas. Eles afirmam que os critérios exigidos são insuficientes, além de serem métodos sem validade científica para testar a relevância ambiental dos ambientes subterrâneos. Este novo regulamento pode levar a decisões errôneas nos planos de manejo e conservação, representando uma das principais ameaças ao ambiente subterrâneo no Brasil (Gallão & Bichuette, 2015). A conservação e adequada exploração das cavernas também ficam comprometidas devido a legislação brasileira não requerer estudos microbianos antes da classificação nos graus de relevância.

Comunidades microbianas em cavernas podem ser observadas como colônias ou pontos na superfície das rochas e em camadas de biofilme presentes nas rochas e poças de água. Nas últimas décadas, investigações microbianas usando técnicas dependente e independente de cultivo têm revelado uma riqueza de espécies microbianas nunca antes descrita. O uso de métodos biomoleculares permite o acesso à diversidade microbiana não cultivável e aqueles táxons não descritos na literatura científica. Algumas dessas espécies podem produzir compostos de uso biomédico e biotecnológico, tais como novos antibióticos (Cheepthan, 2012). Recentes estudos mostram a comunidade microbiana subterrânea como uma importante fonte de substâncias orgânicas e como os principais organismos nas vias metabólicas, tais como fixação de CO₂ e N₂ (Tetu et al. 2013, Ortiz et al. 2014). Estudos geo-microbiológicos e da biodiversidade microbiana podem também auxiliar nosso conhecimento em como detectar vida em outros planetas, como Marte, devido as similares condições ambientais encontradas em algumas cavernas (Boston et al. 2001; Barton & Northup, 2007).

Microrganismos também possuem um papel chave no ambiente subterrâneo por constituírem a base das cadeias alimentares, são responsáveis pela ciclagem de nutrientes e atuam diretamente nos processos ecológicos (como decomposição da matéria orgânica e algumas espécies são produtoras primárias por meio da quimioautotrofia). Conhecendo a comunidade microbiana e os processos que estes participam seria possível entender melhor a dinâmica ecológica em um ambiente

subterrâneo. Essas informações poderiam ser muito úteis para avaliar previamente a fragilidade e singularidade de cada caverna. Essa microbiota representa um tesouro subestimado que pode ser impactado pelas ações antrópicas e/ou explorações comerciais dos ambientes subterrâneos. Existem diversas ameaças às comunidades microbianas cavernícola, dentre elas: enriquecimento de carbono orgânica nas trilhas turísticas (Chelius et al., 2009), compactação do sedimento (Northup, 2011), importação de microrganismos exóticos associados com a visita humana (Shapiro & Pringle, 2010), luz artificial (Smith & Olson, 2007), uso inapropriado de agroquímicos nos sistemas de bacias de drenagem, entre outros (Northup, 2011; Epure & Borda 2014).

Pesquisas atuais no Brasil e no mundo todo enfatizam a crucial importância das comunidades microbianas nas cavernas e sugerem que a sua conservação é vital para esse ambiente. Um bom exemplo é a Lascaux cave, França, a qual abriga algumas das mais impressionantes pinturas rupestres do mundo todo. Danificações nas pinturas pelos microrganismos, devido à falta de controle da visita turística e um plano de manejo mal elaborado, levou ao fechamento da caverna afim de proteger as pinturas rupestres, reconstituir a comunidade microbiana cavernícola e mitigar os impactos causados (Bastian et al., 2010).

No caso da Lascaux cave, houveram poucas dúvidas que a extrema preservação da comunidade microbiana é necessária. No entanto, o que dizer das cavernas menos conhecidas, o que está ameaçando as comunidades microbianas que não são visíveis a olho nú? É difícil pensar sobre a proteção de organismos que não são visíveis. Se os microrganismos de uma caverna são percebidos como organismos chaves no ambiente subterrâneo, ou como possibilidades de novos tratamentos para doenças letais, então as pessoas, cientistas e o governo estariam mais dispostos a discutir a conservação e o manejo de comunidades microbianas nesses ambientes. Um dos esforços feitos na conservação de microrganismos cavernícolas é o IDEC (Extração Colaborativa de Imagem de Dados). O IDEC é um programa educacional sobre microrganismos cavernícolas, estimulando e envolvendo os visitantes, educando-os com discussões sobre o papel desses organismos no ambiente subterrâneo e como se dá a conservação das comunidades microbianas nesses habitats (Northup, 2011). No entanto, a maneira mais simples de iniciar um bom plano de conservação da microbiota subterrânea é conduzindo mais pesquisas sobre os danos e as medidas de proteção para comunidades

microbianas em cavernas. Essas informações podem ser úteis para educar os visitantes das cavernas sobre problemas e soluções, e ajudar o governo e os administradores a desenvolverem um bom planejamento para o uso e o gerenciamento de cavernas.

1.3 REFERÊNCIAS

Auler A.S., Piló L.B. (2015) *Caves and mining in Brazil: the dilemma of cave preservation within a mining context*. In: *Hydrogeological and Environmental Investigations in Karst Systems* (pp. 487-496). Springer, Berlin, Heidelberg.

Auler A.S., Souza T.A., Sé D.C., Soares G.A. (2018) *A review and statistical assessment of the criteria for determining cave significance*. Geological Society, London, Special Publications, 466(1), 443-459.

Barton H.A., Northup D.E. (2007) *Geomicrobiology in cave environments: past, current and future perspectives*. Journal of Cave and Karst Studies, 69(1), 163-178.

Bastian F., Jurado V., Nováková A., Alabouvette C., Sáiz-Jiménez C. (2010) *The microbiology of Lascaux cave*. Microbiology, 156(3), 644-652.

Boston P.J., Spilde M.N., Northup D.E., Melim L.A., Soroka D.S., Kleina L.G., Crossey L.J. (2001) *Cave biosignature suites: microbes, minerals, and Mars*. Astrobiology, 1(1), 25-55.

Cheeptham N. (Ed.) (2012). *Cave microbiomes: A novel resource for drug discovery* (Vol. 1). Springer Science & Business Media.

Chelius M.K., Beresford G., Horton H., Quirk M., Selby G., Simpson R. T., Moore J. C. (2009) *Impacts of alterations of organic inputs on the bacterial community within the sediments of Wind Cave, South Dakota, USA*. International Journal of Speleology, 38(1), 1.

Epure L., Borda D. (2014) *Groundwater contamination and the relationship between water chemistry and biotic components in a karst system (Bihor Mountains, Romania)*. Travaux de l'Institut de Speologie Emile Racovitza, 53(1), 69-84.

Gallao J.E., Bichuette M.E. (2015) *Taxonomic distinctness and conservation of a new high biodiversity subterranean area in Brazil*. Anais da Academia Brasileira de Ciências, 87(1), 209-217.

Northup D.E. (2011) *Managing microbial communities in caves*. In: *Karst Management* (pp. 225-240). Springer, Dordrecht.

Ortiz M., Legatzki A., Neilson J.W., Fryslie B., Nelson W.M., Wing R.A., Maier R.M. (2014) *Making a living while starving in the dark: metagenomic insights into the energy dynamics of a carbonate cave*. The ISME journal, 8(2), 478.

Paula C.C.P., Montoya Q.V., Rodrigues A., Bichuette M.E., Selegim M.H.R. (2016) *Terrestrial filamentous fungi from Gruta do Catão (Sao Desiderio, Bahia, Northeastern Brazil) show high levels of cellulose degradation*. Journal of Cave and Karst Studies, 78(3), 208–217.

Piló L.B., Auler A.S. (2011) *Introdução à Espeleologia*. In: *Curso de Espeleologia e Licenciamento Ambiental*. Belo Horizonte: Instituto Terra Brasilis, pp. 7-23.

Sallun Filho W., Almeida L.H.S., Boggiani P.C., Karmann I. (2012) *Characterization of quaternary tufas in the Serra do André Lopes karst, southeastern Brazil*. Carbonates and evaporites, 27(3-4), 357-373.

Shapiro J., Pringle A. (2010) *Anthropogenic influences on the diversity of fungi isolated from caves in Kentucky and Tennessee*. The American Midland Naturalist, 163(1), 76-86.

Smith T., Olson R. (2007) *A taxonomic survey of lamp flora (Algae and Cyanobacteria) in electrically lit passages within Mammoth Cave National Park, Kentucky*. International Journal of Speleology, 36(2), 6.

Tetu S.G., Breakwell K., Elbourne L.D., Holmes A.J., Gillings M.R., Paulsen I.T. (2013) *Life in the dark: metagenomic evidence that a microbial slime community is driven by inorganic nitrogen metabolism*. The ISME journal, 7(6), 1227.

Trajano E., Bichuette M.E. (2010) *Diversity of Brazilian subterranean invertebrates, with a list of troglomorphic taxa*. Subterranean Biology, 7, 1-16.

CAPÍTULO 2:

CAVERNAS TROPICIAS E TEMPERADAS MOSTRAM DIFERENÇAS NA QUANTIDADE E QUALIDADE DA MATÉRIA ORGÂNICA DISSOLVIDA

2.1 RESUMO

Muitos estudos consideram as cavernas como ambientes oligotróficos extremos. No entanto, poucos estudos avaliam a quantidade de energia e a qualidade de nutrientes em cavernas tropicais, limitando a discussão sobre o nível trófico em ambientes subterrâneos tropicais. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar as diferenças na quantidade e qualidade de matéria orgânica (carbono e nitrogênio) em cavernas tropicais e temperadas e discutir a influência das condições climáticas (temperatura e precipitação) no nível trófico desses ambientes. Dados de cavernas do mundo todo publicados na literatura e novos resultados obtidos em cavernas tropicais foram utilizados para analisar a quantidade e a qualidade da matéria orgânica em ambientes superficiais e subterrâneos de zonas temperadas e tropicais. Nos 49 ambientes avaliados a quantidade de carbono orgânico foi, em média, $33.75 \text{ mgC L}^{-1} \pm 74.85\text{SD}$ em cavernas temperadas e $100.47 \text{ mgC L}^{-1} \pm 58.12 \text{ SD}$ em cavernas tropicais. A quantidade média de nitrogênio (NT) encontrada em 34 cavernas foi de $2.98\% \text{ TN} \pm 5.07 \text{ SD}$ e $7.59\% \text{ TN} \pm 5.89 \text{ SD}$ em cavernas temperadas e tropicais, respectivamente. A razão C/N foi de 9.77 ± 15.83 em cavernas temperadas e 2.62 ± 2.93 em cavernas tropicais. Houve correlação positiva entre os valores de carbono e temperatura ($r = 0,6943$) e entre a quantidade de nitrogênio e precipitação ($r = 0,9163$) em todas as cavernas avaliadas. As cavernas temperadas mostraram uma diferença maior na quantidade de carbono e nitrogênio entre o ambiente superficial e o subterrâneo do que as cavernas tropicais. Estes resultados indicam que os ambientes superficiais e subterrâneos das zonas tropicais apresentam maior quantidade e qualidade de matéria orgânica que aqueles localizados nas zonas temperadas. Essa maior diferença na quantidade de carbono e nitrogênio entre o ambiente superficial e subterrâneo na zona temperada mostra que esses habitats são mais oligotróficos do que os ambientes subterrâneos e superficiais localizados nas zonas tropicais. Correlações positivas entre as condições climáticas e a quantidade e qualidade da matéria orgânica dissolvida indicam que a precipitação é um importante meio de transporte de compostos nitrogenados para o ambiente subterrâneo. A temperatura na superfície influencia o processo de decomposição da serapilheira, aumentando a concentração de matéria orgânica solúvel (como o carbono

orgânico dissolvido - COD) em ambientes com temperaturas mais altas e afetando diretamente a concentração de COD nas cavernas.

2.2 INTRODUÇÃO

Ambientes subterrâneos são caracterizados por alta estabilidade climática, como temperatura e umidade, que têm pouca variação em certas regiões (Culver, 1982). As cavernas representam apenas uma fração dos sistemas de drenagens subterrâneos (White et al., 2002). A maioria das cavernas do mundo estão localizadas em rochas carbonáticas (calcários e dolomitos) e sob a ação da dissolução química pela água. Esses habitats são caracterizados por apresentarem sumidouros e ressurgências, vales cegos, rachaduras, cavidades e dolinas (Culver & Pipan, 2009). Cavernas localizadas em quartzito, arenito, minério de ferro, granito, gnaiss, filito e até mesmo no solo também são registradas, embora em menor número do que nas rochas carbonáticas. Cavidades em diferentes tipos de litologias frequentemente possuem gêneses diferenciadas (Ford & Williams, 2007). Além disso, o nível de descontinuidade de uma rocha define diferentes configurações e dimensões para os ambientes subterrâneos de menor volume (micro-cavernas e interface com o epicarste), conectadas aos macro-cavidades (meso e grandes cavernas) (Culver & Pipan, 2009).

A ausência parcial ou total de luz nas áreas mais distantes da entrada da caverna, juntamente com a limitação de recursos, contribui para a singularidade desses locais, principalmente do ponto de vista biológico, como a ausência de organismos fotossintetizantes. Esse conjunto de características suporta indiretamente evidências sobre a presença de organismos que habitam ambientes subterrâneos que possuem características específicas como alta longevidade e reduzida taxa metabólica, conforme a hipótese da limitação de recursos preconizada por Huppopp (2000). No entanto, pouco se sabe sobre a entrada de energia (carbono) e nutrientes, como o nitrogênio, em sistemas subterrâneos (Gilbert, 1986, Simon et al., 2003), restringindo a discussão sobre a limitação de recursos nesse ecossistema.

Gilbert (1986) publicou um estudo pioneiro avaliando o fluxo de energia em ecossistemas subterrâneos onde foi observado um alto fluxo de carbono orgânico dissolvido (COD) em relação ao carbono orgânico particulado (POC) e destacou a comunidade microbiana como os organismos responsáveis por este fluxo de energia.

No entanto, Simon et al (2007) propuseram um modelo de fluxo de energia no sistema cárstico, destacando as diferentes vias do carbono orgânico, e considerando carbono orgânico dissolvido (COD), carbono orgânico particulado (COP = fino, FBOC <1.0mm + espessura, CBOC > 1,0 mm) e biofilmes microbianos como principais estoques de energia nesse ecossistema (FIGURA 2.1). Os pesquisadores apontaram que, em relação à entrada de carbono orgânico nas cavernas, os sumidouros dos rios contribuem para concentrações sete vezes maiores de COD do que o epicarste. Este fato evidencia a importância da matéria orgânica dissolvida carregada na água de gotejamento, inundações dos rios subterrâneos, e pela entrada de animais da área externa e suas excretas (Jurado et al., 2010).

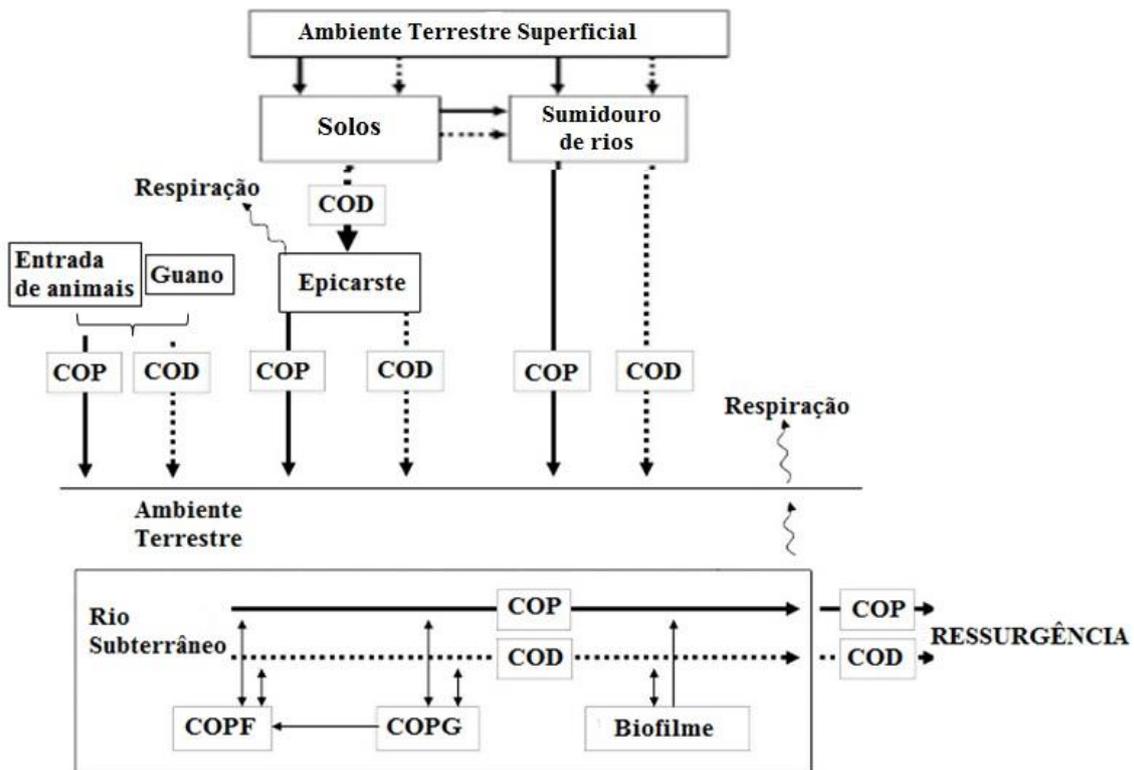


FIGURA 2.1. Modelo de fluxo de energia (carbono orgânico) no sistema cárstico. Carbono orgânico dissolvido (COD), carbono orgânico particulado (COP), sendo que no meio aquático o COP é classificado como fino (COPF) ou grosso (COPG). Os biofilmes microbianos foram considerados os principais estoques de carbono orgânico no ecossistema subterrâneo. As setas representam os fluxos de energia, com as setas de duas cabeças representando deposição e suspensão (Simon et al., 2007 modificado).

Deve ser explicado, no modelo de fluxo de energia (FIGURA 2.1), que a composição da matéria orgânica dissolvida (MOD) é uma mistura complexa de moléculas orgânicas. Portanto, existem diferenças na qualidade (composição da MOD)

desses complexos orgânicos presentes no epicarste e sumidouros de rios. Sumidouros de rios e rachaduras verticais podem transportar COD e compostos nitrogenados, tais como folhas, galhos, troncos de árvore e pequenos detritos do solo ou rios de superfície. A água presente no epicarste raramente apresenta matéria orgânica particulada devido à filtração da fração líquida pelos grânulos do solo. Portanto, a dependência da matéria orgânica alóctone, incluindo a composição variada de matéria orgânica, juntamente com os pontos de entrada de nutrientes difusos nos ecossistemas subterrâneos, promove uma distribuição heterogênea de carbono orgânico e nitrogênio ao longo dos condutos das cavernas. A maioria dos estudos sobre fluxo de energia e nutrientes (como o nitrogênio) em ambientes subterrâneos foram conduzidos em áreas temperadas, os quais consideraram as cavernas como ambientes oligotróficos. Há pouca informação sobre a quantidade e qualidade da matéria orgânica dissolvida, ou seja, a quantidade de carbono orgânico e nitrogênio, em cavernas tropicais. Devido à escassez de dados, a discussão sobre a quantidade e qualidade da matéria orgânica em cavernas tropicais e temperadas torna-se limitada. A distribuição da matéria orgânica nas camadas superficiais do solo está correlacionada com fatores climáticos, com a matéria orgânica dissolvida distribuída à medida que a precipitação diminui e a temperatura aumenta (Jobbágy & Jackson, 2000). Este padrão está de acordo com a observação de que a proporção de matéria orgânica com os nutrientes minerais no solo diminui das áreas temperadas para tropicais (Jenny, 1950), sugerindo que a temperatura média anual pode ter um efeito proporcionalmente maior na decomposição da matéria orgânica. Saber como a matéria orgânica é influenciada na superfície da caverna permite uma melhor compreensão da dinâmica de energia e nutrientes no ambiente subterrâneo.

Em suma, a matéria orgânica dissolvida é a principal fonte de energia e nutrientes nas cavernas. A água da chuva é uma importante via de transporte de matéria orgânica dissolvida para cavernas e a alta temperatura afeta a taxa de decomposição da matéria orgânica em componentes solúveis na superfície da caverna. Portanto, o objetivo deste trabalho foi discutir as diferenças na quantidade e qualidade da matéria orgânica dissolvida (carbono e nitrogênio) e avaliar a relação entre as variáveis climáticas (temperatura e precipitação) da superfície da caverna com a quantidade e qualidade da matéria orgânica dissolvida encontrada dentro das cavernas localizadas em clima tropical e temperado. Esses objetivos são abordados em um aspecto global,

com base em dados da literatura científica. Devido à baixa quantidade de dados de carbono e nitrogênio em cavernas tropicais, este trabalho apresenta novos resultados para complementar a discussão. A hipótese do estudo é que existem diferenças na qualidade e quantidade de matéria orgânica dissolvida (carbono e nitrogênio) de acordo com a localização das cavernas (zona temperada ou tropical) e características climáticas da região.

2.3 MATERIAL E MÉTODOS

Este artigo revisou informações sobre matéria orgânica dissolvida (carbono e nitrogênio) relatadas em cavernas carbonáticas do mundo todo desde 1980. Grande parte da literatura publicada sobre carbono orgânico e nitrogênio em cavernas é encontrada em fontes dispersas, obscuras ou que não estão prontamente disponíveis. Foram utilizados dados de carbono e nitrogênio de 68 artigos publicados em revistas internacionais sobre cavernas carbonáticas (FIGURA 2.2) em 11 países (Austrália, Bélgica, Brasil, China, Eslovênia, Israel, Itália, Jamaica, Espanha, Malásia e EUA). Assim, este trabalho não aborda a quantidade de energia e nutrientes em cavernas marinhas, cavernas de gelo, tubos de lava, cavernas de riftes tectônicas ou outros habitats subterrâneos naturais ou feitos pelo homem.

Os estudos foram localizados usando as plataformas de pesquisa na Internet, ISI Web of Science e Google Acadêmico, da Thomson Reuters, além de consultar bibliografias, ler livros sobre ecologia cavernícola e acessando uma revisão publicada anteriormente. (Simon et al., 2007). Dados de carbono e nitrogênio foram extraídos de cada estudo. Detalhes das metodologias foram registrados, incluindo localização das cavernas, número de amostras coletadas, temperatura, umidade e precipitação. Outras variáveis não foram analisadas devido à falta de dados. A análise foi conduzida em um conjunto de 25 trabalhos, abrangendo 13 cavernas tropicais e 27 cavernas temperadas. De todas as cavernas estudadas, o carbono orgânico e quantidade de nitrogênio foram estudados em 34 (carbono) e 20 (nitrogênio) cavernas, respectivamente. Os artigos excluídos careciam de detalhes sobre a metodologia e geralmente foram publicados antes de 1980. O primeiro estudo publicado sobre o fluxo de carbono orgânico em um ecossistema cárstico foi feito por Humboldt (1794), descrito em Simon et al (2007).

Infelizmente, os dados não puderam ser utilizados devido à nomenclatura ultrapassada e indetectável.

Devido à falta de dados de carbono e nitrogênio em cavernas tropicais, este artigo mostra novos dados obtidos em cavernas brasileiras: área cárstica do Alto do Ribeira (03 cavernas), área cárstica de Peruaçu (01 caverna), área cárstica de Posse (02 cavernas), área cárstica de São Domingos (06 cavernas), área cárstica de São Desidério (02 cavernas) e área cárstica da Serra do Ramalho (02 cavernas).

2.3.1 ÁREA CÁRSTICA DO ALTO RIBEIRA

A área cárstica do Alto Ribeira está localizada no sudoeste do estado de São Paulo, no Vale do Ribeira. Essa área protegida (35.712 m²), juntamente com outros parques estaduais, compreende mais de 270.000 hectares de Mata Atlântica contínua em Unidades de Conservação. Esta área foi inscrita como patrimônio natural na Lista do Patrimônio Mundial da Humanidade. A área cárstica do Alto Ribeira é definida geologicamente pela presença de metassedimentos e calcário marinho, depositados em um ambiente tectonicamente pré-cambriano. Os afloramentos de calcário descontínuo são orientados NE-SW, com largura variando de 1.000 a 8.000 m, mas chegando a 20.000 m de extensão (Karmann & Sánchez, 1979; Genthner et al., 2003). A área cárstica do Alto Ribeira é uma das regiões brasileiras mais estudadas por pesquisadores espeleólogos. As cavernas estudadas na área cárstica do Vale Ribeira foram: Morro Preto, Santana e Ressurgência das Areias de Águas Quentes.

2.3.2 ÁREA CÁRSTICA DO PERUAÇU

A área cárstica do Peruaçu faz parte da Bacia do Peruaçu, o qual está inserida na Bacia do Rio São Francisco. É composta por grandes formações rochosas com predominância de pedras calcárias do grupo Bambuí (Auler & Ferrant, 1996). A área situa-se na zona de transição entre as fitofisionomias do Cerrado e da Caatinga. A caverna Olhos d'Água, uma das cavernas estudados neste trabalho, é a maior caverna do Estado de Minas Gerais, com aproximadamente nove quilômetros de projeção horizontal. Apesar de não estar em uma Unidade de Conservação, a caverna Olhos d'Água é considerada um ponto de alta biodiversidade no Brasil, abrigando um número

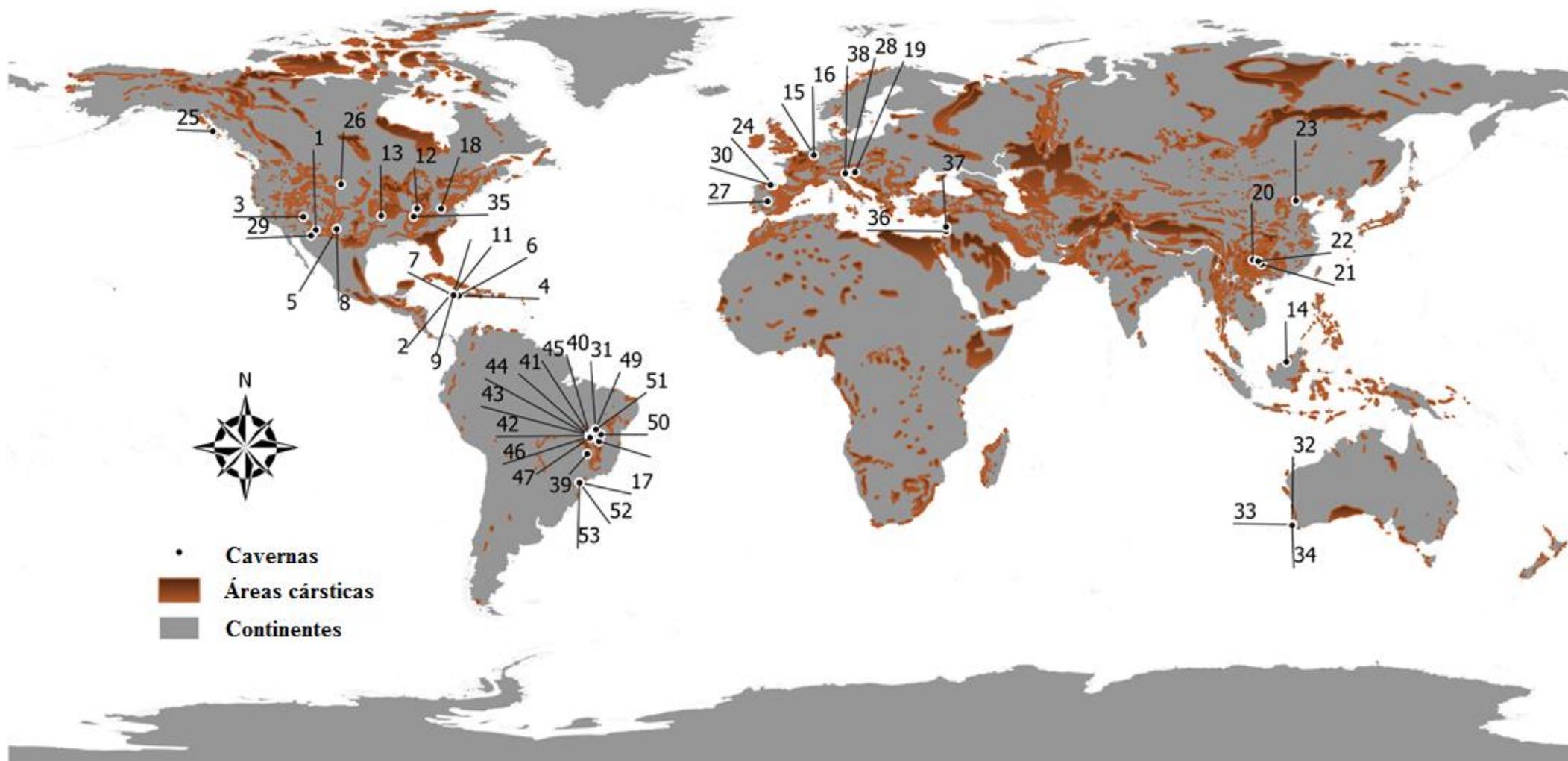


FIGURA 2.2. Distribuição das 54 cavernas estudadas nos artigos revisados. Os números representam as cavernas temperadas e tropicais listadas nas Tabelas 2.I e 2.II. As cavernas brasileiras amostradas neste trabalho estão representadas pelos números de 40 a 54 (Mapa: Diego Monteiro von Schimonsky).

significativo de espécies troglóbias com restrita faixa de distribuição (Auler et al. 2001, Trajano & Bichuette, 2010).

2.3.3 ÁREA CÁRSTICA DE POSSE

A área cárstica de Posse está localizada no município de Posse, nordeste do estado de Goiás, central do Brasil. A área está dentro do grupo geomorfológico Bambuí. Essa área cárstica tem sistemas de drenagem menos desenvolvidos e pequenos afloramentos escondidos na vegetação, em comparação com as áreas cársticas próximas da região. O cárste está inserido no domínio morfoclimático do Cerrado e o clima é tropical semi-úmido. Esse sistema de drenagem está inserido principalmente na margem leste do rio Paraná, afluente do alto rio Tocantins. Não há unidades de conservação na área cárstica de Posse, tornando o local desprotegido de impactos antropogênicos. A maioria das cavernas desta região não foram mapeadas e estudadas por pesquisadores espeleólogos. As cavernas estudadas na área cárstica de Posse foram: Russão e Revolucionários.

2.3.4. ÁREA CÁRSTICA DE SÃO DOMINGOS

A área cárstica de São Domingos está localizada no leste do estado de Goiás, no domínio fitogeográfico do Cerrado. Esta área é caracterizada pela presença de afloramentos de calcários contínuos pertencentes à unidade Bambuí (Auler & Ferant, 1996). A área é atravessada por vários rios paralelos que correm para o oeste para se unir ao rio Paraná, afluente do Alto Rio Tocantins, na Bacia do Amazonas. Os principais rios e afluentes entram nas cavernas através de um sumidouro, atravessam centenas de milhares de metros através de condutos subterrâneos e alcançam a superfície por uma ressurgência (Bichuette & Trajano, 2006). As cavernas na área cárstica de São Domingos possuem rios subterrâneos com alta capacidade de carreamento de sedimentos e detritos. Mesmo na estação seca, os principais rios têm um grande volume de água. Portanto, uma grande quantidade de matéria orgânica (principalmente detritos vegetais e fauna associada) se acumula dentro dessas cavernas (Bichuette & Trajano, 2003). As cavernas estudadas na área cárstica de São Domingos foram: Angélica, Terra Ronca I, Terra Ronca II, São Bernardo II, São Bernardo III e São Vicente II.

2.3.5 ÁREA CÁRSTICA DE SÃO DESIDÉRIO

A área cárstica de São Desidério está localizada na região nordeste do Brasil, no oeste do estado da Bahia. A área está localizada na região noroeste da bacia hidrográfica do Rio São Francisco e compreende sedimentos Fanerozóicos pertencentes à Bacia do São Francisco (unidade Bambuí) (Campos & Dardenne, 2017). Este é um sistema cárstico típico, com uma grande concentração de cavernas, os quais se destacam pelos grandes volumes dos dutos subterrâneos e a zona de transição superficial (epicarste), gerados pelos sumidouros. As cavernas estudadas na área cárstica de São Desidério foram: Ernesto Pereira e Palmeiras.

2.3.6 ÁREA CÁRSTICA DA SERRA DO RAMALHO

A área cárstica da Serra do Ramalho, no sudoeste da Bahia, faz parte da bacia hidrográfica do médio São Francisco, com predomínio de rochas calcárias da unidade Bambuí (Auler & Ferrant, 1996). O clima da região é definido como semiárido (seco tropical), caracterizado por um inverno seco (março a outubro). A vegetação nativa da região é composta por Caatinga (vegetação semiárida), intercalada com o Cerrado. A área cárstica da Serra do Ramalho é dominada por um planalto formado por rochas calcárias que se estendem por quilômetros e formam grandes sistemas de cavernas na região (Trajano, Secutti & Bichuette, 2009). A caverna estudada na área cárstica da Serra do Ramalho foi Altina.

2.3.7 AMOSTRAGEM

As cavernas estudadas foram amostradas entre 2012 - 2016. Um quadrante de aproximadamente 0,25 m² (solo ou sedimento) foi amostrado no interior (subterrâneo) e exterior (superfície) de cada caverna (pelo menos 03 pontos em cada local). Aproximadamente 300 g de substrato cavernícola foram coletados em cinco locais diferentes em cada quadrante. Amostras de sedimento e solo das cavernas foram coletados a uma profundidade de 0 a 10 cm e armazenados em recipientes plásticos estéreis. As amostras foram transportadas refrigeradas para o laboratório, homogeneizadas e peneiradas (malha 2 mm), e armazenadas em geladeira a 4,0 ° C até a análise.

Os dados de precipitação e temperatura de cada caverna amostrada foram obtidos do Banco de Dados Meteorológicos para o Ensino e Pesquisa do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET). As concentrações de carbono orgânico dissolvido (DOC) foram estimadas colorimetricamente de acordo com Bartlett & Ross (1988). O nitrogênio total (NT) foi determinado pela digestão de Kjeldahl seguida da destilação de amônia (Bremner & Mulvaney, 1982). A razão C / N foi calculada a partir dos dados obtidos. A relação de temperatura e precipitação com a quantidade de carbono orgânico e nitrogênio total relatados foi examinada por meio do Modelo Linear Generalizado (distribuição de Poisson), usando a análise de correlação de Pearson (r). As análises estatísticas foram realizadas no PAST: Pacote estatístico paleontológico para educação e análise de dados (Hammer, 2009).

2.4 RESULTADOS

Ao todo, 34 cavernas foram estudadas em relação a quantidade de carbono orgânico, as quais estão localizadas nos EUA (10), Jamaica (7), China (4), Austrália (3), Espanha (3), Bélgica (2), Brasil (2), Eslovênia (1), Itália (1) e Malásia (1). Destas cavernas, 24 são cavernas em regiões temperadas e 10 são cavernas em regiões tropicais. As cavernas temperadas mostraram uma média de $33.75 \text{ mgC L}^{-1} \pm 74.85\text{SD}$ e as cavernas tropicais (incluindo os novos dados) tiveram uma média de $100.47 \text{ mgC L}^{-1} \pm 58.12\text{SD}$ (FIGURA 2.3). Houve uma diferença significativa nos valores de COD encontrados em cavernas temperadas e tropicais ($p = 0,0019$). A Tabela 2.I apresenta os valores detalhados de carbono orgânico para cada caverna, além de dados sobre a superfície, como temperatura, precipitação e quantidade de carbono orgânico (quando esses dados estavam disponíveis). O substrato mais comum amostrado nos estudos revisados foi sedimento (58,3% dos estudos), seguido por água (33,3%), principalmente água corrente e de gotejamento, calcita (5,55%) e rocha (2,77%).

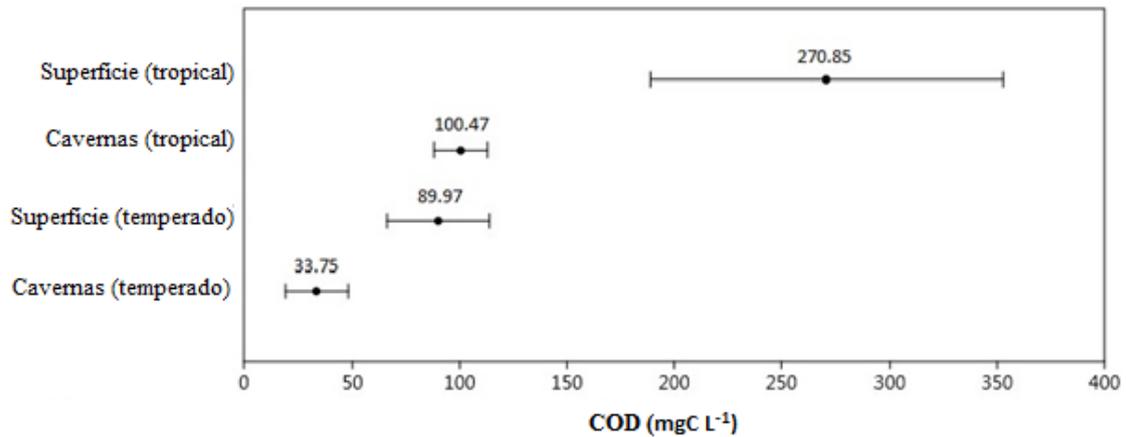


FIGURA 2.3. Valores médios da quantidade de COD (mgC L⁻¹) em cavernas e áreas da superfície localizadas em regiões temperadas e tropicais.

Houve uma correlação positiva entre os valores de COD e temperatura ($r = 0,6943$), mas não houve correlação entre o valor de COD e precipitação ($r = 0,2990$). A FIGURA 2.4 mostra o Modelo Linear Generalizado dos valores de COD em relação à temperatura e precipitação obtidos em cavernas temperadas e tropicais.

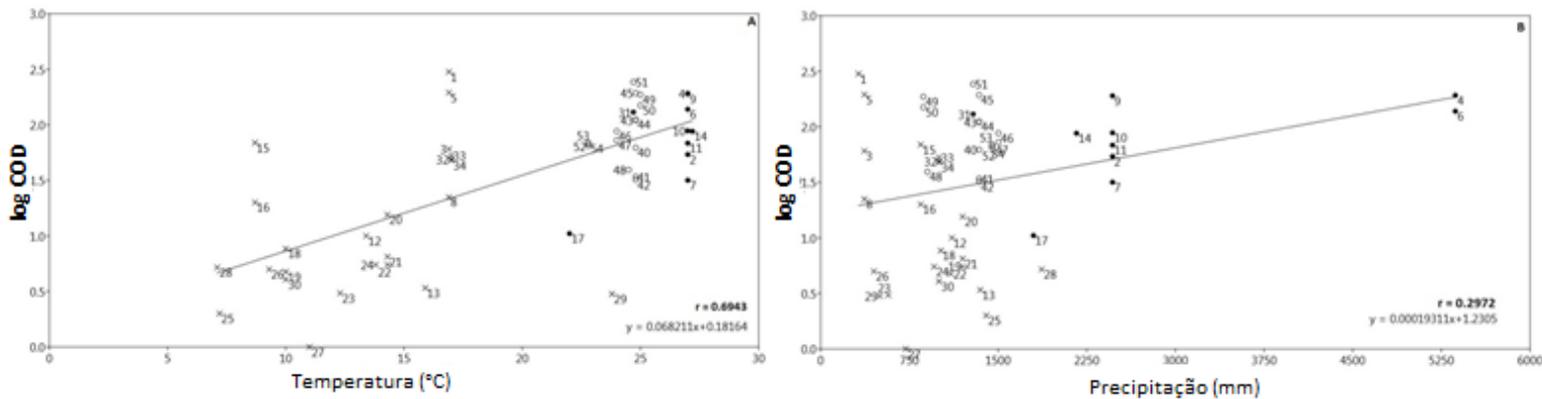


FIGURA 2.4. Modelo linear generalizado da quantidade de COD (log transformado) com valores de temperatura (A) e precipitação (B) em cavernas temperadas e tropicais. Cavernas temperadas são representadas por 'x', cavernas tropicais são representadas pelos pontos preenchidos e pontos abertos representam os novos dados das cavernas brasileiras amostradas neste estudo. Os números representam as cavernas listadas na Tabela 2.I. (r = correlação de Pearson).

Após a revisão dos estudos, destacamos a escassez de publicações sobre a quantidade de nutrientes em cavernas, neste caso o nitrogênio (NT) especificamente. Houve 13 estudos em cavernas temperadas e 7 estudos em cavernas tropicais localizadas nos EUA (8 cavernas), Jamaica (6), Israel (2), Itália (2), Brasil (1) e Espanha (1). A Tabela II mostra os dados detalhados sobre a quantidade de NT, temperatura e precipitação em cavernas temperadas e tropicais. Além disso, a Tabela 2.II apresenta

Tabela 2.1. Quantidade de carbono orgânico dissolvido na superfície (COD surf) e no subterrâneo (COD sub), temperatura e precipitação das cavernas avaliadas (dados revisados de publicações científicas e novos resultados em cavernas brasileiras). A tabela mostra os nomes das cavernas e cada número corresponde as cavernas mostradas na FIGURA 2.2.

Número Caverna	Caverna	País	COD sub (mgC/L)	COD surf (mgC/L)	Temperatura (°C)	Precipitação (mm)	Referência
1	Caverna Eagle Creek	EUA	300	-	16.9	320	Mizutani et al. 1991
2	Caverna Abingdon	Jamaica	54.1	-	27	2468	Mizutani et al. 1992
3	Caverna dos Morcegos	EUA	60.6	-	16.9	370	Mizutani et al. 1992
4	Brother Frader's Ratbat	Jamaica	192	-	27	5368	Mizutani et al. 1992
5	Cavernas Carlsbad	EUA	195	-	16.9	370	Mizutani et al. 1992
6	Cavernas Cornwall Barracks	Jamaica	138	-	27	5368	Mizutani et al. 1992
7	Caverna Falling	Jamaica	31.7	-	27	2468	Mizutani et al. 1992
8	Caverna New	EUA	22.3	-	16.9	370	Mizutani et al. 1992
9	Caverna Oxford	Jamaica	190	-	27	2468	Mizutani et al. 1992
10	Caverna Welsch RatBat	Jamaica	88.3	-	27	2468	Mizutani et al. 1992
11	Caverna Wondrous	Jamaica	68.3	-	27	2468	Mizutani et al. 1992
12	Caverna Marengo	EUA	10	30	13.4	1110	Beynen et al. 2002
13	Caverna Spring	EUA	3.4	-	15.9	1350	Graening and Brown 2003
14	Caverna Great	Malásia	87.36	478.1	27.2	2163	Hunt and Ruschworth 2003
15	Caverna Han	Bélgica	69	61	8.7	846	Ducarme et al. 2004
16	Caverna Nou Maulin	Bélgica	20	61	8.7	846	Ducarme et al. 2004
17	Caverna Santana	Brasil	10.49	34.9	22	1800	Cruz Jr et al. 2005
18	Caverna Organ	EUA	7.67	53.69	10	1016	Simon, Pipan and Culver 2007
19	Caverna Postojna-Olanina	Eslovênia	4.75	56	10	1100	Simon, Pipan and Culver 2007
20	Caverna Jiangjun	China	15.5	83	14.3	1200	Xie et al. 2008
21	Caverna Liangfeng	China	6.5	83	14.3	1200	Xie et al. 2008
22	Caverna Qixing	China	5.5	83	14.3	1200	Xie et al. 2008
23	Caverna Shihua	China	3.05	70	12.3	572	Ban et al. 2008
24	Caverna Altamira	Espanha	5.5	-	13.8	959	Jurado et al. 2009
25	Caverna Cataract	EUA	2	32.1	7.2	1400	Curry et al. 2009
26	Caverna Wind	USA	5	-	9.3	450	Chelius et al. 2009
27	Castanar de Ibor	Espanha	1	30	11	720	Jurado et al. 2010
28	Grotta della Foos	Itália	5.2	131	7.1	1869	Engel et al. 2013
29	Cavernas Kartchner	EUA	3	20	23.8	500	Ortiz et al. 2014
30	Caverna Herrerías	Espanha	4.06	47.6	10	1000	Meléndez et al. 2015
31	Caverna Catão	Brasil	130	241	24.7	1289	Paula et al. 2016
32	Caverna Lake	Austrália	49	100	17	1000	Dhami et al. 2018
33	Caverna Mammoth	Austrália	53	100	17	1000	Dhami et al. 2018
34	Caverna Moondyne	Austrália	48	100	17	1000	Dhami et al. 2018
40	Caverna Angélica	Brasil	62.2	74.83	24.8	1340	
41	Caverna São Bernardo II	Brasil	34.2	162.24	24.8	1340	
42	Caverna São Bernardo III	Brasil	32.05	81.43	24.8	1340	
43	Caverna Terra Ronca I	Brasil	110.1	1549.6	24.8	1340	
44	Caverna Terra Ronca II	Brasil	111.12	444.91	24.8	1340	
45	Caverna São Vicente II	Brasil	441.38	467.86	24.8	1340	
46	Caverna Russão	Brasil	87.49	105.91	24	1503	
47	Caverna Revolucionários	Brasil	72.48	114.56	24	1503	
48	Caverna Olhos D'água	Brasil	39.31	137.66	24.5	903	
49	Caverna Palmeiras	Brasil	227.36	231.79	25	868	
50	Caverna Altina	Brasil	149.5	120.12	25	868	
51	Caverna Ernesto Pereira	Brasil	242.78	242.78	24.7	1289	
52	Caverna Morro Preto	Brasil	64.37	185.92	22.8	1449	
53	Areias Quente	Brasil	68.57	141.73	22.8	1449	
54	Caverna Santana	Brasil	67.94	60.08	22.8	1449	

valores de N encontrados na superfície das cavernas (quando disponíveis), bem como a razão entre carbono orgânico e nitrogênio das amostras subterrâneas. Cavernas temperadas apresentaram uma média de 2,98% TN \pm 5,07 SD e cavernas tropicais (incluindo os novos dados) tiveram uma média de 7,59% TN \pm 5,89 SD. A quantidade de NT em cavernas temperadas diferiu significativamente dos valores de NT em cavernas tropicais ($p = 0,0460$). A maioria dos estudos avaliaram a quantidade de nitrogênio em manchas de guano (45%) e um número menor de estudos analisou a concentração de nitrogênio em água (35%), calcita (10%) e sedimento (10%).

Os procedimentos mais utilizados para quantificar o nitrogênio nos substratos foram o método de Kjeldah e equipamentos de análise por combustão. A relação C / N apresentou um valor médio de 9,77 \pm 15,83 nas cavernas temperadas e uma razão de 2,62 \pm 2,93 nas cavernas tropicais. A relação entre a quantidade de nitrogênio com as variáveis climáticas (temperatura e precipitação) em cavernas temperadas e tropicais é mostrada na FIGURA 2.5. Houve uma alta correlação entre a quantidade de nitrogênio e os dados de precipitação em cavernas temperadas e tropicais ($r = 0,9163$). No entanto, não houve uma forte correlação entre NT e temperatura (0,6991).

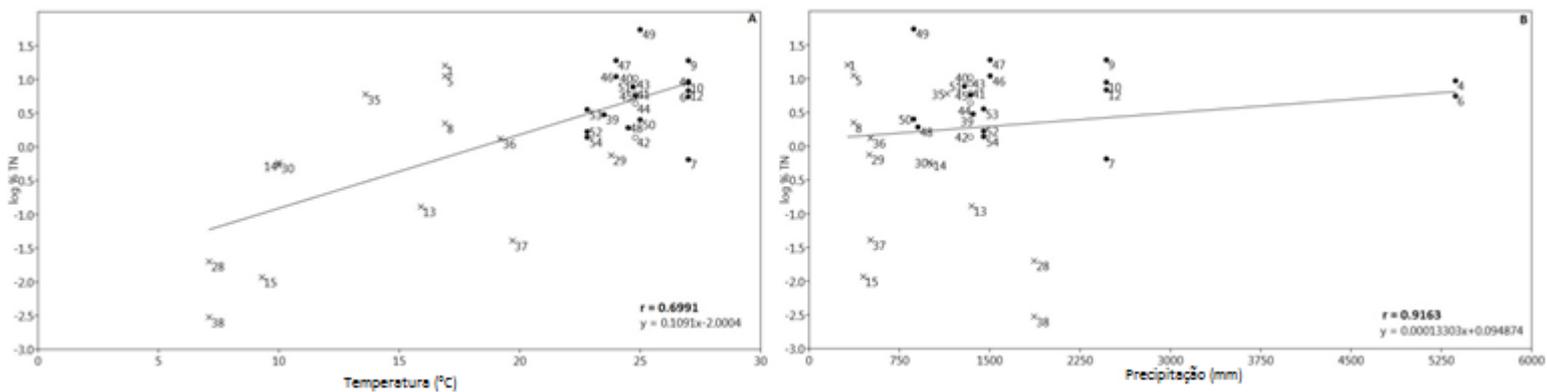


FIGURA 2.2. Modelo linear generalizado da quantidade de nitrogênio (log TN transformado) com valores de temperatura (A) e precipitação (B) em cavernas temperadas e tropicais. Cavernas temperadas são representadas por 'x', cavernas tropicais são representadas pelos pontos preenchidos e pontos abertos representam os novos dados das cavernas brasileiras amostradas neste estudo. Os números representam as cavernas listadas na Tabela 2.II. (r = correlação de Pearson).

Tabela 2.II. Quantidade de nitrogênio na superfície (N surf) e no subterrâneo (N sub), temperatura e precipitação das cavernas avaliadas (dados revisados de publicações científicas e novos resultados em cavernas brasileiras). A tabela mostra os nomes das cavernas e o número de cada caverna corresponde aos dados mostrados na FIGURA 2.2, junto com a referência usada.

Número Caverna	Caverna	País	N sub (mg/L)	N surf (mg/L)	Temperatura (°C)	Precipitação (mm)	C:N	Referência
1	Caverna Eagle Creek	EUA	16	-	16.9	320	1.87	Mizutani et al. 1991
4	Cavernas Brother Frader's Ratbat	Jamaica	9.32	-	27	5368	2.06	Mizutani et al. 1992
5	Cavernas Carlsbad	EUA	11.2	-	16.9	370	1.74	Mizutani et al. 1992
6	Cavernas Cornwall Barracks	Jamaica	5.54	-	27	5368	2.49	Mizutani et al. 1992
7	Cavernas Falling	Jamaica	0.65	-	27	2468	4.87	Mizutani et al. 1992
8	Cavernas New	EUA	2.23	-	16.9	370	2.14	Mizutani et al. 1992
9	Cavernas Oxford	Jamaica	19	-	27	2468	2.89	Mizutani et al. 1992
10	Caverna Welsch RatBat	Jamaica	8.83	-	27	2468	2.70	Mizutani et al. 1992
12	Caverna Wondrous	Jamaica	6.83	-	27	2468	1.64	Mizutani et al. 1992
13	Caverna Spring	EUA	0.13	-	15.9	1350	2.61	Graening and Brown 2003
14	Caverna Organ	EUA	0.53	2.52	10	1016	-	Simon and Benfield 2002
15	Caverna Wind	EUA	0.0117	-	9.3	450	42.73	Chelius et al. 2009
28	Grotta della Foos	Itália	0.02	-	7.1	1869	26.00	Engel et al. 2013
29	Cavernas Kartchner	EUA	0.75	0.16	23.8	500	0.40	Ortiz et al. 2014
30	Caverna Herrerías	Espanha	0.58	0.39	10	1000	0.70	Meléndez et al. 2015
35	Caverna Saltpeter	EUA	6	-	13.6	1145	-	Carmichael et al. 2013
36	Caverna Middle	Israel	1.32	-	19.2	510	-	Sandler and Heaton 1997
37	Caverna Hyena	Israel	0.0408	-	19.7	510	-	Sandler and Heaton 1997
38	Bus della Genziana	Itália	0.003	0.067	7.1	1869	-	Engel et al. 2013
39	Lapa Nova	Brasil	3	-	23.5	1361	-	Pelegrini and Ferreira 2013
40	Caverna Angélica	Brasil	10.49	11.9	24.8	1340	0.59	
41	Caverna São Bernardo II	Brasil	6.1	14.2	24.8	1340	0.55	
42	Cavernas São Bernardo III	Brasil	1.37	3.799	24.8	1340	2.33	
43	Caverna Terra Ronca I	Brasil	8.43	12.5	24.8	1340	1.30	
44	Caverna Terra Ronca II	Brasil	4.38	20.6	24.8	1340	2.53	
45	Caverna São Vicente II	Brasil	5.71	146.7	24.8	1340	7.72	
46	Caverna Russão	Brasil	11	9.7	24	1503	0.79	
47	Caverna Revolucionários	Brasil	19.02	8.8	24	1503	0.38	
48	Caverna Olhos D'água	Brasil	1.92	4.4	24.5	903	2.04	
49	Caverna Palmeiras	Brasil	54.5	72.6	25	868	0.41	
50	Caverna Altina	Brasil	2.52	2.4	25	868	5.93	
51	Caverna Ernesto Pereira	Brasil	7.73	74.8	24.7	1289	3.14	
52	Caverna Morro Preto	Brasil	1.68	26.46	22.8	1449	3.83	
53	Cavernas Ressurgência das Areias Quente	Brasil	3.57	8.462	22.8	1449	1.92	
54	Caverna Santana	Brasil	1.39	6.155	22.8	1449	4.88	

2.5 DISCUSSÃO

Estudos pioneiros sobre o fluxo de energia começaram na Flórida, no sistema cárstico de Silver Spring (Odum, 1957). Após este estudo clássico, Rouch (1977) realizou um longo trabalho sobre o fluxo de carbono na Bacia Baget, um pequeno sistema cárstico de drenagem na França, e Gilbert (1986) utilizou o modelo de trabalho de Rouch e quantificou o fluxo de carbono orgânico proveniente da bacia de drenagem de Dorvan-Cleyzieu, na França. Entre as principais descobertas de Gilbert destaca-se que o fluxo de carbono orgânico dissolvido (COD) é mais variável do que de carbono orgânico

particulado (COP). Logo após esses estudos pioneiros, diversos estudos têm avaliado a quantidade e a qualidade do carbono orgânico em cavernas temperadas (Mizutani et al., 1991; Mizutani et al., 1992; Beynen et al., 2002; Graening & Brown, 2003; Ducarme et al., 2004; Simon, Pipan & Culver, 2007, entre outros).

Estudos sobre a quantidade e qualidade da matéria orgânica (carbono e nitrogênio) em cavernas tropicais iniciaram mais tarde. Embora Mizutani et al. (1991) iniciaram estudos sobre a quantidade de energia em cavernas tropicais, apenas com o trabalho de Cruz Jr et al (2005) houve uma forte discussão sobre a quantidade e qualidade do carbono orgânico. Além disso, usando metodologias precisas para qualificar o carbono orgânico, os pesquisadores observaram a influência dos parâmetros hidrológicos e climáticos na variabilidade espacial e temporal do carbono orgânico no interior de uma caverna tropical. No entanto, nas últimas três décadas, houve mais do que o dobro de estudos sobre energia e nutrientes em cavernas temperadas do que em cavernas tropicais.

Devido ao maior número de estudos em cavernas temperadas e à escassez de trabalhos que discutem o fluxo de energia e nutrientes em cavernas tropicais, as cavernas são consideradas, de modo geral, ambientes oligotróficos extremos, definidos por conterem menos de 2 mg de carbono orgânico por litro de substrato (Barton & Jurado, 2007). Vários nutrientes, como nitrogênio, enxofre, fósforo e ferro, são considerados fatores limitantes nesses habitats subterrâneos (Goldscheider et al., 2006). No entanto, mais estudos devem ser realizados em cavernas tropicais para generalizar essa característica para todas as cavernas do mundo. Portanto, deve-se ter cautela ao discutir o nível trófico do ambiente subterrâneo. A ausência de luz solar nas cavernas e, conseqüentemente ausência de produção primária fotossintética, faz com que as redes alimentares das cavernas dependam exclusivamente de detritos particulados ou matéria orgânica dissolvida originária da superfície (Culver, 1982). As vias quimioautotróficas também podem suportar algumas teias alimentares das cavernas, embora poucas cavernas com insumos significativos de substâncias químicas necessárias aos quimioautótrofos tenham sido estudadas (Sarbu et al., 1996; Hose et al., 2000).

Avaliar se as cavernas tropicais são oligotróficas representa uma significativa mudança de paradigma. Segundo Hunt & Rushworth (2003), as cavernas tropicais e

temperadas apresentam diferenças nas influências do ambiente externo, pois a superfície desses locais possui diferenças na vegetação e composição da fauna visitante. Os autores argumentam que a importância da diversidade de plantas na superfície e da presença animais visitantes (trogloxenos) portando matéria orgânica é muito maior em cavernas tropicais do que em cavernas temperadas. Isso ocorre claramente, já que o número de organismos que podem ser vetores de matéria orgânica é maior nas zonas tropicais do que nas zonas temperadas. O processo de entrada de matéria orgânica pode ser controlado por dois fatores: 1) proximidade de aberturas para o ambiente externo e entrada de matéria orgânica por enxurradas ou inundações de rios; 2) o forte fluxo de guano dentro da caverna. Em alguns casos, como em locais mais profundos das cavernas tropicais, há uma maior quantidade de carbono orgânico e nutrientes. Isto pode ser explicado pela maior taxa de acumulação de matéria orgânica, devido a uma menor taxa de decomposição por organismos (micro e macro) decompositores. É notável que os ecossistemas cavernícolas considerados com maior biodiversidade são aqueles que se desenvolveram nos trópicos, onde há insumos substanciais de fontes de compostos orgânicos derivados do meio externo, além da presença recorrente de fezes de morcego, grilos e outros animais subterrâneos (Ferreira & Martins, 1998), além da presença de raízes penetrantes de plantas da superfície (Jasinska et al., 1996). As cavernas tropicais apresentam maior disponibilidade de alimento para suportar uma maior diversidade de espécies e assim permitir uma rede trófica mais complexa neste habitat (Silva et al., 2011). Esses mesmos padrões, ou seja, as cavernas tropicais apresentarem uma quantidade maior de carbono orgânico do que cavernas temperadas, podem ser observados nos estudos revisados e nos novos dados apresentados neste trabalho. Infelizmente, a relação entre a distância da entrada da caverna e a quantidade de matéria orgânica não foi considerada neste estudo devido à falta desta informação nos artigos revisados.

Em geral, as cavernas temperadas mostram uma quantidade de carbono e nitrogênio 2,8 e 2,54 vezes menor, respectivamente, do que as cavernas tropicais. A relação C/N variou de 0,40 a 7,72, exceto na Caverna Wind e Grotta della Foss. Embora os dados da relação C/N não mostrem grandes diferenças nos valores entre as cavernas tropicais e temperadas, é possível observar uma menor variação deste parâmetro nas cavernas temperadas. Engel et al. (2001) mediram as relações entre C/ N de compostos

orgânicos na Caverna Cesspool, EUA, e relataram uma razão C/N entre 13,5 e 16,06 para biofilmes microbianos, encontrados em corpos d'água e nas paredes das rochas respectivamente. Engel e colegas usaram essas razões juntamente com as medidas da produção autotrófica *versus* heterotrófica para concluir que os compostos orgânicos na Caverna Cesspool têm baixa qualidade nutricional. Geralmente, a relação C/N em teias alimentares baseadas em organismos fotossintéticos é de aproximadamente 15 (chegando até > 700) e baixas relações C/N são indicativos de uma fonte de alimento de alta qualidade para organismos detritívoros (Taylor & Roff, 1984). Relações entre C/N superiores a 5 indicam uma oferta abundante de carbono, mas uma redução potencial na disponibilidade de nitrogênio, devido ao armazenamento desse nutriente na biomassa microbiana e a re-mineralização de nitrogênio por microrganismos (Engels et al., 2013). Dada esta faixa de C/N, a qualidade da matéria orgânica para organismos detritívoros é maior em algumas cavernas tropicais do que em cavernas temperadas (como a caverna Revolucionários, caverna Palmeiras, caverna São Bernardo II e caverna Angélica).

A relação entre carbono e nitrogênio nos ambientes superficiais e subterrâneos (carbono orgânico de superfície / carbono orgânico subterrâneo e nitrogênio de superfície / nitrogênio subterrâneo) destacou que as cavernas localizadas na zona temperada têm em média 12,25 vezes mais carbono orgânico e 6,99 vezes mais nitrogênio na superfície do que no ambiente subterrâneo. Por outro lado, as cavernas tropicais apresentam uma menor desproporção da quantidade de carbono e nitrogênio em comparação com a superfície e no interior das mesmas (2,89 vezes mais carbono e 5,08 vezes mais nitrogênio na superfície). Diferenças na proporção de nutrientes indicam quanto a quantidade de carbono e nitrogênio dentro da caverna difere do ambiente superficial. Valores mais altos, como observado em cavernas temperadas, mostram que a diferença na quantidade de nutrientes (carbono e nitrogênio) entre ambientes subterrâneos e superficiais é muito maior que em cavernas tropicais. Assim, é mais claro observar uma condição oligotrófica no ambiente subterrâneo em relação à superfície em cavernas temperadas do que em cavernas tropicais. Outros pesquisadores enfatizaram, em seus estudos, a grande diferença de energia e nutrientes em cavernas temperadas em comparação com a superfície (Simon & Benfield, 2002; Batiot et al., 2003; Ban et al., 2008), mas nenhum desses estudos fizeram essa discussão em cavernas

tropicais. Portanto deve ser tomado um grande cuidado na classificação da caverna tropical como ambiente oligotrófico extremo considerando a proporção de carbono e nitrogênio entre os ambientes subterrâneos e superficiais e a relação C/N nestes habitats. O carbono e o nitrogênio são oxidativos e controlados pelos microrganismos, e são sensíveis as mudanças no clima, em particular à temperatura e à precipitação (McKnight et al., 1985). Modelos lineares generalizados e a correlação de Pearson neste artigo mostram uma correlação positiva entre carbono e temperatura. Assim, cavernas localizadas em ambientes mais quentes geralmente têm uma quantidade maior de COD. A atividade microbiana no substrato aumenta com o aumento da temperatura, levando à maior produção de fragmentos moleculares de COD solúveis. Laiz et al. (1999) observaram que durante o inverno, o COD na água de gotejamento na caverna Altamira raramente atingia 5 mgC L^{-1} , mas na primavera, com temperaturas mais altas, a concentração de COD aumentou consideravelmente (até 2200 mgC L^{-1}) devido à maior taxa de degradação microbiana de detritos vegetais no solo superficial. Durante este período, pode ter ocorrido uma taxa mais elevada de oxidação microbiana e degradação de ligninas que são dissolvidas em água e transportadas para o interior da caverna.

Por outro lado, a precipitação e o nitrogênio, apresentaram uma alta correlação indicando que a entrada de nitrogênio nas cavernas é mais influenciada pela via de transporte do que pela temperatura externa. Isso indica que as condições climáticas podem influenciar indiretamente na qualidade e quantidade de matéria orgânica dissolvida em cavernas tropicais e temperadas. Beynen et al. (2002) argumenta em seu trabalho que os importantes controles sobre a quantidade de substâncias orgânicas que atingem a caverna são a flutuação sazonal no volume das águas da chuva e a capacidade dos solos em fornecer matéria orgânica. Na caverna Shihua, Ban et al. (2008) demonstraram que durante a estação seca (outono-inverno) houve acúmulo de serapilheira na superfície do solo, sendo decomposta por microrganismos. O aumento no acúmulo de serapilheira na superfície do solo, e conseqüente aumento na taxa de decomposição microbiana, resulta em uma maior concentração de nitrogênio da superfície. Após o primeiro evento de chuva forte, esses compostos nitrogenados são lixiviados para o interior da caverna, por meio de enxurradas, inundações de rios subterrâneos e água de gotejamento.

Este estudo é pioneiro ao compilar dados já publicados sobre a quantidade e qualidade de matéria orgânica em cavernas temperadas e tropicais, além de apresentar novos resultados obtidos em cavernas tropicais. Uma discussão mais aprofundada é realizada sobre as diferenças de energia e nutrientes entre cavernas tropicais e temperadas alertando sobre a generalização em caracterizar todas as cavernas como ambientes oligotróficos extremos, especialmente nas zonas tropicais. Em geral, ambientes superficiais e subterrâneos em zona tropical apresentam maior quantidade de matéria orgânica do que em zonas temperadas. Além disso, as cavernas tropicais mostram uma diferença menor na quantidade de matéria orgânica dissolvida em relação ao ambiente da superfície do que as cavernas temperadas, o que também é evidenciado pela relação C / N desses habitats. Finalmente, a influência das condições climáticas indica que a temperatura da superfície está mais relacionada à decomposição da matéria orgânica em compostos solúveis (como o COD, influenciando a entrada de energia em cavernas) e a precipitação é um fator importante no transporte de compostos nitrogenados para ambientes subterrâneos.

2.6 REFERÊNCIAS

Auler A., Farrant A.R. (1996) *A brief introduction to karst and caves in Brazil*. Proceedings of the University of Bristol Speleological Society, 20, 187-200.

Auler A.S., Rubbioli E., Brandi R. (2001) *As grandes cavernas do Brasil*. Grupo Bambuí de Pesquisas Espeleológicas.

Ban F., Pan G., Zhu J., Cai B., Tan M. (2008) *Temporal and spatial variations in the discharge and dissolved organic carbon of drip waters in Beijing Shihua Cave, China*. Hydrological Processes: An International Journal, 22(18), 3749-3758.

Bartlett R.J., Ross D.N. (1988) *Colorimetric determination of oxidizable carbon in acid soil solutions*. Soil Science Society of America Journal, 52, 1191-1192.

Barton H.A., Jurado V. (2007) *What's up down there? Microbial diversity in caves*. Microbe. 2, 132-138.

Batiot C., Liñán C., Andreo B., Emblanch C., Carrasco F., Blavoux B. (2003) Use of total organic carbon (TOC) as tracer of diffuse infiltration in a dolomitic karstic system: The Nerja Cave (Andalusia, southern Spain). *Geophysical research letters*, 30(22), 2179.

Beynen P.E., Schwarcz H.P., Ford D.C., Timmins G.T. (2002) *Organic substances in cave drip waters: studies from Marengo Cave, Indiana*. *Canadian Journal of Earth Sciences*, 39(2), 279-284.

Bichuette M.E., Trajano E. (2003) *Epigeal and subterranean ichthyofauna from the São Domingos karst area, Upper Tocantins River basin, Central Brazil*. *Journal of Fish Biology*, 63(5), 1100-1121.

Bichuette M.E., Trajano E. (2006) *Morphology and distribution of the cave knifefish *Eigenmannia vicentespelaea* Triques, 1996 (Gymnotiformes: Sternopygidae) from Central Brazil, with an expanded diagnosis and comments on subterranean evolution*. *Neotropical Ichthyology*, 4(1), 99-105.

Bremner J.M., Mulvaney C.S. (1982) *Total nitrogen*. In: *Page AL, Methods of soil analysis*. Madison: American Society on Agronomy, 595-624.

Campos J.E.G., Dardenne M.A. (2017) *Estratigrafia e sedimentação da Bacia Sanfranciscana: uma revisão*. *Revista Brasileira de Geociências*, 27(3), 269-282.

Carmichael S.K., Carmichael M.J., Strom A., Johnson K.W., Roble L.A., Gao Y., Bräuer S.L. (2013) *Sustained anthropogenic impact in Carter Saltpeter Cave, Carter County, Tennessee and the potential effects on manganese cycling*. *Journal of Cave and Karst Studies*, 75(3), 189.

Chelius M.K., Beresford G., Horton H., Quirk M., Selby G., Simpson R.T., ... Moore J.C. (2009) *Impacts of alterations of organic inputs on the bacterial community within the sediments of Wind Cave, South Dakota, USA*. *International Journal of Speleology*, 38(1), 1.

Cruz Jr F.W., Karmann I., Magdaleno G.B., Coichev N., Viana Jr O. (2005) *Influence of hydrological and climatic parameters on spatial-temporal variability of fluorescence intensity and DOC of karst percolation waters in the Santana Cave System, Southeastern Brazil*. *Journal of Hydrology*, 302(1-4), 1-12.

Culver D.C. (1982) *Evolution and ecology* (p. 223). Cambridge, Mass., Harvard University Press.

Culver D.C., Pipan T. (2009) *The biology of caves and other subterranean habitats*. OUP Oxford.

Curry M.D., Boston P.J., Spilde M.N., Baichtal J.F., Campbell A.R. (2009) *Cottonballs, a unique subaqueous moonmilk, and abundant subaerial moonmilk in Cataract Cave, Tongass National Forest, Alaska*. *International Journal of Speleology*, 38(2), 3.

Ducarme X., André H.M., Wauthy G., Lebrun P. (2004) *Comparison of endogeic and cave communities: microarthropod density and mite species richness*. *European Journal of Soil Biology*, 40(3-4), 129-138.

Engel S., Porter M.L., Kinkle B.K., Kane T.C. (2001) *Ecological assessment and geological significance of microbial communities from Cesspool Cave, Virginia*. *Geomicrobiology Journal*, 18(3), 259-274.

Engel A.S., Paoletti M.G., Beggio M., Dorigo L., Pamio A., Gomiero T., ... Squartini A. (2013) *Comparative microbial community composition from secondary carbonate (moonmilk) deposits: implications for the Cansiliella servadeii cave hygropetric food web*. *International Journal of Speleology*, 42(3), 181.

Ferreira R.L., Martins R.P. (1998) *Diversity and distribution of spiders associated with bat guano piles in Morrinho cave (Bahia State, Brazil)*. *Diversity and distributions*, 235-241.

Ford D., Williams P. (2007) *Introduction to Karst*. *Karst Hydrogeology and Geomorphology*, 1-8.

Genthner C, Ferrari J.A., Karman I. (2003) *Identificação das áreas de recarga de fontes cársticas com o uso do traçador rodamina FWT (área carbonática lajeado – bombas, Iporanga-SP)*. *Revista do Instituto Geológico*, 24(1-2), 11–23.

Gibert J. (1986) *Ecologie d'un système karstique jurassien. Hydrogéologie, de rive animale, transits de matières, dynamique de la population de Niphargus (Crustace Amphipode)*. *Memoires de Biospeologie*, 13, 1–379.

Goldscheider N., Hunkeler D., Rossi P. (2006) *Microbial biocenoses in pristine aquifers and an assessment of investigative methods*. Hydrogeology Journal, 14(6), 926-941.

Graening G.O., Brown A.V. (2003) Ecosystem dynamics and pollution effects in an Ozark cave stream. Journal of the American Water Resources Association, 39(6), 1497-1507.

Harmer O. (2009) PAST: Paleontological Statistical. Software version, 1.

Hose L.D., Palmer A.N., Palmer M.V., Northup D.E., Boston P.J., DuChene H.R. (2000) *Microbiology and geochemistry in a hydrogen-sulphide-rich karst environment*. Chemical Geology, 169(3-4), 399-423.

Hunt C.O., Rushworth G. (2005) *Pollen taphonomy and airfall sedimentation in a tropical cave: the West Mouth of The Great Cave of Niah in Sarawak, Malaysian Borneo*. Journal of Archaeological Science, 32(3), 465-473.

Huppopp K. (2000) *How do cave animals cope with the food scarcity in caves?* Ecosystems of the world, 159-188.

Jasinska E.J., Knott B., McComb A.J. (1996) *Root mats in ground water: a fauna-rich cave habitat*. Journal of the North American Benthological Society, 15(4), 508-519.

Jenny H. (1950) *Causes of the high nitrogen and organic matter content of certain tropical forest soils*. Soil Science, 69(1), 63-70.

Jobbágy E.G., Jackson R.B. (2000) *The vertical distribution of soil organic carbon and its relation to climate and vegetation*. Ecological applications, 10(2), 423-436.

Jurado V., Fernandez-Cortes A., Cuezva S., Laiz L., Cañaveras J.C., Sanchez-Moral S., Saiz-Jimenez C. (2009) *The fungal colonisation of rock-art caves: experimental evidence*. Natur wissen schaften, 96(9), 1027-1034.

Jurado V., Laiz L., Rodriguez-Nava V., Boiron P., Hermosin B., Sanchez-Moral S., Saiz-Jimenez C. (2010) *Pathogenic and opportunistic microorganisms in caves*. International Journal of Speleology, 39(1), 15-24.

Karmann I., Sánchez L.E. (1979) *Distribuição das rochas carbonáticas e províncias espeleológicas do Brasil*. Espeleo-tema, 13, 105-167.

Laiz L., Groth I., Gonzalez I., Sáiz-Jiménez C. (1999) *Microbiological study of the dripping waters in Altamira cave (Santillana del Mar, Spain)*. Journal of Microbiological Methods, 36(1-2), 129-138.

McKnight D., Thurman E.M., Wershaw R.L., Hemond H. (1985) *Biogeochemistry of aquatic humic substances in Thoreau's Bog, Concord, Massachusetts*. Ecology, 66(4), 1339-1352.

Mizutani H., McFarlane D.A., Kabaya Y. (1991) *Nitrogen and carbon isotope study of bat guano core from Eagle Creek Cave, Arizona, USA*. Journal of the Mass Spectrometry Society of Japan, 40(1), 57-65.

Mizutani H., McFarlane D.A., Kabaya Y. (1992) *Carbon and nitrogen isotopic signatures of bat guanos as record of past environments*. Journal of the Mass Spectrometry Society of Japan, 40(1), 67-82.

Ortiz M., Legatzki A., Neilson J.W., Fryslie B., Nelson W.M., Wing R.A., ... Maier R.M. (2014) *Making a living while starving in the dark: metagenomic insights into the energy dynamics of a carbonate cave*. The ISME journal, 8(2), 478.

Pellegrini T.G., Ferreira R.L. (2013) *Structure and interactions in a cave guano-soil continuum community*. European Journal of Soil Biology, 57, 19-26.

Sandler A., Heaton T.H. (1997) *Source of nitrate and hydrologic origin of an unusual cave niter dripstone; Israel*. The Journal of Geology, 105(6), 754-762.

Sarbu S.M., Kane T.C., Kinkle B.K. (1996) *A chemoautotrophically based cave ecosystem*. Science, 272(5270), 1953-1955.

Silva M.S., Nicolau J.C., Ferreira R.L. (2011) *Comunidades de invertebrados terrestres de três cavernas quartzíticas no Vale do Mandembe, Luminárias, MG*. Espeleo-tema, 22(1), 155-167.

Simon K.S., Benfield E.F. (2002) *Ammonium retention and whole-stream metabolism in cave streams*. Hydrobiologia, 482(1-3), 31-39.

Simon K.S., Benfield E.F., Macko S.A. (2003) *Food web structure and the role of epilithic films in cave streams*. Ecology, 84, 2395–2406.

Simon K.S., Pipan T., Culver D.C. (2007) *A conceptual model of the flow and distribution of organic carbon in caves*. Journal of Cave and Karst Studies, 69(2), 279–284.

Taylor B.R., Roff J.C. (1984) *Use of ATP and carbon: nitrogen ratio as indicators of food quality of stream detritus*. Freshwater Biology, 14(2), 195-201.

Trajano E., Secutti S., Bichuette M.E. (2009) *Natural history and population data of fishes in caves of the Serra do Ramalho karst area, Middle São Francisco basin, northeastern Brazil*. Biota Neotropica, 9(1), 129-134.

Trajano E., Bichuette M.E. (2010) *Diversity of Brazilian subterranean invertebrates, with a list of troglomorphic taxa*. Subterranean Biology, 7, 1-16.

White W.B. (2002) *Karst hydrology: recent developments and open questions*. Engineering geology, 65(2-3), 85-105.

Xie X., Wang S., Zhou Y., Luo W. (2008) *Three-dimensional fluorescence spectral characteristics of dissolved organic carbon in cave drip waters and their responses to environment changes: Four cave systems as an example in Guizhou Province, China*. Chinese Science Bulletin, 53(6), 884-889.

CAPÍTULO 3:

DIFERENÇAS NAS DINÂMICAS DA BIOMASSA MICROBIANA DE ACORDO COM A DISPONIBILIDADE DE NUTRIENTES EM CAVERNAS TROPICAIS (PARQUE ESTADUAL DE TERRA RONCA, GOIÁS, BRASIL)

3.1 RESUMO

Poucos estudos têm avaliado o nível trófico e a dinâmica da biomassa microbiana na imobilização de carbono e nitrogênio em cavernas tropicais. O objetivo deste estudo foi analisar a dinâmica da biomassa microbiana em quatro cavernas tropicais do Parque Estadual da Terra Ronca: cavernas Angélica, São Bernardo, Terra Ronca I e Terra Ronca II. Variáveis físicas (temperatura, umidade do ar e umidade do substrato), químicas (pH, carbono orgânico dissolvido e nitrogênio total) e microbiológicas (carbono e nitrogênio da biomassa microbiana, respiração microbiana e quociente metabólico) foram estimados na estação seca e chuvosa. Carbono orgânico dissolvido (COD) e nitrogênio total (TN) apresentaram valores mínimos de 44.16 g kg⁻¹ e 0.008 g kg⁻¹, respectivamente. Carbono e nitrogênio da biomassa microbiana (CBM e NBM) foram maiores na superfície do que nas áreas internas das cavernas. Valores mais baixos de NBM foram encontrados na caverna Terra Ronca II (1.33 mgN kg⁻¹) e maiores valores na caverna Angélica (100.25 mgN kg⁻¹). Respiração microbiana e quociente metabólico apresentaram variações semelhantes às encontradas para COD e CMB, com maiores valores na superfície na estação chuvosa. As cavernas São Bernardo, Terra Ronca I e Terra Ronca II apresentaram maiores valores de NT e NBM na estação chuvosa do que na seca. Por outro lado, a caverna Angélica apresentou maiores quantidades de NT e menores valores de NBM na estação seca. Estes resultados, juntamente com os valores de COD, TN e respiração microbiana, indicam uma maior imobilização de carbono e nitrogênio na estação chuvosa. Este estudo conclui que a dinâmica da biomassa microbiana pode ser um parâmetro importante para avaliar a disponibilidade de nutrientes em uma caverna. Portanto as cavernas estudadas mostraram diferentes dinâmicas ambientais em relação à decomposição da matéria orgânica, o que permite considerá-las únicas e com características específicas.

3.2 INTRODUÇÃO

Cavernas carbonáticas são habitats em paisagens cársticas onde a água superficial penetra na rocha solúvel até o subsolo e flui em uma rede de passagens subterrâneas (Ford & Willians, 2013). Embora os regimes de fluxo hidrológico, a geometria das bacias hidrográficas, a geoquímica e a geologia diferem entre as áreas cársticas (Simon, Pipan e Culver, 2007; Bonacci, Pipan e Culver, 2008), muitas cavernas

têm características semelhantes e condições ambientais estáveis, como temperatura e umidade do ar (Hahn & Fuchs, 2009; Griebler et al., 2010).

Muitos pesquisadores consideram as cavernas temperadas como ambientes oligotróficos extremos (< 5 mgC/L) (Engel, 2007). A ausência parcial ou total de luz em áreas mais distantes da entrada e a limitação de recursos contribuem para a singularidade desses locais, principalmente do ponto de vista microbiológico, como a ausência de organismos fototróficos. No entanto, pouco se sabe sobre o fluxo de nutrientes nos sistemas subterrâneos (Gilbert, 1986; Simon, Benfield & Macko, 2003), restringindo a discussão sobre a limitação de recursos neste ecossistema. Portanto, pesquisas recentes em cavernas tropicais mostram que ambientes subterrâneos podem não ser limitados pela entrada de energia (Paula et al., 2016) pois as cavernas podem receber um grande aporte de matéria orgânica por meio de água de gotejamento, inundações de rios subterrâneos e pela entrada de animais troglófitos e suas excretas (Jurado et al., 2010).

Os microrganismos são componentes importantes de todos os ecossistemas subterrâneos (Chapelle, 2000; Griebler & Lueders, 2009). Nesses ambientes, eles são agentes-chave na dinâmica do fluxo de nutrientes (Simon, Pipan & Culver, 2007) e podem regular reações químicas que causam dissolução e precipitação mineral (Engel & Randall, 2011; Lian, Yuan & Liu, 2011). Alguns estudos em cavernas marinhas e aquáticas mostraram alta atividade microbiana nos estágios iniciais da decomposição da matéria orgânica, a qual se correlacionou com o aumento da respiração microbiana (Fichez, 1991, Graening & Brown, 2003). Outros estudos destacaram a importância da comunidade microbiana como organismos chave na base da cadeia alimentar do ambiente subterrâneo e nos processos de decomposição (Graening & Brown, 2003; Paula et al., 2016). Parâmetros microbianos como atividade enzimática, biomassa e respiração microbiana podem ser usados como indicadores sensíveis para monitorar mudanças em ambientes subterrâneos (Kennedy & Papendick, 1995; Matsuoka, Mendes & Loureiro, 2003).

A biomassa microbiana é um componente vivo que geralmente compreende de 1% a 5% da matéria orgânica total do solo e desempenha um papel crítico na fertilidade do solo devido à sua taxa de *turnover* relativamente rápida (Jenkinson & Ladd, 1981). As características físico-químicas do solo têm um grande impacto na sua biomassa

microbiana e podem ser usadas para medir a qualidade ambiental (Parr & Papendick, 1997), mas pode levar anos para que esses parâmetros façam mudanças significativas no meio ambiente. Por outro lado, as alterações microbiológicas e bioquímicas são muito sensíveis a pequenas mudanças nas condições ambientais e, assim, fornecem informações mais precisas e imediatas sobre a qualidade do ambiente, porque a atividade microbiana tem uma influência direta na estabilidade do ecossistema (Spohn, 2015).

A respiração microbiana pode ser considerada outro parâmetro microbiano importante em ecossistemas, como os ambientes subterrâneos. Grandes quantidades de carbono orgânico (C) são transformadas, armazenadas e respiradas por microrganismos. Assim, a percepção dos fatores que controlam a taxa de respiração por unidade de biomassa microbiana é crucial para a compreensão do ciclo de carbono terrestre (Zhou et al., 2014). A taxa de respiração por unidade de carbono da biomassa microbiana - denominado quociente metabólico (qCO_2) - é um bom indicador utilizado como medida do estado de qualidade dos microrganismos terrestres (Anderson & Domsh, 1993).

A área de estudo deste trabalho, o Parque Estadual Terra Ronca, possui um complexo sistema de drenagem superficial e subterrânea, com grande potencial de transporte de matéria orgânica, causando acúmulos de detritos em algumas cavidades. Devido a essa condição, suas cavidades têm uma alta riqueza de organismos subterrâneos terrestres e aquáticos (Pinto-da-Rocha, 1995; Rheims & Pelegatti-Franco, 2003; Trajano et al., 2003). No entanto, não há estudos sobre a dinâmica da biomassa microbiana neste sistema de drenagem. Assim, o objetivo do presente trabalho foi estudar quatro cavernas tropicais do Parque Estadual do Terra Ronca afim de avaliar a dinâmica da biomassa microbiana e sua relação com a disponibilidade de nutrientes (carbono e nitrogênio).

3.3 MATERIAL E MÉTODOS

LOCAL DE ESTUDO

O Parque Estadual de Terra Ronca (PETeR) ($46^{\circ}100'$ - $46^{\circ}300'S$; $13^{\circ}300'$ - $13^{\circ}500'$ W), localizado na cidade de São Domingos (Goiás, Brasil), possui um grande sistema subterrâneo formado por rios que chegam do Planalto da Serra Geral, caracterizado por

sua origem nos arenitos da Formação Urucuia (Cretáceo). Grandes cavernas se desenvolveram ao longo das trajetórias desses rios passando por formações carbonáticas neoproterozóicas do grupo Bambuí (Guyot et al., 1996). PETeR é uma área cárstica atravessada por riachos paralelos que correm para o oeste, para se juntar ao rio Paraná, um afluente do Rio Tocantins, na Bacia do Amazonas. Os principais rios e alguns de seus afluentes do PETeR cruzam a superfície e entram nas cavernas através dos sumidouros, passam por centenas a milhares de metros através de condutos subterrâneos e emergem nas ressurgências. Estes rios são típicos de cabeceira, com fundos rochosos e com cascalho, seixos, pedregulhos, águas transparentes e bem oxigenadas. A área de estudo está inserida no domínio fitogeográfico do Cerrado. O clima da área de estudo é tropical semi-úmido com precipitação média anual de aproximadamente 1270 mm yr⁻¹ registrado na estação meteorológica de São Domingos-GO (Moquet et al., 2016) próximo ao PETeR (aproximadamente 40 km da entrada do PETeR). A estação chuvosa estende-se de novembro a abril e a precipitação cessa entre maio e outubro (estação seca). As inundações dos rios podem tornar algumas cavernas parcialmente ou totalmente inacessíveis na estação chuvosa (novembro a abril). Devido à alta capacidade de carreamento desses rios, grandes quantidades de matéria orgânica, de detritos vegetais e da fauna associada, se acumulam dentro dessas cavernas.

Quatro cavernas foram estudadas: Caverna Angélica (caverna A), Caverna São Bernardo (caverna S), Caverna Terra Ronca I (caverna T) e Caverna Terra Ronca II (caverna TR). A Caverna Angélica (13°31'29" S e 46°23'07" W) é atravessada pelo rio Angélica e é uma das maiores cavernas do Brasil, com uma extensão de aproximadamente 14 km e uma entrada de cerca de 10,0 m de altura (FIGURA 3.1). A Caverna Angélica faz parte de um enorme sistema de drenagem subterrânea chamado Angélica-Bezerra (Bichuette et al., 2015). A Caverna São Bernardo (13.81°S e 46.35°W) (FIGURA 3.2), é atravessada pelos rios São Bernardo e Palmeiras (Sistema São Bernardo - Palmeiras). A entrada da caverna São Bernardo é uma dolina localizada a uma altitude de 631 metros. Esta caverna possui uma grande diversidade de macrofauna aquática e terrestre com espécies endêmicas e troglomórficas, sendo essa caverna considerada um *spot* da biodiversidade. (Trajano et al., 2003; Bichuette et al., 2015). As Cavernas Terra Ronca I e Terra Ronca II fazem parte do sistema Terra Ronca-Malhada (FIGURA 3.3). Milhares de anos atrás um deslizamento de terra causou a divisão do sistema em duas

partes. Atualmente, um cânion (com aproximadamente 900,0 m de diâmetro) separam as cavernas Terra Ronca I e Terra Ronca II. A caverna Terra Ronca I possui uma extensão de 700 m, com uma entrada de 96 metros de altura e 120 metros de largura, onde pode ser encontrado um altar religioso medindo 76 metros de comprimento e 100 metros de altura. Nesse local ocorre a cerimônia religiosa de “Bom Jesus da Lapa” todos os anos, no mês de agosto. A caverna Terra Ronca II possui cerca de 5,1 km, uma entrada de aproximadamente 70 metros de altura e também é utilizado para visitação turística. As cavernas Terra Ronca I e Terra Ronca II abrigam vários animais endêmicos e espécies troglomórficas.

AMOSTRAGEM

As amostragens foram realizadas em abril e outubro de 2016 (licença n  28992-11 (ICMBio / SISBIO) e n  14886/2010 (Secima, Goiás)). Pelo menos duas amostras (réplicas), compostas por quadrantes de 0.25 m², foram coletadas em três áreas das cavernas: superfície ( rea ep gea), entrada da caverna e área subterrânea (zonas af ticas). Aproximadamente 300 g de substrato (solo ou sedimento) foram coletados em cinco pontos diferentes em cada quadrante formando uma amostra composta. O substrato foi coletado a uma profundidade de 0 a 10 cm com o auxílio de uma p  de jardinagem e armazenado em sacos plásticos estéreis. As amostras foram transportadas para o laboratório, homogeneizadas, peneiradas (malha de 2 mm) e armazenadas em geladeira a 4  C.

PARÂMETROS FÍSICO E QUÍMICOS

A temperatura ( C) e umidade do ar (%) foram medidas em cada área amostrada com um intervalo de tempo mínimo de 1 minuto entre as medi es (Thermohygrometer Instruntherm THAL-300, 0.1 de resolu o e   5.0% acurácia). Os dados de precipita o dos 30 dias que antecederam a amostragem foram obtidos do Banco de Dados Meteorológicos para o Ensino e Pesquisa do Instituto Nacional de Meteorologia (estac o meteorológica Posse-GO, cerca de 90 km do PETeR). O pH do substrato foi medido numa propor o de substrato:  gua de 1:2,5 (peso / peso). A umidade nas amostras de solo e sedimento das cavernas foi estimada pelo método gravimétrico, com secagem a 105   C por 20 h, 7 dias após a amostragem e os resultados expressos em

porcentagem de peso seco. Os dados de concentração de carbono orgânico dissolvido (COD) foram medidos colorimetricamente usando o método de Bartlett & Ross (1988). O nitrogênio total (NT) foi determinado pelo método de Kjeldahl, seguida pela destilação da amônia (método do azul de indofenol) (Bremmer & Mulvaney, 1982).

PARÂMETROS MICROBIOLÓGICOS

A extração da biomassa microbiana foi realizada em 10,0 g de amostras de substrato com K_2SO_4 0,5 M, e após a lise celular as amostras foram submetidas a irradiação (Islam & Weil, 1998). O carbono da biomassa microbiana (CBM) foi avaliado pelo método de irradiação-extração (Brookes, Powlson & Jendinson, 1982; Islam & Weil, 1998). O conteúdo do CBM foi estimado com um espectrofotômetro utilizando o fator de correção (K_{CE}) de 0,41, conforme recomendado para solos tropicais para evitar a superestimação dos resultados. (Babujia et al., 2010). O nitrogênio da biomassa microbiana (NBM) foi avaliado de acordo com o método de Brookes et al (1985). O NBM foi determinado pela adição de 1,5 mL de H_2SO_4 e 50 mg de uma mistura catalisadora ($K_2SO_4 + CuSO_4$, 10 : 1) a 20 mL de extrato da biomassa microbiana. As concentrações de NBM foram determinadas por espectrofotometria utilizando o fator de correção K_{NE} de 0,54 (Brookes et al., 1985).

A respiração microbiana foi determinada pela quantificação do CO_2 liberado pelas amostras incubadas em frascos respiratórios de Bartha (Bartha & Pramer, 1965). As amostras (50,0 g de substrato previamente ajustado para 40% de teor de umidade) foram incubadas em triplicatas e o CO_2 foi retido em 30,0 mL de NaOH 0,5 N. Para cada análise, havia dois frascos controles sem substrato e apenas solução de NaOH. Os frascos foram selados e incubados no escuro a $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 48 horas. Depois disso, a respiração microbiana foi estimada pela adição de $BaCl_2$ saturado à solução de NaOH, seguida pela titulação do NaOH não consumido com HCl 0,2 N.

A razão entre a respiração microbiana e carbono da biomassa microbiana (CBM) foi utilizada para calcular o quociente metabólico (qCO_2), que é a quantidade de CO_2 produzida por unidade de carbono da biomassa microbiana (Anderson & Domsch, 1993).

LAPA DA ANGÉLICA

(Mapa: Grupo Bambuí de Pesquisas Espeleológicas – GBPE)

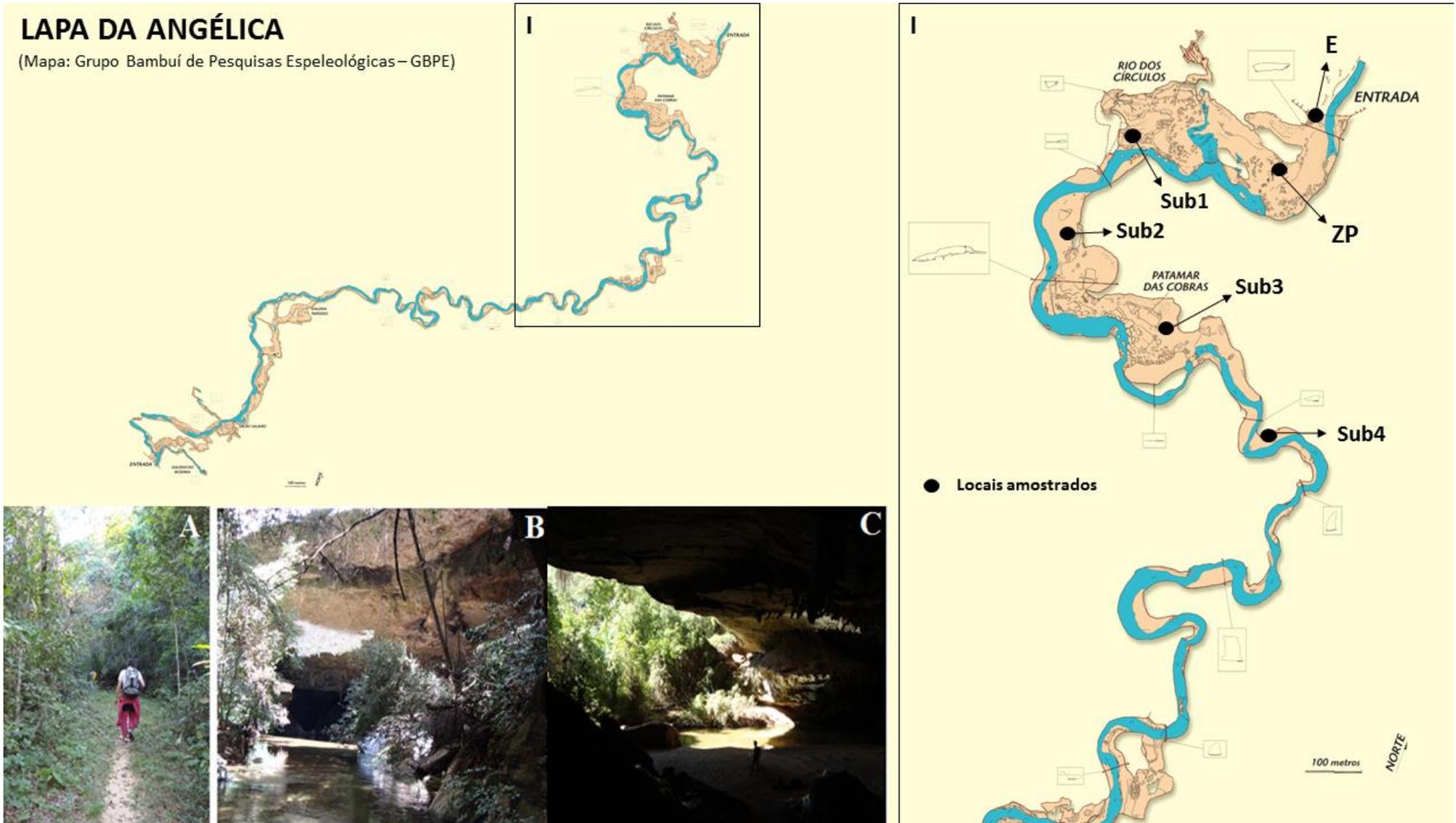


FIGURA 3.3. Planta baixa da caverna Lapa da Angélica. Em destaque (Quadro I) estão apontados os pontos amostrados na Entrada (E), Zona de Penumbra (ZP) e no Subterrâneo (Sub). As imagens apresentam o ambiente superficial (A), vista externa (B) e interna (C) da entrada da caverna (Mapa: Grupo Bambuí de Pesquisas Espeleológicas).

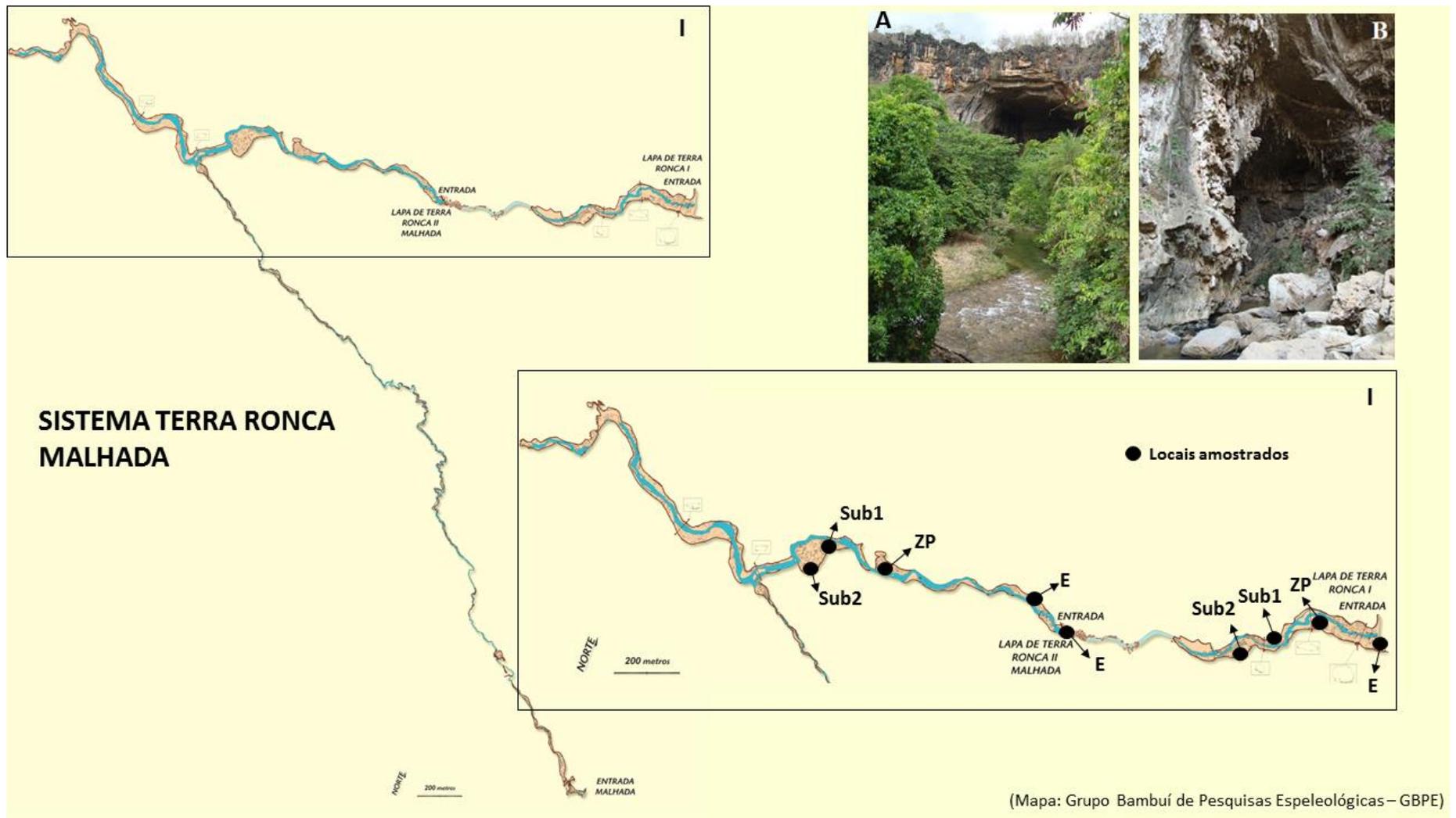


FIGURA 3.3. Planta baixa do Sistema Terra Ronca – Malhada, com destaque (Quadro I) para as cavernas Terra Ronca I e Terra Ronca II, onde estão apontados os pontos amostrados na Entrada (E), Zona de Penumbra (ZP) e no Subterrâneo (Sub). As imagens apresentam a entrada da caverna Terra Ronca I (A) e a entrada da caverna Terra Ronca II (Mapa: Grupo Bambuí de Pesquisas Espeleológicas).

ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados foram analisados por meio de uma estatística descritiva básica (Shapiro-Wilks). A análise de variância e os testes t de Student, com 5% de probabilidade, também foram aplicados para verificar a significância das diferenças entre os resultados. Para analisar a relação entre as variáveis, foi utilizado o coeficiente de correlação de Pearson, considerando as variáveis positivamente correlacionadas com $r \geq 0,90$. A análise de componentes principais foi realizada para analisar a influência das variáveis nos dados, considerando apenas os componentes principais com autovalores maiores ou iguais a 1, segundo o critério de Kaiser (McCune & Grace, 2002). RStudio (2018) foi utilizado para as análises estatísticas e produção de gráficos.

3.4 RESULTADOS

A precipitação total em Abril/2016 e Outubro/2016 foi de 129,80 mm e 19,00 mm, respectivamente. Não houve diferença significativa na temperatura e umidade do ar dos ambientes subterrâneos entre as estações do ano. Em geral, os ambientes subterrâneos tinham maior umidade do ar que na superfície. A umidade do substrato foi maior na estação chuvosa do que na estação seca em todos os locais de amostragem (Tabela 3.I). Áreas superficiais apresentaram maior neutralidade do substrato (pH próximo a 7,0), entretanto a entrada das cavernas e os ambientes subterrâneos apresentaram maior variação de pH (6,93 a 9,02).

Todas as cavernas apresentaram maior quantidade de carbono orgânico dissolvido (COD) na superfície do que nas outras áreas amostradas, com exceção da caverna "T" que apresentou altos valores de COD na entrada da caverna. Além disso, todas as cavernas (exceto a caverna T) tiveram diferenças significativas na quantidade de COD entre as estações chuvosa e seca. Não houve padrão na variação da quantidade de nitrogênio (NT) nos locais amostrados. Os ambientes subterrâneos (cavernas "S", "T" e "TR") apresentaram uma menor quantidade de NT na estação seca do que na chuvosa. Em contrapartida, a área subterrânea da caverna "A" teve uma quantidade maior de NT na estação seca. No entanto, houve uma diferença significativa na concentração de NT em todas as áreas subterrâneas entre as estações chuvosa e seca (Tabela 3.II).

Tabela 3.I. Valores médios e desvio-padrão dos parâmetros físicos (umidade do substrato, temperatura do ar e umidade do ar) nas cavernas Angélica (A), São Bernardo (S), Terra Ronca I (T) e Terra Ronca II (TR) na superfície, entrada e zona afótica (subterrâneo) das amostradas durante a estação chuvosa (abril / 2016) e seca (outubro / 2016).

Caverna		Umidade do substrato (%)		Temperatura (°C)		Umidade do ar (%)	
		Chuvosa	Seca	Chuvosa	Seca	Chuvosa	Seca
Angélica (A)	Superfície	11.07 ± 4.26	13.16 ± 2.25	26.78 ± 0.38	25.58 ± 0.46 *	87.63 ± 3.49	77.70 ± 1.52 *
	Entrada	1.04 ± 0.36	0.86 ± 0.37	30.46 ± 1.75	25.60 ± 0.73 *	69.68 ± 3.94	76.51 ± 1.80 *
	Subterrâneo	16.04 ± 1.64	13.23 ± 6.57	28.21 ± 0.24	27.75 ± 1.73	89.21 ± 5.86	83.88 ± 3.24
São Bernardo (S)	Superfície	3.55 ± 0.17	1.88 ± 0.58 *	26.03 ± 1.06	28.63 ± 0.26 *	97.55 ± 1.77	56.23 ± 2.63 *
	Entrada	4.37 ± 1.58	8.55 ± 6.76	27.76 ± 0.76	27.51 ± 0.67	90.78 ± 2.77	76.33 ± 3.21 *
	Subterrâneo	10.99 ± 6.95	1.40 ± 0.82 *	26.03 ± 0.76	25.50 ± 0.91	96.63 ± 3.11	89.55 ± 3.99
Terra Ronca I (T)	Superfície	5.60 ± 3.85	1.13 ± 0.56 *	26.85 ± 0.53	29.25 ± 0.10 *	73.01 ± 4.24	68.86 ± 0.95 *
	Entrada	4.03 ± 2.54	5.86 ± 1.91	28.33 ± 0.55	30.96 ± 2.30 *	66.23 ± 0.97	64.81 ± 3.93
	Subterrâneo	3.39 ± 1.99	5.91 ± 1.32 *	26.63 ± 0.98	27.38 ± 0.21	76.71 ± 13.96	68.11 ± 1.66
Terra Ronca II (TR)	Superfície	8.21 ± 1.04	4.18 ± 0.94 *	29.51 ± 0.42	26.96 ± 1.28 *	70.83 ± 1.76	81.06 ± 12.23
	Entrada	0.73 ± 0.16	0.62 ± 0.60	27.75 ± 1.55	26.70 ± 0.30	75.53 ± 5.01	78.40 ± 5.70
	Subterrâneo	15.49 ± 4.51	12.56 ± 1.54	25.78 ± 0.27	25.78 ± 0.24	87.00 ± 1.69	89.71 ± 1.03

Nota: Valores com asterisco em uma mesma diferem significativamente ($p < 0,05$) entre as estações chuvosa e seca.

Os valores médios da quantidade de carbono da biomassa microbiana (CBM) foram maiores na superfície do que nas áreas de entrada e subterrânea das cavernas "A" e "S" nas duas estações (FIGURA 3.4). Este mesmo padrão foi observado nas cavernas "T" e "TR" na estação chuvosa. No entanto, a área de entrada das cavernas "T" e "TR" destacou-se em relação à quantidade de CBM na estação seca.

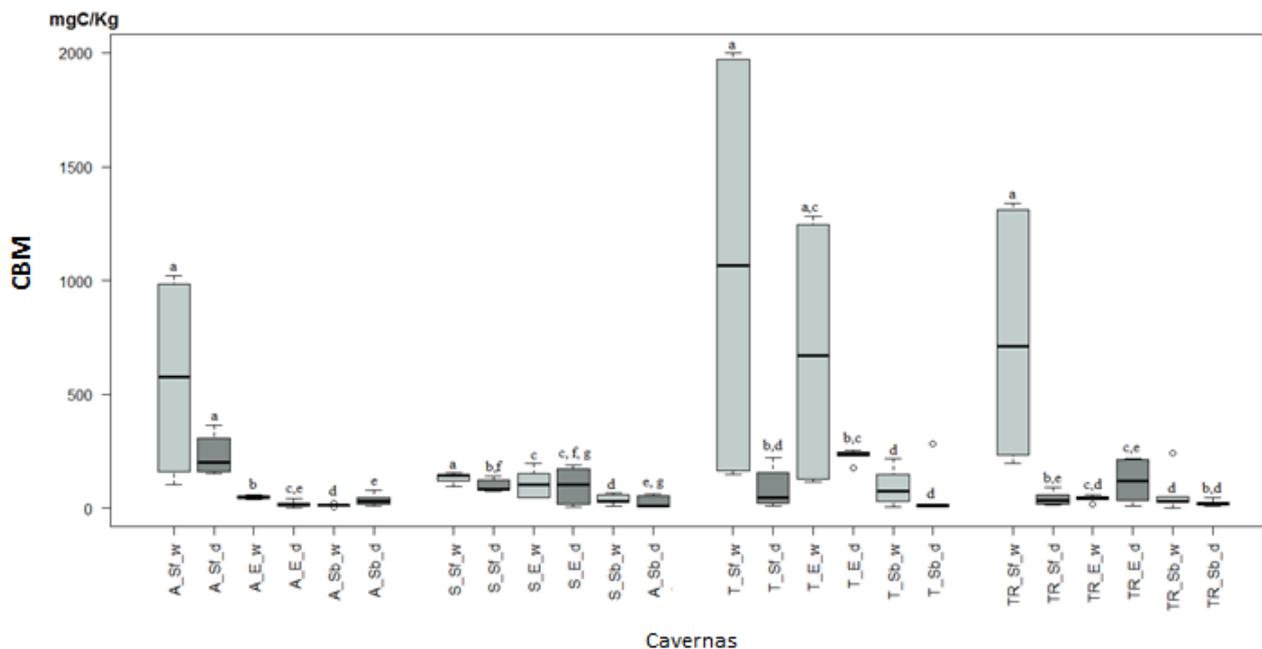


FIGURA 3.4. Valores médios de carbono da biomassa microbiana (CBM) em solo e sedimento das cavernas Angélica (A), São Bernardo (S), Terra Ronca I (T) e Terra Ronca II (TR) nos locais amostrados da superfície (Sf), entrada (E) e subterrâneo (Sb) durante a estação chuvosa (w - Abril/2016, boxplots cinza) e seca (d - Outubro/2016, boxplots escuros). (Boxplots com letras diferentes em locais de uma mesma caverna diferem significativamente ($p \leq 0,05$)).

A quantidade de nitrogênio da biomassa microbiana (NBM) estimado para as cavernas estudadas é apresentada na FIGURA 3.5. Houve uma diminuição na quantidade de NBM entre as áreas da superfície, entrada e subterrânea da mesma caverna, com exceção da caverna "TR". Cavernas "A" e "S" tiveram uma variação maior nos valores de NBM na superfície do que os outros locais. Este padrão de variação do NBM também foi observado nas cavernas "T" e "TR" apenas em uma das estações amostradas. Os valores de NBM foram menores na estação seca do que na estação úmida, quando apenas os dados com diferenças estatísticas entre as estações são considerados.

Tabela 3.II. Valores médios e desvio-padrão dos parâmetros químicos (pH, nitrogênio total (TN) e carbono orgânico dissolvido (COD)) nas cavernas Angélica (A), São Bernardo (S), Terra Ronca I (T) e Terra Ronca II (TR) nos locais amostrados na superfície, entrada e zona afótica (subterrâneo) das cavernas durante a estação chuvosa (abril / 2016) e seca (outubro / 2016).

Caverna		pH		NT		COD	
		Chuvosa	Seca	Chuvosa	Seca	Chuvosa	Seca
Angélica (A)	Superfície	7.67 ± 0.22	8.22 ± 0.04 *	0.067 ± 0.039	0.036 ± 0.001	749.59 ± 517.79	473.11 ± 36.00
	Entrada	6.93 ± 1.03	8.33 ± 0.31 *	0.015 ± 0.0028	0.195 ± 0.1752 *	163.04 ± 58.70	154.03 ± 53.74
	Subterrâneo	8.16 ± 0.46	8.71 ± 0.28 *	0.016 ± 0.0022	0.024 ± 0.0013 **	113.20 ± 8.64	79.01 ± 15.11**
São Bernardo (S)	Superfície	7.61 ± 0.11	7.40 ± 0.42	0.113 ± 0.080	0.039 ± 0.007 *	346.30 ± 52.61	292.78 ± 42.53
	Entrada	7.78 ± 0.66	8.53 ± 0.14 *	0.032 ± 0.022	0.024 ± 0.018	201.14 ± 131.54	269.66 ± 203.36
	Subterrâneo	8.32 ± 1.09	8.61 ± 0.61	0.020 ± 0.002	0.015 ± 0.002 **	77.04 ± 11.36	44.22 ± 14.18**
Terra Ronca I (T)	Superfície	8.88 ± 0.14	8.69 ± 0.29	0.055 ± 0.040	0.075 ± 0.047	820.37 ± 71.61	824.48 ± 700.84
	Entrada	7.49 ± 1.58	7.98 ± 0.75	0.078 ± 0.059	0.025 ± 0.002 *	1008.20 ± 700.86	1170.71 ± 1044.51
	Subterrâneo	7.69 ± 0.25	7.59 ± 0.10	0.036 ± 0.004	0.025 ± 0.007 **	448.93 ± 145.67	334.98 ± 51.23
Terra Ronca II (TR)	Superfície	7.85 ± 0.44	7.63 ± 0.27	0.025 ± 0.016	0.049 ± 0.041	431.34 ± 367.63	708.91 ± 134.31
	Entrada	8.37 ± 0.82	8.51 ± 0.62	0.008 ± 0.002	0.025 ± 0.007 **	85.07 ± 6.60	197.55 ± 10.88**
	Subterrâneo	9.02 ± 0.40	7.56 ± 1.81	0.052 ± 0.009	0.032 ± 0.001 **	176.91 ± 13.28	299.38 ± 17.52**

Nota: Valores com asterisco em uma mesma diferem significativamente ($p < 0,05$) entre as estações chuvosa e seca.

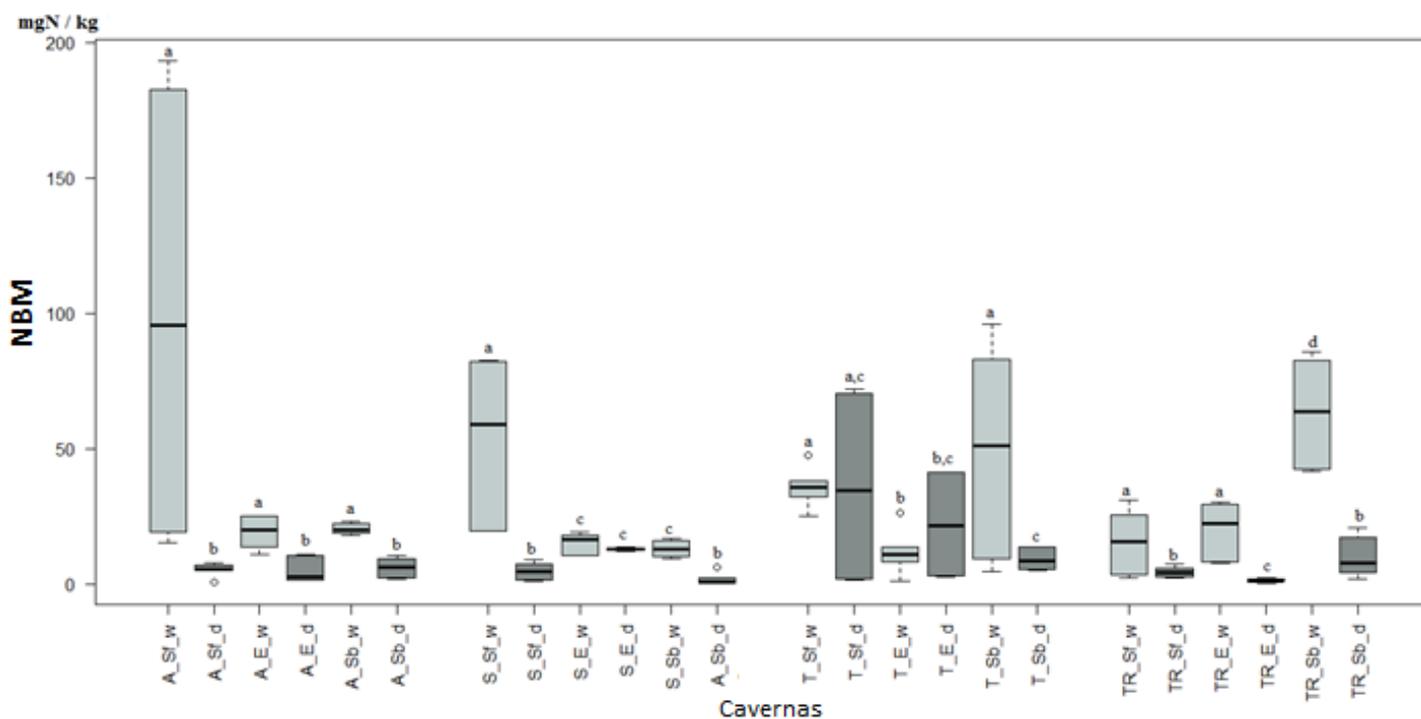


FIGURA 3.5. Valores médios de nitrogênio da biomassa microbiana (NBM) no solo e sedimento das cavernas Angélica (A), São Bernardo (S), Terra Ronca I (T) e Terra Ronca II (TR) na superfície (Sf), entrada (E) e subterrâneo (Sb) durante a estação chuvosa (w - Abril / 2016, boxplots cinza) e seca (d - Outubro/2016, boxplots escuro). (Boxplots com letras diferentes em locais de uma mesma caverna diferem significativamente ($p \leq 0,05$)).

A atividade microbiana do substrato foi avaliada pela taxa de respiração microbiana (FIGURA 3.6). As altas taxas de respiração foram significativamente maiores na estação chuvosa. Cavernas "T" e "TR" destacaram-se com as maiores taxas de respiração em todas as áreas amostradas. No entanto, não houve diferença significativa nos valores de respiração microbiana entre as áreas amostradas dessas cavernas durante a estação seca. A caverna "A" mostrou valores mais altos de respiração microbiana na superfície do que na entrada da caverna e no ambiente subterrâneo. Em contraste, a caverna "S" apresentou taxas de respiração semelhantes entre os locais amostrados, destacando-se apenas o alto valor da respiração microbiana na superfície da caverna "S" durante a estação chuvosa.

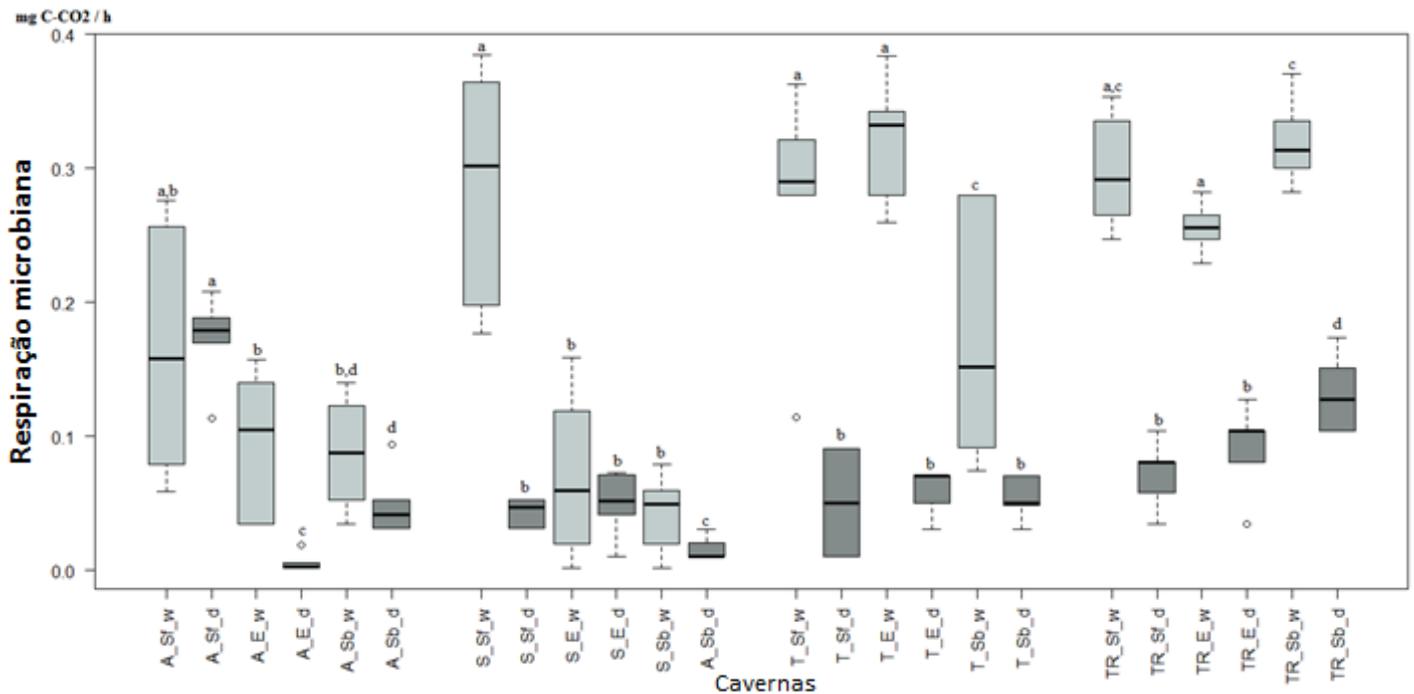


FIGURA 3.6. Valores médios da taxa de respiração microbiana no solo e sedimento das cavernas Angélica (A), São Bernardo (S), Terra Ronca I (T) e Terra Ronca II (TR) na superfície (Sf), entrada (E) e subterrâneo (Sb) durante a estação chuvosa (w - Abril/2016, boxplots cinza) e seca (d - Outubro/2016, boxplots escuro). (Boxplots com letras diferentes em locais de uma mesma caverna diferem significativamente ($p \leq 0,05$)).

As razões entre a taxa respiração microbiana e a quantidade de carbono da biomassa microbiana (CBM) foram usadas para calcular o quociente metabólico (qCO_2) (FIGURA 3.7). As cavernas "A" e "T" apresentaram altos valores de qCO_2 em áreas subterrâneas do que na superfície e entrada das cavernas. As cavernas "TR" e "S" apresentaram valores semelhantes entre os locais amostrados, mas com maior variação dos valores de qCO_2 . A área de entrada da caverna "TR" destacou-se com o maior valor de qCO_2 em relação aos demais locais amostrados. Não houve diferença significativa deste parâmetro na área subterrânea das cavernas entre as estações do ano. Em geral, o quociente metabólico foi maior na estação chuvosa, exceto na área de superfície da caverna "A" que apresentou maiores valores de qCO_2 na estação seca.

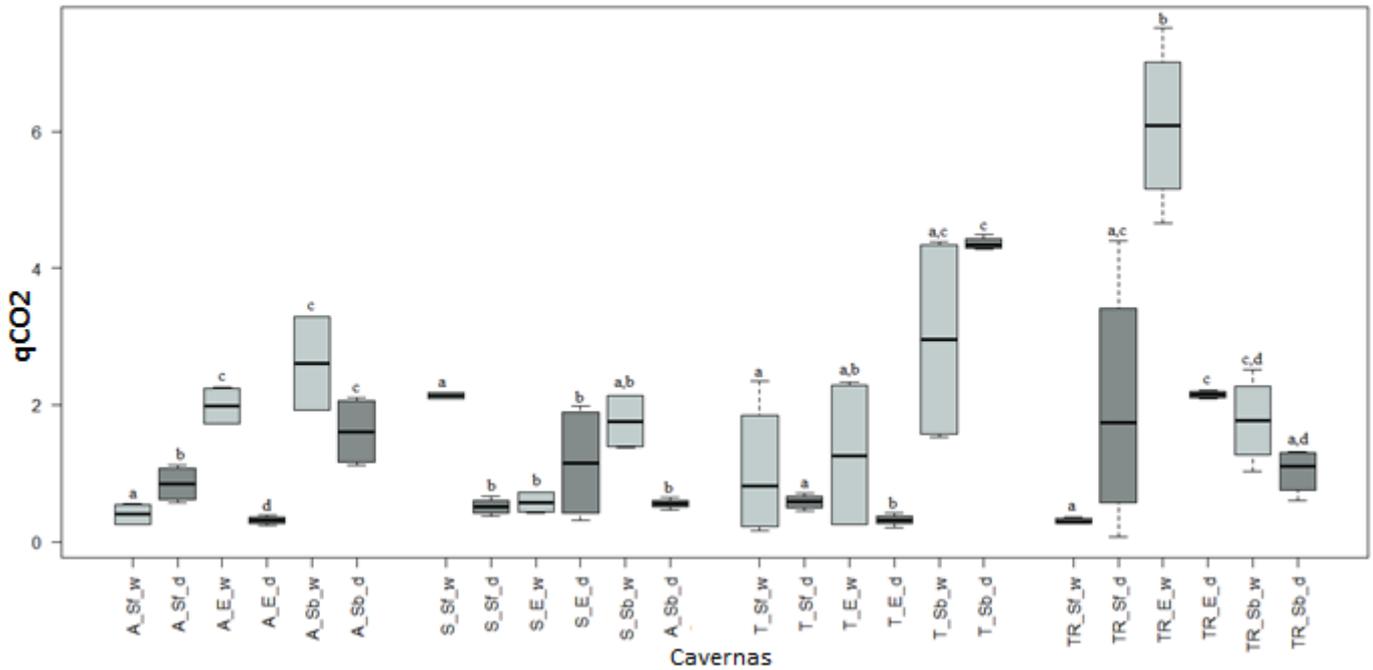


FIGURA 3.7. Valores médios do quociente metabólico no solo e sedimento das cavernas Angélica (A), São Bernardo (S), Terra Ronca I (T) e Terra Ronca II (TR) na superfície (Sf), entrada (E) e subterrâneo (Sb) dos locais amostrados durante a estação chuvosa (w - Abril/2016, boxplots cinza) e seca (d - Outubro/2016, boxplots escuro). (Boxplots com letras diferentes em locais de uma mesma caverna diferem significativamente ($p \leq 0,05$)).

Todas as cavernas, exceto a caverna "T", mostraram uma forte correlação positiva entre CBM e COD ($r > 0,90$) em ambas as estações (FIGURA 3.8 e 3.9). O nitrogênio da biomassa microbiana (NBM) apresentou correlação positiva com o COD, durante a estação chuvosa, nas cavernas "A" e "TR". Correlações positivas foram observadas entre NBM, disponibilidade de nutrientes (COD e NT) e respiração microbiana na estação seca. O NBM não se correlacionou com as outras variáveis ambientais na caverna "S". A análise de componentes principais (PCA) resumiu as variáveis em duas dimensões (FIGURA 3.10). Os componentes principais representam os autovalores, com CP1 representando a maior variância dos dados, e CP2 representando a segunda maior variância dos dados. A FIGURA 3.10 mostra o CP1 relacionado ao nível trófico das amostras. Os autovetores COD e CBM apresentaram maior correlação com CP1 e esses autovetores foram altamente relacionados com amostras de superfície na estação chuvosa. A umidade do ar e a temperatura foram relacionados ao CP2 e abrangem as amostras subterrâneas na mesma estação.

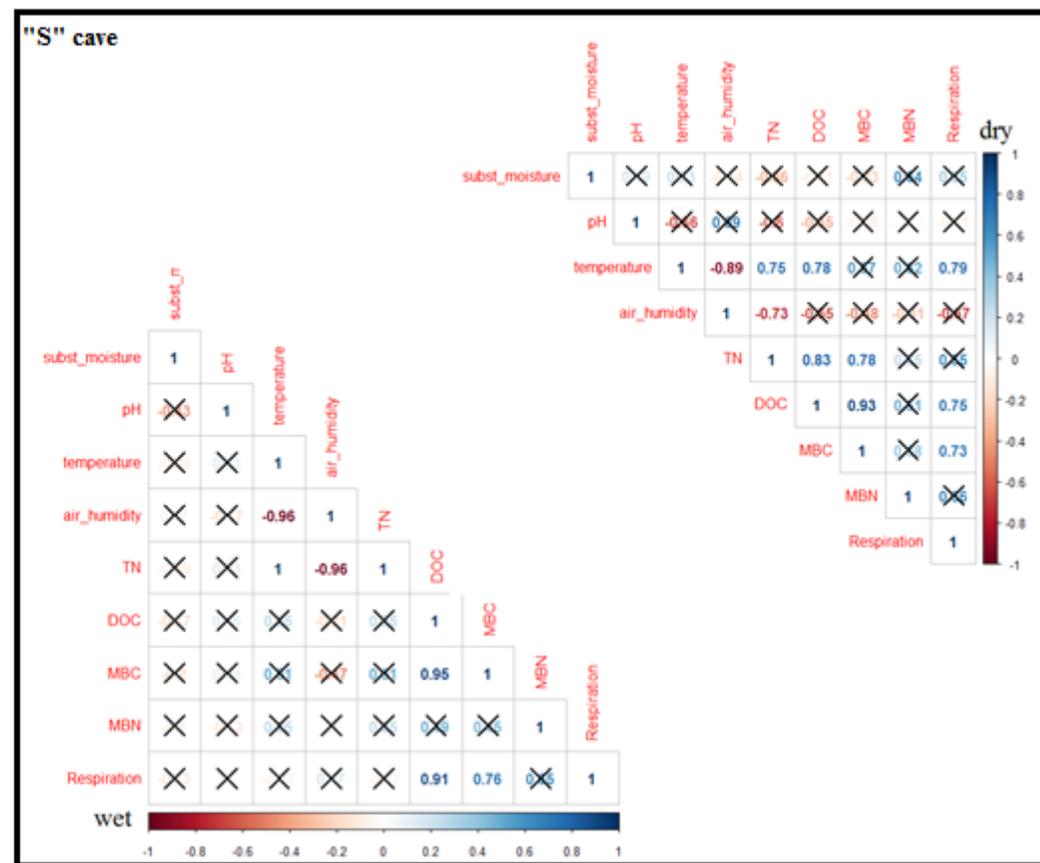
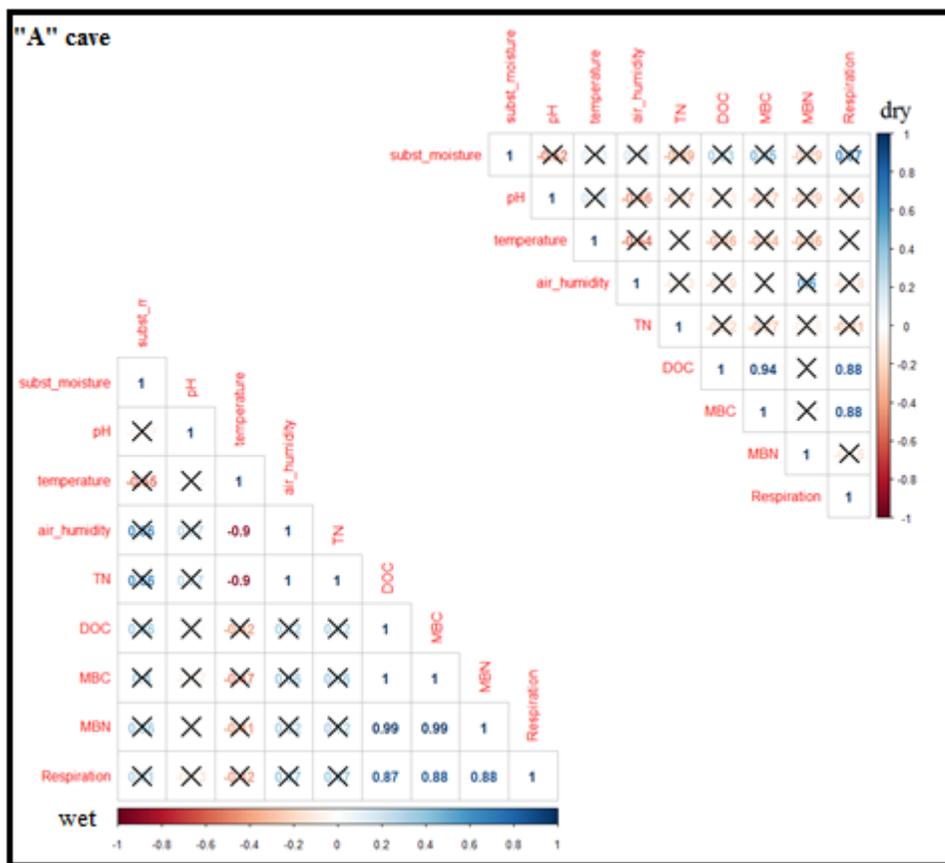


FIGURA 3.8. Correlograma, usando coeficiente de correlação de Pearson (barra lateral), entre parâmetros físicos, químicos e microbiológicos (umidade do substrato, pH, temperatura, umidade do ar, nitrogênio total (NT), carbono orgânico dissolvido (COD), carbono da biomassa microbiana (CBM), nitrogênio da biomassa microbiana (NBM) e respiração) nas cavernas Angélica (A) e São Bernardo (S) nas estações chuvosa (abril / 2016) e seca (outubro / 2016).

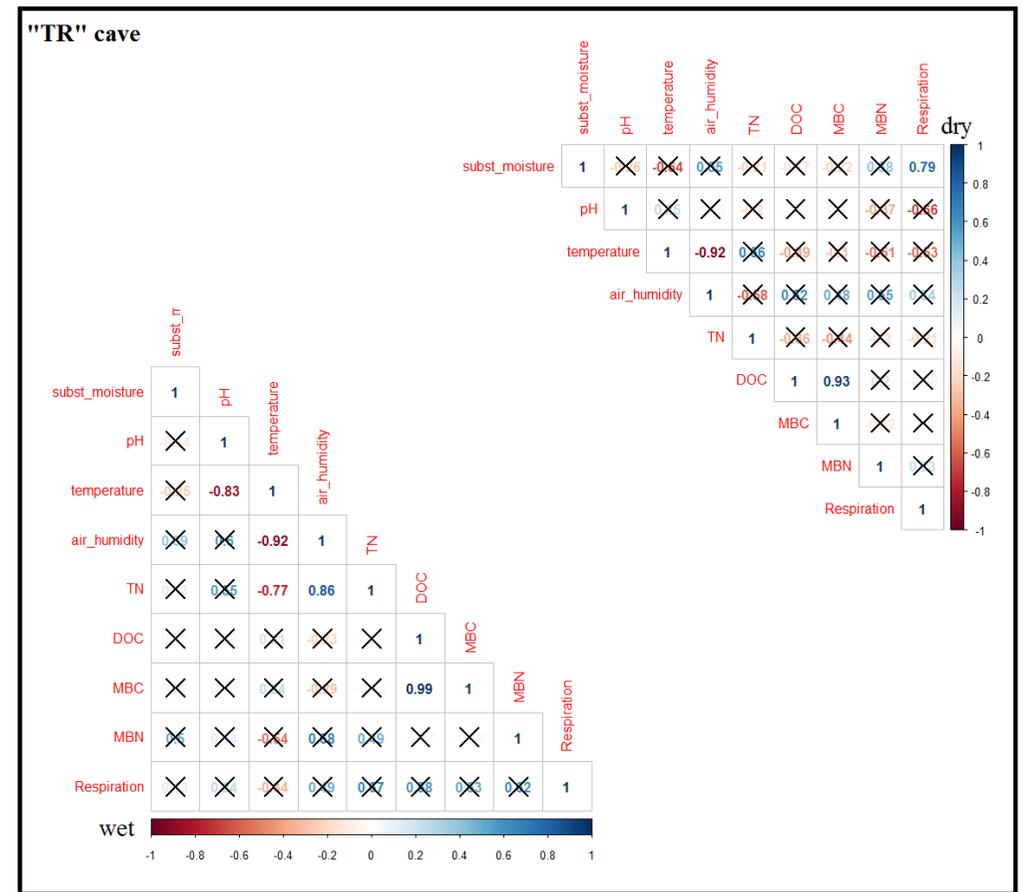
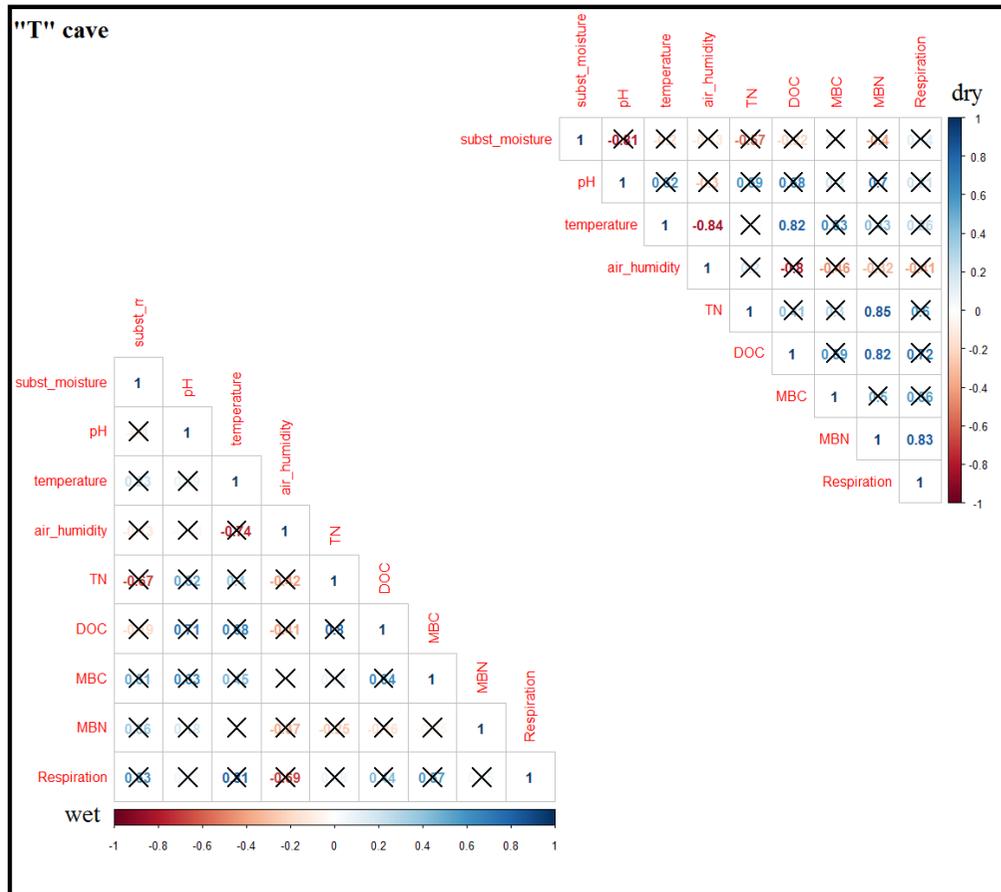


FIGURA 3.9. Correlograma, usando coeficiente de correlação de Pearson (barra lateral), entre parâmetros físicos, químicos e microbiológicos (umidade do substrato, pH, temperatura, umidade do ar, nitrogênio total (NT), carbono orgânico dissolvido (COD), carbono da biomassa microbiana (CBM), nitrogênio da biomassa microbiana (NBM) e respiração) nas cavernas Terra Ronca I (T) e Terra Ronca II (TR) nas estações chuvosa (abril / 2016) e seca (outubro / 2016).

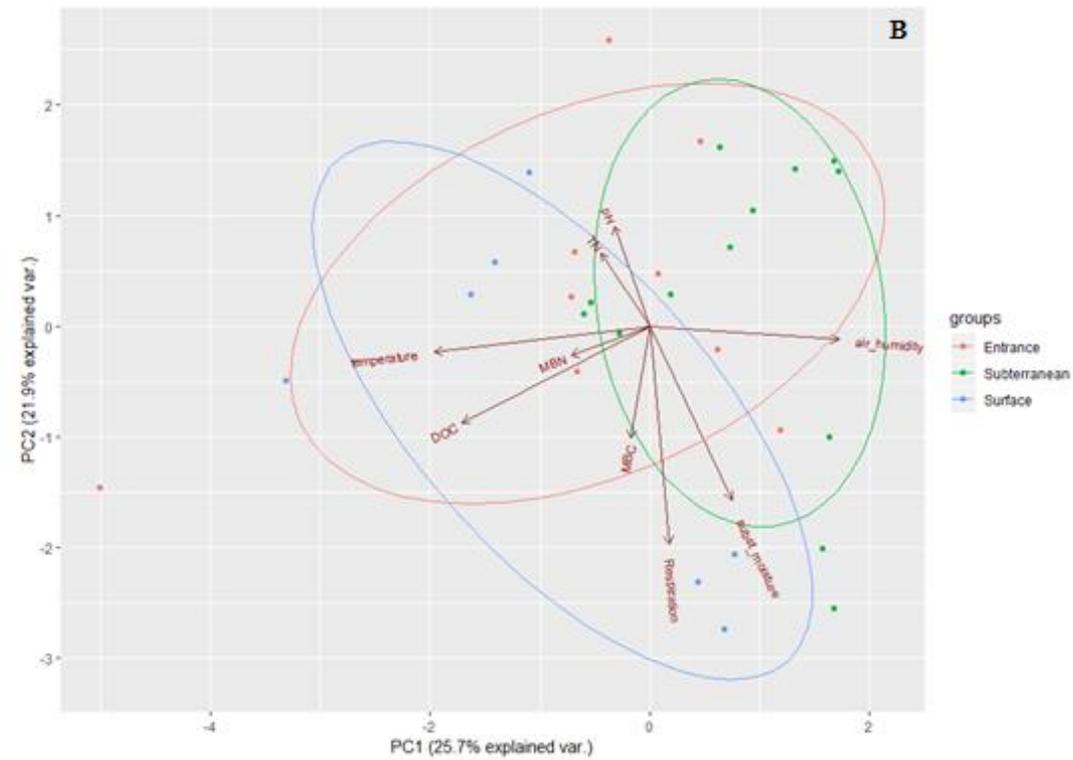
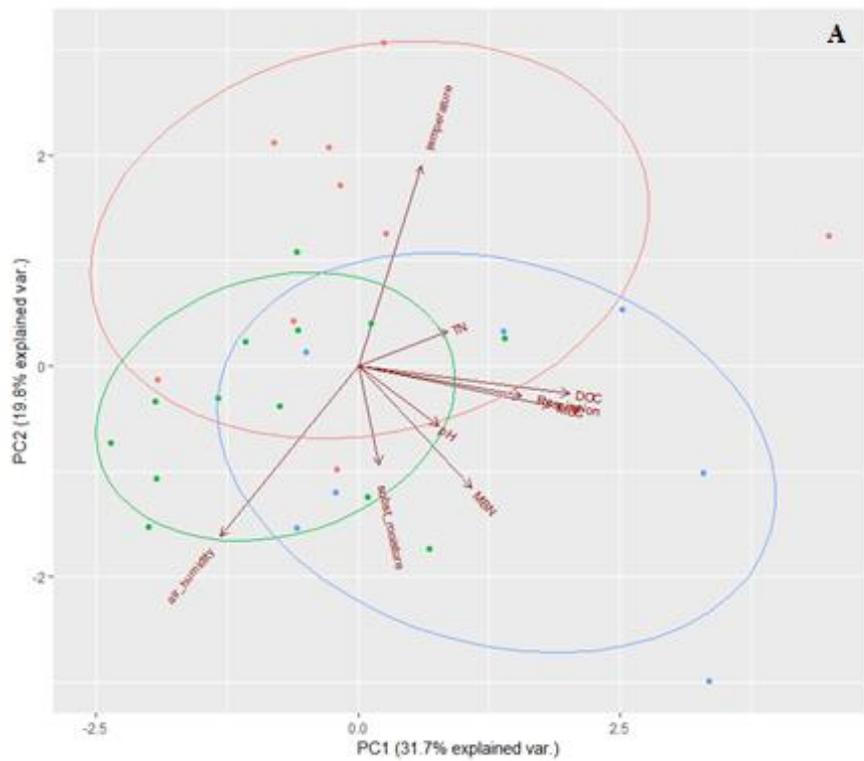


FIGURE 3.10. Análise de componentes principais destacando os parâmetros físicos, químicos e microbiológicos (umidade do substrato, pH, temperatura, umidade do ar, nitrogênio total (NT), carbono orgânico dissolvido (COD), carbono da biomassa microbiana (CBM), nitrogênio da biomassa microbiana (NBM) e respiração) que teve maior efeito nas distribuições dos dados das SUBamostras de cada local amostrado na estação úmida (A) e seca (B). Os vetores representam o peso de cada variável na variância dos dados.

Houve correlações significativas do CP1 com umidade do ar, temperatura e COD na estação seca. O CP2 apresentou correlações negativas com a respiração e a umidade do substrato na mesma estação. Amostras da superfície ficaram mais próximas do CP1 e as áreas de entrada e do subterrâneo foram distribuídas próximas ao CP2 na estação seca.

3.5 DISCUSSÃO

A literatura relata uma ampla faixa de pH, de neutro a ligeiramente alcalino, em áreas cársticas (Zhang et al., 2006) igualmente observado neste estudo. Áreas altamente alcalinas (como a caverna “SB”) mostram a influência da água na dissolução da rocha carbonática, aumentando os valores de pH do substrato. Substratos ácidos dentro da caverna (como a caverna “A”) podem ser originados das diferentes proporções de mistura dos resíduos das rochas carbonáticas, rochas arenosas ou uma mistura de componentes de xisto e matéria orgânica decomposta (Tian et al., 2008; Yang et al., 2010).

Os maiores valores de carbono orgânico dissolvido e nitrogênio total foram observados nas áreas superficiais, pois este ambiente possui um maior acúmulo e elevada riqueza de fontes de matéria orgânica. Muitas cavernas em regiões temperadas apresentam menores valores de carbono orgânico e suas comunidades residentes são geralmente privadas de energia ($< 5,0 \text{ mgC / L}$) (Northup & Lavoie, 2001; Chelius et al., 2009; Ortiz et al., 2014). No entanto, todas as cavernas neste estudo mostraram maior quantidade de carbono orgânico do que as cavernas temperadas. Valores elevados de carbono orgânico em cavernas tropicais também foram observados em estudos anteriores (Paula et al., 2016). Embora essa diferença ocorra, as comunidades das cavernas temperadas e tropicais são sustentadas por insumos orgânicos originários de fontes externas ou alóctones. Simon et al (2007) criou um modelo de fluxo de carbono em cavernas demonstrando que a entrada de carbono orgânico nesses ambientes ocorre principalmente por pequenas aberturas, rachaduras e sumidouros de rios que permitem a entrada de folhas, madeira e detritos por meio de riachos e do ambiente epicárstico. As cavernas estudadas neste trabalho possuem grandes rios que atravessam a superfície antes de entrar na caverna. Assim, de acordo com o modelo de Simon et al (2007), esses rios transportam matéria orgânica da superfície para o interior da caverna

(carbono orgânico particulado e dissolvido), a qual se acumula em bancos de sedimento, principalmente nas estações secas. As cavernas "A" e "S" são um bom exemplo onde a precipitação mais alta na estação chuvosa resulta em uma quantidade maior e mais homogênea de carbono orgânico dissolvido no substrato, enquanto que na estação seca há uma menor quantidade e maior variação na quantidade de carbono orgânico ao longo do ambiente subterrâneo. O mesmo padrão foi observado na caverna Kartchner, com maior quantidade de carbono orgânico dissolvido durante a estação chuvosa (Ortiz et al., 2014).

Vários nutrientes, como nitrogênio, enxofre e fósforo, são considerados fatores limitantes em ambientes subterrâneos (Goldscheider, Hunkeler & Rossi, 2006). Áreas mais distantes da zona de entrada das cavernas estudadas apresentaram menores variações na quantidade de NT, como observado na caverna Lapa Nova (Pellegrini & Ferreira, 2013). A presença de grandes quantidades de nutrientes em cavernas (nitrogênio, fósforo e enxofre), de origem endógena (autóctone) ou exógena (alóctone), pode ter um profundo impacto sobre a fauna, crescimento microbiano e estrutura das comunidades subterrâneas (Jonhston et al., 2012). Enxofre e fósforo podem estar presentes, originados da matriz mineral da rocha, dependendo da geoquímica da caverna, mas é rara qualquer fonte intrínseca de nitrogênio em cavernas (Klimchouk, 2000). Neste estudo, a quantidade de nitrogênio foi maior na estação chuvosa do que na estação seca, assim como o COD. Isso pode ser explicado pela maior intensidade de lixiviação superficial do solo e por inundações repentinas dos rios subterrâneos nesse período. A área subterrânea da caverna "A" foi a única que apresentou maiores valores de NT na estação seca, em contraste com os resultados da estação chuvosa. As principais fontes de nitrogênio nos ambientes subterrâneos são resíduos de plantas, detritos agrícolas, vegetação natural (carregada pela água da chuva ou pelos rios subterrâneos) ou excreção animal (Dubey et al., 2014).

A superfície também apresentou valores de biomassa microbiana mais elevados do que aqueles observados dentro da caverna. Todas as cavernas mostraram valores de biomassa microbiana semelhantes a estudos realizados anteriormente em ambientes subterrâneos do mundo todo (Carmichael et al., 2015; Paula et al., 2016). Houve correlação positiva entre a biomassa microbiana e a matéria orgânica, indicando uma grande influência da quantidade (quantidade de C) e qualidade (quantidade de N) da

matéria orgânica na biomassa da comunidade microbiana. Estudos anteriores demonstraram que a biomassa microbiana dentro de cavernas é geralmente baixa em comparação com os habitats de superfície (Barton & Jurado, 2007). As possíveis razões para isso incluem a baixa taxa de insumos e diversidade de substratos orgânicos autóctones e alóctones (Chelius et al., 2009).

Estudos recentes sugerem o uso da biomassa microbiana do solo como indicador da limitação do ecossistema (Xu, Thornton & Post, 2015) e afirmam que esse parâmetro reflete o grau de imobilização do carbono e do nitrogênio. A relação entre CBM e COD ou NBM e NT pode ser interpretada como a quantidade de substrato disponível e a porção de carbono e nitrogênio imobilizada nas células microbianas. Assim, a dinâmica da biomassa microbiana pode ser um parâmetro útil para monitorar a disponibilidade de matéria orgânica menos recalcitrante no ambiente (Anderson & Domish, 1993). Uma diminuição na biomassa microbiana pode resultar na mineralização de nutrientes, enquanto um aumento na biomassa microbiana pode indicar a imobilização de nutrientes (McGill et al., 1986).

O carbono da biomassa microbiana diminuiu na estação seca na superfície, enquanto que não houve redução desse parâmetro no ambiente subterrâneo. O nitrogênio da biomassa microbiana, por outro lado, diminuiu na estação seca, tanto na superfície quanto no ambiente subterrâneo. Pouca variação dos valores de CBM indica nenhuma alteração na imobilização do carbono nas células microbianas e conseqüentemente na mineralização de carbono. Embora o CBM não tenha apresentado variações entre as estações do ano, a quantidade de NBM foi maior na estação chuvosa, indicando maior mineralização de nitrogênio na estação seca e maior acúmulo desse nutriente na biomassa durante a estação chuvosa. Considerando a redução da quantidade de carbono orgânico na estação seca e a dinâmica do CBM, houve uma maior taxa de mineralização de carbono da biomassa microbiana nas comunidades superficiais. A microbiota subterrânea nas cavernas "S", "T" e "TR" não apresentou diferenças significativas na quantidade de carbono da biomassa microbiana, mesmo com a redução do COD. Por outro lado, a comunidade microbiana dentro da caverna "A" apresentou um aumento do carbono da biomassa microbiana, mesmo com uma redução na quantidade de COD na estação seca. Além disso, a quantidade de nitrogênio da biomassa microbiana diminuiu de acordo com a disponibilidade de NT,

exceto na caverna "A" que reduziu o NBM mesmo com maior quantidade de NT na estação seca. Geralmente, a maior disponibilidade de nutrientes no ambiente leva a uma maior mobilização para a biomassa microbiana local. A alta disponibilidade de frações de nitrogênio pode explicar os maiores valores de biomassa microbiana no local, como as cavernas "S", "T" e "TR" na estação chuvosa. No entanto, um maior aporte de nutrientes e a rápida ciclagem de N lábil poderiam estimular a mineralização da matéria orgânica antiga, o que pode ser uma explicação direta para as baixas concentrações de NBM no local de deposição, como a caverna "A" (Li et al., 2015).

A respiração microbiana representa a liberação de CO₂ utilizando a matéria orgânica e decompondo a serapilheira (Schindlbacher, Zechmeister-Boltenstern & Jandl, 2009; Zhou et al., 2014). Maiores valores de respiração microbiana foram encontrados na área da superfície das cavernas. A respiração microbiana dentro das cavernas variou positivamente de acordo com a disponibilidade do COD e a variação da biomassa microbiana. Em geral, a quantidade de matéria orgânica (COD e NT) e a biomassa microbiana foram maiores na estação chuvosa, com o aumento da respiração microbiana. Todos esses fatores estão de acordo com uma maior imobilização de matéria orgânica na biomassa microbiana e uma redução do crescimento microbiano na estação seca, conforme descrito acima. A caverna "A" apresentou valores mais elevados de respiração microbiana com maiores quantidades de COD e NBM, juntamente com valores mais baixos de NT.

Quando crescem em substrato pobre em N, os microrganismos não têm N suficiente para acumular tanta biomassa quanto a concentração de C permitiria. Assim, supõem-se que os microrganismos podem dispor de C por meio da respiração excessiva, liberando CO₂, para fazer com que o substrato atenda suas demandas nutricionais. (Sinsabaugh et al., 2013). A respiração excessiva nos ecossistemas, ou seja, a respiração sem a produção de energia, foi recentemente questionada por vários estudos. Em primeiro lugar, verificou-se que pode ser mais benéfico para os microrganismos eliminar o excesso de C liberando COD do que gastar energia na cadeia respiratória nesse processo (Spohn, 2015). Em segundo lugar, tem sido apontado que a energia perdida pela disposição de C poderia ser investida em armazenamento de nutrientes ou outros processos, os quais aumentariam a sucesso evolutivo da comunidade microbiana (Hessen et al., 2013).

A dinâmica da biomassa microbiana nas áreas subterrâneas das cavernas "A", "S", "T" e "TR" pode ser enquadrada em duas teorias - "decomposição estequiométrica" e "mineração de nitrogênio microbiano" - em relação aos impactos da disponibilidade de nutrientes produzidos pela decomposição da matéria orgânica (Craine, Morrow & Fierer, 2007). As cavernas "S", "T" e "TR" podem ser enquadradas na teoria da "decomposição estequiométrica", o qual a atividade microbiana é mais alta e as taxas de decomposição são máximas, se a entrada de C e N com o substrato corresponder às demandas microbianas. A caverna "A" estaria enquadrada na teoria de "mineração de nitrogênio microbiano", que supõe que os microrganismos adquirem N utilizando C lábil como fonte de energia para decompor matéria orgânica recalcitrante, a qual contém N (Moorhead & Sinsabaugh, 2006; Craine, Morrow & Fierer, 2007). Isso significa que a baixa disponibilidade de N para os microrganismos facilita a decomposição da matéria orgânica recalcitrante para a aquisição de N. Portanto, de modo geral, na teoria da 'decomposição estequiométrica' a alta disponibilidade de N (condição rica em nutrientes) é provavelmente benéfica para a decomposição da matéria orgânica, enquanto que na teoria da 'mineração de nitrogênio microbiano', a baixa disponibilidade de N (condição pobre em nutrientes) provavelmente facilita a decomposição da matéria orgânica recalcitrante (Chen et al., 2014). No entanto, estudos adicionais sobre o estoque e fluxo de carbono e nitrogênio nessas cavernas são necessários para melhorar a discussão.

De acordo com a análise de componentes principais (FIGURA 3.10), as áreas superficiais e subterrâneas se dividem em clusters diferentes e bem definidos, principalmente na estação chuvosa, indicando que esses ambientes apresentam diferenças significativas dos parâmetros ambientais (físicos, químicos e microbiológicos). Embora os parâmetros físicos e químicos sejam amplamente utilizados como indicadores ambientais terrestres e aquáticos, os parâmetros microbiológicos, como a respiração e a biomassa microbiana, podem projetar o cenário da qualidade ambiental e responder mais rapidamente às mudanças no ambiente, como nas cavernas. Os parâmetros microbianos deste estudo mostraram-se bons indicadores para avaliar a dinâmica dos nutrientes nos ambientes estudados e com esse conhecimento podemos ter um melhor monitoramento da qualidade ambiental e acompanhar as mudanças nesses habitats.

As diferenças na disponibilidade de C e N encontradas entre as cavernas “A” e “S”, “T” e “TR” podem ter moldado as estratégias da comunidade microbiana para a decomposição da matéria orgânica e para a incorporação desses elementos em sua biomassa. Portanto, as cavernas estudadas apresentaram diferentes dinâmicas da biomassa microbiana, o que permite considerar que essas cavernas sejam consideradas únicas e com características específicas. O conhecimento dos ambientes subterrâneos e dos processos ecossistêmicos locais ainda é muito incipiente, com poucos estudos sobre o fluxo de nutrientes em ambientes subterrâneos. Considerando a especificidade de cada habitat subterrâneo, o estudo de cada caverna é extremamente importante para entender a dinâmica do fluxo de energia e da comunidade local (microorganismos e fauna). Assim, pesquisas desenvolvidas neste âmbito contribuiriam para um melhor uso e manejo desse ambiente, permitindo indicar áreas mais frágeis à exploração econômica e / ou ecoturística e ajudar a adotar decisões mais seguras sobre a conservação desses habitats.

3.6 REFERÊNCIAS

Anderson T.H., Domsch K.H. (1993) *The metabolic quotient for CO₂ (qCO₂) as a specific activity parameter to assess the effects of environmental conditions, such as pH, on the microbial biomass of forest soils.* Soil Biology & Biochemistry, 25, 393–395.

Babujia L.C., Hungria M., Franchini J.C., Brookes P.C. (2010) *Microbial biomass and activity at various soil depths in a Brazilian oxisol after two decades of no-tillage and conventional tillage.* Soil Biology & Biochemistry, 42, 2174-2181.

Bartha R., Pramer D. (1965) *Features of flask and method for measurement of the persistence and biological effects of pesticides in soil.* Soil Science, 100(1), 68-70.

Bartlett R.J., Ross D.N. (1988) *Colorimetric determination of oxidizable carbon in acid soil solutions.* Soil Science Society of America Journal, 52, 1191-1192.

Barton H.A., Jurado V. (2007) *What's up down there? Microbial diversity in caves.* Microbe Magazine 2(3), 132–138

Bichuette M.E., Simões L.B., von Schimonsky D.M., Gallão J.E. (2015) *Effectiveness of quadrat sampling on terrestrial cave fauna survey-a case study in a Neotropical cave.* Acta Scientiarum, Biological Sciences, 37(3), 345.

- Bonacci O., Pipan T., Culver D.C. (2008) *A frame work for karst ecohydrology*. Environmental Geology, 56, 891–900.
- Bremmer J.M., Mulvaney C.S. (1982) *Total nitrogen*. In: Page A.L., *Methods of soil analysis*. Madison: American Society on Agronomy, 595-624.
- Brookes P.C., Landman A., Pruden G., Jenkinson D.S. (1985) *Chloroform fumigation and the release of soil nitrogen: a rapid direct extraction method to measure microbial biomass nitrogen in soil*. Soil Biology & Biochemistry, 17, 837-842.
- Brookes P.C., Powlson D.S., Jenkinson D.S. (1982) *Measurement of microbial biomass phosphorus in soil*. Soil Biology & Biochemistry, 14, 319-326.
- Carmichael S.K., Zorn B.T., Santelli C.M., Roble L.A., Carmichael M.J., Bräuer S.L. (2015) *Nutrient input influences fungal community composition and size and can stimulate manganese (II) oxidation in caves*. Environmental Microbiology Reports, 7(4), 592-605.
- Chapelle F.H. (2000) *The significance of microbial processes in hydrogeology and geochemistry*. Hydrogeology Journal, 8, 41–46.
- Chelius M.K., Beresford G., Horton H., Quirk M., Selby G., Simpson R.T., Horrocks R., Moore J.C. (2009) *Impacts of alterations of organic inputs on the bacterial community within the sediments of Wind Cave, South Dakota, USA*. International Journal of Speleology, 38(1), 1-10.
- Chen R., Senbayram M., Blagodatsky S., Myachina O., Dittert K., Lin X., Blagodatsky S., Kuzyakov Y. (2014) *Soil C and N availability determine the priming effect: microbial N mining and stoichiometric decomposition theories*. Global Change Biology, 20(7), 2356-2367.
- Craine J.M., Morrow C., Fierer N. (2007) *Microbial nitrogen limitation increases decomposition*. Ecology, 88(8), 2105-2113.
- Dubey V., Kaur J., Suryanarayana N.S., Murthy K.V.R. (2014) *Thermoluminescence study, including the effect of heating rate, and chemical characterization of Amarnath stone collected from Amarnath Holy Cave*. Research on Chemical Intermediates, 40(2), 531-536.
- Engel A.S. (2007) *Observations on the biodiversity of sulfidic karst habitats*. Journal of Cave and Karst Studies, 69, 187–206.
- Engel A.S., Randall K.W. (2011) *Experimental evidence for microbially mediated carbonate dissolution from the saline water zone of the Edwards Aquifer, Central Texas*. Geomicrobiology Journal, 28, 313–327.

- Fichez R. (1991) *Composition and fate of organic-matter in submarine cave sediments; implications for the biogeochemical cycle of organic-carbon*. *Oceanologica Acta*, 14(4), 369–377.
- Ford D., Williams P.D. (2013) *Karst Hydrogeology and Geomorphology*. Chichester:JohnWiley&Sons.
- Galas J., Bednarz T., Dumnicka E., Starzecka A., Wojtan K. (1996) *Litter decomposition in a mountain cave water*. *Archiv für Hydrobiologie*, 138(2), 199–211.
- Gibert J. (1986) *Ecologie d'un système karstique jurassien. Hydrogéologie, de rive animale, transits de matières, dynamique de la population de Niphargus (Crustacé Amphipode)*. *Mem Biospeol*, 13, 1–379.
- Goldscheider N., Hunkeler D., Rossi P. (2006) *Microbial biocenoses in pristine aquifers and an assessment of investigative methods*. *Hydrogeology Journal*, 14(6), 926-941.
- Graening G.O., Brown A.V. (2003) *Ecosystem dynamics and pollution effects in an Ozark cave stream*. *Journal of the American Water Resources Association*, 39, 1497–1505.
- Griebler C., Lueders T. (2009) *Microbial biodiversity in groundwater ecosystems*. *Freshwater Biology*, 54, 649–677.
- Griebler C., Stein H., Kellermann C., Berkhoff S., Brielmann H., Schmidt S., Selesi S., Selesi D., Steube C., Fuchs A., Hahn H.J. (2010) *Ecological assessment of groundwater ecosystems—Vision or illusion?* *Ecological Engineering*, 36, 1174–1190.
- Guyot J.L., Auler A., Oga D., Obstancias I., Appay J.L. (1996) *Balanço hidro-geoquímico = Bilan hydro-géochimique*. *Bulletin du Groupe Spéléologique Bagnols Marcoule, Hors série spécial Goiás 94 & Goiás 95. Carste de São Domingos, Goiás, Brasil*, pp. 52–57.
- Hahn H.J., Fuchs A. (2009) *Distribution patterns of groundwater communities across aquifer types in south-western Germany*. *Freshwater Biology*, 54, 848–860.
- Hessen D.O., Elser J.J., Sterner R.W., Urabe J. (2013) *Ecological stoichiometry: An elementary approach using basic principles*. *Limnology and Oceanography*, 58, 2219–2236.
- Islam K.R., Weil R.R. (1998) *Microwave irradiation as foil for routine measurement of microbial biomass carbon*. *Biology and Fertility of Soils*, 27, 408-416.
- Jenkinson D.S., Ladd J.N. (1981) *Microbial biomass in soils: Measurement and turnover*. In: *Soil biochemistry*. Paul E.A., Ladd J.N. (eds). Marcel Dekker: New York; 415–471
- Johnston M.D., Muench B.A., Banks E.D., Barton H.A. (2012) *Human urine in Lechuguilla Cave: the microbiological impact and potential for bioremediation*. *Journal of Cave and Karst Studies*, 74(3), 278–291.

- Jurado V., Laíz L., Rodríguez-Nava V., Boiron P., Hermosin B., Sanchez-Moral S., Saiz-Jimenez C. (2010) *Pathogenic and opportunistic microorganisms in caves*. *International Journal of Speleology*, 39(1), 15-24.
- Kennedy A.C., Papendick R.I. (1995) *Microbial characteristics of soil quality*. *Journal of Soil and Water Conservation*, 50(3), 243–248.
- Klimchouk A.B. (2000) *Speleogenesis of the great gypsum mazes in the Western Ukraine*. *Speleogenesis: Evolution of Karst Aquifers*, National Speleological Society, Huntsville, Alabama, USA, 261-273.
- Li Xiao H., Tang Z., Huang J., Nie X., Huang B., Ma W., Lu Y., Zeng G. (2015) *Microbial responses to erosion-induced soil physico-chemical property changes in the hilly red soil region of southern China*. *European Journal of Soil Biology*, 71, 37-44.
- Lian B., Yuan D., Liu Z. (2011) *Effect of microbes on karstification in karst ecosystems*. *Chinese Science Bulletin*, 56, 3743–3747.
- Matsuoka M., Mendes I.C., Loureiro M.F. (2003) *Biomassa microbiana e atividade enzimática em solos sob vegetação nativa e sistemas agrícolas anuais e perenes na região de Primavera do Leste (MT)*. *Revista Brasileira de Ciências do Solo*, 27, 425–433.
- McCune J., Grace J.B. (2002) *Analysis of ecological communities*. Glendeden Beach. Oregon, 300p.
- McGill M.B., Gannon K.R., Robertson J.A., Cook F.D. (1986) *Dynamics of soil microbial biomass and water soluble organic C in Breton L after 50 years of cropping to two rotations*. *Canadian Journal of Soil Science*, 66, 1–19.
- Moorhead D.L., Sinsabaugh R.L. (2006) *A theoretical model of litter decay and microbial interaction*. *Ecological Monographs*, 76, 151–174.
- Moquet J.S., Cruz F.W., Novello V.F., Stríkis N.M., Deininger M., Karmann I., Santos R.V., Millo C., Apaestegui J., Guyot J.L., Siffedine A., Vuille M., Cheng H., Edwards R.L., Santini W. (2016) *Calibration of speleothem $\delta 18 O$ records against hydroclimate instrumental records in Central Brazil*. *Global and Planetary Change*, 139, 151-164.
- Northup D.E., Lavoie K.H. (2001) *Geomicrobiology of caves: a review*. *Geomicrobiology Journal*, 18, 199-222.
- Ortiz M., Legatzki A., Neilson J.W., Fryslie B., Nelson W.M., Wing R.A., Soderlund C.A., Pryor B.M., Maier R.M. (2014) *Making a living while starving in the dark: metagenomic insights into the energy dynamics of a carbonate cave*. *ISME Journal*, 8, 478 – 491.

- Parr J.F., Papendick R.I. (1997) *Soil quality: relationships and strategies for sustainable dryland farming systems*. *Annals of Arid Zone*, 36(3), 181-191.
- Paula C.C.P., Montoya Q.V., Rodrigues A., Bichuette M.E., Seleguim M.H.R. (2016) *Terrestrial filamentous fungi from gruta do Catão (São Desidério, Bahia, northeastern Brazil) show high levels of cellulose degradation*. *Journal of Cave and Karst Studies*, 78(3), 208.
- Pellegrini T.G., Ferreira R.L. (2013) *Structure and interactions in a cave guano–soil continuum community*. *European Journal of Soil Biology*, 57, 19-26.
- Pinto-da-Rocha R. (1995) *Sinopse da fauna cavernícola do Brasil (1907-1994)*. *Papéis Avulsos de Zoologia*, 39(6), 61-173.
- Rheims C.A., Pelegatti-Franco F. (2003) *Invertebrados terrestres de cavernas da área cárstica de São Domingos, nordeste de Goiás*. *O Carste*, 15(4), 132-137.
- Schindlbacher A., Zechmeister-Boltenstern S., Jandl R. (2009) *Carbon losses due to soil warming: Do autotrophic and heterotrophic soil respiration respond equally?* *Global Change Biology*, 15, 901–913.
- Simon K.S., Pipan T., Culver D.C. (2007) *A conceptual model of the flow and distribution of organic carbon in caves*. *Journal of Cave and Karst Studies*, 69, 279–284.
- Simon K.S., Benfield E.F., Macko S.A. (2003) *Food web structure and the role of epilithic films in cave streams*. *Ecology*, 84, 2395–2406.
- Sinsabaugh R.L., Manzoni S., Moorhead D.L., Richter A. (2013) *Carbon use efficiency of microbial communities: stoichiometry, methodology and modelling*. *Ecology Letters*, 16, 930–939.
- Spohn M. (2015) *Microbial respiration per unit microbial biomass depends on litter layer carbon-to-nitrogen ratio*. *Biogeosciences*, 12(3), 817-823.
- Tian Y., Haibara K., Toda H., Ding F., Liu Y., Choi D. (2008) *Microbial biomass and activity along a natural pH gradient in forest soils in a karst region of the upper Yangtze River, China*. *Journal of Forest Research*, 13(4), 205-214.
- Trajano E., Majer A.P., Santos F.B., Basile P.A. (2003) *Invertebrados aquáticos de cavernas da área cárstica de São Domingos, nordeste de Goiás*. *O Carste*, 15(4), 126-131.
- Xu X., Thornton P.E., Post W.M. (2013) *A global analysis of soil microbial biomass carbon, nitrogen and phosphorus in terrestrial ecosystems*. *Global Ecology and Biogeography*, 22, 737–749.
- Yang P., Yuan D., Yuan W., Kuang Y., Jia P., He Q. (2010) *Formations of groundwater hydrogeochemistry in a karst system during storm events as revealed by PCA*. *Chinese Science Bulletin*, 55(14), 1412-1422.

Zhang P., Li L., Pan G., Ren J. (2006) *Soil quality changes in land degradation as indicated by soil chemical, biochemical and microbiological properties in a karst area of southwest Guizhou, China*. *Environmental Geology*, 51, 609–619.

Zhou L., Zhou X., Zhang B., Lu M., Luo Y., Liu L., Li B. (2014) *Different responses of soil respiration and its components to nitrogen addition among biomes: a meta-analysis*. *Global Change Biology*, 20(7), 2332-2343.

CAPÍTULO 4:

O QUE HÁ DEBAIXO DA TERRA? DIVERSIDADE MICROBIANA REVELADA EM CAVERNAS TROPICAIS

4.1 RESUMO

As cavernas geralmente possuem estabilidade climática e nichos altamente especializados para organismos que habitam esses ambientes. Poucos estudos usaram o sequenciamento de nova geração para analisar, simultaneamente, a diversidade de bactérias e fungos em comunidades microbianas presentes no ambiente subterrâneo. A maioria dos estudos envolvem apenas as comunidades bacterianas. Em cavernas tropicais, o conhecimento das comunidades microbianas é ainda mais incipiente e não há estudos usando técnicas de sequenciamento para avaliar a diversidade dessas comunidades. O objetivo deste trabalho foi caracterizar a composição e estrutura das comunidades microbianas em cavernas tropicais e avaliar se há um padrão de similaridade entre os grupos de bactérias e fungos. Para isso, o DNA foi extraído de amostras de solo e sedimento (na estação chuvosa - Abril / 2016 e na estação seca - Outubro / 2016) de três cavernas tropicais localizadas no Parque Estadual de Terra Ronca. Após a extração do DNA, as regiões V3-V4 (para bactérias) e ITS (para fungos) foram amplificadas e as sequências obtidas foram utilizadas para análise das comunidades. Variáveis ambientais (como temperatura, umidade do ar e do substrato, pH, carbono orgânico e nitrogênio total) relacionadas às comunidades microbianas foram analisadas. As comunidades bacterianas mostraram dominância de *Actinobacteria* (38,52%) e *Proteobacteria* (principalmente *Alpha* (10,41%) e *Gamma* (8,98%)) nas amostras subterrâneas. As comunidades de fungos foram dominadas pelo filo *Ascomycota* (76,40%), seguido por *Basidiomycota* (6,79%), o qual ocorria com maiores proporções na estação seca e no exterior das cavernas. As comunidades bacterianas mostraram 52,82% de OTUs de organismos não cultiváveis, enquanto as comunidades de fungos se destacaram pelo grande número de OTUs com filo não identificado (15,32%). Apesar da presença de OTUs associadas à atividade quimioautotrófica, o grande número de OTUs de bactérias e fungos com função saprofítica indica a importância da cadeia alimentar detritívora nessas cavernas tropicais. A forte relação entre a estrutura da comunidade microbiana e a quantidade de carbono orgânico sustenta essa afirmação. Não houve padrão sazonal nas comunidades microbianas em cavernas tropicais. No entanto, a vida microbiana dentro das cavernas mostrou maior dissimilaridade entre as comunidades do que nos

ambientes superficiais. Este estudo mostra que, embora as comunidades microbianas em cavernas tropicais tenham a mesma composição (Filos e Classes) do que as cavernas em todo o mundo, as comunidades dos ambientes subterrâneos possuem microrganismos específicos (gênero e espécie), muitos dos quais são desconhecidos, presentes nesses habitats. A singularidade das espécies de microrganismos presente em cada caverna e a forte relação com a entrada de nutrientes alóctones fazem dos estudos microbianos em cavernas tropicais uma ferramenta prioritária para avaliar o uso e manejo desses ambientes. O aumento dos esforços para estudar a diversidade e a dinâmica das comunidades microbianas permite o conhecimento de novas espécies de microrganismos, relações de comunidades microbianas com as dinâmicas ecológicas do ambiente subterrâneo e possíveis riscos na exploração deste habitat.

4.2 INTRODUÇÃO

As cavernas são definidas como qualquer cavidade natural abaixo da superfície da Terra que se estenda além da zona afótica, e que seja acessível aos seres humanos (Gillieson, 1996). Muitas cavernas são encontradas em regiões cársticas, formadas em rochas carbonáticas. As cavernas são consideradas ambientes com climas estáveis, ou seja, com baixa variação de temperatura, alta umidade e com concentrações minerais que fornecem nichos ecológicos para microrganismos altamente especializados. (Schabereiter-Gurtner et al., 2003). A vida é suportada pela atividade fotossintética apenas na entrada da caverna, em alguns casos nas zonas de penumbra, onde a luz solar penetra na caverna. Alternativas para fixação de carbono em cavernas incluem quimioautotrofia e quimiolitotrofia pela oxidação de amônio, nitrito, enxofre, manganês ou ferro (Northup & Lavoie, 2001). Evidências indicam que microrganismos podem sustentar ecossistemas subterrâneos por meio da produção primária quimioautotrófica, por constituírem a base das cadeias alimentares e suprindo os ciclos biogeoquímicos (Wu et al., 2015). Além disso, os microrganismos podem interagir com as rochas e contribuir para a espeleogênese, processo de desenvolvimento das cavernas (Macalady et al., 2007, Carmichael et al., 2013).

A presença de microrganismos em ambientes terrestres e aquáticas em cavernas de todo o mundo tem sido relatado usando métodos dependentes de cultivo (Laiz et al., 2000; Canaveras et al., 2001; Paula et al., 2016). No entanto, conhecidos Filos

bacterianos e fúngicos foram detectados em ambientes cavernícolas por sequenciamento de nova geração (Barton et al., 2007; Carmichael et al., 2013; Ortiz et al., 2014; Man et al., 2018), trazendo grandes avanços ao nosso conhecimento sobre a diversidade de microrganismos em ambientes subterrâneos, desde a sua introdução aos estudos da ecologia microbiana (Roesch et al., 2007).

As comunidades microbianas em cavernas são frequentemente variáveis de acordo com os microhabitats. A entrada de nutrientes e impactos ambientais podem mudar a diversidade microbiana de uma caverna. Águas de gotejamento, rios subterrâneos e animais podem fornecer insumos orgânicos que facilitam a vida de microrganismos heterotróficos em algumas cavernas (Groth et al., 2001). Além disso, atividades humanas podem ser ameaças às cavernas abertas ao turismo, podendo introduzir espécies exóticas e causar um desequilíbrio ecológico (Diaz-Herraiz et al., 2013). A análise da diversidade microbiana de habitats únicos, como as cavernas, oferece a oportunidade de expandir nossa compreensão sobre a diversidade microbiana em uma visão global e o potencial de obter novas informações sobre a dinâmica energética de novas comunidade microbianas (Ortiz et al., 2012).

Embora a diversidade microbiana seja estudada em cavernas, a maioria das pesquisas se concentram em comunidades microbianas localizadas no clima temperado, limitando-se a poucos locais de amostragens em uma caverna e, muitas vezes, em apenas uma ocasião de amostragem (Vanderwolf et al., 2013). Não há estudos sobre comunidades microbianas em cavernas tropicais usando o sequenciamento de nova geração. As comunidades microbianas (fungos e bactérias) em cavernas podem ser utilizadas como conhecimento básico para inferir a dinâmica entre as comunidades e os insumos energéticos nesses ecossistemas. Portanto, os objetivos deste trabalho foram caracterizar a composição e estrutura de comunidades microbianas, bactérias e fungos, em três cavernas tropicais e avaliar se houve padrões de similaridade entre comunidades de bactérias e fungos de cavernas tropicais. Embora estudos anteriores tenham documentado comunidades microbianas distintas em cavernas de calcário localizadas em regiões globalmente diversas, o trabalho atual é único em seu esforço para analisar a diversidade e a dinâmica de comunidades microbianas em um gradiente trófico durante dois períodos contrastantes: estação seca e chuvosa. A caracterização taxonômica das distintas comunidades microbianas presentes nas cavernas tropicais

estudadas e sua relação com as variáveis ambientais é um passo crítico para elucidar as dinâmicas ecológicas que orientam a formação de comunidades microbianas em ambientes subterrâneos.

4.3 MATERIAIS E MÉTODOS

4.3.1 LOCAL DE ESTUDO

O Parque Estadual de Terra Ronca (PETeR) (46 ° 100'-46 ° 300'S; 13 ° 300 ' - 13 ° 500'W), localizado na cidade de São Domingos (GO), possui um grande sistema subterrâneo formado por rios que nascem no Planalto da Serra Geral, caracterizada morfologicamente por ser originada nos arenitos da Formação Urucuia (no Cretaceus). O PETeR é uma área cárstica cortada por riachos paralelos que correm para o oeste, para se juntar ao rio Paraná, um afluente do Rio Tocantins, na Bacia do Amazonas. A área de estudo está inserida no domínio fitogeográfico do Cerrado e o clima é tropical semi-úmido com uma precipitação anual de cerca de 1270 mm ano⁻¹ (Moquet et al., 2016). A estação chuvosa estende-se de novembro a abril e a seca, essencialmente de maio a outubro (Moquet et al., 2016).

Três cavernas foram estudadas: Angélica (caverna "A"), São Bernardo (caverna "S") e Terra Ronca II (caverna "TR"). Todas as cavernas estudadas possuem uma grande diversidade de macrofauna aquática e terrestre composta por aranhas, millípedes, opiliões, isopodas, morcegos, entre outros (Simões, Ferreira & Bichuette, 2013). Algumas delas são espécies endêmicas e troglomórficas, portanto, essas cavernas são consideradas como *spots* de biodiversidade (Trajano et al., 2003; Bichuette et al., 2015). A caverna Angélica (13 ° 31'29 "S e 46 ° 23'07" W) é atravessada pelo Rio Angélica e é uma das maiores cavernas do Brasil, com uma extensão de aproximadamente 14 km e uma entrada 10,0 m de altura (FIGURA 4.1). A caverna faz parte de um enorme sistema de drenagem subterrânea chamado Angélica-Bezerra (Bichuette et al., 2015). A caverna São Bernardo (13,81 ° S e 46,35 ° W) (FIGURA 4.2) é atravessada pelos rios São Bernardo e Palmeiras (Sistema São Bernardo - Palmeiras). A entrada da caverna São Bernardo é uma dolina localizada a uma altitude de 631 ,0 m de altura. A caverna Terra Ronca II faz parte do sistema Terra Ronca-Malhada (FIGURA 4.3). A caverna Terra Ronca II possui uma entrada de aproximadamente 70 metros e também é utilizada para visitaç

turística. A caverna Terra Ronca II abriga vários animais endêmicos e espécies troglomórficas.



FIGURA 4.5. Imagens da caverna Angélica destacando o ambiente superficial (A), vista externa (B) e interna (C) da entrada da caverna, e zona afótica da caverna (D).



FIGURA 4.6. Imagens da caverna São Bernardo destacando o ambiente superficial (A), vista externa (B) e interna (C) da entrada da caverna, e zona afótica da caverna (D).

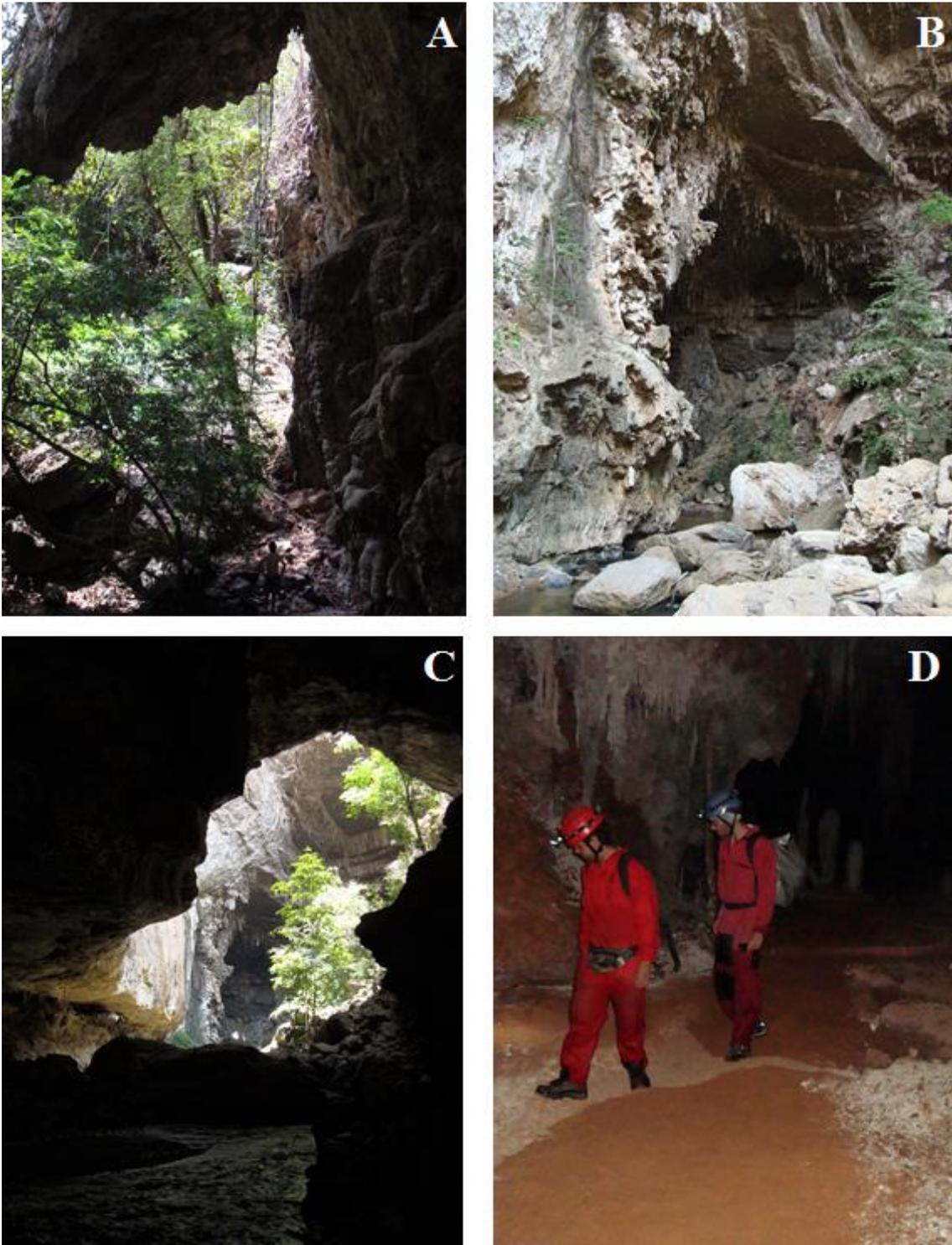


FIGURA 4.7. Imagens da caverna Terra Ronca II destacando o ambiente superficial (A), vista externa (B) e interna (C) da entrada da caverna, e zona afótica da caverna (D).

4.3.2 AMOSTRAGEM

As coletas foram realizadas nos meses de abril e outubro de 2016 (licença ICMBio / SISBIO nº 28992-11 e licença Secima, Goiás nº 14886/2010). Quadrantes de aproximadamente 0,25 m² foram utilizados para amostrar três diferentes áreas das cavernas: superfície, entrada da caverna e ambiente subterrâneo (i.e. zona afótica, sem incidência de luz solar). Estas áreas foram amostradas pelo menos duas vezes (réplicas) em cada ocasião de amostragem. Aproximadamente 300 g de substrato (solo ou sedimento) foram coletados em cinco pontos diferentes da área do quadrante, formando uma amostra composta. Os substratos foram coletados a uma profundidade de até 10 cm e armazenados em sacos plásticos estéreis. As amostras foram transportadas para o laboratório de forma refrigerada, homogeneizadas, peneiradas (malha de 2 mm) e armazenadas a 4 ° C.

4.3.3 PARÂMETROS FÍSICOS E QUÍMICOS

Os valores de temperatura (° C) e a umidade do ar (%) foram anotados em cada área amostrada com um intervalo de tempo mínimo de 1 minuto entre as medições (termo-higrômetro Instruntherm THAL-300, resolução 0.1 e ± 5.0% de precisão). O pH do substrato foi medido em uma proporção de água e substrato de 1: 2,5 (peso / peso). A umidade nas amostras de solo e sedimento foi estimada pelo método gravimétrico, com secagem a 105 °C por 20 h e os resultados expressos em porcentagem de peso seco. As concentrações de carbono orgânico dissolvido (DOC) foram estimadas colorimetricamente usando o método de Bartlett & Ross (1988). O nitrogênio total (NT) foi determinado pelo método de Kjeldahl, seguido da destilação de amônia (método azul de indofenol) (Bremner & Mulvaney, 1982).

4.3.4 EXTRAÇÃO DE DNA E SEQUENCIAMENTO

O DNA foi extraído de 0,25 g de substrato de cada amostra usando um kit de extração de DNA MoBio PowerSoil (MoBio Laboratories, Carlsbad, CA, EUA) seguindo as instruções do fabricante. Para analisar as comunidades bacterianas as regiões V3-V4 do 16S rRNA foram amplificadas usando o par de primers 341F (5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3') e 805R (5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3') (Herlemann et al., 2011). Para analisar a comunidade de fungos a região Espaçadora do Transcrito

Interno (ITS) presente no rRNA foi amplificada usando o par de primers, ITS3F (5'-GCATCGATGAAGAACGCAGC-3') e ITS4R (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White et al., 1990). Controles negativos e positivos para a extração de DNA e a reação em cadeia da polimerase (PCR) foram utilizados ao longo do experimento. Cada amostra de DNA foi amplificada utilizando a técnica da PCR em reações duplicadas com um volume final de 25 µl. A amplificação dos fragmentos bacterianos incluiu uma etapa inicial de 3 min a 95 °C, seguida por 35 ciclos em 95 °C por 30 s, 55 °C por 1 min e 15 s, 72 °C por 45 s e finalmente 72 °C por 5 min. A amplificação dos fragmentos dos fungos começa em uma etapa inicial de 95 °C por 3 min, seguida por 35 ciclos de 95 °C por 15 s, 60 °C por 15 s, 72 °C por 45 s e, finalmente, 72 °C por 10 min. Cada reação continha 8,5 µl de enzima Kapa High-fidelity HOTSTART ready MIX, 0.1 µM de cada primer, 10 µl água ultra-pura, e 10 ng de DNA. Os produtos da PCR foram purificados com o kit de esferas magnéticas AMPURE XP (Bechman Coulter) e indexados com o kit Nextera XT V2 (Illumina) para identificar as amostras. Realizou-se outro passo de purificação com esferas magnéticas e o pool genômico foi agrupado com 5 µl de cada biblioteca. O sequenciamento de nova geração das regiões V3-V4 para bactérias e região ITS para fungos foram realizados em uma plataforma de sequenciamento Illumina MiSeq. Os amplicons bacterianos foram sequenciados no Laboratório Multi-usuário de Sequenciamento em Larga Escala e Expressão Gênica (Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho) e as sequências dos amplicons fúngicos foram determinadas na empresa Macrogen (Macrogen Inc., Seul, Coréia).

4.3.5 PROCESSAMENTO DOS DADOS E ANÁLISES DA COMUNIDADE

Os dados de sequenciamento de bactérias foram processados usando UPARSE (Edgar, 2013) em um pipeline implementado internamente (Logares, 2017). Os pares das sequências obtidas foram emparelhados com PEAR (Zhang et al., 2014). Os controles de qualidade das sequências foram realizados nas seguintes etapas: todas as sequências menores que 100 bp foram descartadas, a qualidade da desrepliação foi verificada, quimeras foram filtradas e o agrupamento das OTUs (usando o algoritmo UPARSE, com similaridade $\geq 97\%$) foi realizado usando como referência a base de dados SILVA v.119 (Quast et al., 2013). A classificação taxonômica foi feita através do BLASTn SILVA v. 119.1.

As sequências dos fungos foram processadas de modo similar usando o pipeline Referenced Binning Engine for Autonomous Finding (BEAF) (Santos-Júnior, et al., no prelo). Uma busca por sequências homólogas foi realizada usando o algoritmo USEARCH (com semelhança $\geq 97\%$). Em seguida, uma contagem dos hits foi realizada e a abundância calculada após o agrupamento das sequências pelo programa Spades e uma avaliação da qualidade com QUASt. Uma verificação do formato foi realizada e a classificação taxonômica feita usando o banco de dados UNITE (Abarenkov et al., 2010).

Todas as análises estatísticas foram realizadas no Software R (R. Core Team, 2016). As variáveis ambientais foram analisadas por uma estatística descritiva básica (Shapiro-Wilks). A análise de variância e os testes t de Student, com 5% de probabilidade, também foram aplicados para verificar a significância das diferenças entre os resultados. Para a análise de comunidades microbianas, as tabelas de OTUs, para bactérias e fungos, foram rarefeitas para equalizar a abundância relativa de cada organismo, usando a função *rrarefy* do pacote *vegan* (Oksanen et al., 2018). As OTUs Core foram consideradas aquelas com uma abundância relativa, dentro de uma mesma amostra, acima de 1% (Pedrós-Alió, 2012). As análises estatísticas da riqueza microbiana, diversidade alfa (índice de Shannon) e estrutura da comunidade (Simpson e Equitabilidade) foram estimadas usando o pacote *BiodiversityR* (Kindt, 2016). As matrizes de distância da composição das comunidades foram obtidas utilizando a distância de Bray-Curtis e a distância euclidiana foi utilizada para as matrizes ambientais. Assim, o teste de Mantel e o correlograma de Pearson foram utilizados para determinar a influência de variáveis ambientais na composição de comunidades microbianas através dos pacotes *vegan*, *MASS* e *ggplot2*. (Wickham, 2016; Oksanen et al., 2018). As diferenças entre os locais amostrados, cavernas estudadas e as estações foram testadas usando análise de variância multivariada permutacional (PERMANOVA) usando a distância de Bray-Curtis, com 10.000 permutações, por meio da função *adonis* (Oksanen et al., 2018). O escalonamento multidimensional não métrico (NMDS) e análise de agrupamento (função *phreatmap*) foram utilizados para avaliar a dissimilaridade das matrizes de OTUs nos locais amostrados (Kolde & Kolde, 2018). Para o digrama de Venn, o aplicativo de navegação Venny 2.0 foi usado (Oliveros, 2007-2015).

4.4 RESULTADOS

Um total de 3.193.122; 1.616.241 e 737.040 *reads* de comunidades bacterianas foram obtidas das cavernas Angélica (“A”), São Bernardo (“S”) e Terra Ronca II (“TR”), respectivamente. Após a montagem dos contigs, corte e remoção das quimeras, um total de 846.760; 403.170 e 125.970 *reads* válidos foram obtidos para as cavernas “A”, “S” e “TR”, respectivamente. Os *reads* válidos para a caverna “A” foram atribuídos a 4.279 OTUs, enquanto os *reads* válidos para a caverna “S” foram atribuídos a 3.857 OTUs e a “TR” apresentou 3.187 OTUs. A rarefação foi feita a uma profundidade máxima para equalizar o número de leituras por amostra. Após a rarefação, um total de 267 OTUs foram retiradas.

O domínio *Bacteria* (97,83%) apresentou maior proporção de OTUs do que *Archaea* (2,17%). As OTUs bacterianas representaram taxonomicamente 45 filos. A maioria das OTUs dentro desses filos pertencia a grupos não cultiváveis, sugerindo a presença de novos grupos de microrganismos a serem cultivados e taxonomicamente descritos. A distribuição das 50 OTUs mais abundantes nas comunidades bacterianas pode ser observada na FIGURA 4.4. Considerando as OTUs mais abundantes (aquelas com mais de 1,0% de abundância), houve dominância de *Actinobacteria* (13,36%), *Gammaproteobacteria* (6,34%), *Alphaproteobacteria* (2,41%) e *Betaproteobacteria* (1,74%) na estação chuvosa. Os grupos dominantes na estação seca foram *Actinobacteria* (14,69%), *Gammaproteobacteria* (2,57%), *Alphaproteobacteria* (2,26%), *Termoleofilia* (1,26%) e *Acidimicrobiia* (1,22%). O número de OTUs bacterianas compartilhadas entre os locais da superfície, entrada das cavernas e os ambientes subterrâneos pode ser visto na FIGURA 4.6. Considerando as três cavernas, a superfície, entrada das cavernas e os ambientes subterrâneos compartilharam 534, 306 e 824 OTUs respectivamente na estação chuvosa. Houve uma quantidade menor de OTUs compartilhadas na estação seca, exceto na superfície (OTUs compartilhadas: 631 na superfície, 303 na entrada da caverna e 662 no ambiente subterrâneo).

As comunidades de fungos apresentaram um total de 1.316.194; 1.278.211 e 974.578 *reads* válidos obtidos nas cavernas “A”, “S” e “TR”, respectivamente. Os *reads* válidos para a caverna “A” foram atribuídos a 1.810 OTUs, enquanto que para a caverna “S” foram encontradas 1.717 OTUs e para “TR” foram 1.272 OTUs. A rarefação foi feita

a uma profundidade máxima para equalizar o número de *reads* por amostra e todas as OTUs assimiladas a outros filos eucarióticos que não pertencem ao grupo dos fungos foram removidas. Após essa limpeza, foram retiradas 176 OTUs. Foram obtidos 10 filos fúngicos (*Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Chytridiomycota*, *Entomophthoromycota*, *Glomeromycota*, *Mortierellomycota*, *Mucoromycota*, *Olpidiomycota* e *Rozellomycota*) e cerca de 792 OTUs (17,7%) foram classificadas como não identificadas, sugerindo a presença de novas espécies de organismos. As OTUs mais abundantes pertenciam às seguintes classes na estação chuvosa: *Sordariomycetes* (20,07%), *Eurotiomycetes* (16,26%), *Dothideomycetes* (3,47%) e *Saccharomycetes* (3,05%). Houve diferenças na composição das espécies principais na estação seca, com as OTUs pertencentes às classes *Eurotiomycetes* (26,84%), *Sordariomycetes* (18,42%), *Dothideomycetes* (2,90%) e *Agaricomycetes* (1,81%). A composição das comunidades fúngicas com as 50 OTUs mais abundantes pode ser observada na FIGURA 4.5. O número de OTUs compartilhadas entre os ambientes foi semelhante nas duas estações: superfície com 7 OTUs compartilhadas na estação chuvosa e 8 OTUs compartilhadas na estação seca; a entrada das cavernas com 11 OTUs compartilhadas na estação chuvosa e 12 OTUs compartilhadas na estação seca e ambientes subterrâneos com 20 OTUs compartilhadas na estação chuvosa e 15 OTUs compartilhadas na estação seca (FIGURA 4.6).

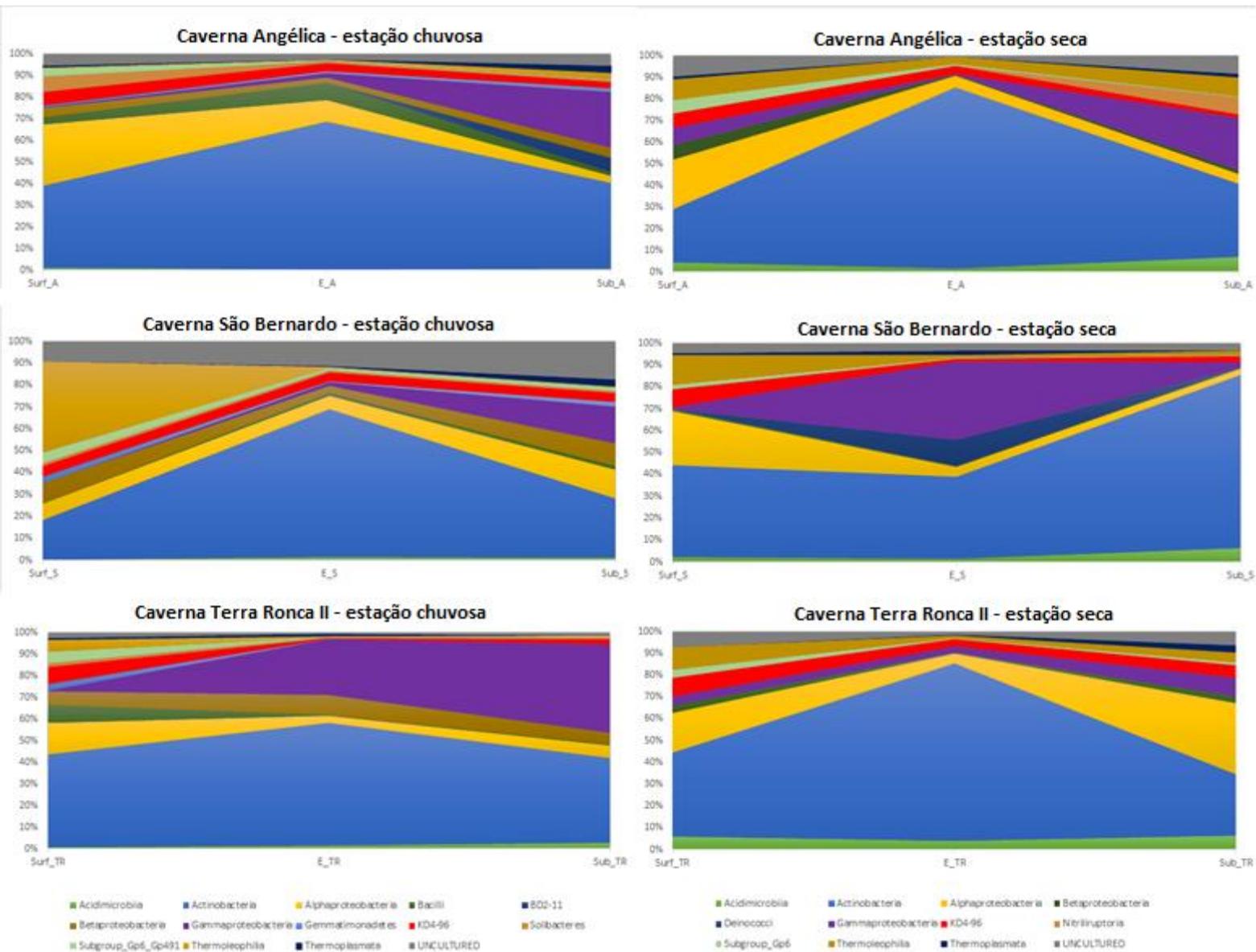


FIGURA 4.8. Distribuição taxonômica (Classes) com as 50 OTUs bacterianas mais abundantes nos locais de amostragem (superfície - Surf, entrada - E - e subterrâneo - Sub) nas cavernas Angélica (“A”), São Bernardo (“SB”) e Terra Ronca II (“TR”) durante a estação chuvosa e seca.

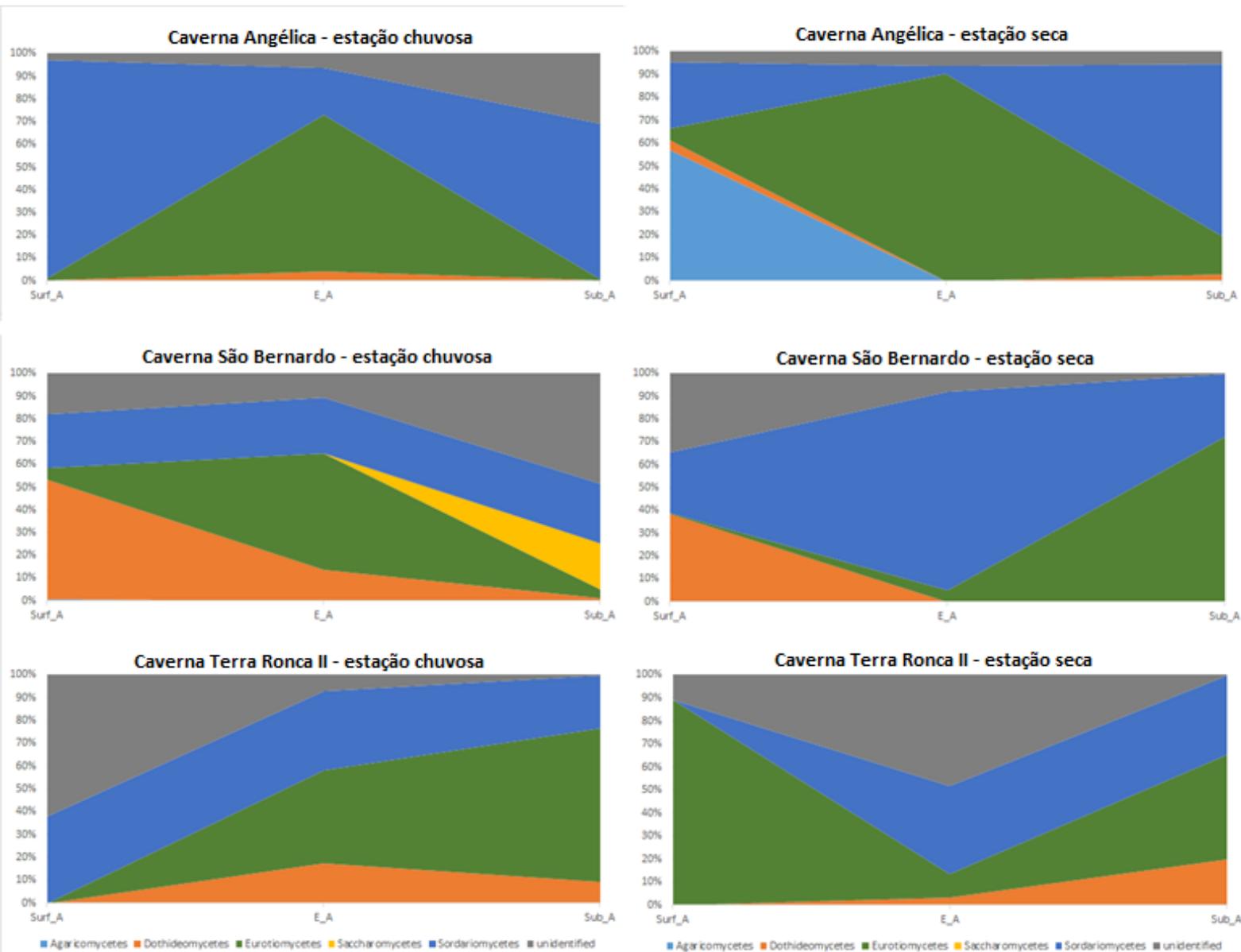


FIGURA 4.9. Distribuição taxonômica (Classe) com as 50 OTUs de fungos mais abundantes nos locais de amostragem (superfície - Surf, entrada - E - e subterrânea - Sub) nas cavernas Angélica (“A”), São Bernardo (“SB”) e Terra Ronca II (“TR”) durante a estação chuvosa e seca.

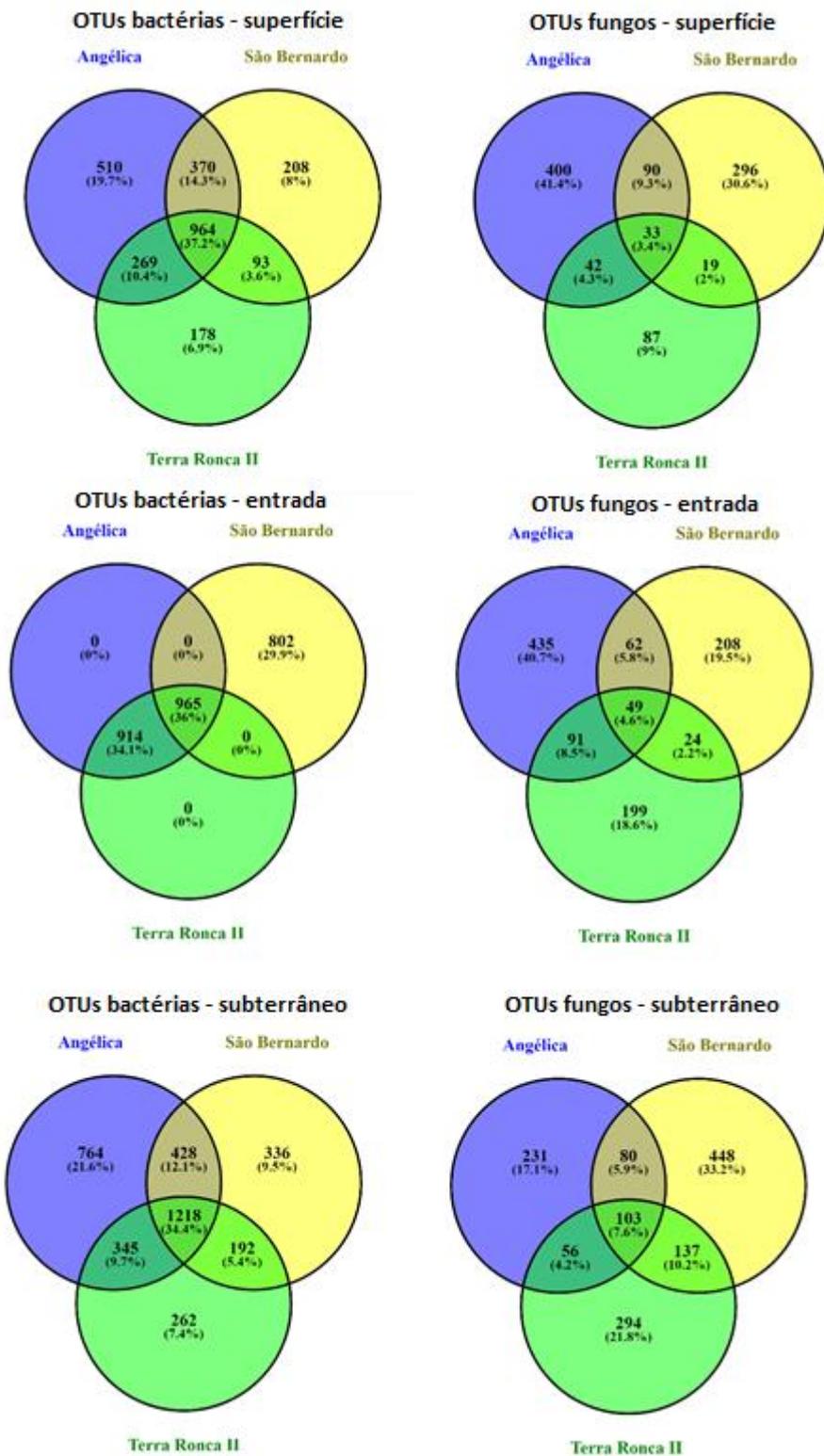


FIGURA 4.10. Diagrama de Venn com a quantidade de OTUs de bactérias e fungos presentes e compartilhadas nos locais de amostragem (superfície, entrada das cavernas e ambientes subterrâneos) nas cavernas Angélica, São Bernardo e Terra Ronca II. Os números indicam a quantidade de OTUs e as interseções dos círculos mostram o número de OTUs compartilhadas.

Os resultados sobre Riqueza, índice de Shannon, Simpson, e Equitabilidade mostraram variabilidade da comunidade microbiana entre os locais estudados (Tabela 4.I). A riqueza das comunidades bacterianas foi maior no ambiente subterrâneo do que na superfície. No entanto a diversidade bacteriana, por meio do índice de Shannon, foi menor no ambiente subterrâneo e a superfície apresentou maior dominância (índice de Simpson) e equitabilidade das OTUs bacterianas. A riqueza e dominância das comunidades de fungos mostraram um padrão similar em relação às comunidades bacterianas, as quais mostraram maior abundância no ambiente subterrâneo do que na superfície. No entanto, não houve nenhum padrão quanto à diversidade e equitabilidade das comunidades de fungos entre as cavernas amostradas. A análise da diversidade alfa nas comunidades estudadas sugere que essas comunidades bacterianas e fúngicas mostraram uma alta biodiversidade em todos os índices testados, sendo a superfície com mais diversidade de OTUs do que o ambiente subterrâneo.

TABELA 4.I. Riqueza, índice de diversidade de Shannon, índice de dominância de Simpson e Equitabilidade de comunidades microbianas (bactérias e fungos) das cavernas Angélica, São Bernardo e Terra Ronca II nas estações chuvosa (abril / 2016) e seca (outubro / 2016). (Surf = superfície, E = entrada das cavernas e Sub = ambientes subterrâneos).

Grupos Taxonômicos	Cavernas	Amostras	Riqueza		Shannon		Simpson		Equitabilidade	
			Chuvosa	Seca	Chuvosa	Seca	Chuvosa	Seca	Chuvosa	Seca
Bactéria	Angélica	Surf	1638	1483	6.531	6.489	0.996	0.997	0.418	0.443
		E	1383	1244	6.041	5.315	0.990	0.973	0.304	0.163
		Sub	1915	2225	6.179	6.387	0.992	0.993	0.252	0.267
	São Bernardo	Surf	1357	1230	6.254	6.179	0.995	0.995	0.383	0.392
		E	913	1493	5.250	5.971	0.984	0.987	0.208	0.262
		Sub	1802	1476	5.806	5.651	0.982	0.989	0.184	0.192
	Terra Ronca II	Surf	896	1220	5.599	6.398	0.985	0.996	0.301	0.492
		E	933	813	5.691	5.258	0.990	0.978	0.317	0.236
		Sub	1633	1473	6.477	6.312	0.996	0.995	0.398	0.374
Fungo	Angélica	Surf	561	213	4.449	4.365	0.970	0.968	0.152	0.369
		E	441	413	4.272	4.325	0.956	0.943	0.162	0.183
		Sub	296	330	4.555	4.189	0.978	0.965	0.321	0.199
	São Bernardo	Surf	309	349	4.769	4.934	0.984	0.987	0.381	0.398
		E	216	214	4.021	4.449	0.958	0.974	0.258	0.399
		Sub	460	609	4.167	4.052	0.953	0.943	0.140	0.094
	Terra Ronca II	Surf	82	143	3.221	4.263	0.980	0.976	0.305	0.497
		E	215	259	4.557	4.484	0.895	0.974	0.443	0.342
		Sub	408	448	3.416	3.343	0.894	0.905	0.074	0.0632

As variáveis ambientais foram comparadas usando o teste t de Student pareando os dois períodos de amostragem (Tabela 4.II). Para entender a relação das variáveis ambientais com as comunidades microbianas, produzimos um correlograma (Correlação de

TABELA 4.II. Valores médios e desvio-padrão dos parâmetros físico (umidade do substrato, temperatura do ar e umidade do ar) e químicos (pH, nitrogênio total (NT) e carbono orgânico dissolvido (COD)) nas cavernas Angélica, São Bernardo e Terra Ronca II em amostras da superfície (Surf), entrada das cavernas (E) e ambientes subterrâneos (Sub) durante a estação chuvosa (abril / 2016) e seca (outubro / 2016).

Estação	Variáveis Ambientais	Caverna Angélica			Caverna São Bernardo			Caverna Terra Ronca II		
		Surf	E	Sub	Surf	E	Sub	Surf	E	Sub
Chuvosa	Umidade substrato (%)	11.07 ± 4.26	1.04 ± 0.36	16.04 ± 1.64	3.55 ± 0.17	4.37 ± 1.58	10.99 ± 6.95	8.21 ± 1.04	0.73 ± 0.16	15.49 ± 4.51
	Temperatura (°C)	26.78 ± 0.38	30.46 ± 1.75	28.21 ± 0.24	26.03 ± 1.06	27.76 ± 0.76	26.03 ± 0.76	29.51 ± 0.42	27.75 ± 1.55	25.78 ± 0.27
	Umidade do ar (%)	87.63 ± 3.49	69.68 ± 3.94	89.21 ± 5.86	97.55 ± 1.77	90.78 ± 2.77	96.63 ± 3.11	70.83 ± 1.76	70.83 ± 1.76	87.00 ± 1.69
	pH	7.67 ± 0.22	6.93 ± 1.03	8.16 ± 0.46	7.61 ± 0.11	7.78 ± 0.66	8.32 ± 1.09	7.85 ± 0.44	8.37 ± 0.82	9.02 ± 0.40
	NT (g kg ⁻¹)	0.067 ± 0.039	0.015 ± 0.0028	0.016 ± 0.0022	0.113 ± 0.080	0.032 ± 0.022	0.020 ± 0.002	0.025 ± 0.016	0.008 ± 0.002	0.052 ± 0.009
	COD (mg kg ⁻¹)	749.59 ± 517.79	163.04 ± 58.70	113.20 ± 8.64	346.30 ± 52.61	201.14 ± 131.54	77.04 ± 11.36	431.34 ± 367.63	85.07 ± 6.60	176.91 ± 13.28
Seca	Umidade substrato (%)	13.16 ± 2.25	0.86 ± 0.37	13.23 ± 6.57	1.88 ± 0.58	8.55 ± 6.76	1.40 ± 0.82	4.18 ± 0.94	0.62 ± 0.60	12.56 ± 1.54
	Temperatura (°C)	25.58 ± 0.46	25.60 ± 0.73	27.75 ± 1.73	28.63 ± 0.26	27.51 ± 0.67	25.50 ± 0.91	26.96 ± 1.28	26.70 ± 0.30	25.78 ± 0.24
	Umidade do ar (%)	77.70 ± 1.52	76.51 ± 1.80	83.88 ± 3.24	56.23 ± 2.63	76.33 ± 3.21	89.55 ± 3.99	81.06 ± 12.23	78.40 ± 5.70	89.71 ± 1.03
	pH	8.22 ± 0.04	8.33 ± 0.31	8.71 ± 0.28	7.40 ± 0.42	8.53 ± 0.14	8.61 ± 0.61	7.63 ± 0.27	8.51 ± 0.62	7.56 ± 1.81
	NT (g kg ⁻¹)	0.036 ± 0.001	0.195 ± 0.1752	0.024 ± 0.0013	0.039 ± 0.007	0.024 ± 0.018	0.015 ± 0.002	0.049 ± 0.041	0.025 ± 0.007	0.032 ± 0.001
	COD (mg kg ⁻¹)	473.11 ± 36.00	154.03 ± 53.74	79.01 ± 15.11	292.78 ± 42.53	269.66 ± 203.36	44.22 ± 14.18	708.91 ± 134.31	197.55 ± 10.8	299.38 ± 17.52

Pearson) e usamos o teste de Mantel para verificar a significância das relações e indicar os principais fatores ambientais que influenciam a estrutura das comunidades.

Pode-se observar que os ambientes subterrâneos e a superfície possuem OTUs específicas relacionadas a variáveis ambientais, ou seja, OTUs correlacionadas positivamente com uma variável ambiental em um local de amostragem não apresentam essa mesma correlação em outro local amostrado. Além disso, a estação seca mostrou correlações mais fortes entre as OTUs e as variáveis ambientais no ambiente subterrâneo (aqui considerando a entrada das cavernas e a zona afótica). OTUs das classes *Betaproteobacteria* (*Comamonas* sp., *Ideonella* sp. e *Nitrosomonadaceae* sp.) e *Gamma*proteobacteria (*Pseudomonas* sp., *Xanthomonadales* e *Steroidobacter*) mostraram correlação positiva com a quantidade de carbono orgânico. Houve uma correlação positiva entre a quantidade de nitrogênio em ambientes subterrâneos e OTUs da classe *Betaproteobacteria* (*Nitrosomonadaceae*). No entanto, algumas OTUs de Actinobacteria mostraram uma correlação negativa com a quantidade de nitrogênio e carbono (FIGURA 4.7 e 4.8).

As comunidades de fungos tiveram correlações mais fortes com carbono do que com quantidades de nitrogênio em ambientes subterrâneos. OTUs das classes *Wallemiomycetes* (*Wallemia* sp), *Sordariomycetes* (*Hypocreales* sp), *Eurotiomycetes* (*Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus* sp e *Penicillium citrinum*) e *Dothideomycetes* (*Dothiorella oblonga*, *Phoma* sp e *Botryosphaeriaceae*) apresentaram correlações positivas com carbono orgânico na estação chuvosa. Houve uma fraca correlação entre as OTUs fúngicas e a quantidade de nitrogênio nos ambientes (FIGURA 4.9 e 4.10).

O teste de Mantel (Tabela 4.III) mostrou relações fortes e significativas entre as comunidades bacterianas e a quantidade de carbono e nitrogênio, tanto na estação chuvosa quanto na seca. Diferentes fatores ambientais influenciam a estrutura das comunidades de fungos em cada estação. Na estação chuvosa, as comunidades de fungos estavam relacionadas com a quantidade de carbono orgânico, no entanto, na estação seca, outras variáveis ambientais foram determinantes para as comunidades de fungos, como umidade do substrato, pH e quantidade de carbono orgânico.

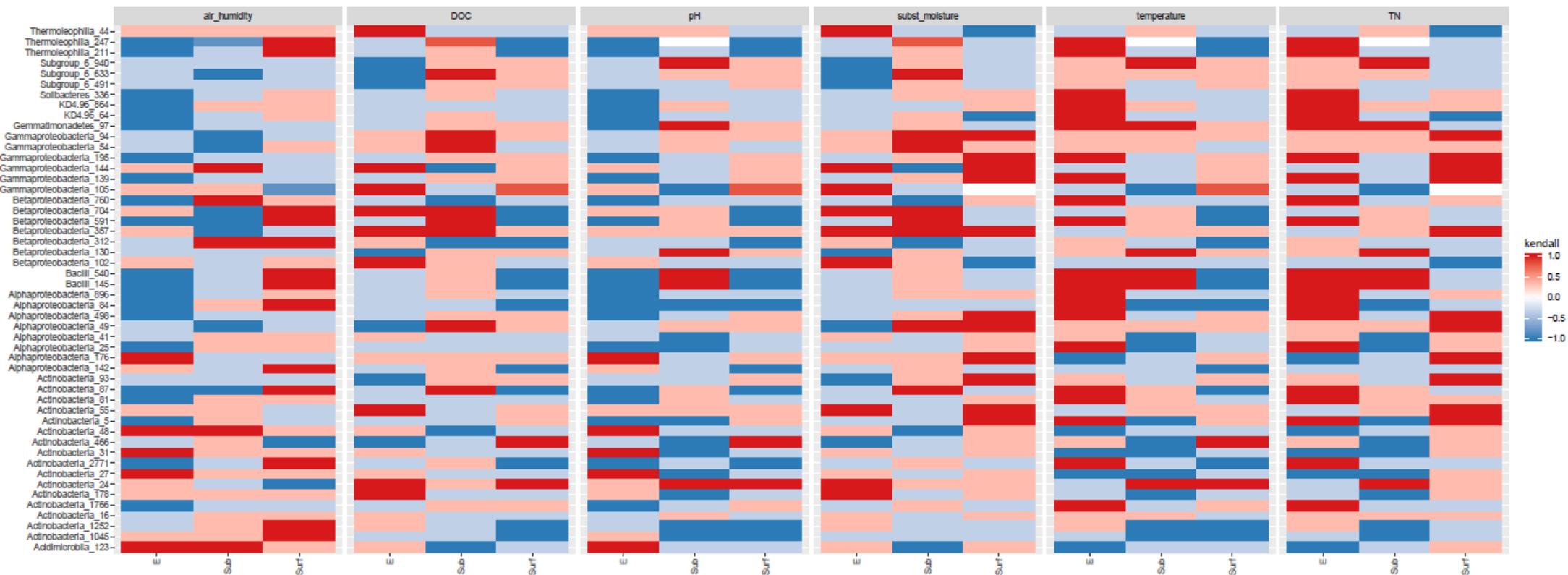


FIGURE 4.11. Correlograma de Pearson, usando o coeficiente de Kendall (barra lateral), entre variáveis físicas e químicas (umidade do ar, carbono orgânico dissolvido (DOC), pH, umidade do substrato, temperatura e nitrogênio total (TN)) e OTUs bacterianas mais abundantes das cavernas estudadas nos locais de amostragem (Superfície - surf, Entrada – E, Subterrâneo - Sub) na estação chuvosa (abril / 2016).

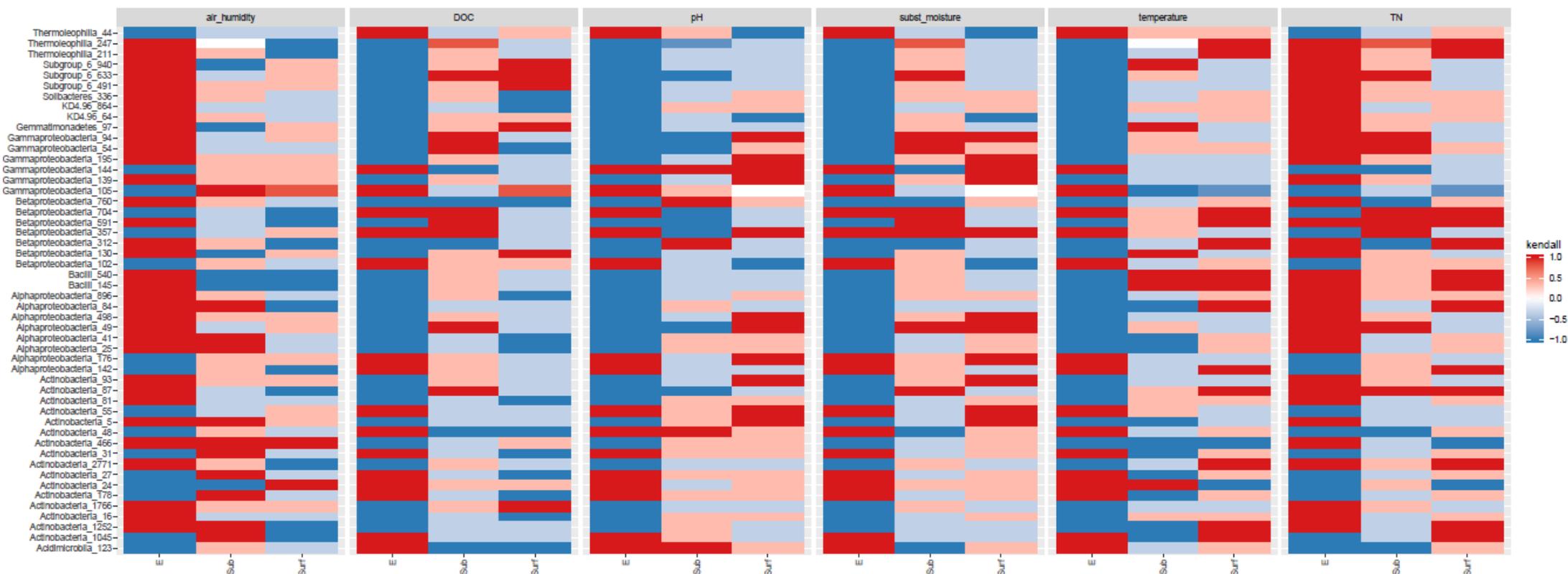


FIGURE 4.12. Correlograma de Pearson, usando o coeficiente de Kendall (barra lateral), entre variáveis físicas e químicas (umidade do ar, carbono orgânico dissolvido (DOC), pH, umidade do substrato, temperatura e nitrogênio total (TN)) e OTUs bacterianas mais abundantes das cavernas estudadas nos locais de amostragem (Superfície - surf, Entrada – E, Subterrâneo - Sub) na estação seca (Outubro/2016).

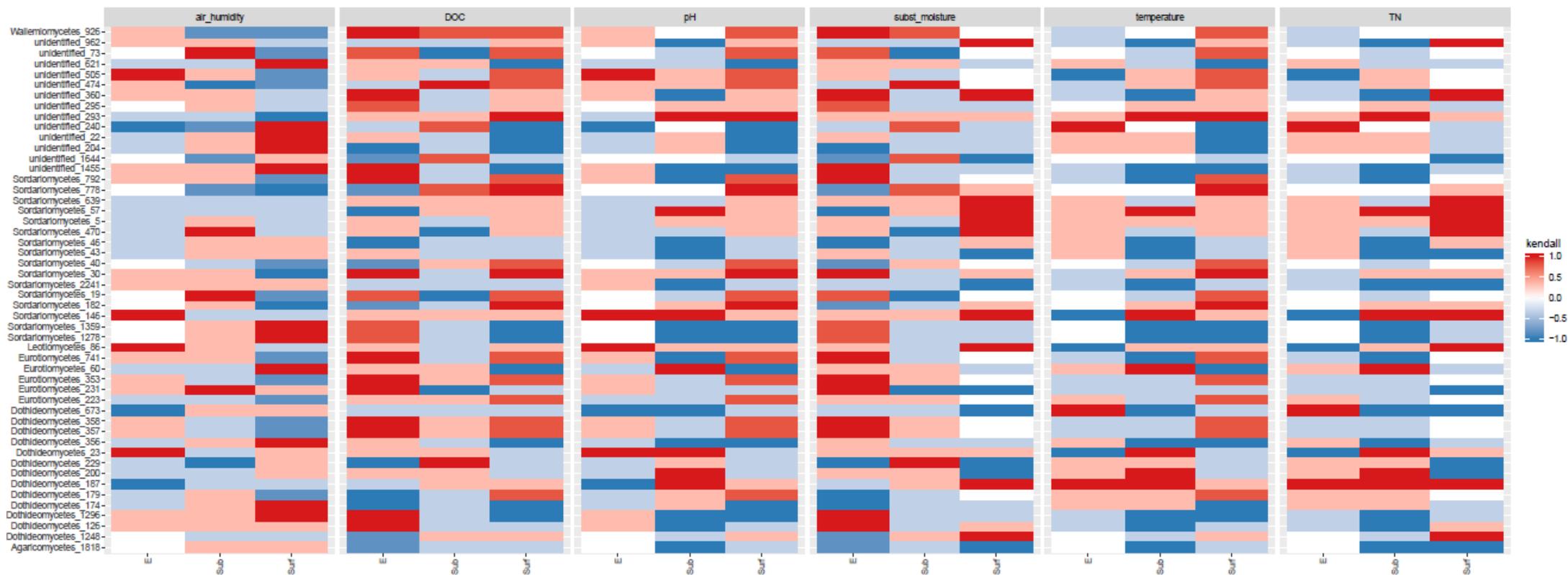


FIGURE 4.13. Correlograma de Pearson, usando o coeficiente de Kendall (barra lateral), entre variáveis físicas e químicas (umidade do ar, carbono orgânico dissolvido (DOC), pH, umidade do substrato, temperatura e nitrogênio total (TN)) e OTUs dos fungos mais abundantes das cavernas estudadas nos locais de amostragem (Superfície - surf, Entrada – E, Subterrâneo - Sub) na estação chuvosa (Abril/2016).

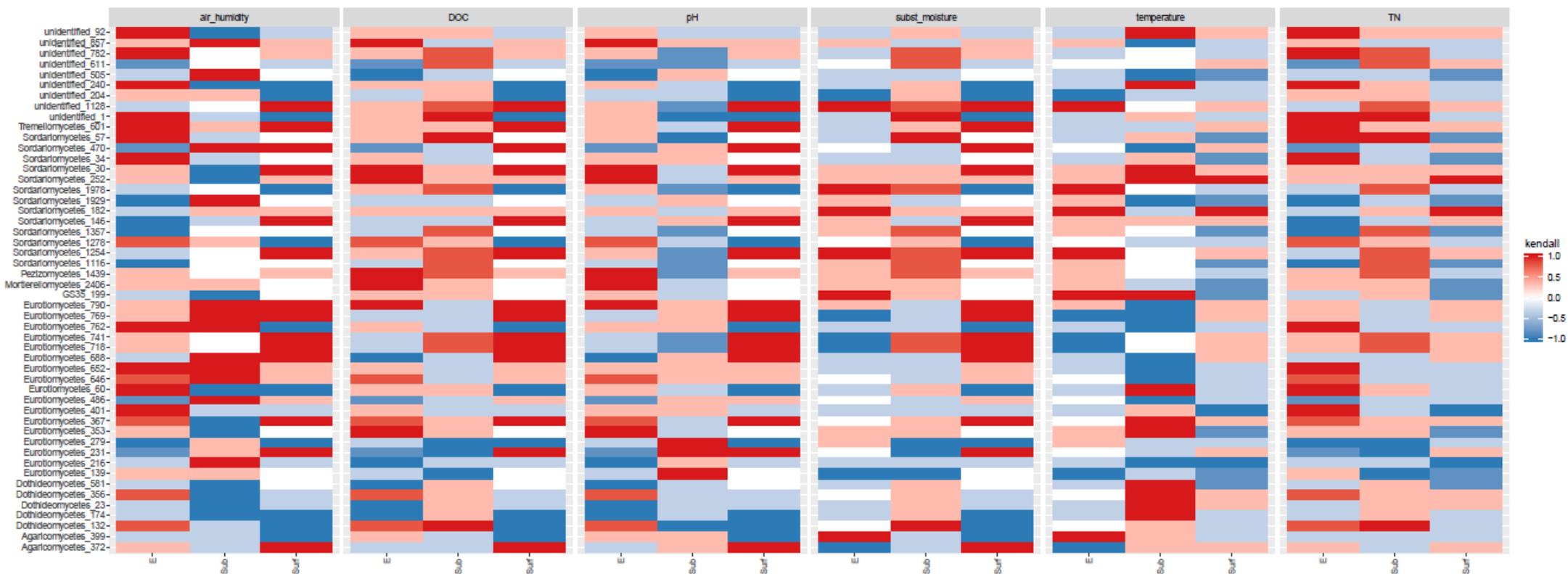


FIGURE 4.14. Correlograma de Pearson, usando o coeficiente de Kendall (barra lateral), entre variáveis físicas e químicas (umidade do ar, carbono orgânico dissolvido (DOC), pH, umidade do substrato, temperatura e nitrogênio total (TN)) e OTUs de fungos mais abundantes das cavernas estudadas nos locais de amostragem (Superfície - surf, Entrada – E, Subterrâneo - Sub) na estação seca (Outubro/2016).

Tabela 4.III. Teste de Mantel mostrando as relações significativas entre as matrizes de dissimilaridade da comunidade microbiana (distância de Bray Curtis) e as matrizes de dissimilaridade das variáveis ambientais (distância Euclidiana) nos dois períodos de amostragem (estação chuvosa e seca). r = coeficiente de correlação de Pearson e p = significância estatística. Valores em negrito indicam variáveis com significância estatística.

ESTAÇÃO	Grupo taxonômico * variável ambiental	R	p
CHUVOSA	Bactéria * umidade do substrato	0.0915	0.0791
	Bactéria * temperature	0.0256	0.0918
	Bactéria * umidade do ar	0.0636	0.0687
	Bactéria * pH	0.1289	0.1800
	Bactéria * carbon orgânico dissolvido	0.7212	0.0465
	Bactéria * nitrogênio total	0.2852	0.0303
	Fungo * umidade do substrato	0.0892	0.0839
	Fungo * temperature	0.1608	0.4680
	Fungo * umidade do ar	0.0327	0.0675
	Fungo * pH	0.0747	0.1012
	Fungo * carbono orgânico dissolvido	0.3628	0.0266
	Fungo * nitrogênio total	0.0719	0.1220
	SECA	Bactéria * umidade do substrato	0.1078
Bactéria * temperature		0.0391	0.0847
Bactéria * umidade do ar		0.1179	0.0810
Bactéria * pH		0.1079	0.2230
Bactéria * carbono orgânico dissolvido		0.6708	0.0442
Bactéria * nitrogênio total		0.7465	0.0348
Fungo * umidade substrato		0.1828	0.0030
Fungo * temperature		0.0656	0.1930
Fungo * umidade do ar		0.0248	0.3680
Fungo * pH		0.1700	0.0140
Fungo * carbon orgânico dissolvido		0.4669	0.0240
Fungo * nitrogênio total		0.0303	0.0611

Análises de PERMANOVA, utilizando a distância de Bray-Curtis, mostraram diferença significativa entre os grupos superfície, entrada da caverna e ambiente subterrâneo para as comunidades bacterianas ($R^2 = 0,1492$, $p = 9,999 \text{ e}^{-05}$) e fungos ($R^2 = 0,06456$, $p = 9,999 \text{ e}^{-05}$) nos dois períodos amostrados (estação chuvosa e seca). Não houve diferença significativa nas comunidades microbianas considerando apenas a sazonalidade. Portanto, esses grupos (superfície, entrada da caverna e ambiente subterrâneo) foram utilizados em análises de dispersão de dispersão, escalonamento multidimensional não-métrico (NMDS) e análise de agrupamento por heatmap.

Apesar das diferenças estatísticas observadas na PERMANOVA, apenas as comunidades de fungos na superfície não mostraram sobreposição na análise de escalonamento multidimensional não-métrico (NMDS) (FIGURA 4.11). Na análise de agrupamento em conjunto com o mapa de calor para as comunidades bacterianas e fúngicas, não foi possível observar uma tendência clara na separação entre os locais amostrados (superfície, entrada da caverna e ambiente subterrâneo) e entre as cavernas estudadas (Angélica, São Bernardo e Terra Ronca II) (FIGURA 4.12 e 4.13).

4.5 DISCUSSÃO

Embora os ambientes subterrâneos apresentem um menor aporte de nutrientes, os resultados deste trabalho mostraram microbiomas altamente diversos nas cavernas tropicais, indicando uma alta diversidade de bactérias e de fungos, além do grande potencial deste ambiente em abrigar novas espécies de microrganismos. As análises estatísticas não mostraram diferenças nas comunidades microbianas em relação à variação sazonal, ou seja, não houve sinal sazonal em nosso estudo. Portanto, a sazonalidade não foi considerada na discussão, mas foram consideradas as diferenças espaciais entre a superfície, entrada da caverna e ambiente subterrâneo.

Cavernas de calcário, como a caverna Altamira na Itália (Portillo et al., 2009), Pajsarjeva na Eslovênia (Pasic et al., 2010), Kartchner Caverns nos Estados Unidos da América (Ortiz et al., 2012), caverna Jinjia na China (Wu et al., 2015) e cavernas de Mizoram na Índia (Mandal et al., 2017) foram estudadas microbiologicamente na última década. Nestas cavernas houveram predomínio do filo *Actinobacteria* e *Proteobacteria*, com as classes mais comuns pertencentes a *Actinobacteria*, *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria* e *Gammaproteobacteria*. Da mesma forma, nossos resultados revelaram que o filo *Actinobacteria* e *Proteobacteria* foram dominantes na estação chuvosa e seca.

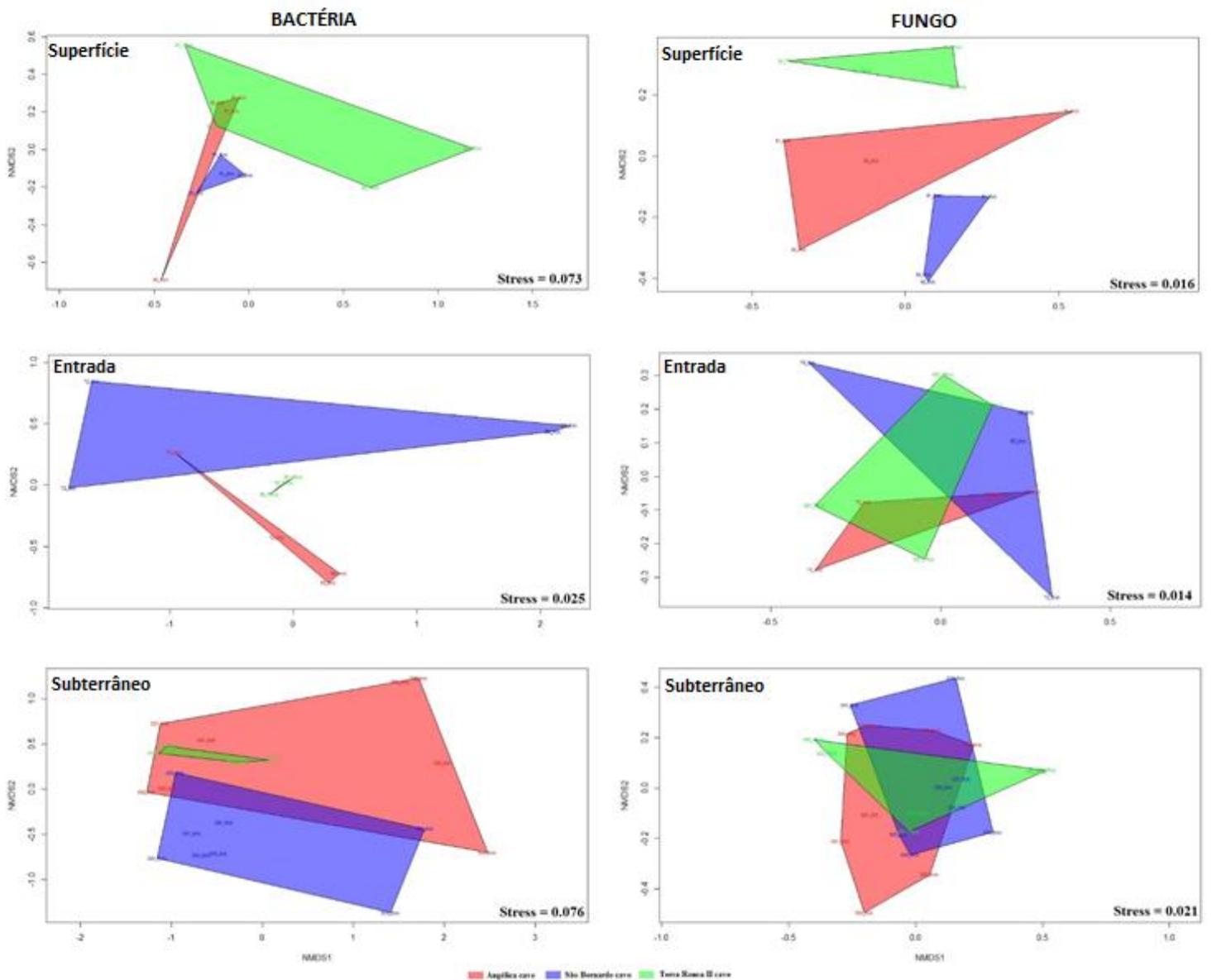


FIGURA 4.151. Escalonamento multidimensional não-métrico (NMDS) com distância de Bray-Curtis para as OTUs de bactérias e fungos das amostras coletadas nas cavernas (superfície, entrada e ambiente subterrâneo). Cada polígono indica uma caverna designada pela cor (vermelho = caverna Angélica, azul = caverna São Bernardo e verde = caverna Terra Ronca II).

Proteobacteria em cavernas do mundo todo, um conjunto de microrganismos específicos das cavernas de calcário torna-se mais evidente. No entanto, as proporções das classes dadas dependem das características particulares de cada caverna (Engel et al., 2010; Jurado et al., 2010; Jones et al., 2012), indicando que cada caverna possui características singulares que a diferenciam de outras do ponto de vista microbiológico.

Actinobacteria foi uma das classes dominantes em nosso estudo, especialmente na entrada das cavernas. Os gêneros mais abundantes foram *Arthrobacter*, *Crossiella*, *Micromonospora*, *Nocardioides* e *Streptomyces*. Esses gêneros foram encontrados anteriormente em outras cavernas em grande abundância (Groth et al., 2001; Barton et al., 2004). Os organismos da classe *Actinobacteria* são heterotróficos típicos, desempenham um papel crucial no ciclo de carbono pela degradação de resíduos orgânicos (Ivanova et al., 2013), possuem versatilidade na degradação de diversos materiais húmicos e recalcitrantes, solubilizam fosfato e carbonato de cálcio (Ortiz et al., 2012) e possuem papel funcional na biomineralização nos ecossistemas cavernícolas (Zhou et al., 2007). Organismos do gênero *Arthrobacter* foram previamente observados em cavernas, demonstrando como via metabólica fixação de nitrogênio e sobrevivendo a períodos prolongados de limitação nutricional (Dworkin, 2002). Embora a maioria dos organismos da classe *Actinobacteria* prefira o substrato com menor umidade, como na entrada das cavernas, numerosos organismos do grupo *Actinobacteria* (principalmente do gênero *Streptomyces*) parecem ser aptos a se reproduzirem em condições de alta umidade, como no interior das cavernas (Groth et al., 2001), explicando a grande proporção dessa classe nas áreas mais profundas das cavernas tropicais. As entradas das cavernas podem ser consideradas zonas de transição entre a superfície e o subterrâneo, sendo áreas influenciadas por fatores ambientais externos e internos. Devido à inconstância ambiental nesses locais, os microrganismos da classe *Actinobacteria*, dada sua resistência e boa capacidade competitiva, podem ser bons colonizadores na entrada das cavernas. Essas características também destacam o risco envolvido no potencial desenvolvimento de um supercrescimento populacional de *Actinobacteria* em áreas mais profundas das cavernas quando as condições ambientais variam e a matéria orgânica disponível no local aumenta, suportando seu crescimento e grande acúmulo de biomassa, como observado em estudos anteriores (Portillo et al., 2009).

A maioria das sequências bacterianas não foi relacionada a organismos conhecidos por apresentarem atividade quimioautotrófica em cavernas, tais como *Thiobacillus*, *Thiothrix* e *Thioploca* (Sarbu et al., 1996, Chen et al., 2009). No entanto, nosso estudo mostrou que algumas comunidades bacterianas na zona afótica possuem microrganismos do gênero *Beggiatoa*, o qual também é relacionado às atividades quimioautotróficas em cavernas (Langecker et al., 1996; Chen et al., 2009). Além disso, todas as comunidades bacterianas nos ambientes subterrâneos continham bactérias da família *Nitrosomonadaceae* e do gênero *Nitrospira* (2,78%). Bactérias da família *Nitrosomonadaceae* e do gênero *Nitrospira* são microrganismos indicadores de atividades oxidantes de amônia e nitritos acopladas à fixação de CO₂ em cavernas (Sarbu et al., 1996), importantes produtores primários e agentes chave no ciclo do nitrogênio em cavernas (Ortiz et al., 2012), convertendo amônia em nitrito (Suzuki et al., 1974; Hiorns et al., 1995).

Apesar das cavernas estudadas apresentarem alguns gêneros de bactérias conhecidos por apresentarem atividades quimioautotróficas, a grande abundância de OTUs relacionadas a bactérias saprófitas sugere que essas cavernas provavelmente são suportadas por detritos de origem alóctone e de carbono orgânico transportado para as cavernas por água de gotejamento, rios subterrâneos e atividades turísticas. A atividade heterotrófica foi mais intensa na estação chuvosa, devido à grande quantidade de carbono orgânico neste período e maior correlação entre as OTUs bacterianas e a quantidade de carbono orgânico, conforme observado pela análise de correlação e teste de Mantel. No período seco a correlação de OTUs bacterianas com a quantidade de nitrogênio aumenta, indicando maior influência desse nutriente na comunidade bacteriana, principalmente para microrganismos que atuam no ciclo biogeoquímico do nitrogênio.

Ambientes subterrâneos apresentaram maior riqueza e diversidade de OTUs relacionadas a classes de bactérias não cultiváveis (67 OTUs, com 1,13% das sequências, na superfície; 92 OTUs, com 0,86% das sequências, na entrada das cavernas e 192 OTUs, com 2,68% das sequências, nos ambientes subterrâneos). Dentre as classes não cultiváveis, apenas 30 OTUs foram compartilhadas nos três locais amostrados (superfície, entrada das cavernas e ambientes subterrâneos) e 107 OTUs foram exclusivas dos ambientes subterrâneos. Analisando os níveis taxonômicos mais baixos,

como gênero e espécie, essa proporção aumenta bastante. Em nível de espécie, a maior riqueza e abundância de OTUs bacterianas não cultiváveis foi encontrada nos ambientes subterrâneos, com 52,82% das sequências pertencentes a 1626 OTUs, do que na superfície, com 52,17% das sequências pertencentes a 1316 OTUs. Esses dados evidenciam o grande potencial das cavernas em abrigar novas linhagens bacterianas a serem isoladas e descritas taxonomicamente, similarmente aos resultados obtidos em estudos anteriores (Wu et al., 2015; Mandal et al., 2017).

Poucos estudos na literatura científica avaliaram a diversidade de fungos em cavernas. Muitos pesquisadores alertam sobre a falta de estudo das comunidades de fungos em cavernas (Vanderwolf et al., 2013), tornando o conhecimento de sua diversidade e das interações com o ambiente subterrâneo incipiente. Mesmo que grandes esforços tenham sido realizados para revelar a diversidade de fungos em diferentes nichos por meio de tecnologias de sequenciamento de nova geração (NGS) (Abdelfattah et al., 2016; Duarte et al., 2016), essa ferramenta biomolecular ainda é pouco utilizada em estudos com as comunidades de bactérias em cavernas. Até agora, apenas 1029 espécies de 518 gêneros de fungos foram relatadas em cavernas (Vanderwolf et al., 2013). Mais relevante ainda, cerca de 92,0% dos estudos sobre fungos em cavernas de calcário foram baseados em métodos dependentes de cultivo (Vanderwolf et al., 2013). Sabe-se que as análises baseadas nos métodos dependentes de cultivo revelam de 0,6% a menos de 8,0 % da comunidade total de fungos em um ambiente específico (Hawksworth, 2012). Isso limita substancialmente um conhecimento aprofundado das comunidades de fungos em cavernas, bem como a exploração das potenciais funções ecológicas dos fungos nesse ambiente. Nosso trabalho é pioneiro na avaliação da estrutura e composição de comunidades de fungos em cavernas tropicais usando tecnologias de sequenciamento de nova geração (NGS).

Nossos resultados mostraram uma alta dominância do filo *Ascomycota* nas comunidades de fungos, especialmente durante a estação seca e nos ambientes subterrâneos. No entanto, não foi possível observar um padrão de distribuição das OTUs de fungos nas três cavernas tropicais estudadas. Os *Ascomycota* são fungos com importante função saprofítica, embora algumas espécies possam ser patogênicas, e geralmente são encontradas em áreas com grande quantidade de matéria orgânica (Carmichael et al., 2015). Esse resultado é consistente com outros estudos realizados

anteriormente, os quais mostraram uma predominância do filo *Ascomycota* em cavernas no Brasil e no mundo (Vanderwolf et al., 2013, Paula et al., 2016, Paula et al., 2018). Um estudo molecular da comunidade de fungos na caverna Lascaux (Patrimônio Mundial da UNESCO) mostrou que o filo *Ascomycota* era o mais abundante, sugerindo que o grau de impacto do turismo e de nutrientes pode influenciar diretamente a estrutura dessas comunidades (Martin-Sanchez et al., 2012). Assim, as cavernas tropicais estudadas aqui podem estar recebendo quantidades significativas de carbono alóctone, interferindo diretamente no ciclo biogeoquímico do carbono, e, portanto, tornando as comunidades de fungos dominadas pelo filo *Ascomycota* vulneráveis às mudanças na entrada de nutrientes.

Basidiomycota foi o segundo filo mais abundante nos locais amostrados, com maior abundância na superfície do que nos ambientes subterrâneos. Os *Basidiomycota* são geralmente associados a substratos ricos em nutrientes - como madeira, troncos e galhos, e guano- nos ambientes subterrâneos (Vanderwolf et al., 2013). Nas cavernas estudadas o acúmulo de madeira e guano é influenciado pela dinâmica dos rios subterrâneos, pois as cheias fluviais carregam toda a matéria orgânica (incluindo madeira e guano) dos bancos de sedimentos, dificultando o estabelecimento de fungos *Basidiomycota* nesses locais. Esta quantidade inconstante de substratos ricos em nutrientes dentro da caverna pode explicar a menor abundância de *Basidiomycota* versus *Ascomycota*.

Os gêneros de fungos comumente encontrados em cavernas, como *Laboulbenia*, *Rhachomyces*, *Trichophyton*, *Verticillium* e *Microsporium* (Vanderwolf et al., 2013), não foram detectados nesse estudo. Outros gêneros comuns em cavernas, como *Chrysosporium*, *Isaria*, *Absidia* e *Coprinus*, foram encontrados apenas na entrada das cavernas. No entanto, as cavernas estudadas aqui apresentaram organismos abundantes pertencentes a gêneros nunca antes relatados em cavernas, como *Neocosmospora*. Fungos entomopatogênicos em cavernas, como *Beauveria* spp. e *Paecilomyces* spp. (Yoder et al., 2009), foram encontrados em nossos resultados, mas em baixa abundâncias. As abundâncias notáveis dos filios *Ascomycota* e *Basidiomycota*, em conjunto com a presença de algumas OTUs entomopatogênicas, podem refletir a estrutura trófica detritívora dos ambientes subterrâneos tropicais. Como observado em outros estudos, fungos em cavernas geralmente estão associados a funções parasitárias

e / ou detritívora e, juntamente com as comunidades bacterianas, constituem as principais fontes de alimento dos invertebrados troglóbios não predadores, como isópodos e colêmbolas, além dos protozoários (Bastian et al., 2010, Vanderwolf et al., 2013). Por outro lado, não foi detectada nenhuma OTU associada a *Hystoplasma capsulatum* e *Pseudogymnoascus destructans*, espécies patogênicas comuns em cavernas que causam problemas de saúde para visitantes e exploradores de cavernas, como a Histoplasmose, e afetam a economia local pela proliferação da Síndrome do Nariz Branco nos morcegos (Boyles et al., 2011; Vanderwolf et al., 2013)

Dentre as 103 OTUs de fungos compartilhados nas cavernas estudadas, apenas duas OTUs entre os organismos mais abundantes foram compartilhadas entre os locais das cavernas amostrados: *Aspergillus fumigatus* e *Cladosporium* sp. A maioria das OTUs mais abundantes eram específicas para cada caverna, ou seja, as populações dominantes em cada caverna foram diferentes. Além disso, em cada caverna estudada as comunidades de fungos mostraram uma grande proporção de OTUs específicas para cada ambiente amostrado. Esses resultados evidenciam, mais uma vez, o isolamento desses ambientes, com nichos distintos que dificultam a colonização de OTUs específicas de fungos e não proporcionam o sucesso da colonização de outras populações abundantes fora de seus habitats naturais.

A análise da diversidade de fungos por sequenciamento de nova geração mostrou uma grande diversidade de organismos desconhecidos pela ciência e banco de dados. A composição das comunidades de fungos mostrou muitas OTUs assimiladas com filós que não foram identificados. Dentre essas OTUs não identificadas, a superfície mostrou 270 OTUs (34.853 sequências, 16,86%), entrada das cavernas com 224 OTUs (49.729 sequências, 17,19%) e os ambientes subterrâneos com 322 OTUs não identificadas (61.122 sequências, 13,44%). Considerando todas as cavernas estudadas, 45 OTUs (7,5%) destes fungos não identificados foram compartilhadas nos três locais amostrados (superfície, entrada das cavernas e ambientes subterrâneos). Ainda, entre os fungos não identificados, apenas 29 OTUs foram compartilhadas nos ambientes subterrâneos das três cavernas, onde a maior riqueza de OTUs não identificadas foi observada na caverna Angélica (66 OTUs únicas), seguida pela caverna Terra Ronca II (48 OTUs únicas) e a caverna São Bernardo (46 OTUs únicas). Esse padrão é semelhante ao encontrado por Grishkan et al. (2004) em cavernas de Israel. Embora os autores

tenham trabalhado com isolamento, eles observaram que a maioria das espécies estavam com abundância muito baixa e mostravam baixa frequência de ocorrência entre as cavernas amostradas.

Os resultados do teste de Mantel foram utilizados para investigar a influência de variáveis ambientais nas comunidades de fungos, indicando uma grande influência da quantidade de carbono orgânico em ambas as estações. A umidade do substrato e o pH foram outros fatores ambientais que mostraram resultados significativos, apesar da fraca correlação, com as comunidades de fungos na estação seca. A distribuição e composição de comunidades de fungos nas cavernas são influenciadas por condições microambientais, como pH, umidade e disponibilidade de carbono orgânico (Gorbushina, 2007; Chelius et al., 2009), semelhante aos nossos resultados.

As comunidades bacterianas apresentaram maior riqueza e diversidade em relação às comunidades de fungos, como observado na caverna dos Morcegos, na Espanha (Urzi et al., 2010). Em geral, a comunidade bacteriana apresentou um gradiente de diversidade, onde a entrada das cavernas apresentou a menor diversidade, seguido pelos ambientes subterrâneos e a superfície. Por outro lado, não houve gradiente para diversidade e riqueza dos fungos. O único padrão observado nas comunidades dos fungos foi uma menor diversidade de fungos na entrada da caverna do que nos ambientes subterrâneos e superficiais. Esses resultados são contraditórios aos trabalhos de Vaughan et al (2015), que observaram maior riqueza e diversidade microbiana com o aumento da distância da entrada da caverna. Os pesquisadores relacionaram esse padrão de distribuição de comunidades microbianas ao fluxo de ar na caverna e, talvez, em nosso trabalho, esse fator tenha sido menos determinante na distribuição espacial dos microrganismos nas comunidades subterrâneas.

Houveram diferenças claras entre os ambientes subterrâneos e a superfície no escalonamento multidimensional não-métrico (NMDS). Essas diferenças foram mais evidentes nas comunidades de fungos de ambientes subterrâneos e superficiais. As comunidades microbianas em ambientes subterrâneos formaram polígonos sobrepostos, enquanto as comunidades microbianas na superfície de cada caverna mostraram uma clara separação dos polígonos. Por outro lado, é possível observar que os polígonos formados pelas comunidades subterrâneas (bactérias e fungos) possuem uma maior área, as quais as comunidades microbianas apresentam uma maior distância

ao centróide. Isso indica que as comunidades microbianas na superfície são mais semelhantes entre si do que as comunidades presentes nos ambientes subterrâneos. Esses resultados foram reforçados pela análise de agrupamento, a qual não mostrou uma clara separação entre as comunidades microbianas dos ambientes subterrâneos, embora a superfície tenha apresentado uma tendência de agrupamento.

Enquanto as comunidades bacterianas e fúngicas nos ambientes subterrâneos foram igualmente ricas taxonomicamente e altamente diversas em relação a superfície, não houveram evidências significativas de que as comunidades microbianas dentro das cavernas estudadas apresentassem diferentes composições de espécies. Como mencionado acima, as cavernas estudadas compartilharam 1.218 OTUs bacterianas e 103 OTUs fúngicas nos ambientes subterrâneos. Estes resultados indicam que as comunidades microbianas em um ambiente subterrâneo (ou seja, em apenas uma caverna) podem ter alta dissimilaridade entre elas, no entanto, ao comparar duas ou mais cavernas, essas comunidades microbianas podem mostrar semelhanças na composição das OTUs. Estas dissimilaridades de comunidades microbianas e sobreposição dos agrupamentos das comunidades microbianas também foram observados em Kartchner Cavern (Vaughan et al., 2015; Pfendler et al., 2018), indicando que esse padrão pode ser repetido em cavernas ao redor do mundo.

Este é o primeiro estudo sobre comunidades microbianas em cavernas tropicais e o trabalho é inovador ao considerar variações sazonais e espaciais. Muitos estudos anteriores avaliaram apenas um grupo taxonômico, bactérias ou fungos, e se limitaram a poucas amostras ou apenas uma ocasião de amostragem. Este trabalho mostrou que as cavernas tropicais apresentam grande riqueza e diversidade de bactérias e fungos, com domínio de filós já encontrados em outras cavernas. Devido ao grande número de OTUs relacionadas a funções saprofíticas e associadas ao ciclo do carbono nas cavernas estudadas, a composição das comunidades microbianas indicou que as cadeias alimentares são majoritariamente detritívoras, suportando toda a comunidade cavernícola presente nesse ambiente. Além disso, bactérias conhecidas por atividades quimioautotróficas e associadas ao ciclo do nitrogênio foram encontradas nos ambientes estudados, demonstrando a interação das OTUs bacterianas, uma vez que os produtores primários em cavernas tropicais podem ser complexos, necessitando de mais estudos para esse grupo de microrganismos. Os dados mostraram as cavernas

tropicais como ambientes biologicamente inexplorados e de grande importância ecológica, pois abrigam novos organismos para compor a árvore da vida e melhorar a compreensão da dinâmica ambiental desses habitats. Políticas ambientais negligentes e planos de manejo mal elaborados, incluindo a falta de estudos microbianos, contribuem para a falta de conhecimento da biodiversidade microbiana nesses ambientes. Como demonstrado neste estudo, cada caverna possui OTUs de bactérias e fungos únicas em cada ambiente estudado, sendo necessário o estudo da estrutura e da dinâmica microbiana de cada caverna para entender seu funcionamento ecológico. O uso inadequado dos ambientes subterrâneos pode alterar a entrada de nutrientes e / ou introduzir espécies microbianas exóticas, influenciando diretamente na composição microbiana e podendo levar a mudanças nas funções do ecossistema microbiano nesses habitats. Esse cenário aumenta os riscos de desequilíbrio ambiental em habitats subterrâneos, além da exploração inadequada das cavernas permitir que parte dessa biodiversidade seja perdida, sem mesmo ser conhecida.

4.6 REFERENCES

Abarenkov K., Henrik Nilsson R., Larsson K.H., Alexander I.J., Eberhardt U., Erland S., Hoiland K., Kjoller R., Larsson E., Pennanen T., Sen R., Taylor A.F.S., Tedersoo L., Ursing B.M., Vralstad T., Liimatainen K., Peintner U., Koljalg U. (2010). *The UNITE database for molecular identification of fungi—recent updates and future perspectives*. New Phytologist, 186(2), 281-285.

Abdelfattah A., Wisniewski M., Nicosia M.G.L.D., Cacciola S.O., Schena L. (2016) *Metagenomic analysis of fungal diversity on strawberry plants and the effect of management practices on the fungal community structure of aerial organs*. PloS one, 11(8), 1 - 17.

Bartlett R.J., Ross D.N. (1988) *Colorimetric determination of oxidizable carbon in acid soil solutions*. Soil Science Society of America Journal, 52, 1191-1192.

Barton H.A., Taylor M.R., Pace N.R. (2004) *Molecular phylogenetic analysis of a bacterial community in an oligotrophic cave environment*. Geomicrobiology Journal, 21(1), 11-20.

Barton H.A., Taylor N.M., Kreate M.P., Springer A.C., Oehrle S.A., Bertog, J.L. (2007) *The impact of host rock geochemistry on bacterial community structure in oligotrophic cave environments*. International Journal of Speleology, 36(2), 93 - 104.

Bastian F., Jurado V., Nováková A., Alabouvette C., Sáiz-Jiménez C. (2010) *The microbiology of Lascaux cave*. Microbiology, 156(3), 644-652.

- Bichuette M.E., Simões L.B., von Schimonsky D.M., Gallão J.E. (2015) *Effectiveness of quadrat sampling on terrestrial cave fauna survey-a case study in a Neotropical cave*. Acta Scientiarum, Biological Sciences, 37(3), 345 - 351.
- Boyles J.G., Cryan P.M., McCracken G.F., Kunz T.H. (2011) *Economic importance of bats in agriculture*. Science, 332(6025), 41-42.
- Bremmer J.M., Mulvaney C.S. (1982) *Total nitrogen*. In: Page A.L., *Methods of soil analysis*. Madison: American Society on Agronomy, 595-624.
- Cañaveras J.C., Sanchez-Moral S., Sloer V., Saiz-Jimenez C. (2001). *Microorganisms and microbially induced fabrics in cave walls*. Geomicrobiology Journal, 18(3), 223-240.
- Carmichael M.J., Carmichael S.K., Santelli C.M., Strom A., Bräuer S.L. (2013) *Mn (II)-oxidizing bacteria are abundant and environmentally relevant members of ferromanganese deposits in caves of the upper Tennessee River Basin*. Geomicrobiology Journal, 30(9), 779-800.
- Carmichael S.K., Zorn B.T., Santelli C.M., Roble L.A., Carmichael M.J., Bräuer S.L. (2015) *Nutrient input influences fungal community composition and size and can stimulate manganese (II) oxidation in caves*. Environmental Microbiology Reports, 7(4), 592-605.
- Chelius M.K., Beresford G., Horton H., Quirk M., Selby G., Simpson R.T., Horrocks R, Moore J.C. (2009) *Impacts of alterations of organic inputs on the bacterial community within the sediments of Wind Cave, South Dakota, USA*. International Journal of Speleology, 38(1), 1 -10.
- Chen Y., Wu L., Boden R., Hillebrand A., Kumaresan D., Moussard H., Baciu M., Lu Y., Murrell J.C. (2009) *Life without light: microbial diversity and evidence of sulfur-and ammonium-based chemolithotrophy in Movile Cave*. The ISME journal, 3(9), 1093 - 1104.
- Contos A.K., James J.M., Heywood B., Pitt K., Rogers P. (2001) *Morphoanalysis of bacterially precipitated subaqueous calcium carbonate from Weebubbie Cave, Australia*. Geomicrobiology Journal, 18(3), 331-343.
- Diaz-Herraiz M., Jurado V., Cuezva S., Laiz L., Pallecchi P., Tiano P., Sanchez-Moral S, Saiz-Jimenez C. (2013) *The actinobacterial colonization of Etruscan paintings*. Scientific reports, 3, 1440.
- Duarte S., Bärlocher F., Pascoal C., Cássio F. (2016) *Biogeography of aquatic hyphomycetes: current knowledge and future perspectives*. Fungal Ecology, 19, 169-181.
- Dworkin M. (2002) *The Prokaryotes: An evolving electronic resource for the microbiological community*. New York: Springer-Verlag.

- Edgar R.C. (2010) *Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST*. *Bioinformatics*, 26(19), 2460-2461.
- Edgar R.C. (2013) *UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads*. *Nature methods*, 10(10), 996.
- Engel A.S., Meisinger D.B., Porter M.L., Payn R.A., Schmid M., Stern L.A., Schleifer K.H., Lee N.M. (2010) *Linking phylogenetic and functional diversity to nutrient spiraling in microbial mats from Lower Kane Cave (USA)*. *The ISME journal*, 4(1), 98-110.
- Gillieson D.S. (1996) *Caves: Processes, development, management*. Malden: Blackwell Publishers.
- Gorbushina A. (2007) *Life on the rocks*. *Environmental Microbiology*, 9: 1613-1615
- Grishkan I., Nevo E., Wasser S.P. (2004) *Micromycetes from the saline arubotaim cave: Mount Sedom, the dead sea southwestern shore, Israel*. *Journal of Arid Environments*, 57(4), 431-443.
- Groth I., Schumann P., Laiz L., Sanchez-Moral S., Cañaveras J.C., Saiz-Jimenez C. (2001) *Geomicrobiological study of the Grotta dei Cervi, Porto Badisco, Italy*. *Geomicrobiology Journal*, 18, 241-258.
- Hawksworth D.L. (2012) *Global species numbers of fungi: are tropical studies and molecular approaches contributing to a more robust estimate?* *Biodiversity and Conservation*, 21(9), 2425-2433.
- Herlemann D.P., Labrenz M., Jürgens K., Bertilsson S., Waniek J.J., Andersson A.F. (2011) *Transitions in bacterial communities along the 2000 km salinity gradient of the Baltic Sea*. *The ISME journal*, 5(10), 1571.
- Hiorns W.D., Hastings R.C., Head I.M., McCarthy A.J., Saunders J.R., Pickup R.W., Hall G.H. (1995) *Amplification of 16S ribosomal RNA genes of autotrophic ammonia-oxidizing bacteria demonstrates the ubiquity of nitrosospiras in the environment*. *Microbiology*, 141(11), 2793-2800.
- Ivanova V., I. Tomova, A. Kamburov, A. Tomova, E. Vasileva-Tonkova, M. Kambourova (2013) *High phylogenetic diversity of bacteria in the area of prehistoric paintings in Magura Cave, Bulgaria*. *Journal of Cave and Karst Studies*, 75(3), 218–228.
- Jones D.S., Albrecht H.L., Dawson K.S., Schaperdoth I., Freeman K.H., Pi Y., Pearson A., Macalady J.L. (2012) *Community genomic analysis of an extremely acidophilic sulfur-oxidizing biofilm*. *The ISME journal*, 6(1), 158 - 170.

Jurado V., Laiz L., Rodríguez Nava V., Boiron P., Hermosin B., Sánchez Moral S., Saiz-Jimenez C. (2010) *Pathogenic and opportunistic microorganisms in caves*. International Journal of Speleology, 39(1), 15 – 24.

Kindt R. (2016) *Biodiversity R: package for community ecology and suitability analysis*. R version 2.7-1.

Kolde R., Kolde M.R. (2018) Package 'Pheatmap'. R version 2.10-1

Laiz L., Groth I., Schumann P., Zezza F., Felske A., Hermosin B., Saiz-Jimenez C. (2000) *Microbiology of the stalactites from Grotta dei Cervi, Porto Badisco, Italy*. International Microbiology, 3(1), 25-30.

Langecker T.G., Wilkens H., Parzefall J. (1996) *Studies on the trophic structure of an energy-rich Mexican cave (Cueva de las Sardinias) containing sulfurous water*. Mem Biospeol, 23, 121-125.

Logares R. (2017) *Workflow for analysing MiSeq amplicons based on Uparse v1.5*. Zenodo, 10, 5281.

Macalady J.L., Jones D.S., Lyon E.H. (2007) *Extremely acidic, pendulous cave wall biofilms from the Frasassi cave system, Italy*. Environmental Microbiology, 9(6), 1402-1414.

Man B., Wang H., Yun Y., Xiang X., Wang R., Duan Y., Cheng X. (2018) *Diversity of fungal communities in Heshang Cave of central China revealed by mycobiome-sequencing*. Frontiers in Microbiology, 9, 1400.

Mandal S., Chatterjee R., Kumar N.S. (2017) *Dominant bacterial phyla in caves and their predicted functional roles in C and N cycle*. BMC microbiology, 17(1), 90.

Manes C.L.D.O., West N., Rapenne S., Lebaron P. (2011) *Dynamic bacterial communities on reverse-osmosis membranes in a full-scale desalination plant*. Biofouling, 27(1), 47-58.

Martin-Sanchez P.M., Nováková A., Bastian F., Alabouvette C., Saiz-Jimenez C. (2012) *Use of biocides for the control of fungal outbreaks in subterranean environments: the case of the Lascaux Cave in France*. Environmental Science & Technology, 46(7), 3762-3770.

Moquet J.S., Cruz F.W., Novello V.F., Stríkis N.M., Deininger M., Karmann I., Santos R.V., Millo C., Apaestegui J., Guyot J.L., Siffedine A., Vuille M., Cheng H., Edwards R.L., Santini W. (2016) *Calibration of speleothem $\delta 18 O$ records against hydroclimate instrumental records in Central Brazil*. Global and Planetary Change, 139, 151-164.

- Northup D.E., Lavoie K.H. (2001) *Geomicrobiology of caves: a review*. Geomicrobiology journal, 18(3), 199-222.
- Oksanen J., Blanchet F., Kindt R., Legendre P., Minchin P., O'Hara R. (2018) *Vegan: Community Ecology Package*. R package vegan, vers. 2.2-1.
- Oliveros J.C. (2007-2015) *Venny. An interactive tool for comparing lists with Venn's diagrams*. <http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>
- Ortiz M., Neilson J.W., Nelson W.M., Legatzki A., Byrne A., Yu Y., Wing R.A., Soderlund C.A., Pryor M.B., Pierson L.S., Maier R.M. (2012) *Profiling bacterial diversity and taxonomic composition on speleothem surfaces in Kartchner Caverns, AZ*. Microbial Ecology, 65, 371–383.
- Ortiz M., Legatzki A., Neilson J.W., Fryslie B., Nelson W.M., Wing R.A., Soderlund C.A., Pryor B.M., Maier R.M. (2014) *Making a living while starving in the dark: metagenomic insights into the energy dynamics of a carbonate cave*. ISME Journal, 8, 478 – 491.
- Pasic L., B. Kovce, B. Sket and B. Herzog-Velikonnja (2010) *Diversity of microbial communities colonizing the walls of a karstic cave in Slovenia*. FEMS Microbiology Ecology, 71, 50–60.
- Paula C.C.P., Montoya Q.V., Rodrigues A., Bichuette M.E., Selegim M.H.R. (2016) *Terrestrial filamentous fungi from gruta do Catão (São Desidério, Bahia, northeastern Brazil) show high levels of cellulose degradation*. Journal of Cave and Karst Studies, 78(3), 208.
- Paula C.C.P., Montoya Q.V., Meirelles L.A., Farinas C.S., Rodrigues A., Selegim M.H.R. (2018) *High cellulolytic activities in filamentous fungi isolated from an extreme oligotrophic subterranean environment (Catão cave) in Brazil*. Annals of the Brazilian Academy of Sciences (no prelo).
- Pedrós-Alió C. (2012) *The rare bacterial biosphere*. Annual review of marine science, 4, 449-466.
- Pfendler S., Karimi B., Maron P.A., Ciadamidaro L., Valot B., Bousta F., Alaoui-Sosse L, Alaoui-Sosse B, Aleya L. (2018) *Biofilm biodiversity in French and Swiss show caves using the metabarcoding approach: First data*. Science of the Total Environment, 615, 1207-1217.
- Portillo M.C., Saiz-Jimenez C., Gonzalez J.M. (2009) *Molecular characterization of total and metabolically active bacterial communities of "white colonizations" in the Altamira Cave, Spain*. Research in Microbiology, 160, 41–47.

- Quast C., Pruesse E., Yilmaz P., Gerken J., Schweer T., Yarza P., Peplies J., Glöckner F.O. (2012) *The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools*. *Nucleic acids research*, 41(D1), D590-D596.
- Roesch L.F., Fulthorpe R.R., Riva A., Casella G., Hadwin A.K.M., Kent A.D., Daroub S.H., Camargo F.A.O., Farmerie W.G., Triplett E.W. (2007) *Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity*. *ISME Journal*, 1, 283–290.
- Santos-Júnior C.D., Henrique-Silva F., Coppini G.B. *BEAF: An automated pipeline to referenced genome and protein or gene families binning and assembly of next generation sequencing data*. (Under publishing). <https://github.com/celiosantosjr/BEAF>
- Sarbu S.M., Kane T.C., Kinkle B.K. (1996) *A chemoautotrophically based cave ecosystem*. *Science*, 272(5270), 1953-1955.
- Schabereiter-Gurtner C., Saiz-Jimenez C., Piñar G., Lubitz W., Rölleke S. (2003) *Phylogenetic diversity of bacteria associated with Paleolithic paintings, and surrounding rock walls in two Spanish caves Llonín, and La Garma*. *FEMS Microbiology Ecology*. 1606, 1-13.
- Simões L., Ferreira T., Bichuette M. (2013) *Aquatic biota of different karst habitats in epigeal and subterranean systems of Central Brazil—visibility versus relevance of taxa*. *Subterranean Biology*, 11, 55.
- Suzuki I., Dular U., Kwok S.C. (1974) *Ammonia or ammonium ion as substrate for oxidation by Nitrosomonas europaea cells and extracts*. *Journal of Bacteriology*, 120(1), 556-558.
- Trajano E., Majer A.P., Santos F.B., Basile P.A. (2003) *Invertebrados aquáticos de cavernas da área cárstica de São Domingos, nordeste de Goiás*. *O Carste*, 15(4), 126-131.
- Urzi C., De Leo F., Bruno L., Albertano P. (2010) *Microbial diversity in paleolithic caves: a study case on the phototrophic biofilms of the Cave of Bats (Zuheros, Spain)*. *Microbial ecology*, 60(1), 116-129.
- Vanderwolf K.J., Malloch D., McAlpine D.F., Forbes G.J. (2013) *A world review of fungi, yeasts, and slime molds in caves*. *International Journal of Speleology*, 42(1), 9.
- Vaughan M.J., Nelson W., Soderlund C., Maier R.M., Pryor B.M. (2015) *Assessing fungal community structure from mineral surfaces in Kartchner caverns using multiplexed 454 pyrosequencing*. *Microbial Ecology*, 70(1), 175-187.
- White T.J., Bruns T., Lee S.J.W.T., Taylor J.L. (1990) *Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics*. *PCR protocols: a guide to methods and applications*, 18(1), 315-322.

Wickham H. (2016) *ggplot2: elegant graphics for data analysis*. Springer.

Wu Y., Tan L., Liu W., Wang B., Wang J., Cai Y., Lin X. (2015) *Profiling bacterial diversity in a limestone cave of the western Loess Plateau of China*. *Frontiers in Microbiology*, 6, 244.

Yoder J.A., Benoit J.B., Christensen B.S., Croxall T.J., Hobbs H.H. (2009) *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*, 71(2), 116-120.

Zhang J., Kobert K., Flouri T., Stamatakis A. (2013) *PEAR: a fast and accurate Illumina Paired-End reAd mergeR*. *Bioinformatics*, 30(5), 614-620.

Zhou J.P., Gu Y.Q., Zou C.S., Mo M.H. (2007) *Phylogenetic diversity of bacteria in an earth-cave in Guizhou Province, Southwest of China*. *Journal of Microbiology*, 45. 105–112.

CAPÍTULO 5:

PRIMEIRA EVIDÊNCIA DE DOMINÂNCIA DE HALOBACTERIACEA EM UMA CAVERNA CARBONÁTICA

5.1 RESUMO

A diversidade de *Bacteria* e *Archaea* foi caracterizada a partir de sedimentos amostrados em uma caverna carbonática localizada no Parque Estadual Terra Ronca, Goiás, Brasil. Esta caverna é inserida em uma paisagem cárstica e o local é utilizado para atividades turísticas e religiosas. Amostras de solo e sedimento (da superfície, entrada da caverna e do subterrâneo) foram coletadas em abril/2016 (estação chuvosa) e outubro/2016 (estação seca) e caracterizadas quanto as suas propriedades físicas e químicas (temperatura, umidade do ar e substrato, salinidade, pH, nitrogênio total e carbono orgânico dissolvido). O DNA foi extraído das amostras e amplificado com o par de primers 341F / 805R (16S rRNA, região V3-V4). A diversidade bacteriana foi avaliada por sequenciamento de nova geração seguida pelo processamento das sequencias obtidas. A entrada da caverna apresentou elevada salinidade (2,41% - estação chuvosa; 4,10% - estação seca) e maior quantidade de carbono orgânico em ambas as estações. Foram observados 25 filos e dominância de cinco classes (*Halobacteria*, *Actinobacteria*, *Rubrobacteria*, *Bacilli* e *Alphaproteobacteria*). A entrada da caverna mostrou grande abundância de microrganismos da família *Halobacteriaceae*, chegando a mais de 60% dos organismos da comunidade na estação seca, enquanto a superfície e o subterrâneo apresentaram maior abundância de microrganismos saprófitos, como *Actinobacteria* e *Alphaproteobacteria*. A grande proporção de *Halobacteriaceae* observada sugere que a entrada da caverna pode ser dominada por *Archaeas*, microrganismos bem conhecidos na ciência por sua capacidade quimioautotrófica e redução de nitrato. A salinidade e o carbono orgânico foram os principais fatores ambientais que influenciaram a estrutura e a composição das comunidades bacterianas na caverna Terra Ronca. Apesar da ausência de padrão sazonal, houve uma clara distinção entre os habitats estudados nas análises de ordenações, principalmente quando apenas os microrganismos com abundância menor que 0,01% (biosfera rara) foram analisados. A caverna Terra Ronca mostrou grande riqueza e diversidade de microrganismos e os resultados deste estudo sugerem que a entrada da caverna pode apresentar dominância do grupo *Archaea* em sua comunidade bacteriana. Este foi o primeiro estudo de comunidades bacterianas na caverna de Terra Ronca e a primeira evidência da

dominância de microrganismos da família *Halobacteriaceae* em uma caverna de calcário.

5.2 INTRODUÇÃO

Bacterias e *Archaeas* constituem a maioria da biodiversidade microbiana em cavernas e são encontrados em vários habitats das cavernas, como solos, sedimentos, águas de riachos e superfícies rochosas (Barton & Jurado, 2007). Muitos estudos descreveram as comunidades microbianas em cavernas, geralmente com uma maior atenção aos microrganismos do domínio *Bacteria* (Cuezva et al., 2012). Muitos desses estudos indicam uma grande abundância de *Alphaproteobacteria*, possivelmente com organismos envolvidos na fixação de nitrogênio, juntamente com grandes populações significativas de *Actinobacteria*, sugerindo que essa classe de microrganismos possuem um papel fundamental nas interações heterotróficas e na ciclagem do carbono (Barton et al., 2014). No entanto, poucos estudos têm avaliado a presença e a dinâmica de outros grupos microbianos, como os organismos do domínio *Archaea*. Com o avanço das tecnologias de sequenciamento de nova geração é possível aprofundar o conhecimento das comunidades procarióticas em cavernas, acessando principalmente os microrganismos não cultiváveis. Estudos recentes em cavernas mostram que há muito a aprender sobre a biodiversidade e a extensão da fisiologia microbiana no ambiente subterrâneo (Tetu et al., 2013; Ortiz et al., 2014).

Estudos recentes constataram a presença de *Archaea* em cavernas e a maioria destes estudos destacaram a presença dos filos *Thaumarchaeota* e *Euryarchaeota* (Mandal et al., 2016; Reitschuler et al., 2016; Anda et al., 2017). As *Archaeas* metanogênicas (MA) e as *Archaeas* oxidantes de amônia (AOA) são os grupos de *Archaeas* melhor caracterizados e estes microrganismos são procurados na maioria dos estudos em ambientes subterrâneos devido à sua importância ecológica nos ciclos biogeoquímicos (Zhao et al., 2016). Esses microrganismos estão envolvidos em processos de nitrificação (Tournai et al., 2011), produção primária (Yakimov et al., 2011) e emissão de N₂O (Zhu et al., 2013) em ambientes terrestres e aquáticos. Por outro lado, o filo *Thaumarchaeota* é o mais recorrente em cavernas e não há registro de nenhum microrganismo cultivável nesse grupo (Tetu et al., 2013; Ortiz et al., 2014, Zhao et al., 2016). No entanto, devido à dificuldade de cultivo desses microrganismos, as funções

fisiológicas e os papéis ecológicos de *Thaumarchaeota* em cavernas são quase desconhecidos ou são inferidos a partir de estudos metagenômicos (Treusch et al., 2005; Nicol et al., 2006). Novas descobertas foram recentemente descritas para este grupo, evidenciando que é provável que *Thaumarchaeota* desempenhe um papel na oxidação da amônia em cavernas localizadas na zona temperada (Anda et al., 2017). Mandal et al. (2016) encontraram uma grande proporção do filo *Euryarchaeota* em cavernas indianas, divididas em quatro classes: *Methanomicrobia*, *Thermoplasmata*, *Halobacteria* e *Methanobacteria*. Sabe-se que o filo *Euryarchaeota* é constituído em grande parte por microrganismos halófilos extremos, redutores de enxofre, redutores de sulfato, heterotróficos termofílicos e metanogênicos (Bintrim et al., 1997).

Dentre as diversas áreas cársticas brasileiras, o Parque Estadual Terra Ronca (PETeR) é uma unidade de conservação localizada no nordeste do estado de Goiás. O PETeR possui um complexo sistema de drenagem superficial e subterrânea, com grande potencial de transporte de matéria orgânica, causando acúmulos de detritos em algumas cavernas encontradas no local. Assim, estas cavidades possuem alta riqueza de fauna subterrânea terrestre e aquática, sendo considerada um *spot* de biodiversidade (Pinto-da-Rocha, 1995; Reims & Pelegatti-Franco, 2003; Trajano et al., 2003). Entre as grandes cavernas encontradas no PETeR, a caverna Terra Ronca é uma das mais visitadas pelos turistas. Além disso, a caverna Terra Ronca tem valor histórico-cultural, pois tem caráter religioso e abriga anualmente o festival religioso de “Bom Jesus da Lapa”. Embora a biologia subterrânea dos macrorganismos nas cavernas do PETeR seja bem conhecida, não há estudos sobre a composição e distribuição das comunidades microbianas na caverna Terra Ronca. Devido à falta de conhecimento sobre a vida microbiana na caverna Terra Ronca, este trabalho propõe caracterizar a estrutura e distribuição de comunidades bacterianas em três habitats da caverna (superfície, entrada da caverna e subterrâneo) e avaliar se os ambientes estudados são semelhantes, considerando os microrganismos encontrados.

5.3 MATERIAIS E MÉTODOS

5.3.1 LOCAL DE ESTUDO

O Parque Estadual de Terra Ronca (PETeR) (46 ° 100'-46 ° 300'S; 13 ° 300 '- 13 ° 500'W), localizado na cidade de São Domingos (GO), possui um grande sistema de

drenagem subterrânea formado por rios chegando do Planalto Serra Geral, característica morfológica originada nos arenitos da Formação Urucuia (Cretaceus). PETeR é uma área cárstica atravessada por riachos paralelos que correm para o oeste, para se juntar ao rio Paraná, um afluente do Rio Tocantins, na Bacia do Amazonas. A área de estudo está inserida no domínio fitogeográfico do Cerrado. O clima é tropical semi-úmido com uma precipitação média anual de aproximadamente 1270 mm.ano⁻¹ (Moquet et al., 2016). A estação chuvosa se estende de novembro a abril e a estação seca, essencialmente entre maio e outubro.

A caverna Terra Ronca faz parte do sistema Terra Ronca-Malhada (FIGURA 5.1). A caverna Terra Ronca tem uma entrada de 96 metros de altura e 120 metros de largura, com um altar construído medindo 760 metros de comprimento e 10,0 metros de altura onde a cerimônia religiosa “Bom Jesus da Lapa” acontece no início de agosto. A caverna possui uma grande diversidade de macrofauna aquática e terrestre com espécies endêmicas e troglomórficas, sendo considerada *spot* de biodiversidade (Trajano et al., 2003; Bichuette et al., 2015).

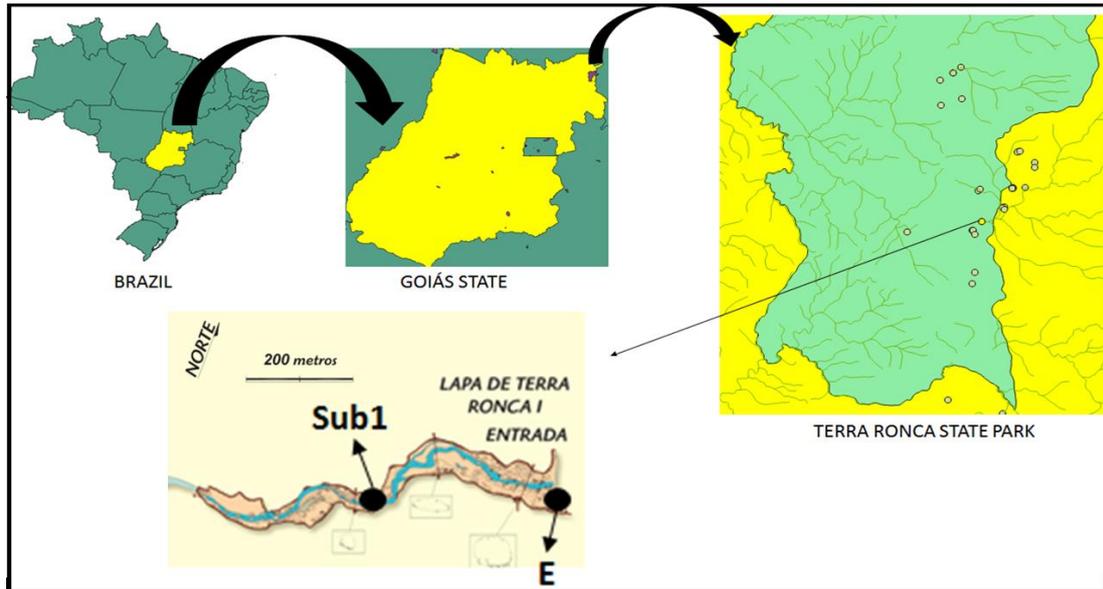


FIGURA 5.17. Localização do Parque Estadual de Terra Ronca, com destaque para a planta baixa a caverna Terra Ronca indicando os pontos amostrados na entrada da caverna (E) e no subterrâneo (Sub) (Mapa: Grupo Bambuí de Pesquisas Espeleológicas).

5.3.2 AMOSTRAGEM

As coletas foram realizadas em abril e outubro de 2016 (licença ICMBio / SISBIO nº 28992-11 e licença Secima (Goiás) nº 14886/2010). Quadrantes de aproximadamente 0,25 m² foram amostrados em três áreas distintas das cavernas: superfície, entrada da caverna e ambiente subterrâneo (sem incidência de luz solar). Aproximadamente 300,0 g de substrato (solo ou sedimento) foram coletados em cinco pontos diferentes da área do quadrante em cada local, formando uma amostra composta. Sedimento e solo foram coletados (profundidade de até 10 cm) com o auxílio de uma pá e armazenados em sacos plásticos estéreis. As amostras foram transportadas refrigeradas para o laboratório, homogeneizadas, peneiradas (malha de 2 mm) e armazenadas no refrigerador a 4 °C.

5.3.3 PARÂMETROS FÍSICOS E QUÍMICOS

A temperatura (°C) e a umidade do ar (%) foram medidas em cada local amostrado com um intervalo de tempo mínimo de 1 minuto entre as medições (termohigrômetro Instruntherm THAL-300, resolução 0.1 e ± 5.0% de precisão). O pH do substrato foi medido em uma solução contendo substrato: água a uma razão de 1: 2,5 (peso / peso) e a salinidade do substrato foi estimada em um refratômetro. A umidade nas amostras de solo e sedimento das cavernas foi estimada pelo método gravimétrico, secando o substrato a 105 °C por 20 h e os resultados expressos em porcentagem de peso seco. As concentrações de carbono orgânico dissolvido (COD) foram estimadas colorimetricamente usando o método de Bartlett & Ross (1988). O nitrogênio total (NT) foi determinado pelo método de Kjeldahl, seguida por uma destilação da amônia (método do indofenol azul) (Bremmer & Mulvaney, 1982).

5.4.4 EXTRAÇÃO DE DNA E SEQUENCIAMENTO

O DNA foi extraído a partir de 0,25 g de substrato de cada local amostrado usando o kit de extração de DNA MoBio PowerSoil (MoBio Laboratories, Carlsbad, CA, EUA) seguindo as instruções do fabricante. A região V3-V4 do fragmento 16S (rRNA) foi amplificada pelo par de primers 341F (5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3') e 805R (5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3') (Herlemann et al., 2011). Para a extração e amplificação do DNA, controles negativos e positivos foram utilizados. Cada amostra de

DNA foi amplificada por PCR em reações duplicadas com volume final de 25 µl. A amplificação incluiu uma etapa inicial de 95°C por 3 min, seguida por 35 ciclos de 95 °C por 30 s, 55 °C por 1 min e 15 s, 72 °C por 45 s e finalmente 72 °C por 5 min. Cada reação da PCR continha 8,5 µl de enzima Kapa HOPSTART Ready MIX, 0,1 µl de cada primer, 10 µl de água ultra-pura e 10 ng de DNA. Os produtos da PCR foram purificados com o kit de esferas magnéticas AMPURE XP (Bechman Coulter) e indexados com o kit Nextera XT V2 (Illumina) para identificar as amostras. Realizou-se outro passo de purificação com esferas magnéticas e depois reuniu-se o conjunto metagenômico em 5 µl de cada biblioteca. O sequenciamento da região V3-V4 foi realizado em uma plataforma de sequenciamento Illumina MiSeq. Os amplicons foram sequenciados no Laboratório Multiusuário de Sequenciamento em Larga Escala e Expressão Gênica (Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho").

5.4.5 PROCESSAMENTO DOS DADOS E ANÁLISE DA COMUNIDADE

Os dados do sequenciamento foram processados usando UPARSE (Edgar, 2013) em um pipeline implementado internamente (Logares, 2017). As sequências foram emparelhadas e agrupadas com PEAR (Zhang et al., 2014). O controle de qualidade das sequências seguiu as etapas de remoção das sequências menores que 100 bp e quimeras, e por fim foi realizado o agrupamento das sequências em OTUs (usando o algoritmo UPARSE, com similaridade $\geq 97\%$) utilizando a base de dados SILVA v.119 com referência para a classificação taxonômica, por meio da ferramenta USEARCH (Edgar, 2010, Quast et al., 2013).

Todas as análises estatísticas foram realizadas no Software R (R. Core Team, 2016). As variáveis ambientais foram analisadas usando uma estatística descritiva (Shapiro-Wilks). A análise de variância e testes t de *Student* foram aplicados para verificar se houve diferenças significativas entre os resultados. Para a análise das comunidades microbianas as comunidades bacterianas foram rarefeitas para equalizar a abundância relativa de cada microrganismo usando a função *rarefy* do pacote *vegan* (Oksanen et al., 2018). As OTUs mais abundantes foram aquelas com uma abundância relativa acima de 1,0% e os microrganismos raros foram aqueles com menos de 0,01% da abundância de uma comunidade (Pedrós-Alió, 2012). A riqueza das comunidades microbianas, diversidade alfa (índice de Shannon) e estrutura da comunidade (Simpson

e Evenness) foram estimados usando o pacote BiodiversityR (Kindt, 2018). As matrizes de distância para comparação das comunidades bacterianas foram obtidas utilizando a distância de Bray-Curtis e, para as matrizes ambientais, foi utilizada a distância euclidiana. A relação entre a matriz das comunidades bacterianas e a matriz ambiental foi avaliada por meio de Análise Canônica de Coordenadas Principais (CAP) (Anderson e Willis, 2003). As diferenças entre os locais amostrados e entre as estações analisadas foram testadas usando análise de variância multivariada permutacional (PERMANOVA) com a distância de Bray-Curtis, realizando 10000 permutações usando a função *adonis* (Oksanen et al., 2018). O escalonamento multidimensional não-métrico (NMDS) e análise de agrupamento (função *heatmap*) foram utilizados para avaliar a dissimilaridade das matrizes das comunidades bacterianas nos locais amostrados (Kolde & Kolde, 2018). Diagrama de Venn foi elaborado a partir do navegador Venny 2.0 (Oliveros, 2007-2015).

5.5 RESULTADOS

O valor médio e o desvio padrão das variáveis ambientais são mostrados na Tabela 5.I. As temperaturas médias dos ambientes foram maiores na estação seca e a umidade do ar apresentou maiores valores na estação chuvosa. Maiores valores de umidade dos substratos foram encontrados no interior da caverna no período seco e altos valores de salinidade foram encontrados na entrada da caverna (4,10% na estação chuvosa e 2,41% na estação seca). Todas as amostras apresentaram substratos levemente alcalinos (pH entre 7,49 e 8,88) e houve gradiente trófico em ambas as estações, com maiores valores de carbono orgânico na entrada da caverna (1008,20 mgC kg⁻¹ e 1170,71 mgC kg⁻¹), seguido pela superfície (820,37 mgC kg⁻¹ e 824,48 mgC kg⁻¹) e ambiente subterrâneo com as menores concentrações (448,93 mgC kg⁻¹ e 334,98 mgC kg⁻¹). A superfície e a entrada da caverna apresentaram maior quantidade de nitrogênio na estação seca (0,075 mgN kg⁻¹ e 0,078 mgN kg⁻¹), no entanto, a maior quantidade de nitrogênio do ambiente subterrâneo foi observada na estação chuvosa (0,036 mgN kg⁻¹).

Tabela 5.I. Média e desvio padrão dos parâmetros físicos (umidade do substrato, temperatura e umidade do ar) e químicos (salinidade, pH, nitrogênio total (NT) e carbono orgânico dissolvido (COD)) na caverna Terra Ronca na superfície, entrada da caverna e no ambiente subterrâneo durante a estação chuvosa (Abril / 2016) e seca (Outubro / 2016).

Variáveis Ambientais	Estação	Caverna Terra Ronca		
		Superfície	Entrada	Subterrâneo
Umidade do ar (%)	Chuvosa	73,01 ± 4,24 *	66,23 ± 0,97	76,71 ± 13,96
	Seca	68,86 ± 0,95 *	64,81 ± 3,93	68,11 ± 1,66
Temperatura (°C)	Chuvosa	26,85 ± 0,53 *	28,33 ± 0,55 *	26,63 ± 0,98
	Seca	29,25 ± 0,10 *	30,96 ± 2,30 *	27,38 ± 0,21
Umidade do Substrato (%)	Chuvosa	5,60 ± 3,85 *	4,03 ± 2,54	3,39 ± 1,99 *
	Seca	1,13 ± 0,56 *	5,86 ± 1,91	5,91 ± 1,32 *
Salinidade (%)	Chuvosa	0,0727 ± 0,04	2,4169 ± 0,08 *	0,1019 ± 0,01 *
	Seca	0,2325 ± 0,19	4,1012 ± 0,08 *	0,0216 ± 0,01 *
Ph	Chuvosa	8,88 ± 0,14	7,49 ± 1,58	7,69 ± 0,25
	Seca	8,69 ± 0,29	7,98 ± 0,75	7,59 ± 0,10
NT (gN kg ⁻¹)	Chuvosa	0,055 ± 0,040	0,025 ± 0,002 *	0,036 ± 0,004 *
	Seca	0,075 ± 0,047	0,078 ± 0,059 *	0,025 ± 0,007 *
COD (mgC kg ⁻¹)	Chuvosa	820,37 ± 71,61	1008,20 ± 700,86	448,93 ± 145,67
	Seca	824,48 ± 700,84	1170,71 ± 1044,51	334,98 ± 51,23

Ao todo, três ambientes amostrados, representando diferentes habitats (superfície, entrada e subterrâneo) da caverna de Terra Ronca, foram sequenciados pela plataforma Illumina MiSeq, resultando em 1.156.899 sequências. Após a formação dos contigs, emparelhamento e remoção das quimeras, obteve-se um total de 471.285 sequências válidas. A quantidade de sequências na superfície (40.000 sequências) e entrada da caverna (9.582 sequências) foram menores na estação chuvosa do que na estação seca. A maior quantidade de sequências no ambiente subterrâneo foi observada na estação chuvosa (122.904 sequências) do que na estação seca (5.158 sequências). Todas as amostras juntas mostraram um total de 2.172 OTUs, distribuídas entre a superfície (1.452 OTUs na estação chuvosa / 1.057 OTUs na estação seca), entrada da caverna (994 OTUs na estação chuvosa / 927 OTUs na estação seca) e ambiente subterrâneo (1.382 OTUs na estação chuvosa / 1.116 OTUs na estação seca). A rarefação das comunidades foi feita a uma profundidade máxima para equalizar o número de leituras por amostra.

O domínio *Bacteria* foi observado em 2.128 OTUs (79,77%) e o domínio *Archaea* em 44 OTUs (20,23%). A nível de domínio, a proporção microbiana diferiu entre a

superfície (99,21% *Bacteria* / 0,79% *Archaea*), entrada da caverna (43,88% *Bacteria* / 56,12% *Archaea*) e ambiente subterrâneo (96,21% *Bacteria* / 3,79% *Archaea*). No total, 25 filos conhecidos (*Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Armatimonadetes*, *Bacteroidetes*, *Bathyarchaeota*, *BRC1*, *Chlorobi*, *Chloroflexi*, *Cyanobacteria*, *Deinococcus*, *Elusimicrobia*, *Euryarchaeota*, *Firmicutes*, *Gemmatimonadetes*, *Latescibacteria*, *Microgenomatos*, *Nitrospirae*, *Parcubacteria*, *Planctomycetes*, *Proteobacteria*, *Saccharibacteria*, *Tectomicrobia*, *Thaumarchaeota*, *Verrucomicrobia*, *WS2*) foram encontrados na caverna Terra Ronca. Cerca de 23,22% das sequências pertenciam a gêneros não cultiváveis e a espécies mais abundantes (aquelas com mais de 1,0% de abundância) foram compostas pelas classes *Halobacteria* (15,70%), *Actinobacteria* (6,27%), *Rubrobacteria* (2,89%), *Bacilli* (1,30%) e *Alphaproteobacteria* (1,01%). A distribuição das 50 OTUs mais abundantes nas comunidades microbianas pode ser observada na FIGURA 5.2.

Do total de OTUs, 56 OTUs foram compartilhadas nos três ambientes amostrados na estação chuvosa e 64 OTUs foram compartilhadas na estação seca (FIGURA 5.3). Entre as OTUs mais abundantes, não houve nenhuma OTU compartilhada nos três ambientes estudados. Mas houveram OTUs abundantes compartilhadas entre habitats específicos, por exemplo, uma OTU (*Sphingomonadales_OTU142*) compartilhada entre a superfície e o ambiente subterrâneo em ambas as estações; uma OTU (*Bacillus_OTU540*) compartilhada entre o ambiente subterrâneo e a entrada da caverna na estação chuvosa, e finalmente, a superfície e a entrada da caverna compartilharam quatro OTUs na estação seca (*Bacillus_OTU11*, *Bacillus_OTU18*, *Arthrobacter_OTU27* e *Blastococcus_OTU1614*). A superfície e entrada da caverna mostraram um maior número de OTUs exclusivas nesses ambientes na estação chuvosa (305 OTUs na superfície / 193 OTUs na entrada) do que na estação seca (253 OTUs na superfície / 55 OTUs na entrada). O ambiente subterrâneo se destacou com o maior número de OTUs únicas em ambas as estações (672 OTUs na estação chuvosa / 807 OTUs na estação seca). Considerando apenas os microrganismos raros (ou seja, aqueles com menos de 0,01% de abundância), não houve nenhuma OTU compartilhada entre os habitats (superfície, entrada da caverna e ambiente subterrâneo) nas estações chuvosa e seca.

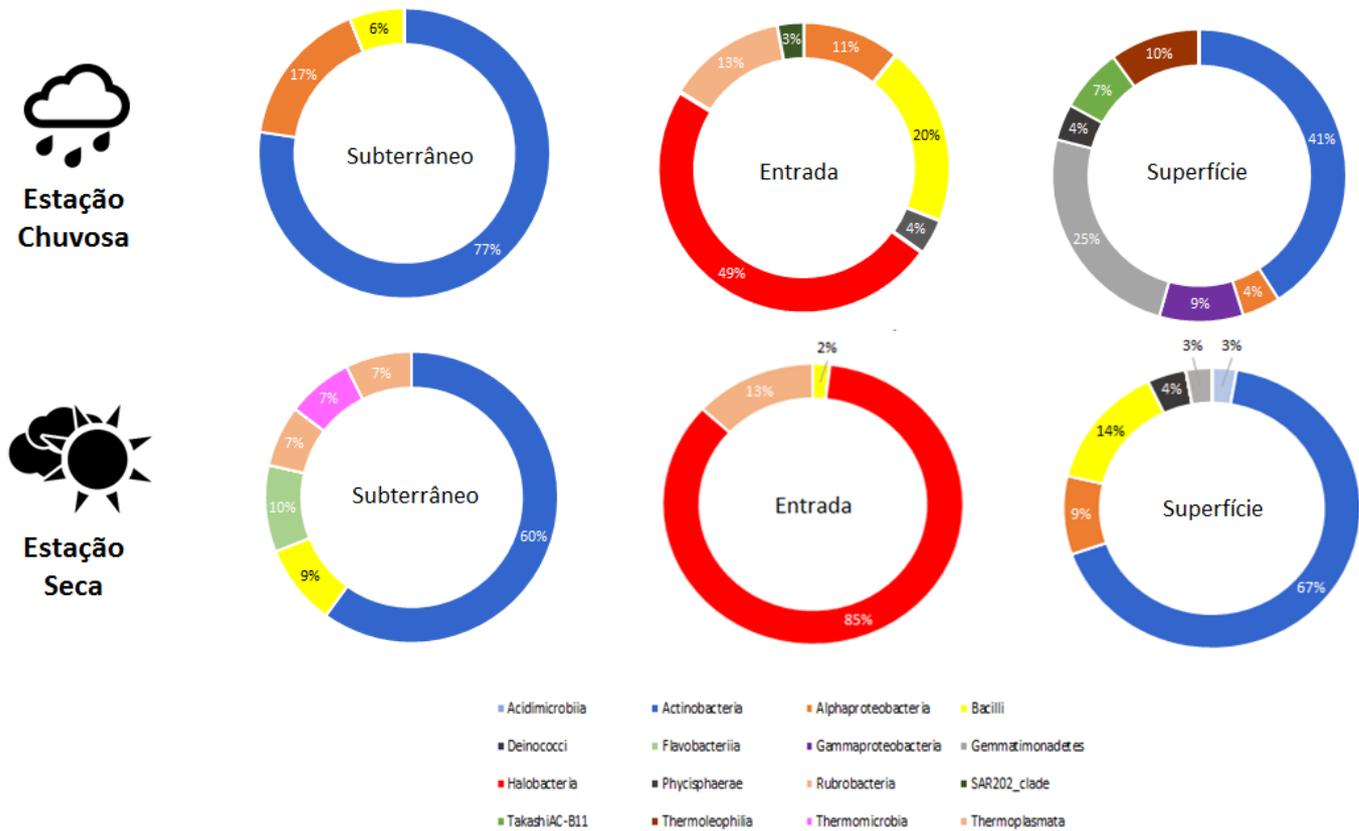


FIGURA 5.2. Distribuição taxonômica (Classes) das 50 OTUs mais abundantes presentes na superfície, entrada da caverna e no ambiente subterrâneo da caverna Terra Ronca durante a estação chuvosa (Abril / 2016) e seca (Outubro / 2016). Os números nos gráficos representam a proporção das classes mais abundantes.

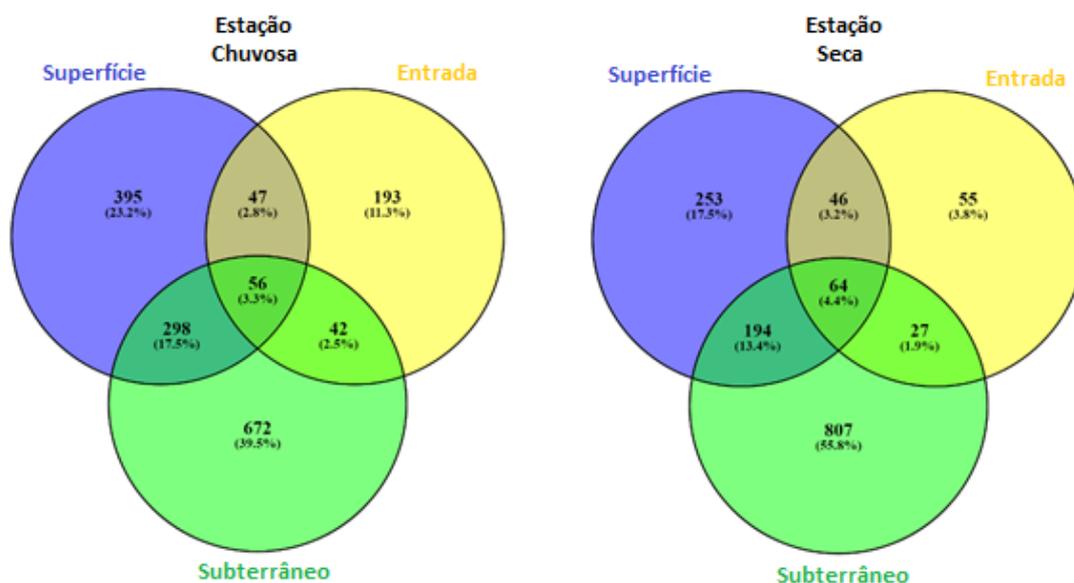


FIGURA 5.3. Diagrama de Venn com a quantidade de OTUs presentes na superfície, entrada da caverna e no ambiente subterrâneo da caverna Terra Ronca durante a estação chuvosa (Abril / 2016) e seca (Outubro / 2016). Os números indicam a quantidade de OTUs e as interseções dos círculos mostram o número de OTUs compartilhadas.

O ambiente subterrâneo mostrou maior riqueza e diversidade (índice de Shannon) do que os outros ambientes estudados, especialmente na estação seca. A riqueza e o índice de Shannon mostraram a entrada da caverna com a menor diversidade e o menor número de OTUs. A riqueza e a diversidade das comunidades microbianas apresentaram uma tendência semelhante, com valores mais altos na superfície e entrada da caverna durante a estação chuvosa, e o ambiente subterrâneo com valores mais altos na estação seca. A superfície foi o habitat com maior dominância e entrada da caverna com a menor uniformidade.

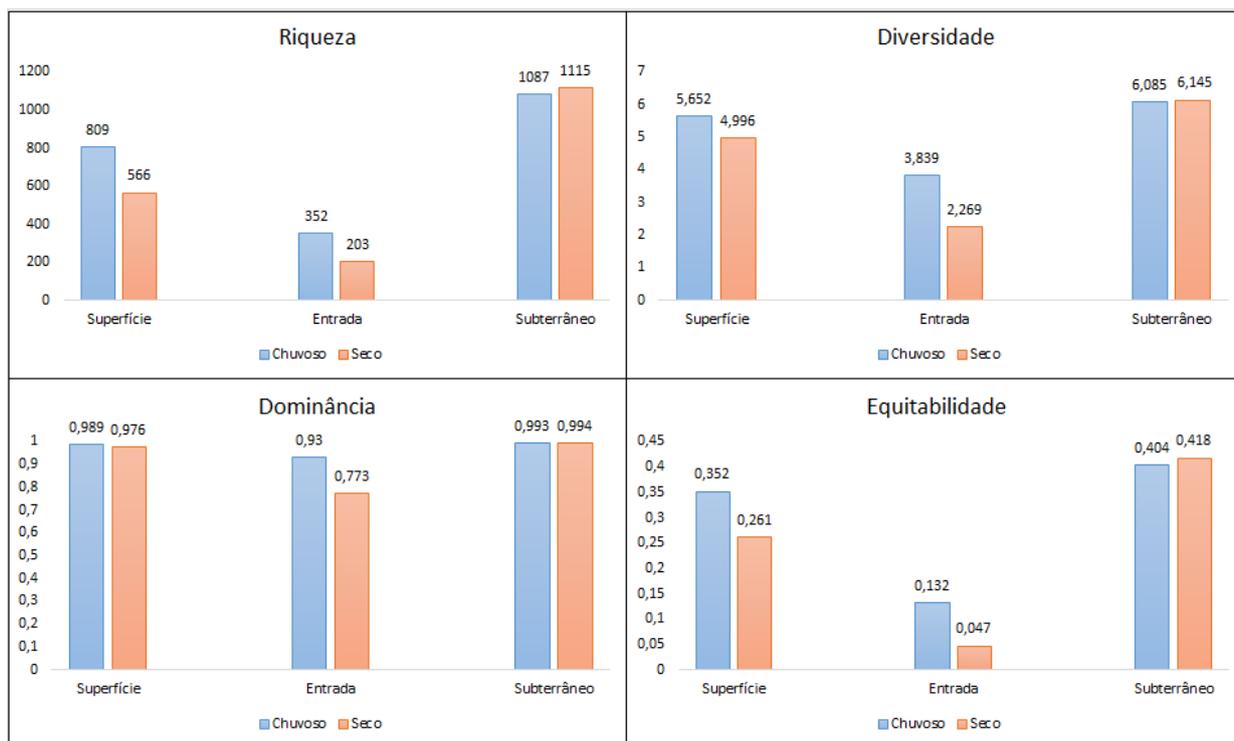


FIGURE 5.4. Riqueza, índice de diversidade de Shannon, dominância de Simpson e equitabilidade das comunidades microbianas na superfície, entrada da caverna e no ambiente subterrâneo da caverna Terra Ronca durante a estação chuvosa (Abril/2016) e estação seca (Outubro/2016).

Análises de PERMANOVA, utilizando a distância de Bray-Curtis, mostraram diferença significativa entre os ambientes amostrados: superfície, entrada da caverna e ambiente subterrâneo ($R^2 = 0,733$, $p = 0,05$). No entanto, esta análise não mostrou diferença significativa nas comunidades microbianas entre as estações chuvosa e seca ($R^2 = 0,075$, $p = 0,62$). Além disso, não foi possível observar uma diferença significativa nas comunidades microbianas, considerando apenas as OTUs abundantes ($R^2 = 0,08732$, $p = 0,8833$) e raras ($R^2 = 0,0108$, $p = 0,9014$) entre as estações do ano.

As relações entre as comunidades microbianas e as variáveis ambientais foram exploradas por meio da Análise Canônica das Coordenadas Principais (CAP). O Escalonamento Multidimensional Não Métrico (NMDS) foi utilizado para avaliar o agrupamento e a similaridade das comunidades microbianas em ambas as estações. A análise CAP mostrou o carbono orgânico e a salinidade como os principais fatores ambientais que influenciaram as comunidades microbianas na caverna Terra Ronca (FIGURA 5.5). As diferenças estatísticas nas composições do microbioma foram demonstradas pelo NMDS, considerando o nível da OTU, e os locais amostrados agruparam-se de acordo com os habitats (FIGURA 5.6). A observação dos habitats por meio da análise NMDS sugeriu a heterogeneidade dos microbiomas da caverna Terra Ronca distinguindo claramente a superfície, a entrada da caverna e o ambiente subterrâneo.

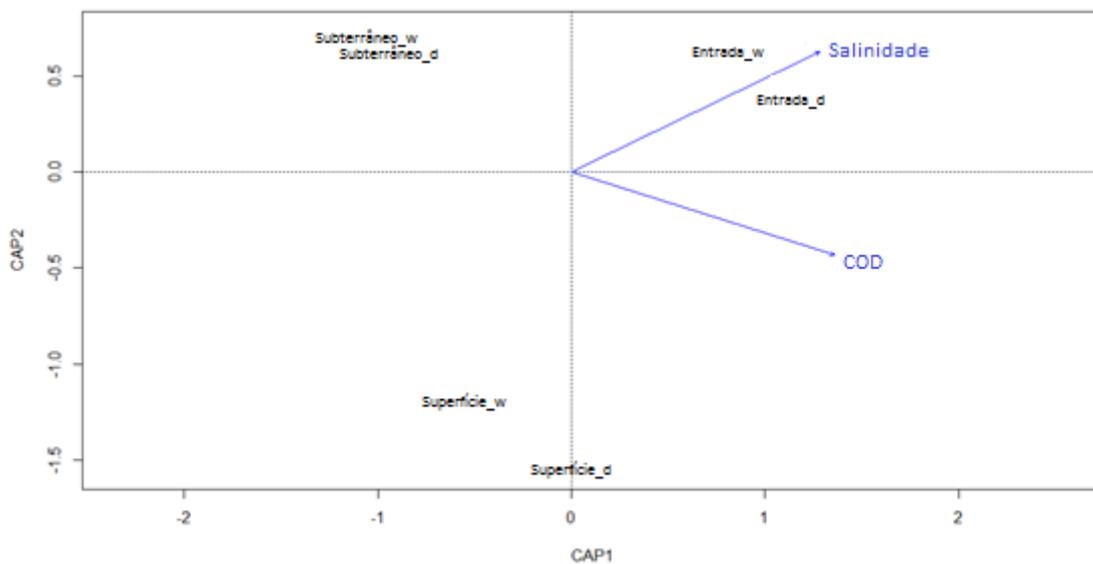


FIGURA 5.5. Análise Canônica de Coordenadas Principais (CAP) relacionando as OTUs microbianas e os fatores ambientais (salinidade e carbono orgânico dissolvido - COD) nos locais amostrados da caverna Terra Ronca (superfície, entrada da caverna e ambiente subterrâneo) durante a estação chuvosa (Abril / 2016) e a estação seca (Outubro / 2016) (w = estação chuvosa; d = estação seca).

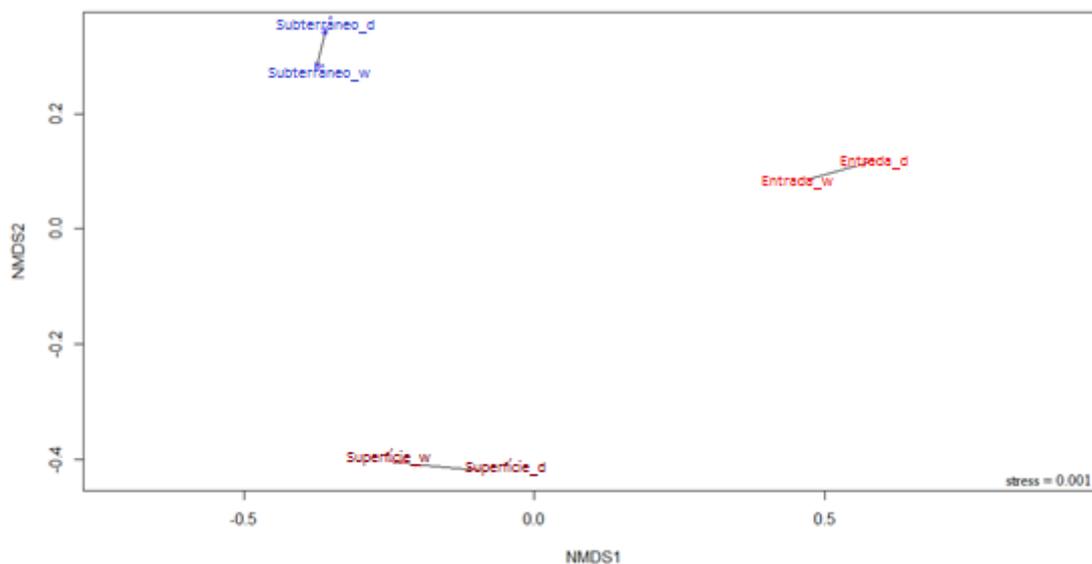


FIGURA 5.6. Escalonamento multidimensional não-métrico (NMS) usando a distância de Bray-Curtis para gerar a matriz das comunidades microbianas encontradas nos locais amostrados da caverna Terra Ronca (superfície, entrada da caverna e ambiente subterrâneo) durante a estação chuvosa (Abril / 2016) e a estação seca (Outubro / 2016) (w = estação chuvosa; d = estação seca).

A similaridade dos habitats estudados, de acordo com a composição das comunidades microbianas, foi observada por meio do Mapa de Calor (*HeatMap*) e análise de agrupamento (FIGURA 5.7.A; 5.7.B e 5.7.C). No mapa de calor houve agrupamentos entre a entrada da caverna e o ambiente subterrâneo, no entanto, não é possível separar claramente os habitats pela composição das comunidades microbianas. Por outro lado, essa mesma análise considerando apenas as OTUs abundantes, mantém o agrupamento dos habitats e torna evidente quais OTUs são exclusivas da superfície (*Actinobacteria_OTU27* e *Actinobacteria_OTU55*), entrada da caverna (*Halobacteria_OTU1* e *Halobacteria_OTU2*) e ambiente subterrâneo (*Actinobacteria_5*). Esse padrão tornou-se mais evidente ao analisar apenas as OTUs raras, onde permaneceu o agrupamento dos habitats e as OTUs raras foram específicas para cada ambiente, mostrando diferenças na distribuição e composição dos microbiomas.

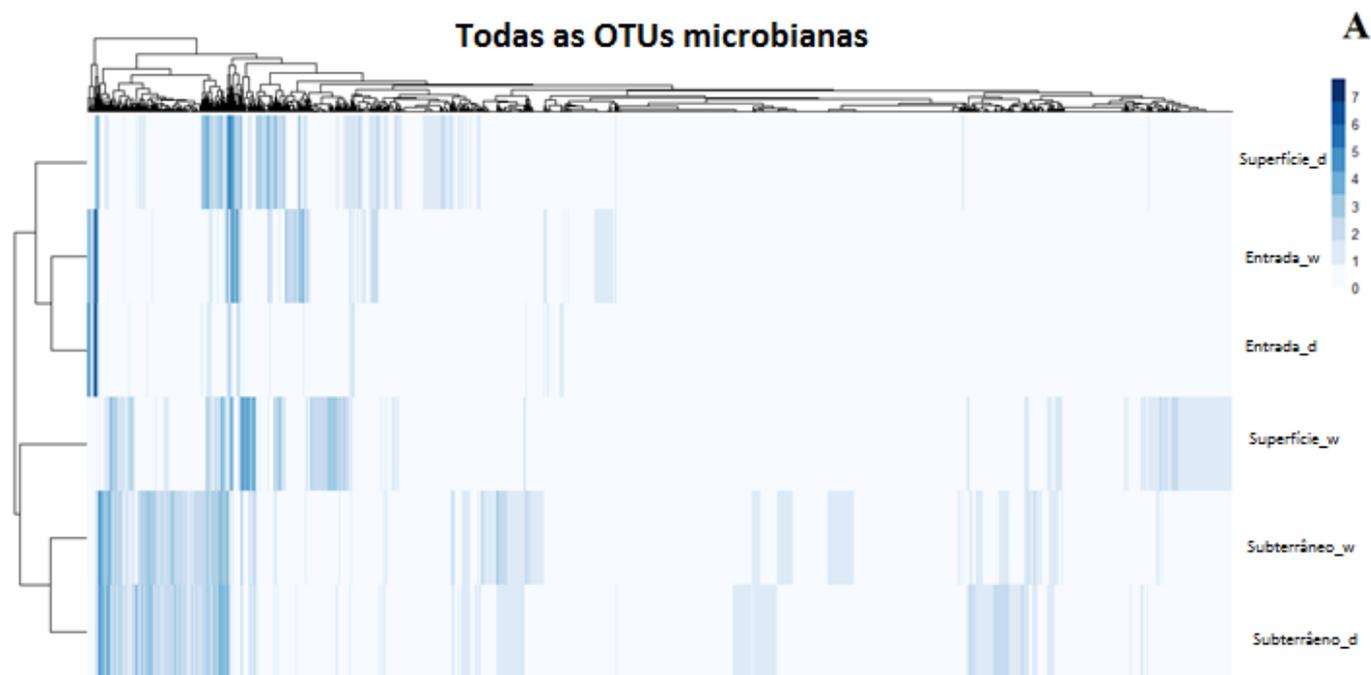


FIGURA 5.7.A. Mapa de calor com todas as OTUs microbianas e agrupamento dos ambientes amostrados. A matriz de dissimilaridade foi construída usando a distância de Bray Curtis. Cores mais fortes no gráfico indicam uma correlação mais alta de OTU com o ambiente estudado (w = estação chuvosa; d = estação seca).

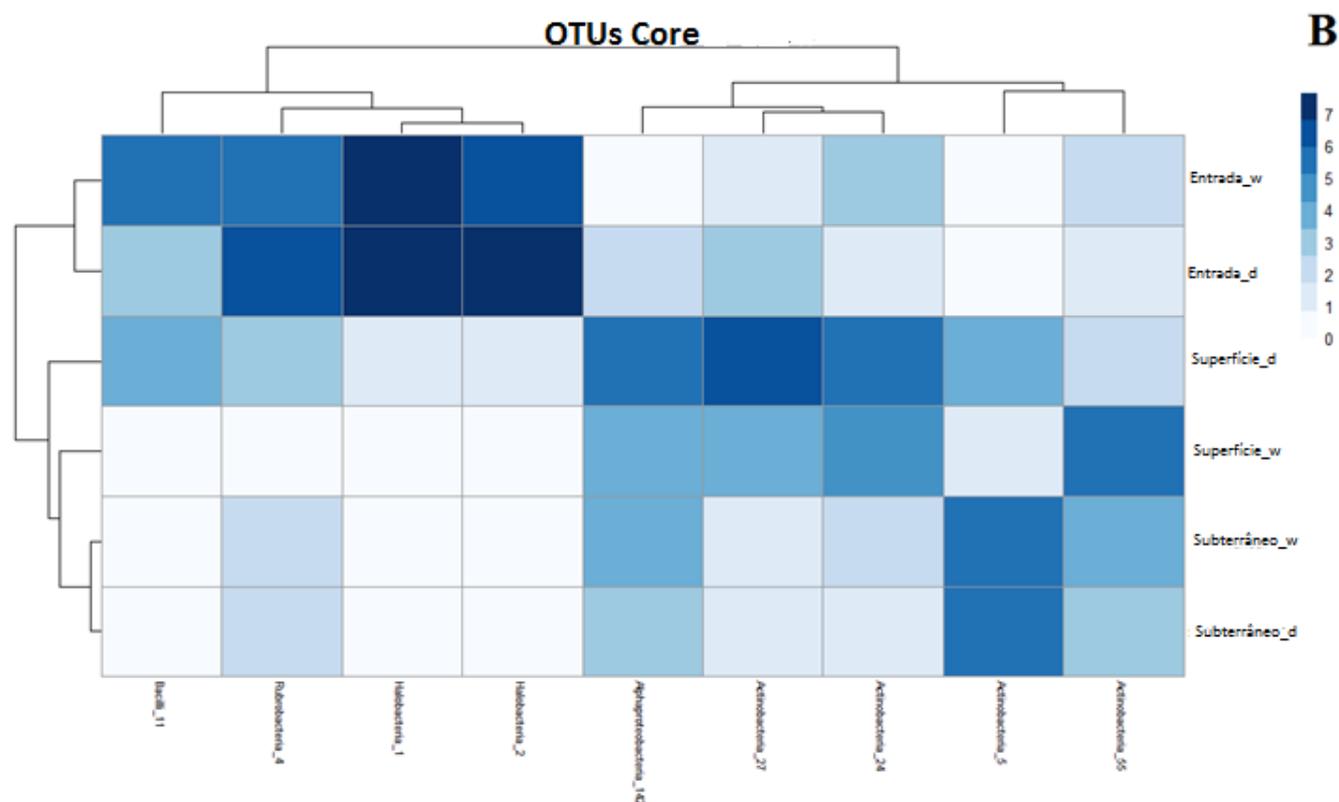


FIGURE 5.7.B. Mapa de calor com as OTUs abundantes e agrupamento dos ambientes amostrados. A matriz de dissimilaridade foi construída usando a distância de Bray Curtis. Cores mais fortes no gráfico indicam uma correlação mais alta de OTU com o ambiente estudado (w = estação chuvosa; d = estação seca).

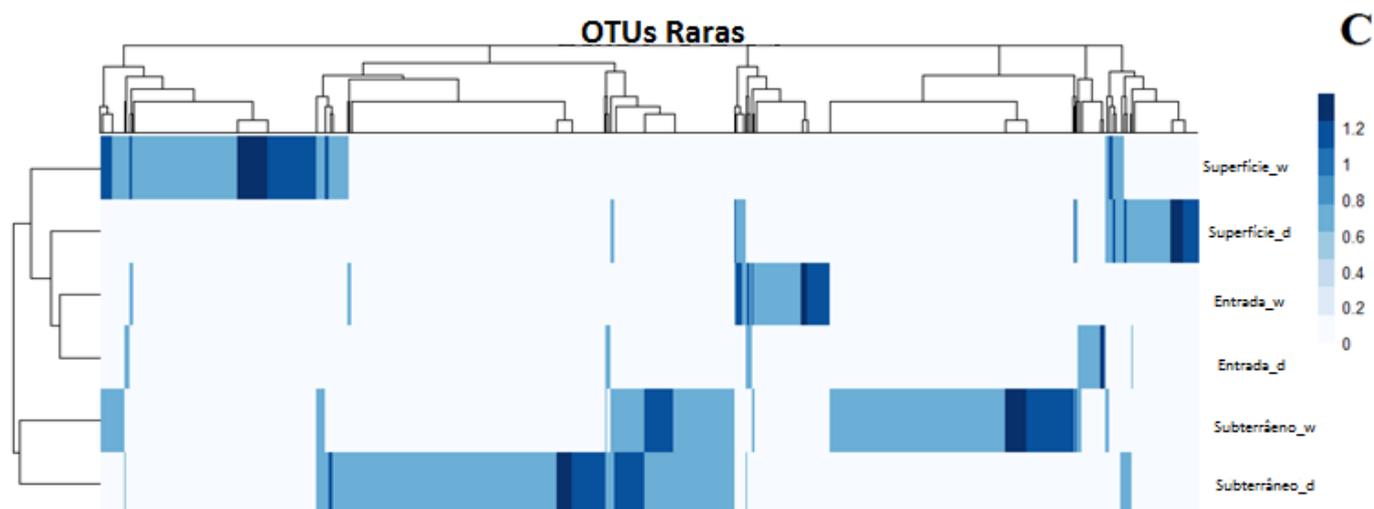


FIGURE 5.7.C. Mapa de calor com as OTUs raras e agrupamento dos ambientes amostrados. A matriz de dissimilaridade foi construída usando a distância de Bray Curtis. Cores mais fortes no gráfico indicam uma correlação mais alta de OTU com o ambiente estudado (w = estação chuvosa; d = estação seca).

5.6 DISCUSSÃO

Técnicas independentes de cultivo fornecem informações mais próximas do real sobre a diversidade das comunidades microbianas. O advento do sequenciamento de nova geração permitiu uma análise aprofundada da diversidade microbiana em vários ambientes, incluindo as cavernas de todo o mundo (Ortiz et al., 2014; Wu et al., 2015; Mandal et al., 2017). O estudo da microbiologia em cavernas é um campo de pesquisa microbiana relativamente recente, embora tenha ocorrido um aumento do número de pesquisas sobre a microbiota subterrânea nos últimos anos (Lee et al., 2012).

As classes bacterianas dominantes na caverna Terra Ronca foram *Halobacteria*, *Actinobacteria*, *Rubrobacteria*, *Bacilli* e *Alphaproteobacteria*. A superfície e o ambiente subterrâneo foram dominados por bactérias da classe *Actinobacteria*. Esses resultados foram semelhantes aos encontrados em outras cavernas carbonáticas (Ortiz et al., 2012; Ortiz et al., 2014). *Actinobacterias* são heterotróficas típicas que desempenham um papel crucial no ciclo do carbono pela decomposição da matéria orgânica (Ivanova et al., 2013). Além dessas características, a Análise Canônica de Coordenadas Principais (CAP) indicou que o carbono orgânico dissolvido é um dos fatores ambientais determinantes na composição de comunidades microbianas, principalmente naquelas dominadas por microrganismos saprofíticos, como nos habitats superficiais e

subterrâneos. O ambiente subterrâneo apresentou maior diversidade de OTUs na estação seca e maior proporção de *Actinobacteria* na estação chuvosa. Microrganismos e matéria orgânica alóctone são levados para a caverna por inundações dos rios subterrâneos durante a estação chuvosa (Simon, Pipan & Culver, 2007). Sabendo que o ambiente subterrâneo apresenta uma maior diversidade e riqueza de microrganismos na estação seca, a influência do ambiente externo é menor na estação seca do que na estação chuvosa. Portanto, a dinâmica dos microrganismos na caverna demonstrou a interferência das comunidades microbianas na superfície sob as comunidades microbianas subterrâneas (uma vez que o número de OTUs compartilhadas entre os dois ambientes é maior na estação chuvosa) e o isolamento ambiental das comunidades subterrâneas durante a estação seca.

Dentre os microrganismos, o domínio *Bacteria* era o foco da maioria dos estudos sobre a vida microbiana em cavernas (Wu et al., 2015; Mandal et al., 2017). Existem poucos estudos examinando a diversidade de *Archaeas* em cavernas (Barton et al., 2014; Mandal et al., 2016; Anda et al., 2017). Recentemente Barton et al. (2014) relataram a dominância do domínio *Archaea* em cavernas orthoquartzitas na Venezuela. Os autores enfatizaram a relevância do estudo dos microrganismos pertencentes ao domínio *Archaea*, principalmente porque este grupo inclui microrganismos quimioautotróficos, os quais possuem papéis importantes nos ciclos biogeoquímicos das cavernas, como a fixação de carbono e nitrogênio.

Muitos pesquisadores questionam o uso dos primers 341F/R806 para avaliar a diversidade do domínio *Archaea*. No entanto, Klindworth et al. (2013) e Takahashi et al. (2014) confirmaram a boa acurácia dos primers 341F/806R na análise da diversidade de microrganismos dos domínios *Archaea* e *Bacteria*. Em nosso estudo, os autores reconhecem a existência de primers específicos para o domínio *Archaea*, como o ARC344F / Arch806R (Takahashi et al., 2014), que podem gerar resultados mais robustos sobre a diversidade desse grupo. No entanto, os resultados obtidos neste estudo destacam a dominância do grupo *Archaea* na entrada da caverna de Terra Ronca durante os dois períodos de amostragem, dados que não puderam ser desprezados. As sequências obtidas no domínio *Archaea* apresentaram alta identidade com o banco de dados (> 90%) e as duas OTUs dominantes (OUT_1 e OUT_2) desse grupo tiveram

98,59% e 94,82% de semelhança, respectivamente, com a identidade das sequências depositadas na base de dados SILVA 119.1.

O filo *Euryarchaeota* representou cerca de 21% das sequências obtidas na caverna Terra Ronca. Estudos anteriores em cavernas indianas relatam o filo *Euryarchaeota* como dominante dentro do domínio *Archaea* (Mandal et al., 2016) e uma grande proporção do domínio *Archaea* (cerca de 45%) em relação ao domínio *Bacteria* (cerca de 42%) foi encontrada na caverna Weebubbie (Tetu et al. 2013), semelhante aos resultados obtidos na caverna Terra Ronca. A família *Halobacteriaceae* (filo *Halobacteria*) foi o grupo mais abundante neste estudo e foi encontrado principalmente na entrada da caverna Terra Ronca. A entrada da caverna mostrou dominância de duas espécies de microrganismos: *Halalkalicoccus tibetensis* e *Halococcus thailandensis*. Estas duas espécies juntas representaram cerca de 32% e 63% das sequências obtidas neste habitat durante a estação chuvosa e seca, respectivamente. *Halalkalicoccus tibetensis*, isolado pela primeira vez no Lago Zabuye (Tibete, China), são microrganismos ativos no ciclo do nitrogênio, reduzindo o nitrato ao nitrito, exigindo substratos alcalinos, quimiorganotróficos e estritamente aeróbios (Xue et al., 2005). *Halococcus thailandensis*, isolado da fermentação de molho de peixe na Tailândia, são cocos estritamente aeróbicos e reduzem o nitrato sem produção de gás (Namwong et al., 2007). Esse é o primeiro relato sobre a presença de *Halalkalicoccus tibetensis* e *Halococcus thailandensis* em cavernas, indicando que sua distribuição dessas espécies pode ser mais ampla. Em contraste aos nossos resultados, estudos recentes em cavernas orthoquartzitas venezuelanas e cavernas de Kartchner mostraram dominância de *Thaumarchaeota*, filo oxidante de amônia (AOA), dentro do domínio *Archaea* (Tetu et al., 2013; Ortiz et al., 2014). A caverna Terra Ronca continha em sua comunidade o filo *Thaumarchaeota*, mas em menor proporção em comparação com a família *Halobacteriaceae*. Até onde sabemos, esta é a primeira evidência da presença e dominância de linhagens de *Halobacteriaceae* em uma caverna carbonática.

A classe das haloarchaeas, principalmente a família *Halobacteriaceae*, são encontradas em habitats aquáticos ou terrestres na maior parte do mundo, caracterizadas por habitarem ambientes hipersalinos (Navarro-Noya et al., 2015). *Halobacteriaceae* é a maior família de haloarchaea que compreende 36 gêneros com 129 espécies (*Halobacterium* sp., *Halococcus* sp., *Halalkalicoccus* sp., *Natrococcus* sp.,

entre outros) (Torregrosa-Crespo et al., 2017). Haloarchaeas são comumente encontrados em ambientes com salinidade superior a 3% e, preferencialmente, ocorrem em habitats de pH neutro a alcalino (Haferburg et al., 2017). Essas características são consistentes com os parâmetros físicos e químicos dos substratos encontrados na entrada da caverna Terra Ronca. Além disso, a Análise Canônica de Coordenadas Principais (CAP) corrobora com os resultados relacionando as comunidades microbianas da entrada da caverna com a salinidade do substrato como principal fator ambiental.

Solos com elevada salinidade pode ser consequência de uma baixa precipitação anual, alta evaporação da superfície terrestre, intemperismo das rochas naturais, irrigação com água salgada e práticas agrícolas inadequadas (Shrivastava e Kumar, 2015). A caverna Terra Ronca, além de ser um *spot* de biodiversidade subterrânea, tem um valor cultural e religioso para a população local e das cidades do entorno do Parque Estadual de Terra Ronca. Todos os anos, em agosto, ocorre a festa religiosa do Bom Jesus da Lapa, que atrai milhares de pessoas para a entrada da caverna Terra Ronca desde 1920 (FIGURA 5.8). Durante a festa religiosa o solo e os sedimentos são altamente compactados por milhares de pessoas e até o ano de 2001 era recorrente o uso de fogos de artifício na entrada da caverna. Depois de 2001, os fogos de artifício foram proibidos pelos órgãos ambientais devido a danos causados aos espeleotemas. Sabe-se que a fabricação de fogos de artifício utiliza a pólvora preta, que possui salitre entre outros elementos e essas substâncias podem ser liberadas durante o uso dos fogos de artifício (Werrett, 2015).



FIGURA 5.8. Imagens do festival religioso “Bom Jesus da Lapa” em agosto de 2016. A) animais na entrada da caverna e B) religiosos durante a celebração do festival (fonte = Dalvan G. Silva).

Portanto, a alta salinidade na entrada da caverna de Terra Ronca pode ser devido a: i) intensa radiação solar na entrada da caverna em relação aos demais habitats estudados, aumentando a evaporação da superfície; ii) compactação do solo durante o festival religioso diminuindo a quantidade de água e consequentemente aumentando a concentração de sais no substrato e iii) o uso intenso e prolongado de fogos de artifício até o ano 2001 pode ter deixado salitre como resíduo e modificado a composição do substrato. A salinidade afeta as comunidades microbianas por meio de dois mecanismos primários: efeito osmótico e efeitos específicos dos íons (Yan et al., 2015). Assim, todos esses fatores de estresse ambiental e alta salinidade do substrato na entrada da caverna Terra Ronca influenciaram a composição das comunidades microbianas e favoreceram a dominância de microrganismos tolerantes a essas condições, como as *Halobacteriaceae*. Considerando a alta abundância desse grupo, em combinação com a menor riqueza e baixa diversidade na entrada da caverna, é provável que os microrganismos da família *Halobacteriaceae* desempenhem um papel importante neste habitat, como atuar no ciclo do nitrogênio ou na produção primária por processos quimioautotróficos.

A composição das comunidades microbianas na caverna Terra Ronca mostrou claramente uma distinção entre os habitats estudados. O escalonamento multidimensional não-métrico (NMDS) contribui para esta afirmação, mostrando a dissimilaridade dos habitats estudados. Ao analisar apenas as OTUs abundantes e raras, é possível observar a presença de OTUs raras específicas em cada habitat. Ao analisar cada estação separadamente, não há OTUs raras compartilhadas entre a superfície, entrada da caverna e o ambiente subterrâneo. Considerando as OTUs raras nas duas ocasiões de amostragem, apenas quatro OTUs são compartilhadas entre os habitats estudados (*Acidimicrobiia_OTU1064*, *Bacilli_OTU368*, *Thermoleophilia_OTU2172* e *Bacterium_OTU2402*). Além disso, a maioria das OTUs raras foram encontradas apenas na estação chuvosa ou seca, principalmente na entrada da caverna, onde apenas seis OTUs dos microrganismos raros foram encontradas em ambas as estações. Além da baixa abundância, os microrganismos raros possuem alta capacidade de escapar de predadores e podem desempenhar papéis importantes na dinâmica ecológica (Pedrós-Alió, 2012). As OTUs raras podem exibir padrões de distribuição específicos e às vezes exclusivos, como neste estudo, diferentes das OTUs abundantes. Além disso,

microrganismos raros podem contribuir com até 97% na variabilidade da dissimilaridade da comunidade em uma escala temporal e espacial (Shade et al., 2014). Mesmo que diferentes classes dos microrganismos abundantes tenham sido observadas nos habitats estudados em conjunto com uma distinção entre os ambientes por meio da análise de ordenação, os microrganismos raros representaram melhor as diferenças na distribuição e composição das comunidades microbianas ao longo da caverna Terra Ronca.

Este é o primeiro estudo de comunidades microbianas na caverna Terra Ronca e também o primeiro registro da dominância de microrganismos do domínio *Archaea* na entrada de uma caverna tropical. Os resultados evidenciaram uma enorme riqueza de espécies e grande diversidade, mostrando grupos bacterianos já encontrados em outras cavernas do mundo, como *Actinobacteria* e *Alphaproteobacteria*. Embora o conjunto de primers utilizados não seja específico para avaliar a diversidade de *Archaea*, a predominância da família *Halobacteriaceae*, juntamente com altos níveis de salinidade do substrato, evidencia uma grande abundância de *Archaea* na entrada da caverna. O grupo *Archaea* pode exibir um importante papel ecológico neste ambiente como potenciais produtores primários (quimioautotróficos) e podendo atuar no ciclo do nitrogênio. Infelizmente, não há dados históricos sobre a caracterização do substrato e composição das comunidades microbianas na caverna Terra Ronca. Portanto, não se pode afirmar que o impacto antrópico sobre o ambiente alterou as condições naturais do local e, posteriormente, modificou a estrutura e composição das comunidades bacterianas. Por outro lado, as características ambientais peculiares da entrada da caverna em relação aos demais ambientes da caverna estudados (ambiente superficial e subterrâneo) indicam que o uso do local para fins turísticos e religiosos pode ter alterado suas condições naturais. Finalmente, as OTUs raras permitiram uma melhor distinção entre os habitats do que as espécies abundantes, indicando que os microrganismos raros podem contribuir mais efetivamente para a dissimilaridade desses habitats. Estudos das comunidades microbianas em cavernas permitem uma melhor compreensão da biodiversidade e permitem inferências sobre interações ecológicas entre componentes bióticos e abióticos desse ecossistema. Conhecer a dinâmica ambiental em uma caverna é de extrema importância para orientar órgãos

ambientais e políticas públicas sobre a possibilidade de utilização e exploração desse ambiente e boas práticas de conservação.

5.7 REFERÊNCIAS

Anda D., Krett G., Makk J., Márialigeti K., Mádl-Szonyi J., Borsodi A.K. (2017) *Comparison of bacterial and archaeal communities from different habitats of the hypogenic Molnár János Cave of the Buda Thermal Karst system (Hungary)*. *Journal of Cave and Karst Studies*, 79(2), 113-121.

Anderson M.J., Willis T.J. (2003) *Canonical analysis of principal coordinates: a useful method of constrained ordination for ecology*. *Ecology*, 84(2), 511-525.

Bartlett R.J., Ross D.N. (1988) *Colorimetric determination of oxidizable carbon in acid soil solutions*. *Soil Science Society of America Journal*, 52, 1191-1192.

Barton H.A., Jurado V. (2007) *What's up down there? Microbial diversity in caves*. *Microbe Magazine* 2(3), 132–138

Barton H.A., Giarrizzo J.G., Suarez P., Robertson C.E., Broering M.J., Banks E.D., Vaishampayan P.A., Venkateswaran K. (2014) *Microbial diversity in a Venezuelan orthoquartzite cave is dominated by the Chloroflexi (Class Ktedonobacterales) and Thaumarchaeota Group I. 1c*. *Frontiers in microbiology*, 5, 615.

Bichuette M.E., Simões L.B., von Schimonsky D.M., Gallão J.E. (2015) *Effectiveness of quadrat sampling on terrestrial cave fauna survey—a case study in a Neotropical cave*. *Acta Scientiarum, Biological Sciences*, 37(3), 345 - 351.

Bintrim S.B., Donohue T.J., Handelsman J., Roberts G.P., Goodman R.M. (1997) *Molecular phylogeny of Archaea from soil*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(1), 277-282.

Bremner J.M., Mulvaney C.S. (1982) *Total nitrogen*. In: Page A.L., *Methods of soil analysis*. Madison: American Society on Agronomy, 595-624.

Cuezva S., Fernandez-Cortes A., Porca E., Pašić L., Jurado V., Hernandez-Marine M., Serrano-Ortiz P., Hermosin B., Cañaveras J.C., Sanchez-Moral S., Saiz-Jimenez, C. (2012) *The biogeochemical role of actinobacteria in Altamira cave, Spain*. *FEMS Microbiology Ecology*, 81(1), 281-290.

Edgar R.C. (2010) *Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST*. *Bioinformatics*, 26(19), 2460-2461.

Edgar R.C. (2013) *UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads*. *Nature methods*, 10(10), 996.

- Haferburg G., Gröning J.A., Schmidt N., Kummer N.A., Erquicia J.C., Schlömann M. (2017) *Microbial diversity of the hypersaline and lithium-rich Salar de Uyuni, Bolivia*. Microbiological research, 199, 19-28.
- Herlemann D.P., Labrenz M., Jürgens K., Bertilsson S., Waniek J.J., Andersson A.F. (2011) *Transitions in bacterial communities along the 2000 km salinity gradient of the Baltic Sea*. The ISME journal, 5(10), 1571.
- Ivanova V., Tomova I., Kamburov A., Tomova A., Vasileva-Tonkova E., Kambourova M. (2013) *High phylogenetic diversity of bacteria in the area of prehistoric paintings in Magura Cave, Bulgaria*. Journal of Cave and Karst Studies, 75(3), 218–228.
- Kindt R. (2016) *Biodiversity R: package for community ecology and suitability analysis*. R version 2.7-1.
- Klindworth A., Pruesse E., Schweer T., Peplies J., Quast C., Horn M., Glöckner F.O. (2013) *Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies*. Nucleic acids research, 41(1), e1-e10.
- Kolde R., Kolde M.R. (2018) Package 'Pheatmap'. R version 2.10-1
- Lee N.M., Meisinger D.B., Aubrecht R., Kovacic L., Saiz-Jimenez C., Baskar S., Baskar R., Liebl W., Porter M.L., Engel A.S. (2012) *Caves and Karst Environments*. Life at extremes: environments, organisms, and strategies for survival, 1, 320.
- Logares R. (2017) *Workflow for analysing MiSeq amplicons based on Uparse v1.5*. Zenodo, 10, 5281.
- Mandal S., Panda A.K., Bisht S.S., Kumar N.S. (2016) *MiSeq HV4 16S rRNA gene analysis of bacterial community composition among the cave sediments of Indo-Burma biodiversity hotspot*. Environmental Science and Pollution Research, 23(12), 12216-12226.
- Mandal S., Chatterjee R., Kumar N.S. (2017) *Dominant bacterial phyla in caves and their predicted functional roles in C and N cycle*. BMC microbiology, 17(1), 90.
- Moquet J.S., Cruz F.W., Novello V.F., Strikis N.M., Deininger M., Karmann I., Santos R.V., Millo C., Apaestegui J., Guyot J.L., Siffedine A., Vuille M., Cheng H., Edwards R.L., Santini W. (2016) *Calibration of speleothem $\delta 18 O$ records against hydroclimate instrumental records in Central Brazil*. Global and Planetary Change, 139, 151-164.
- Namwong S., Tanasupawat S., Visessanguan W., Kudo T., Itoh T. (2007) *Halococcus thailandensis sp. nov., from fish sauce in Thailand*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 57, 2199-2203.

- Navarro-Noya Y.E., Valenzuela-Encinas C., Sandoval-Yuriar A., Jiménez-Bueno N.G., Marsch R., Dendooven L. (2015) *Archaeal communities in a heterogeneous hypersaline-alkaline soil*. *Archaea*, 2015, 1 - 11.
- Nicol G.W., Schleper C. (2006) *Ammonia-oxidising Crenarchaeota: important players in the nitrogen cycle?* *TRENDS in Microbiology*, 14(5), 207-212.
- Oksanen J., Blanchet F., Kindt R., Legendre P., Minchin P., O'Hara R. (2018) *Vegan: Community Ecology Package*. R package vegan, vers. 2.2-1.
- Oliveros J.C. (2007-2015) *Venny. An interactive tool for comparing lists with Venn's diagrams*. <http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>
- Ortiz M., Neilson J.W., Nelson W.M., Legatzki A., Byrne A., Yu Y., Wing R.A., Soderlund C.A., Pryor M.B., Pierson L.S., Maier R.M. (2012) *Profiling bacterial diversity and taxonomic composition on speleothem surfaces in Kartchner Caverns, AZ*. *Microbial Ecology*, 65, 371–383.
- Ortiz M., Legatzki A., Neilson J.W., Fryslie B., Nelson W.M., Wing R.A., Soderlund C.A., Pryor B.M., Maier R.M. (2014) *Making a living while starving in the dark: metagenomic insights into the energy dynamics of a carbonate cave*. *ISME Journal*, 8, 478 – 491.
- Pedrós-Alió C. (2012) *The rare bacterial biosphere*. *Annual review of marine science*, 4, 449-466.
- Pinto-da-Rocha R. (1995) *Sinopse da fauna cavernícola do Brasil (1907-1994)*. *Papéis Avulsos de Zoologia*, 39(6), 61-173.
- Quast C., Pruesse E., Yilmaz P., Gerken J., Schweer T., Yarza P., Peplies J., Glöckner F.O. (2012) *The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools*. *Nucleic acids research*, 41(D1), D590-D596.
- Reitschuler C., Spötl C., Hofmann K., Wagner A.O., Illmer P. (2016) *Archaeal distribution in moonmilk deposits from alpine caves and their ecophysiological potential*. *Microbial ecology*, 71(3), 686-699.
- Rheims C.A., Pelegatti-Franco F. (2003) *Invertebrados terrestres de cavernas da área cárstica de São Domingos, nordeste de Goiás*. *O Carste*, 15(4), 132-137.
- Shade A., Jones S.E., Caporaso J.G., Handelsman J., Knight R., Fierer N., Gilbert J.A. (2014) *Conditionally rare taxa disproportionately contribute to temporal changes in microbial diversity*. *MBio*, 5(4), e01371-14.
- Shrivastava P., Kumar R. (2015) *Soil salinity: a serious environmental issue and plant growth promoting bacteria as one of the tools for its alleviation*. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 22(2), 123-131.

Simon K.S., Pipan T., Culver D.C. (2007) *A conceptual model of the flow and distribution of organic carbon in caves*. *Journal of Cave and Karst Studies*, 69, 279–284.

Takahashi S., Tomita J., Nishioka K., Hisada T., Nishijima M. (2014) *Development of a prokaryotic universal primer for simultaneous analysis of bacteria and archaea using next-generation sequencing*. *PLoS one*, 9(8), e105592.

Tetu S.G., Breakwell K., Elbourne L.D., Holmes A.J., Gillings M.R., Paulsen I.T. (2013) *Life in the dark: metagenomic evidence that a microbial slime community is driven by inorganic nitrogen metabolism*. *The ISME journal*, 7(6), 1227.

Torregrosa-Crespo J., Bergaust L., Pire C., Martínez-Espinosa R.M. (2017) *Denitrifying haloarchaea: sources and sinks of nitrogenous gases*. *FEMS microbiology letters*, 365(3), fnx270.

Tourna M., Stieglmeier M., Spang A., Koenneke M., Schintlmeister A., Urich T., Engel M., Schloter M., Wagner M., Richter A., Schleper C. (2011) *Nitrososphaera viennensis, an ammonia oxidizing archaeon from soil*. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108, 8420-8425.

Trajano E., Majer A.P., Santos F.B., Basile P.A. (2003) *Invertebrados aquáticos de cavernas da área cárstica de São Domingos, nordeste de Goiás*. *O Carste*, 15(4), 126-131.

Treusch A.H., Leininger S., Kletzin A., Schuster S.C., Klenk H.P., Schleper C. (2005) *Novel genes for nitrite reductase and Amo-related proteins indicate a role of uncultivated mesophilic crenarchaeota in nitrogen cycling*. *Environmental microbiology*, 7(12), 1985-1995.

Werrett S. (2015) *Fireworks and Color in the Sixteenth and Seventeenth Centuries*. *Early Science and Medicine*, 20(4-6), 458-477.

Wu Y., Tan L., Liu W., Wang B., Wang J., Cai Y., Lin X. (2015) *Profiling bacterial diversity in a limestone cave of the western Loess Plateau of China*. *Frontiers in Microbiology*, 6, 244.

Xue Y., Fan H., Ventosa A., Grant W.D., Jones B.E., Cowan D.A., Ma Y. (2005) *Halalkalicoccus tibetensis* gen. nov., sp. nov., representing a novel genus of haloalkaliphilic archaea. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 55(6), 2501-2505.

Yakimov M.M., La Cono V., Smedile F., DeLuca T.H., Juarez S., Ciordia S., Fernandez M., Albar J.P., Ferrer M., Golyshin P.N., Giuliano L. (2011) *Contribution of crenarchaeal autotrophic ammonia oxidizers to the dark primary production in Tyrrhenian deep waters (central Mediterranean Sea)*. *ISME Journal*, 5, 945-961.

Yan N., Marschner P., Cao W., Zuo C., Qin W. (2015) *Influence of salinity and water content on soil microorganisms*. International Soil and Water Conservation Research, 3(4), 316-323.

Zhang J., Kobert K., Flouri T., Stamatakis A. (2013) *PEAR: a fast and accurate Illumina Paired-End read merger*. Bioinformatics, 30(5), 614-620.

Zhao R., Wang H., Yang H., Yun Y., Barton H.A. (2016) Ammonia oxidizing archaea dominant over bacterial ammonia oxidizers within alkaline cave sediments, Geomicrobiology Journal, 34, 511 – 523.

Zhu X., Burger M., Doane T.A., Horwath W.R. (2013) *Ammonia oxidation pathways and nitrifier denitrification are significant sources of N₂O and NO under low oxygen availability*. Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America, 110, 6328-6333.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ao final desse estudo percebemos o ambiente subterrâneo, em particular as cavernas, com propriedades ecológicas específicas e únicas quanto à sua biodiversidade microbiana. Muitas cavernas brasileiras se localizam em Unidades de Conservação, as quais oferecem proteção a esses ambientes. No entanto, o Brasil possui um patrimônio espeleológico a ser descoberto e infelizmente a atual legislação ambiental local apresenta falhas ao designar critérios na classificação da relevância das cavernas em território nacional. Dentre os critérios estabelecidos na legislação brasileira não há nenhuma menção à estudos e pesquisas envolvendo a comunidade microbiana. Diante desse cenário, os resultados obtidos nesse estudo mostram atributos microbianos, como biomassa e respiração microbiana, bons indicadores para avaliar a dinâmica do fluxo de nutrientes e a saúde do ambiente cavernícola. Portanto, pesquisas avançadas nesse escopo poderiam desenvolver modelos envolvendo a comunidade microbiana e variáveis ambientais, principalmente aquelas relacionadas com o fluxo de energia e nutrientes, a fim de prever possíveis mudanças e alterações no equilíbrio do ecossistema cavernícola. Em geral, poucos estudos têm discutido a quantidade e qualidade da matéria orgânica em cavernas tropicais e temperadas. Portanto esse estudo se destaca ao compilar novos dados e outros já publicados na literatura científica sobre essa temática e discutir as diferenças tróficas entre cavernas tropicais e temperadas, abordando a importância da comunidade microbiana nesse processo.

Este trabalho mostrou que as cavernas tropicais apresentam grande riqueza e diversidade de bactérias e fungos, com a presença de filos já encontrado em outras cavernas do mundo, como *Actinobacteria* e *Proteobacteria* nas comunidades bacterianas e os *Actinomicetos* nas comunidades fúngicas. A composição das comunidades microbianas em cavernas tropicais evidenciou a importância das cadeias alimentares detritívoras, devido ao grande número de OTUs relacionadas a funções saprofitas. Além disso, bactérias conhecidas por apresentarem atividades quimioautótrofas e associadas aos ciclos biogeoquímicos foram encontradas nas cavernas estudadas, indicando que esses grupos podem possuir relações complexas nesse ambiente. No entanto, estudos mais profundos são necessários para determinar

como esses microrganismos atuam na dinâmica ecológica desse ecossistema. Os resultados mostraram as cavernas tropicais como ambientes microbiologicamente inexplorados e de grande importância ecológica, pois abrigam novos organismos para compor a árvore da vida e melhorar a compreensão da dinâmica ambiental desses habitats. Muitos trabalhos publicados anteriormente avaliaram apenas um grupo taxonômico, bactérias ou fungos, e limitaram seus resultados a poucas amostras ou apenas uma ocasião de amostragem. Portanto este é o primeiro estudo sobre comunidades microbianas em cavernas tropicais que apresenta resultados da dinâmica e diversidade de microrganismos considerando a variação sazonal (estação seca e chuvosa) e espacial (gradiente trófico).

Por fim a composição bacteriana da caverna Terra Ronca mostrou evidências dessa comunidade ser dominada por microrganismos do grupo *Archaea*, em particular *Halobacteriaceae*, na entrada da caverna. Além da grande abundância desses microrganismos nas duas ocasiões de amostragem, a elevada salinidade no local pode favorecer a predominância da família *Halobacteriaceae* na comunidade microbiana. Estudos com metodologias específicas para acessar a biodiversidade de *Archaeas* são necessários para obtermos conclusões mais robustas. No entanto, tais resultados são as primeiras evidências sobre a dominância de microrganismos da família *Halobacteriaceae* em cavernas de calcário.

Se os microrganismos cavernícolas fossem percebidos como organismos chave do ambiente subterrâneo, ou como uma possibilidade de um novo tratamento para doenças letais, ou ainda como uma possível fonte de enzimas e biomoléculas para a indústria nacional, então cidadãos, cientistas e governos estariam mais dispostos a discutir a conservação e o manejo de comunidades microbianas nesses ambientes. No entanto a maneira mais simples de começar a discutir a importância dos microrganismos nesse ambiente é conduzir mais pesquisas sobre a diversidade microbiana, além de discutir os impactos e as medidas de proteção para essas comunidades em cavernas tropicais. Só a partir dessas informações compreenderemos o papel complexo da comunidade microbiana em cavernas tropicais e como os impactos antropogênicos nessa comunidade, e conseqüentemente no funcionamento do ambiente subterrâneo, pode afetar a sociedade.

Essas informações podem auxiliar o planejamento e uso sustentável dos ambientes cavernícolas pela comunidade local, pelas atividades ecoturísticas e pelas empresas que visam a exploração comercial das cavernas de calcário. Assim, a microbiologia em conjunto com a ecologia pode contribuir com políticas e medidas para a conservação dos ecossistemas subterrâneos e colaborando para mitigar impactos ambientais no funcionamento desse ecossistema.