

ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS UTILIZANDO A TÉCNICA DE SEDIMENTAÇÃO EM PLACA E AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DA ÁGUA NA CAVERNA TRÊS LAGOS, FELIPE GUERRA-RN

Alyne de Oliveira Amorim; Lorena Lúcia do Vale Vasconcelos; Francisco Fábio Mesquita Oliveira; Erika Linzi Silva Taylor; Regina Célia Pereira Marques

Universidade do Estado do Rio Grande do Norte- UERN: aline.amorim1@hotmail.com; Universidade do Estado do Rio Grande do Norte- UERN: lorena.vvale@hotmail.com; Universidade do Estado do Rio Grande do Norte- UERN: ffabiomesquita@hotmail.com; Universidade Federal de Minas Gerais- UFMG: taylor.els@gmail.com; Universidade do Estado do Rio Grande do Norte- UERN: marques.regina@gmail.com

INTRODUÇÃO

As cavernas são feições formadas por processos naturais e são passíveis de serem adentradas pelo homem. Apesar de serem ambientes mais extremos, as cavidades subterrâneas abrigam uma grande biodiversidade, com diferentes níveis de adaptação ao ecossistema subterrâneo (podendo chegar ao caso extremo de restrição a esses ambientes). Dentre os organismos cavernícolas existe uma grande diversidade de fungos e bactérias ainda muito pouco estudadas. Nosso conhecimento do mundo microbiano em geral é limitado. Esse cenário é ainda mais limitado em se tratando da microbiota cavernícola. Desta forma, o potencial para a descoberta de novos microrganismos, ou até mesmo novos processos microbianos, é imenso. A investigação de tais organismos pode ampliar o conhecimento sobre a ecologia e as relações evolutivas microbianas (BARTON; NORTHUP, 2007; KAMBESIS, 2007). Apesar desse grande potencial, o conhecimento sobre microrganismos em cavernas vem crescendo nas últimas décadas, no entanto, ainda é restrito a poucas cavernas no mundo (BARTON; LUISZNER, 2005; BARTON *et al.* 2007; CHEN *et al.* 2009). Já o conhecimento da diversidade microbiana no Brasil é ainda mais limitado, sendo representados por poucos inventários (FERREIRA *et al.* 2000; CURY *et al.* 2001; TAYLOR *et al.* 2009; TAYLOR *et al.* 2013; VANDERWOLF *et al.* 2013; TAYLOR *et al.* 2014).

Apesar de o Brasil possuir um vasto patrimônio espeleológico, e do espeleoturismo ser uma prática comum no Brasil, existem poucos trabalhos sobre a microbiota nessas cavidades. Tal fato é alarmante, principalmente considerando-se o risco da presença de microrganismos patogênicos ao homem e outros animais (NORTHUP & LAVOIE, 2001; JURADO *et al.* 2010; CAMPBELL *et al.* 2011; VANDERWOLF *et al.* 2013; TAYLOR *et al.* 2013; TAYLOR *et al.* 2014). A presença de fungos e bactérias causadores de infecções oportunistas em humanos tem sido reportada em diversos trabalhos. Além dos fungos, existe uma grande diversidade de bactérias causadoras de infecções mais sérias em humanos. Um exemplo que pode ser citado é o grupo de bactérias gram negativas, denominado coliformes. A mais conhecida desse grupo é a *Escherichia coli*, comumente encontrada no intestino humano (e de outros animais). Essa bactéria em grandes quantidades pode causar sérias infecções nos sistemas urinários e digestório. Apesar do grupo dos coliformes ter sido cada vez mais estudado em aquíferos de cavernas em outros países (JURADO *et al.* 2010; CAMPBELL *et al.* 2011), esse estudo é praticamente inexistente no Brasil.

Como já discutido, o conhecimento acerca da diversidade microbiana no Brasil é ainda muito limitado, sendo ainda mais limitado na região nordeste do país. A caverna Três Lagos é uma caverna localizada no interior do estado do Rio Grande do Norte e é caracterizada pela presença de três grandes lagos, interconectados. Suas características e proximidade com centro urbano atraem

(83) 3322.3222

contato@conidis.com.br

www.conidis.com.br

diversos visitantes com finalidade recreativa (banhistas). O presente trabalho teve por objetivo isolar fungos filamentosos presentes no ar da gruta Três Lagos (Felipe Guerra, RN, Brasil) e realizar um teste de balneabilidade na água para avaliar os riscos microbiológicos aos quais os visitantes possam estar expostos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Local de estudo

A gruta Três Lagos (05° 35' 35.84" S e 37° 41' 13.76" W) (Figura 1) é uma caverna calcária inserida no município de Felipe Guerra (Rio Grande do Norte, Brasil) (BENTO, 2011), Grupo Apodi, aflorante na bacia costeira do Rio Grande do Norte. O grupo Apodi divide-se e em duas unidades: a porção superior (calcário Jandaíra) e a porção inferior (arenito Açú). Essa cavidade possui três lagos interconectados, que preenchem uma área considerável da caverna (Figura 1). Além disso, existem três entradas emersas, que correspondem a aberturas verticais ou sub-verticais (associadas a fundos de pequenas dolinas).

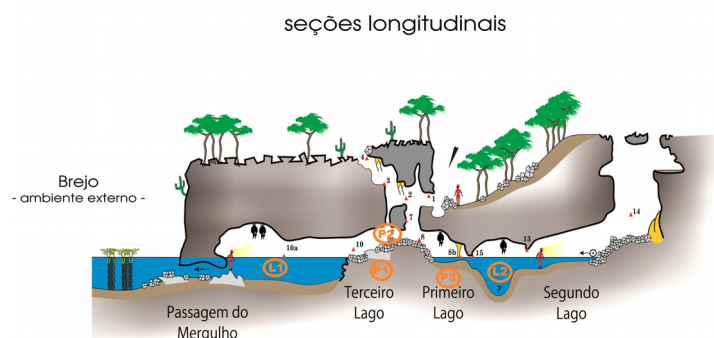


Figura 1 - Mapa de seções longitudinais na caverna três lagos, Felipe Guerra/RN adaptado do mapa da Sociedade Espeleológica Potiguar (2007)

2.2. Coleta de fungos filamentosos cultiváveis e presentes no ar.

O material utilizado foi devidamente preparado, esterilizado e acondicionado no Laboratório de Cultura do Tecido Vegetal do Departamento de Ciências Biológicas da Universidade do Estado do Rio Grande do Norte, DECB/UERN (Mossoró, RN, Brasil). O material foi devidamente lacrado e transportado para a caverna. Para a coleta de dados foi utilizada a técnica de sedimentação em placa, através da exposição de placas contendo meio PDA (Potato Dextrose Ágar) em pontos selecionados no interior da caverna (Figura 1) (P1, P2, P3) durante 15 minutos. Após período de exposição, as placas foram imediatamente seladas *in situ* para transporte ao laboratório, aonde foram realizados os processos de incubação, isolamento e triagem. Após o período de incubação à temperatura ambiente (30°C), os isolados foram repicados em placas contendo ágar extrato de malte (MEA) e incubado às temperaturas 25°C e 35°C por sete dias. Após esse período, o material foi enviado para identificação.

2.4. Identificação de fungos filamentosos

Os isolados obtidos foram contabilizados, purificados e identificados até o nível taxonômico possível. A identificação dos isolados foi realizada no Laboratório de Micologia da Universidade

Federal de Minas Gerais (Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil) através da técnica de caracterização macro e micromorfológica dos isolados em meios de cultura específicos e seguindo as chaves taxonômicas mais utilizadas (DOMSCH; GAMS; ANDERSON, 2007; SAMSON; FRISVAD, 2004; KLICH, 2002; PITT, 1991; SAMSON; PITT, 1985; SAMSON; VARGA, 2007). Os meios de cultura utilizados foram ágar Czapek com extrato de levedura (CYA), ágar extrato de malte (MEA), ágar Sabouraud (SDA) e CREA, conforme o gênero identificado e de acordo com as chaves de identificação específicas (DOMSCH; GAMS; ANDERSON, 2007; SAMSON; FRISVAD, 2004; KLICH, 2002; PITT, 1991; SAMSON; PITT, 1985; SAMSON; VARGA, 2007).

Para a análise microbiológica de água foi utilizado o método do substrato cromogênico Colilert®. O material coletado foi dissolvido em água destilada autoclavada e distribuído em tubos de ensaio tampados e previamente esterilizados. As amostras foram inoculadas em concentração de 1:1, 1:10 e 1:100, sendo cinco tubos para cada concentração. Em seguida os tubos foram incubados em uma estufa bacteriológica à 37°C/24hs. A leitura foi feita com o auxílio de uma lâmpada ultravioleta e os resultados são expressos em NMP (Número Mais Provável)/100 mL de amostra, com limite de confiança de 95%, conforme a metodologia descrita pela FUNASA (2013) através do método do *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, publicação da American Public Health Association (APHA, 1997).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram isoladas apenas 11 unidades formadoras de colônias (UFC) de fungos filamentosos cultiváveis através da técnica selecionada. Esses isolados estavam distribuídos entre pelo menos oito espécies dos gêneros *Aspergillus* (*A. flavus*, *A. niger*, *A. versicolor* e *A. wentii*), *Fusarium* (*F. solani*), *Penicillium* (*P. chrysogenum*), *Scopulariopsis* sp., e *Ulocladium* sp.. O gênero mais representativo foi o *Aspergillus*, e corrobora com diversos trabalhos já publicados (VANDERWOLF *et al.*, 2013; TAYLOR *et al.*, 2013; TAYLOR *et al.* 2014). Esse gênero é extremamente ubíquo e está entre os mais bem estudados e conhecidos na micologia

O gênero *Penicillium* apresentou uma baixa diversidade (com apenas uma espécie, *P. chrysogenum*). Os poucos trabalhos existentes no Brasil acerca da micobiota do ar têm relatado uma representatividade maior desse gênero. No entanto, é possível que a baixa densidade, frequência e diversidade desse gênero tenham sido resultado das limitações do método de coleta. Como foram obtidas apenas amostras do ar, e várias espécies de crescimento rápido foram isoladas, é possível que esse resultado seja reflexo da limitação do espaço oferecido pela placa de Petri em contrapartida ao rápido crescimento de algumas espécies (*A. flavus*, *A. niger*, *A. wentii* e *F. Solani*).

É importante ressaltar que a espécie *P. chrysogenum* apresenta uma boa taxa de crescimento comparada às outras espécies desse gênero e têm sido altamente relatada em diversas cavernas no Brasil e no mundo (KOILRAJ *et al.* 1999; NIEVES-RIVERA, 2003; ULLOA *et al.* 2006; VANDERWOLF *et al.* 2013; BISWAS *et al.* 2013; TAYLOR *et al.* 2013; TAYLOR *et al.* 2014). A espécie *F. solani* também é comumente encontrada em cavernas no Brasil e no mundo (RESENDE-STOIANOFF *et al.* 2012; VANDERWOLF *et al.* 2013; TAYLOR *et al.* 2013; TAYLOR *et al.* 2014).

Em relação ao estudo da qualidade de água, foi possível detectar presença de coliformes totais (L1- 110 NMP/100mL ; L2 - 280NMP/100mL) e coliformes termotolerantes (≥1600 NMP/100mL) em ambos os lagos. Os resultados obtidos indicaram que a água da gruta Três Lagos encontrava-se (no momento da coleta) imprópria para o consumo humano, conforme padrões microbiológicos estabelecidos pela Portaria n.2914 de 12 de dezembro de 2011 do Ministério da

Saúde (BRASIL, 2011). Porém, de acordo com a resolução nº 274 de 29 de novembro de 2000 do CONAMA, esse aquífero está dentro do padrão de aceitabilidade para as condições de balneabilidade.

CONCLUSÃO

Os resultados desse estudo contribuem para a ampliação do conhecimento sobre a microbiologia de cavernas no Brasil. O levantamento de fungos filamentosos contribui para o conhecimento da distribuição de fungos em cavernas no Brasil e no mundo, sendo altamente relevantes para a preservação do patrimônio genético brasileiro. Além disso, algumas espécies de fungos encontradas podem causar infecções oportunistas em humanos. Considerando que a gruta Três Lagos é altamente visitada, é importante ressaltar que mais estudos devam ser realizados para melhor compreensão da dinâmica da comunidade microbiana nessa caverna. Através de estudos mais detalhados poderíamos comparar a diversidade e o funcionamento desse ecossistema em diferentes regiões do mundo. Além disso, esse estudo é um dos primeiros a realizar análise de contaminação de aquífero subterrâneo por coliformes fecais no Brasil. Tal análise é extremamente relevante em cavernas visitadas e deve ser considerada em estudos de manejo e conservação. O acompanhamento dos níveis de contaminação por coliformes podem fornecer dados relevantes para a conservação da biodiversidade cavernícola, além de evitar problemas mais sérios de saúde pública (contaminação de visitantes).

REFERÊNCIAS

- APHA – American Public Health Association, AWWA American Water Works Association, WPCF Water Pollution Control Federation: 1997, **Standard Methods**, 19 ed. Washington. Ed APHA.
- BARTON, H.A.; NORTHUP, D.E. Geomicrobiology in cave environments: past, current and future perspectives. **Journal of Cave and Karst Studies**, v.69, p.163-178, 2007.
- BARTON, H. A.; LUISZER, F. Microbial metabolic structure in a sulfidic cave hot spring: potential mechanisms of biospeleogenesis. **Journal of Cave and Karst Studies**, v. 67, n. 1, p. 28-38, 2005.
- BARTON, H. A.; JURADO, V. What's up down there? Microbial diversity in caves. **Microbe**, v. 2, n. 3, p. 132-138, 2007.
- BARTON, H. A.; TAYLOR, N. M.; KREATE, M. P *et al.* The Impact of Host Rock Geochemistry on Bacterial Community Structure in Oligotrophic Cave Environments. **International Journal of Speleology**, v. 36, p. 93-104, 2007.
- BENTO, D.M.; CRUZ, J. B.; FERREIRA, R. L *et al.* Mapeamento, caracterização ambiental e relevância do patrimônio espeleológico de Felipe Guerra/RN. IN: 31º Congresso Brasileiro de Espeleologia., 2011, Ponta Grossa. **ANAIS do 31º Congresso Brasileiro de Espeleologia...** Ponta Grossa-PR, 2011. P.1-15.
- BISWAS, J.; SHARMA, K.; HARRIS, K.K *et al.* Biodeterioration agents: Bacterial and fungal diversity dwelling in or on the pre-historic rock-paints of Kabra-pahad, India. **Iranian Journal of Microbiology**, 5.3: 309, 2013.
- BRASIL. Fundação Nacional de Saúde. **Manual prático de análise de água**. 4.ed. Brasília: Funasa, 2013. 150 p.
- BRASIL. Ministério da Saúde Portaria MS nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011, Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão

(83) 3322.3222

contato@conidis.com.br

www.conidis.com.br

de potabilidade. **Diário Oficial da União** [da República Federativa do Brasil]. Brasília, 14 dez. 2011; Seção 1.

BRASIL. Decreto nº. 99.556, de 1º de outubro de 1990. Casa Civil, Brasília, DF, 1º out. 1990.

CAMPBELL, J.W, WATSON, A, WATSON, C, BALL, H, and PIRKLE, R. – *Escherichia coli*, other coliform, and environmental chemoheterotrophic bacteria in isolated water pools from six caves in northern Alabama and northwestern Georgia. *Journal of Cave and Karst Studies*, v. 73, no. 2, p. 75–82. DOI: 10.4311/jcks2009mb0131 2011.

CHEN, Y.; WU, L.; BODEN, R *et al.* Life without light: microbial diversity and evidence of sulfur- and ammonium-based chemolithotrophy in Movile cave. **The ISME Journal**, v. 3, p. 1093-1104, 2009.

DOMSCH, K.H.; GAMS, W.; ANDERSON, T.H. Compendium Of Soil Fungi, 2nd Taxonomically Revised Edition by W. Gams. IHW, **Eching**, 2007.

CONSELHO NACIONAL DE MEIO AMBIENTE – CONAMA. **Resolução nº 274/2000. Brasília, 2000.** Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/>>. Acesso em 08 out. 2015

FERREIRA, R.L.; PROUS, X.; BERNARDI, L.F.O *et al.* Fauna subterrânea do Estado do Rio Grande do Norte: Caracterização e Impactos. **Revista Brasileira de Espeleologia- RBE**, v. 1, n.1, p.33-34, 2010.

FERREIRA, R.L. & MARTINS, R.P. Guano de morcegos: fonte de vida em cavernas. **Ciência Hoje**, 25 (146):34-40, 1999.

FERREIRA, R. L., & MARTINS, R. P. Cavernas em risco de ‘extinção’. **Ciência Hoje**, [S.l.], 29, p.20–28, 2001.

FERREIRA, R.L.; MARTINS, R.P. & YANEGA, D. Ecology of bat guano arthropod communities in a brazilian dry cave. **Ecotropica**, [S.l.], 6: p. 105-115, 2000.

GERIC, B.; PIPAN, T & MULEC, J. Diversity of culturable bacteria and meiofauna in the jama caves (Slovenia). **Acta Carsologica**, 33:301-309, 2004.

HOLSINGER, R. & CULVER, D. C. The Invertebrate Cave Fauna of Virginia and a Part of Eastern Tennessee: Zoogeography and Ecology. **Brimleyana**, 14. 1-162, 1988.

KAMBESIS, P. The importance of cave exploration to scientific research. **J. of Cave and Karst Studies**, v.69, p. 46–58, 2007.

KLICH, M.A. Identification of common *Aspergillus* species. 1st ed, Central albureau voor Schimmel cultures, Utrecht, **The Netherlands**, 122p, 2002.

KOILRAJ, A. J *et al.* Fungal diversity inside caves of southern India. **Current Science-Bangalore**, 77: 1081-1083, 1999.

NIEVES-RIVERA, A. M. Mycological survey of Río Camuy Caves Park, Puerto Rico. **Journal of Cave and Karst Studies**, 65.1: 23-28, 2003.

- NORTHUP, D. E.; LAVOIE, K. H. Geomicrobiology of Caves: A Review. **Geomicrobiology Journal**, v.18, p. 199-222, 2001.
- PITT, J.I. Advances in the taxonomy of food spoilage fungi. **Fungi and Mycotoxins in Stored Products**, 23, 32, 1991.
- POULSON, T. L.; WHITE, W. B. The cave environment. **Science**, v. 165, n. 3897, p. 971-981, 1969.
- PULIDO-BOSCH, A.; MARTÍN-ROSALES, W.; LÓPEZ-CHICANO, M. *et al.* Human impact in a tourist karstic cave (Aracena, Spain). **Environmental Geology** n. 31, v. 3/4, p. 142-149. 1997.
- RESENDE-STOIANOFF *et al.* Activity of aldimines against *Fusarium solani* isolated from bat guano in a neotropical touristic cave. In: **Mycoses**, v. 55, p. 102-103, 2012.
- SAMSON, R.A & FRISVAD, J.C. *Penicillium* subgenus *pennicilium*: new taxonomic schemes and mycotoxins and other extrolites. **Studies in Mycology**, 49p, 2004.
- SAMSON, R. A. & GANS, W. (1985). Typification of the species of *Aspergillus* and associated teleomorphs. In R.A.Samson & J. I. Pitt (Eds.), **Advances in Penicillium and Aspergillus systematics** (pp. 31-54). New York: Plenum Press.
- SAMSON, R. A.; VARGA, J. *Aspergillus* systematic in the genomic era. Utrecht: CBS Fungal Biodiversity Centre, 2007. 207 p. (**Studies in Mycology** 59)
- TAYLOR, E.L.S; RESENDE-STOIANOFF, M.A & FERREIRA, R.L. Mycological study for a management planto f a neotropical show cave (Brazil). **Int. J. Speleology**.,42 (3): 267-277, 2013.
- TAYLOR, E.L.S *et al.* Cave Entrance dependent Spore Dispersion of Filamentous Fungi Isolated from Various Sediments of Iron Ore Cave in Brazil: a colloquy on human threats whilecaving. **Ambient Science**. Vol 1(1): 16-28, 2014.
- TISCH D.; SCHMOLL, M. Ligth Regulation of metabolic pathways in fungi. **Applied Microbiology Biotechnology**, 85:1259-1277, 2010.
- ULLOA, M.; LAPPE, P.; AGUILLAR, S *et al.* Contribution to the study of the mycobiota present in the natural habitats of *Histoplasma capsulatum*: an integrative study in Guerrero, Mexico. **Revista Mexicana de Biodiversidad**, 77:153-160. 2006.
- VAUGHAN-MARTINI, A.; ANGELINE, P.; ZACCHI, L. The Influence of Human and animal visitation on the yeast ecology of three Italian caverns. **Annals of Microbiology**, 50:133-140, 2000.
- VANDERWOLF, K. J.; MALLOCK, D, MCALPINE, D.F *et al.* A word review of fungi, yeasts, and slime mold in caves. **International Journal of Speleology**, 42(1):77-96, 2013.
- WANG, J.; ZHU, Z.Q.; ZHANG, Z *et al.* A novel endophytic Huperzine A-producing fungus, *Shiraia sp* Slf14, isolated from *Huperzia serrata*. **Journal of Applied Microbiology**, 109(4): 1469-1478, 2010.