



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE MICOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE FUNGOS

ALINE OLIVEIRA BARBOZA DA CUNHA

**CARACTERIZAÇÃO TAXONÔMICA DA MICOBIOTA DE UMA *BAT CAVE* NO
PARNA DO CATIMBAU, PERNAMBUCO, BRASIL**

Recife

2019

ALINE OLIVEIRA BARBOZA DA CUNHA

**CARACTERIZAÇÃO TAXONÔMICA DA MICOBIOTA DE UMA *BAT CAVE* NO
PARNA DO CATIMBAU, PERNAMBUCO, BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos do Departamento de Micologia do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos parciais para a obtenção do título de mestre em Biologia de Fungos.

Área de Concentração: Taxonomia e ecologia de Fungos

Mestranda: Aline Oliveira Barboza da Cunha
Orientador: Dra. Cristina Maria de Souza Motta
Co-orientador: Dr. Alexandre Reis Machado

Recife
2019

Catálogo na fonte:
Bibliotecária Claudina Queiroz, CRB4/1752

Cunha, Aline Oliveira Barboza da

Caracterização taxonômica da micobiota de uma *Bat cave* no Parna do Catimbau, Pernambuco, Brasil / Aline Oliveira Barboza da Cunha - 2019.

99 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Cristina Maria de Souza Motta

Coorientador: Alexandre Reis Machado

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos. Recife, 2019.

Inclui referências e apêndices.

1. Fungos patogênicos 2. Fungos anemófilos 3. Caatinga

I. Motta, Cristina Maria de Souza (Orientadora) II. Machado, Alexandre Reis (Coorientador) III. Título

579.5 CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2022-014

ALINE OLIVEIRA BARBOZA DA CUNHA

**CARACTERIZAÇÃO TAXONÔMICA DA MICOBIOTA DE UMA *BAT CAVE* NO
PARNA DO CATIMBAU, PERNAMBUCO, BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos do Departamento de Micologia do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos parciais para a obtenção do título de mestre em Biologia de Fungos.

Aprovada em: 19/06/2019

BANCA EXAMINADORA

Dra. Cristina Maria de Souza-Motta (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Neiva Tinti de Oliveira (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Diogo Xavier Lima (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Rafael José Vilela de Oliveira (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Dedico aos meus pais, **Claudenor** (*in memorian*) e **Eunilde** que sempre investiram em minha educação, meu esposo **Edson** e minha filha **Heloísa**, pelo amor incondicional em todos os momentos da minha vida. Papai, saudades! Eu lhe amo muito!

*“Tudo que planejares realizar dará certo e a luz brilhará
constantemente em teus caminhos.”*

JÓ 22: 28

AGRADECIMENTOS

Gostaria de prestar os meus sinceros agradecimentos:

Especialmente a Deus, nosso Senhor, por ser Fortaleza, Luz e perseverança de cada dia que nasce. Por Ele ter me permitido realizar mais este sonho. Bendito seja!

Com gratidão e carinho, aos meus amados pais, Claudenor e Eunilde, pelo exemplo, pelo amor incondicional, conforto, carinho, paciência e apoio em todos os momentos. Amo vocês!

A minha querida irmã, Amanda, pelo carinho e companheirismo.

Ao meu esposo, Edson, pelo amor, pelo porto seguro, paciência, pelo conforto, pela força e por compartilhar comigo este sonho.

À Universidade Federal de Pernambuco, ao Centro de Biociências e o Departamento de Micologia pela contribuição à minha formação, pelas oportunidades de ingressar e vivenciar o mundo da Ciência e da pesquisa; ao Laboratório de Biologia molecular da Micoteca URM pelo espaço e materiais disponibilizados para realização da dissertação na Biologia Molecular e todos que fazem parte desta.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro concedido para realização deste trabalho.

Ao programa e secretaria da Pós-graduação em Biologia de Fungos pelo apoio.

Aos doutorandos Eder Barbier e Aída Otálora e Narjara Pimentel do Laboratório de Ciências Aplicadas à Conservação da Biodiversidade pelo auxílio nas coletas e manejo dos morcegos no Catimbau para minha pesquisa.

Em especial, à colega de turma e de laboratório Thays Gabriele e ao Pós-doutorando Jadson Bezerra pelo super apoio na realização das etapas de identificação dos fungos pela Biologia Molecular e análises dos dados. Pelo profissionalismo, dedicação e disposição. Pela empatia. Devo muito a vocês!

Aos Professores Dra. Cristina Maria Souza-Motta e Dr. Alexandre Reis Machado por terem aceitado me orientar nesta pesquisa, pela disposição, pelo incentivo e atenção, ensinamentos e

pela enorme paciência e, principalmente, pelo apoio ao descobrir minha gravidez. Muito obrigada!

À professora Dra. Laura Mesquita, por me receber em seu laboratório desde a graduação, sempre muito carinhosa e atenciosa, preocupada com nosso bem-estar e disposta a ouvir, a ajudar. Muito obrigada!

Às doutorandas Karla Freire e Gianne Rizutto pela amizade, pelo carinho, apoio, aconchego e alegria. Às minhas amigas Tamara Caldas e Letícia Silva, pela amizade de todas as horas. Pelo ouvido, pela paciência e pelo carinho.

Aos estudantes do Laboratório Micologia Ambiental no auxílio da realização deste trabalho, Ana Patrícia, Juliana Mello, Amanda Cupertino, Layanne Ferro, Anthony Cavalcanti, pelos conhecimentos compartilhados, pelo carinho, pelos momentos maravilhosos de convivência, pela ajuda mútua.

Aos colegas de turma, obrigada pela convivência e aprendizado.

A todos que contribuíram de forma direta e indireta na realização deste trabalho.

RESUMO

Bat caves são cavernas que abrigam congregações de milhares de morcegos. A presença destes animais altera a composição da biota cavernícola, principalmente devido ao guano dos morcegos. Os estudos sobre a microbiota em cavernas brasileiras são considerados raros e merecem destaque pelo potencial patogênico e pela capacidade desses microrganismos de produzir micotoxinas. O objetivo deste estudo foi determinar a diversidade de fungos isolados do ar, dos morcegos e do guano da caverna “Meu Rei”, localizada no Parque Nacional do Vale do Catimbau, Tupanatinga – PE. Para o isolamento dos fungos anemófilos, a técnica utilizada consistiu da exposição das placas de Petri ao ar, contendo meios de cultura Ágar Dicloran Rosa Bengala Cloranfenicol (DRBC) e Ágar Brain Heart Infusion (BHI). As placas foram expostas por 20 minutos nas quatro câmaras da caverna e em seguida foram incubadas a 28°C por sete dias. Para coleta dos fungos dos morcegos, foram utilizados esfregaços com swabs da cavidade oral, pelos e asas. Realizou-se o plaqueamento direto em meio BHI e Saboraud contidos em placas e incubadas a 37°C e 28°C, respectivamente, por sete dias. Para isolamento dos fungos do guano, foi realizada diluição seriada (10⁻⁴) do guano fresco e velho de morcegos insetívoros, frugívoros e hematófagos. Fez-se o plaqueamento direto em placas com DRBC e Saboraud que foram incubadas a 25°C por sete dias. Todos os isolados foram purificados em meio de cultura Batata Dextrose Agar e incubados por sete dias a 28°C. Para identificação, utilizou-se a morfologia e caracterização molecular, observando características macro e microscópicas e análise filogenética das sequências de DNA dos fungos utilizando diferentes genes (ITS, LSU (D1/D2) e/ou TUB) de acordo com os gêneros obtidos na identificação prévia. Um total de 170 fungos foi isolado e 158 foram identificados. Os substratos apresentaram micobiotas distintas, variando de 6 a 24 gêneros, onde *Aspergillus*, *Penicillium* e *Talaromyces* foram comuns a todos. Ascomycota foi o grupo de fungos com o maior número de representantes, *Aspergillus* (25), *Talaromyces* (23) e *Candida* (16). *Geosmithia carolliae* foi descrita como espécie nova para a ciência e possíveis outras novidades taxonômicas em diferentes gêneros. A maioria dos gêneros identificados já foram citados em literatura associados a cavernas ou cavernas associadas a morcegos. Nossos dados confirmam a necessidade de pesquisas deste tipo, indicando que cavernas devem ser monitoradas e visitas devem ser realizadas em condições controladas para prevenção de infecções, contribuindo para o estabelecimento de um plano de gestão e visita segura para esta caverna e para o PARNA Catimbau.

Palavras-chave: Caatinga; Filogenia; Fungos patogênicos; Fungos anemófilos.

ABSTRACT

Bat caves are caves that house congregations of thousands of bats. The presence of these animals alters the composition of the cave biota, mainly due to the guano of the bats. Studies on the mycobiota in Brazilian caves are considered rare and deserve attention due to the pathogenic potential and the ability of these microorganisms to produce mycotoxins. The objective of this study was to determine the diversity of fungi isolated from the air, bats and guano of the "Meu Rei" Cave, located in the Catimbau Valley National Park, Tupanatinga - PE. For the isolation of anemophilic fungi, the technique used consisted of exposing Petri dishes to the air, containing culture medium Agar Dicloran Rosa Bengal Chloramphenicol (DRBC) and Brain Heart Infusion Agar (BHI). Plates were exposed for 20 minutes in the four chambers of the cave and then incubated at 25°C for seven days. To collect the fungi from the bats, swabs were used with swabs from the oral cavity, hairs and wings. Direct plating on BHI and Saboraud medium was contained in plates and incubated at 37°C and 28°C, respectively, for seven days. For the isolation of guano fungi, serial dilution (10⁻⁴) of fresh and old guano of insectivorous, frugivorous and hematophagous bats were performed. Direct plating was performed on DRBC and Saboraud plates which were incubated at 25°C for seven days. All isolates were purified in Potato Dextrose Agar culture medium and incubated for seven days at 28°C. For identification, morphology and molecular characterization were used, observing macro and microscopic characteristics and phylogenetic analysis of fungal DNA sequences using different genes (ITS, LSU (D1 / D2) and / or TUB) according to the genera obtained in the identification. A total of 170 fungi were isolated and 158 were identified. The substrates presented distinct mycobias, ranging from 6 to 24 genera, where *Aspergillus*, *Penicillium* and *Talaromyces* were common to all. Ascomycota was the group of fungi with the highest number of representatives, *Aspergillus* (25), *Talaromyces* (23) and *Candida* (16). *Geosmithia carolliae* has been described as a new species for science and possible other taxonomic novelties in different genera. Most of the genres identified have been cited in literature associated with caves or caves associated with bats. Our data confirm the need for research of this type, indicating that caves should be monitored and visits should be made under controlled conditions to prevent infections, contributing to the establishment of a safe management and visitation plan for this cave and PARNA Catimbau.

Key-words: Caatinga; identification; isolation; pathogenic fungi; anemophilus fungi.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Morcegos infectados com a Síndrome do Nariz Branco, causada pelo fungo <i>Pseudogymnoascus destructans</i>	18
Figura 2 -	Entrada da caverna “Meu Rei”, no Parque Nacional do Vale do Catimbau, Tupanatinga, Pernambuco, Brasil.....	25
Figura 3 -	Mapa e dimensões da caverna “Meu Rei”, no Parque Nacional do Catimbau, Pernambuco, Brasil.....	26
Figura 4 -	Croquis da Caverna “Meu Rei”. Na figura, destacam-se as câmaras da caverna onde os fungos foram coletados.....	28
Figura 5 -	Hastes de sustentação feitas de PVC confeccionadas para a coleta dos fungos do ar da caverna “Meu Rei”	29
Figura 6 -	Exemplo de Puçá utilizado para captura dos morcegos na caverna “Meu Rei”	30
Figura 7 -	Coleta dos fungos a partir de esfregaços na cavidade oral e asa dos morcegos na caverna “Meu Rei”	30
Figura 8 -	Guano de morcegos frugívoros que se abrigam na caverna “Meu Rei”.....	31
Figura 9 -	Morfologia macroscópica (1) e microscópica (2) do gênero <i>Aspergillus</i> isolado da caverna “Meu Rei”, PARNA do Catimbau, Pernambuco, Brasil, cultivado em MEA por sete dias a 25°C.....	35
Figura 10 -	Morfologia macroscópica (1) e microscópica (2) do gênero <i>Penicillium</i> isolado da caverna “Meu Rei”, PARNA do Catimbau, Pernambuco, Brasil cultivado em MEA por sete dias a 25°C.....	36
Figura 11 -	Árvore de inferência bayesiana (IB) utilizando sequencias de ITS do rDNA de 133 fungos isolados de morcegos e do ar.....	48
Figura 12 -	Árvore de inferência bayesiana (IB) utilizando sequencias de LSU (D1/D2) do rDNA de 25 leveduras isoladas de morcegos.....	50

Figura 13 -	Árvore de inferência bayesiana (IB) utilizando sequencias do gene tubulina	
	de 25 fungos isolados do guano.....	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Frequência absoluta (F) e relativa (Fr) dos fungos identificados por substrato da caverna “Meu Rei”, PARNA do Catimbau, Pernambuco, Brasil.....	36
Tabela 2 - Relação da distribuição dos gêneros de fungos identificados do ar nas câmaras da Caverna “Meu Rei”, PARNA do Catimbau-PE, Brasil.....	38
Tabela 3 - Ocorrência e distribuição dos gêneros de fungos identificados do ar por meio de cultura nas câmaras da Caverna “Meu Rei”, PARNA do Catimbau-PE, Brasil.....	38
Tabela 4 - Relação da Abundância, Riqueza e Diversidade das espécies da Caverna “Meu Rei”, PARNA do Catimbau-PE, Brasil.....	39
Tabela 5 - Relação dos táxons e ocorrência de fungos identificados por partes dos morcegos da Caverna “Meu Rei”, PARNA do Catimbau-PE, Brasil.....	42
Tabela 6 - Relação de Abundância, Riqueza e Diversidade de fungos identificados por partes dos morcegos da Caverna “Meu Rei”, PARNA do Catimbau-PE, Brasil.....	43
Tabela 7 - Ocorrência das espécies de fungos em guano fresco e velho de morcegos de hábitos alimentares diferentes da Caverna “Meu Rei”, PARNA do Catimbau-PE, Brasil.....	45
Tabela 8 - Relação de Abundância, Riqueza e Diversidade de fungos isolados de amostras de guano fresco e velho de morcegos de hábitos alimentares diferentes da Caverna “Meu Rei”, PARNA do Catimbau-PE, Brasil.....	46

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	16
2.1	Bat caves	16
2.1.1	<i>Fungos em bat caves.....</i>	<i>16</i>
2.2	Bioma caatinga.....	22
2.3	Parque Nacional do Vale do Catimbau.....	23
2.4	Fungos isolados em cavernas da caatinga.....	24
2.5	Bat Cave “Meu Rei” – Área de estudo.....	24
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
3.1	Área de estudo.....	27
3.2	Coleta e isolamento de fungos do ar.....	27
3.3	Coleta e isolamento de fungos dos morcegos.....	29
3.4	Coleta e isolamento de fungos do guano.....	31
3.5	Caracterização morfológica dos fungos.....	32
3.6	Extração do rDNA.....	32
3.6.1	<i>PCR e sequenciamento.....</i>	<i>32</i>
3.6.2	<i>Alinhamento das sequências e análise filogenética.....</i>	<i>33</i>
3.7	Análises ecológicas e estatísticas.....	33
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
4.1	Riqueza dos fungos.....	35
4.2	Identificação dos fungos do ar	37
4.3	Identificação dos fungos dos morcegos.....	42
4.4	Identificação dos fungos do guano.....	45
4.5	Análises filogenéticas	47
5	CONCLUSÕES	52
	REFERÊNCIAS.....	53
	APÊNDICE A - FUNGAL PLANET DESCRIPTION SHEETS:785.....	63
	APÊNDICE B - LIVING IN THE DARK: BAT CAVES AS HOTSPOTS OF FUNGAL DIVERSITY.....	66

1 INTRODUÇÃO

Bat caves são cavernas que abrigam grandes concentrações de colônias permanentes de morcegos e consequentemente, grande abundância de guano (HOLSINGER & CULVER, 1988). O guano destes animais possui alto nível de nitrogênio que favorece o desenvolvimento de uma rica microbiota cavernícola. Também são caracterizadas por possuírem temperatura e umidade estáveis e ausência de luminosidade, o que favorece o desenvolvimento de micro-organismos. Além disso, a ocorrência de morcegos nas cavernas pode afetar a diversidade fúngica deste ambiente, que além da deposição do guano, esses animais são vetores de esporos de dentro e fora do ambiente da caverna (VANDERWOLF et al., 2013a). A microbiota deste tipo de ambiente é distinta, possuindo hábitos alimentares adaptados para sua permanência, desempenhando importantes papéis no ecossistema cavernícola (BARTON, 2006; LADLE et al., 2012; TAYLOR, 2013).

Cavernas abrigam uma grande diversidade de fungos que podem ser possíveis oportunistas e patogênicos (TAYLOR, 2013), apesar disso, de acordo com as informações disponíveis, poucas bat caves tiveram sua microbiota investigada no Brasil. Dentre os estudos conhecidos, é dada maior atenção ao *Histoplasma capsulatum*, espécie fúngica patogênica encontrada em morcegos associados a cavernas, causadora da histoplasmose, uma infecção sistêmica grave dentre os fungos conhecidos com o maior potencial patogênico ambientes cavernícolas. (GOMPERTZ et al., 2004; GUIMARÃES et al., 2006).

Os fungos que utilizam o ar como principal meio de dispersão são denominados de fungos anemófilos e, por serem cosmopolitas, habitam diversos tipos de ambientes, incluindo cavernas, o que garante maior sucesso na disseminação em diferentes substratos, desde que estes contenham nutrientes necessários para manutenção de seu metabolismo. (CURTIS et al., 2004; LOBATO et al., 2009). Estes micro-organismos podem produzir grande número de esporos que, quando inalados, podem ser responsáveis por manifestações respiratórias alérgicas. Também é comum a produção de micotoxinas e compostos orgânicos voláteis que podem causar problemas graves em quem circula em ambientes internos, como cavernas. Além disso, algumas espécies de fungos produzem álcoois e cetonas como parte de seu metabolismo que de acordo com a literatura, são responsáveis por causar irritações nasais (MEZZARI et al., 2003. SIGH, 2005).

Algumas espécies dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Alternaria* são relatadas como fungos anemófilos, sendo considerados contaminantes biológicos e causadores de infecções, alergias, asma e rinite (LOBATO et al., 2009). Estas espécies também são relatadas como causadoras de infecções fúngicas oportunistas e vem sendo relatadas com frequência em várias manifestações clínicas, desde micoses cutâneas até infecções sistêmicas generalizadas. A ocorrência dessas infecções é bastante conhecida na literatura médica e os esporos inalados do ar têm sido observados como responsáveis por esses problemas alérgicos (FURTADO & FERRARONI, 1998).

O conhecimento da frequência e ocorrência das espécies de fungos são importantes para controle da exposição do homem na prevenção a estas manifestações alérgicas e demais infecções provocadas por fungos potencialmente patogênicos nestes ambientes (CHAMPMAN & MEZZARI, 2000). Desta forma, entende-se que a Bat cave “Meu Rei” é uma caverna potencialmente perigosa para visitação.

Assim, baseando-se em revisão bibliográfica, devido aos poucos estudos relacionados à micobiota em cavernas, sobretudo no Nordeste brasileiro, o presente estudo teve como objetivo determinar a diversidade de fungos isolados do ar, dos morcegos e do guano da caverna “Meu Rei”, localizada no Parque Nacional do Vale do Catimbau, cidade de Tupanatinga, Pernambuco - Brasil.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Bat caves

Bat caves são cavernas que abrigam concentrações de milhares de colônias permanentes de morcegos e consequentemente, grande abundância de guano em seu interior (HOLSINGER; CULVER, 1988). Apresentam características estáveis de umidade, temperatura e ausência de luz, de forma que seu ecossistema subterrâneo apresente uma biota distinta (CULVER, 1982; TAYLOR, 2013). Os organismos que fazem parte da biodiversidade cavernícola desempenham importante papel ecológico, podendo servir como fontes de alimento para as comunidades de invertebrados (PORTER et al., 2009; ESTRADA- BÁRCENAS et al., 2010; TAYLOR, 2013), ser envolvidos na ciclagem de nutrientes (ENGEL et al., 2004; PORTER et al., 2009) e o controle de populações de alguns invertebrados (YODER et al., 2009; TAYLOR, 2013).

2.1.1 Fungos em Bat caves

Cavernas abrigam grande diversidade fúngica que podem incluir espécies patogênicas e oportunistas. Estes micro-organismos produzem esporos que podem ser inalados e causarem manifestações respiratórias alérgicas e micoses sistêmicas a depender do sistema imunológico de quem circula nestes ambientes (LACAZ, 2002; VANDERWOLF et al., 2013a). Além disso, algumas espécies de fungos produzem micotoxinas e compostos orgânicos voláteis, álcoois e cetonas como parte de seu metabolismo que de acordo com a literatura, são responsáveis por causar irritações nasais em quem circula em ambientes internos, como cavernas. (MEZZARI et al., 2003. SIGH, 2005).

Os fungos, cujo o ar é o seu principal meio de dispersão, são denominados de fungos anemófilos. Os fungos anemófilos presentes em cavernas podem ser isolados facilmente pelo método “*gravity settling method*”, comumente utilizado para a determinação da micobiota cavernícola. Este método é popularmente conhecido como método de exposição de placas de Petri ao ar, utilizando meios de cultura específicos para isolamento (VANDERWOLF et al., 2013b).

A ocorrência de morcegos nas cavernas pode afetar a diversidade fúngica deste ambiente, pois esses animais funcionam como vetores de esporos de dentro e fora do ambiente

da caverna (VANDERWOLF et al., 2013a). Além disso, o guano de morcegos em bat caves dá suporte a uma rica biota cavernícola que inclui desde vertebrados a micro-organismos (BARTON, 2006; LADLE et al., 2012).

A entrada alóctona de matéria orgânica e micro-organismos nestes ambientes podem favorecer o desenvolvimento de espécies fúngicas patogênicas, como *Histoplasma capsulatum*, comumente encontrada em cavernas e associada ao guano de morcegos e pássaros. Esta espécie é conhecida dentre os fungos cavernícolas, pelo maior potencial patogênico, sendo causadora da histoplasmose, uma infecção sistêmica grave (BARTON, 2006; LADLE et al., 2012).

Mas apesar disso, de acordo com as informações disponíveis, poucas *bat caves* tiveram sua micobiota previamente investigada no Brasil (GOMPERTZ et al., 2004; GUIMARÃES et al., 2006; TAYLOR, 2013).

A histoplasmose está distribuída no mundo inteiro, mas é considerada endêmica para o Sudeste Asiático, Índia, Austrália, África e partes da América do Sul e América do Norte, especialmente o Vale do Rio Mississippi-Ohio, nos Estados Unidos. A espécie causadora da doença foi isolada de dentro de cavernas a partir de amostras de guano, solo, ar e água destes locais. (KASUGA et al., 2003).

O aparecimento repentino da doença fúngica letal chamada Síndrome do Nariz Branco (SNB) em morcegos em uma caverna da América do Norte em 2006, aumentou o interesse na pesquisa e estudo dos fungos que ocorrem em cavernas. A síndrome é causada pela espécie *Geomyces destructans* descrita por Blehert & Gargas em 2009 e recebeu essa denominação por deixar um “pó” branco, pulverulento, no nariz dos morcegos infectados (Figura 1). A SNB apareceu pela primeira vez numa caverna perto de Albany, Nova York, e se espalhou para estados adjacentes no Canadá (FOLEY et al., 2011). Esta espécie também tem sido relatada em cavernas no nordeste dos Estados Unidos, Canadá e vários países europeus (VANDERWOLF, 2013a). Recentemente a espécie foi renomeada por Minnis & Lindner (2013) para *Pseudogymnoascus destructans*.

Pseudogymnoascus destructans é bem adaptada a condições frias de cavernas e minas e se assemelha a fungos dermatófitos que causam micoses na pele (GARGAS et al., 2009; WIBBELT et al., 2010).

Pseudogymnoascus destructans parece estar adaptada para o ambiente cavernícola. Várias espécies de fungos podem crescer em morcegos mortos em cavernas, mas *P. destructans* quando infecta morcegos, é capaz de invadir tecidos vivos e perturbar o sono dos morcegos que estão hibernando. Isto causa diminuição prematura das reservas de gordura corporal

armazenadas necessárias até o fim da hibernação e sucesso da sobrevivência na chegada da primavera (MARTINKOVA et al., 2010; VOYRON et al.; CHATUDERVI, 2011).

Estudos em cavernas francesas corroboram para maior adaptação e estabelecimento de *Pseudogymnoascus destructans* em cavernas européias, mas os morcegos infectados exibem sintomas diferentes dos observados nos morcegos norte-americanos e nenhuma mortalidade em massa foi registrada na Europa (MARTINKOVA et al.; PUECHMAILLE et al. 2010).

Figura 1 - Morcegos infectados com a Síndrome do Nariz Branco, causada pelo fungo *Pseudogymnoascus destructans*.



Fonte: <http://micologia-micotoxicologia.blogspot.com>

Apesar de outras espécies de fungos terem sido cultivadas a partir de morcegos que vivem em cavernas, além de *P. destructans* (LARCHER et al., 2003; VOYRON et al., 2011; VANDERWOLF et al., 2013), não se sabe se estes fungos são capazes de utilizar morcegos vivos como um substrato para o crescimento. Atualmente pouco se sabe sobre a micobiota associada a cavernas e morcegos. Os poucos estudos que existem focam em fungos de interesse médico com potencial patogênico ao homem ou a outros animais e ao papel dos morcegos na propagação de patógenos, como o *Histoplasma capsulatum* (ULLOA et al., 2006; VANDERWOLF, 2013a).

A associação entre morcegos e fungos patogênicos foi relatada pela primeira vez por Emmons (1958) quando isolou *Histoplasma capsulatum* de solo contaminado por guano de morcego em Maryland. Em estudos posteriores, identificou que aproximadamente 30 espécies de morcegos foram identificadas como espécies hospedeiras de fungos patogênicos. Além da espécie *H. capsulatum*, outras espécies já isoladas em morcegos foram: *Paracoccidioides brasiliensis*, *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus diffluens*, *Cryptococcus albidus*, *Cryptococcus laurentii*, *Candida parapsilosis*, *Torulopsis glabrata* e *Wangiella dermatitidis*.

dos órgãos internos dos morcegos; *Sporothrix schenckii* das fezes e *Trichophyton mentagrophytes* e *Microsporium canis* da pele. A suscetibilidade natural a infecções fúngicas por fungos foi demonstrada em histoplasmose, coccidioidomicose e paracoccidioidomicose (WAI YIN MOK et al., 1982).

Em revisão geral sobre a micobiota de diferentes substratos de cavernas e minas de todo o mundo, Vanderwolf (2013a) observou que o filo Ascomycota domina os ambientes cavernícolas. Os gêneros mais frequentemente relatados a partir de estudos sobre micologia em cavernas, além de *Histoplasma* e *Pseudogymnoascus* são: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Cladosporium*, *Alternaria*, *Paecilomyces*, *Acremonium*, *Chrysosporium*, *Laboulbenia*, *Rhizopus*, *Mortierella*, *Chaetomium*, *Rhachomyces*, *Trichophyton*, *Humicola*, *Isaria*, *Absidia*, *Beauveria*, *Phoma*, *Verticillium*, *Aureobasidium*, *Gliocladium*, *Coprinus*, *Cunninghamella*, *Epicoccum*, *Geotrichum*, *Microsporium*, *Botrytis*, *Candida*, *Mycena*, *Scopulariopsis* e *Stachybotrys*.

Em estudo para elaboração de plano de gestão da caverna Lapa Nova em Minas Gerais, Brasil, Taylor et al. (2013) isolaram dez gêneros de fungos que ocorrem no ar: *Aspergillus* (33,3%), *Penicillium* (29,1%), *Cladosporium* (8,3%), *Fusarium* (8,3%), *Calcarisporium* (4,1%), *Chaetomium* (4,1%), *Curvularia* (4,1%), *Emericella* (4,1%), *Geotrichum* (4,1%), e *Trichoderma* (4,1%). *Aspergillus* e *Penicillium* foram os gêneros mais diversos, com oito e sete das espécies totais isolados a partir do ar, respectivamente.

Cury et al. (2001) relataram um surto de histoplasmose no município de Pedro Leopoldo em Belo Horizonte, Brasil, onde quatro pacientes foram diagnosticados com histoplasmose pulmonar aguda no período de 13/05/1997 a 28/08/1998.

Estudos específicos sobre a micobiota associada com morcegos para isolar *Pseudogymnoascus destructans* foram realizados em cavernas do estado de Nova York que registraram espécies de *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Helicostylum*, *Mortierella*, *Mucor*, *Penicillium* e *Trichophyton* a partir da pele dos morcegos (VANDERWOLF, 2013b). Assim como o trabalho realizado por Simonovicova et al. (2011) em cavernas na Eslováquia que isolaram *Isaria farinosa*, *Cladosporium* e *Alternaria*.

Na tentativa de entender se o declínio no número de espécies de morcegos em cavernas na América do Norte era causado pela Síndrome do Nariz Branco, amostras de pele e pelos dos morcegos foram analisados por Holz et al. (2018), os quais testaram a presença de fungos potencialmente patogênicos: *P. destructans*, dermatófitos e *Histoplasma capsulatum*. Tanto os morcegos quanto o ambiente foram negativos para *P. destructans* e a maioria dos

isolados encontrados possuem importância ambiental ou vegetal. Desta forma, entendeu-se que nenhum deles possuía algum grau significativo de patogenicidade para morcegos. Também não foi detectada a presença da espécie *Histoplasma capsulatum*.

Para investigar se as diferenças na composição do guano influenciam na diversidade e estrutura da comunidade de espécies, Emerson & Roark (2007) analisaram o guano de morcegos com hábitos alimentares diferentes: frugívoros, hematófagos e insetívoros e assim como Nováková (2009), constataram maior diversidade de espécies de fungos em guano de morcego quando comparadas com outros substratos em uma caverna eslovaca. *Pteropus rodricensis* é uma espécie de morcego frugívoro nativa da Ilha de Rodriguez, no Oceano Índico. *Desmodus rotundus* é uma espécie hematófaga, originária da América Central e do Sul e que se alimenta do sangue de equinos, bovinos e suínos, vivendo em cavernas, árvores ocas e prédios abandonados. *Tadarida brasiliensis* é uma espécie insetívora encontrada no sul dos Estados Unidos e América do Sul (NOWAK, 1999). Eles observaram que o guano do morcego hematófago continha menos fósforo do que o guano das outras duas espécies e continha mais carbono que o frugívoro e este último, continha menos nitrogênio. Desta forma, concluiu-se que estas diferenças na composição do guano podem afetar a estrutura e a dinâmica do ecossistema.

Rivera-Neves et al. (2009) em três cavernas no sudoeste de Porto Rico, obtiveram cinquenta espécies de fungos guanofílicos, a maioria era de fungos mitospóricos, dos gêneros *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Gliocadium*, *Hirtusela*, *Neurospora*, *Paecilomyces*, *Scopulariopsis*, *Sepedonium* e *Trichoderma*. Dentre os zygomycetos, *Circinella umbellata* foi o mais representativo, seguido de *Absidia*, *Cunninghamella*, *Mucor* e *Rhizopus*. *Circinella umbellata* é uma espécie coprófila geralmente associada em esterco de vários animais, como répteis e mamíferos. Porém, nem todas espécies encontradas neste estudo são coprófilas ou guanófilas. Sua presença pode ser explicada pela sua ecologia, por serem sapróbios e neste caso, estão associados ao guano.

Ainda neste estudo os autores isolaram 19 espécies de basidiomicetos dos gêneros *Auricularia*, *Citocybe*, *Collybia*, *Ganoderma*, *Geastrum*, *Hexagonia*, *Lepiota*, *Lepista*, *Mycena*, *Phellinus*, *Podoscypha*, *Polyporus*, *Rigidoporus*, *Ramaria*, *Trametes* e *Volvarellia* e também três espécies de ascomicetos *Hypoxylon*, *Xylaria anisopleura* e *X. kegeliana*.

Ogórek et al. (2016) em primeira avaliação de fungos do ar e do guano de morcegos em cavernas na Eslováquia, isolaram *Penicillium roseopurpureum* e *Rhodotorula glutinis* apenas de guano, enquanto *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea*, *Cladosporium herbarum*,

Epicoccum nigrum, *Gliocladium roseum*, *Penicillium lanosocoeruleum*, *Penicillium urticae* e *Phoma fimeti* foram encontrados exclusivamente nas amostras de ar. *Alternaria. alternata*, *Aspergillus. fumigatus* e *Phoma fimeti* estavam presentes apenas no ar da caverna Driny, enquanto *Absidia glauca*, *Aspergillus foetidus*, *Botrytis. cinerea*, *Gliocladium roseum*, *Penicillium lanosocoeruleum* e *Rhizopus stolonifer* foram encontrados no ar da Gruta Harmaneka. *Penicillium granulatum* constituiu o maior grupo de fungos isolados do ar em ambas as cavernas enquanto as culturas cultivadas de guano, *Mucor hiemalis* foi o mais representativo. Espécies de fungos como *Absidia glauca*, *P. roseopurpureum* e *R. glutinis* foram isoladas apenas do guano coletado na caverna de Harmaneka e *Aspergillus fumigatus* apenas da caverna Driny. Leveduras foram isoladas apenas do guano amostrado na caverna de Harmaneka, representadas pela espécie *Rhodotorula glutinis*.

Vanderwolf et al. (2016) em estudos para determinar a micota das paredes de cavernas na Ilha Anticosti, Quebec, isolaram espécies de *Penicillium*, *Pseudogymnoascus pannorum*, *P. roseus*, *Trichoderma*, *Cladosporium*, *Thysanophora*, *Mucor* e *Trichosporon dulcitum*.

Estudos realizados por Nováková et al. (2018) em cadáveres e esqueletos de animais mortos em cavernas européias, evidenciaram a presença de fungos das espécies *Botryosporium longibrachiatum* isoladas em rãs, *Chaetocladium jonesiae* em morcegos e *Penicillium vulpinum* em aranhas.

A prática de visitação pelo homem em cavernas dá-se geralmente para atividades turísticas e fins religiosos, onde são construídas pequenas capelas e até santuários. Estas atividades podem influenciar na diversidade das espécies devido à entrada alóctona de outras espécies para dentro das cavernas pela dispersão e importação dos conídios. Estas práticas podem influenciar a riqueza e diversidade da fauna e da microbiota, causar alterações nas características do clima cavernícola, principalmente temperatura e umidade, o enriquecimento de matéria orgânica e inorgânica, acúmulo de lixo deixados pelos visitantes, entre outras perturbações (BARTON, 2006; BARTON & NORTHUP, 2007).

Alguns estudos investigaram se visitas a cavernas causam algum impacto sobre a diversidade de fungos. Vaughan- Martini et al. (2000) perceberam que uma caverna italiana com alta visitação humana (aproximadamente 400.000 visitantes por ano), apresentaram mais cepas de leveduras do que duas outras cavernas com baixa visitação humana. Kuzmina et al. (2012) registrou maior número de bactérias heterotróficas e fungos em áreas da caverna com o tráfego humano.

Visitantes em cavernas podem estar susceptíveis a infecções, já que pode haver suspensão dos conídios dos fungos que podem ser inalados (CURY et al., 2001). O conhecimento da frequência e ocorrência das espécies de fungos nestes ambientes são importantes para controle de visitas e consequentemente da exposição do homem na prevenção a manifestações alérgicas e demais infecções provocadas por fungos potencialmente oportunistas e patogênicos (CHAMPMAN & MEZZARI, 2000).

Desta forma, entende-se a importância do estudo e conhecimento das espécies fúngicas que ocorrem em ambientes cavernícolas, pois a partir delas pode-se auxiliar na criação de planejamento de visitação segura (GRUMACH, 2001).

2.2 Bioma caatinga

Bioma exclusivamente brasileiro, está localizada no semiárido nordestino ocupando cerca de 11% do território nacional (844.453 Km²) e 70% da região Nordeste e se estende também para o arquipélago de Fernando de Noronha e uma pequena parcela pelo norte do estado de Minas Gerais (RIZZINI, 1963; ANDRADE-LIMA, 1981; CASTELLETTI et al., 2003; MMA, 2017).

Apesar de estudos mais recentes demonstrarem a importância da Caatinga em termos de biodiversidade, o bioma é considerado como o menos estudado comparado aos outros em relação a composição de sua fauna e flora e como o terceiro bioma mais degradado do Brasil (BEZERRA et al., 2014) com 51% de área alterada pela ação humana, devido principalmente ao uso predatório desordenado (ALVAREZ & OLIVEIRA, 2013). Inclusive, a biodiversidade vem sendo ameaçada mesmo em áreas protegidas por lei, o que tem contribuído para sua perda gradativa (SILVA et al., 2013).

Leal et al. (2003), comentam que apesar da diversidade de plantas e animais de ambientes áridos e semiáridos ser menor quando comparadas a das florestas tropicais, confirmam também que regiões secas apresentam fauna e flora específicas e adaptadas a condições extremas típicos destes ambientes, com alta taxa de endemismos e com características e espécies incomuns.

Embora pesquisas brasileiras deem mais destaque a florestas tropicais (SÁNCHEZ-AZOFEIFA et al., 2005), cerca de 5 mil espécies de fungos foram descobertas até o ano de 2014, onde aproximadamente 850 foram registradas só na Caatinga (MAIA, 2014). Desta forma, percebe-se a possibilidade do manejo sustentável dos recursos naturais da Caatinga que

conforme Paupitz (2010), poderia contribuir no auxílio de um plano de desenvolvimento econômico-social da região Nordeste.

Atividades econômicas como agricultura e criação de animais, exploração da biodiversidade pelas indústrias farmacêuticas, de cosméticos e alimentícia tem desmatado de forma acelerada os recursos da Caatinga de forma ilegal e não sustentável. Desta forma o bioma é considerado como um dos biomas brasileiros mais ameaçados, modificado e degradados pelo homem, ficando atrás apenas da Mata Atlântica e do Cerrado. Estudos estimam que cerca de 45,3% da sua área total foi alterada e que 52% de área sofre com problemas de degradação, tornando este o terceiro bioma brasileiro mais modificado do Brasil (CASTELLETTI et al., 2003; HAUFF, 2010; KIILL, 2017; ICMBio, 2018).

Porém, a Caatinga possui apenas 8,4% de seu território protegido em unidades de conservação federais e estaduais, onde apenas 1,4% está inserida em área de proteção integral (HAUFF, 2010). A área total protegida da Caatinga em Pernambuco é de 16.280,81 hectares (ha), de acordo com dados da Agência Estadual de Meio Ambiente (CPRH), mas com a criação do Refúgio de Vida Silvestre Tatu Bola, criado na Copa de 2014, esta área sobe para 92.278,34 ha, causando o aumento de 1,2% de área de preservação do bioma em Pernambuco (OEKO, 2017; CPRH, 2017).

2.3 Parque Nacional do Vale do Catimbau

Com o objetivo de preservação de ecossistemas naturais de grande relevância ecológica e beleza cênica, no final do século XIX, criaram-se os primeiros Parques Nacionais, destinados à conservação de seus aspectos naturais e culturais para as futuras gerações (SIQUEIRA, 2006; OEKO, 2017). Criado através do Decreto 913/12 de 2002, O Parque Nacional do Vale do Catimbau (PARNA do Catimbau) possibilita a realização de pesquisas científicas e o desenvolvimento de atividades e práticas de educação ambiental, mas possui o objetivo principal de preservar seus ecossistemas naturais (MMA, 2002; IBAMA, 2002) sendo considerada uma das áreas mais importantes de conservação da Caatinga.

O PARNA do Catimbau recebeu este nome devido a Serra do Catimbau, localizada no distrito do Catimbau em Buíque (VASCONCELOS, 2016). O relevo é formado por vales, serras e vertentes, com altitude que varia dos 370 aos 1000 metros acima do nível do mar (SNE, 2002). Apresenta clima predominantemente quente e seco, temperatura média anual de 26°C e precipitação anual cerca de 600mm, onde 60 a 75% das chuvas ocorrem entre março a junho,

sendo o mês de maio considerado o mais chuvoso, enquanto que novembro, o mais seco (FERREIRA, 2015).

Na região existem formações vegetais heterogêneas que incluem caatinga arbustivo-arbórea, caatinga arbustiva com elementos de cerrado predominantes; caatinga arbustiva com elementos de campos rupestres, vegetação florestal perenifólia e caatinga arbustiva perenifólia (RODAL et al., 1998).

2.4 Fungos isolados em cavernas da caatinga

Pouco se sabe sobre a micobiota de cavernas brasileiras, sobretudo na Caatinga nordestina. Taylor et al. (2009) realizaram um inventário de fungos anemófilos, baseados em características morfológicas dos isolados, da distribuição mínima de espécies de fungos filamentosos presentes em grutas inseridas no bioma Caatinga. As coletas foram realizadas em dezoito grutas carbonáticas, inclusive a Caverna “Meu Rei”, localizadas no bioma Caatinga e distribuídas em cinco estado do Nordeste: Alagoas, Bahia, Ceará, Pernambuco e Rio Grande do Norte, mais o estado de Minas Gerais. Os gêneros *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Eupenicillium*, *Eurotium*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Paecilomyces* e *Emericella* foram isolados, sendo o mais representativo *Aspergillus*, seguido por *Penicillium*.

Áreas com alto potencial de biodiversidade cavernícola em Pernambuco estão inseridas no Parque Nacional do Vale do Catimbau, localizadas entre os municípios de Buíque, Tupanatinga e Ibimirim. Algumas cavernas são conhecidas e vem sendo exploradas cientificamente no PARNA, incluindo a caverna “Meu Rei”, área central de estudo da pesquisa. Pesquisas conduzidas pelo Laboratório de Ciência Aplicada à Conservação da Biodiversidade da Universidade Federal de Pernambuco indicam que a Caverna “Meu Rei” é uma *Bat cave*: caverna que abriga permanentemente uma congregação com milhares de morcegos (Com. Pess. E. Bernard).

2.5 *Bat cave* “Meu Rei” – Área de estudo

A caverna “Meu Rei” (08°29'14.1"S; 37°16'48.8"W) (Figura 2) possui formação arenítica, com medidas de 162 m de comprimento, 5.358 m² de área e 4.100 m³ de volume (Figura 3). Está localizada no município de Tupanatinga, Parque Nacional do Vale do Catimbau (PARNA do Catimbau), no semi-árido pernambucano.

Existem poucos relatos escritos que indicam a ocorrência de *Bat caves* no Brasil. O conhecimento da existência destas cavernas para a conservação destes abrigos é de grande importância, já que estes ambientes podem abrigar espécies endêmicas e raras e podem ser objetos do ponto de vista científico e assim, protegidas (TRAJANO & MOREIRA, 1991; GNASPINI-NETO, 1992).

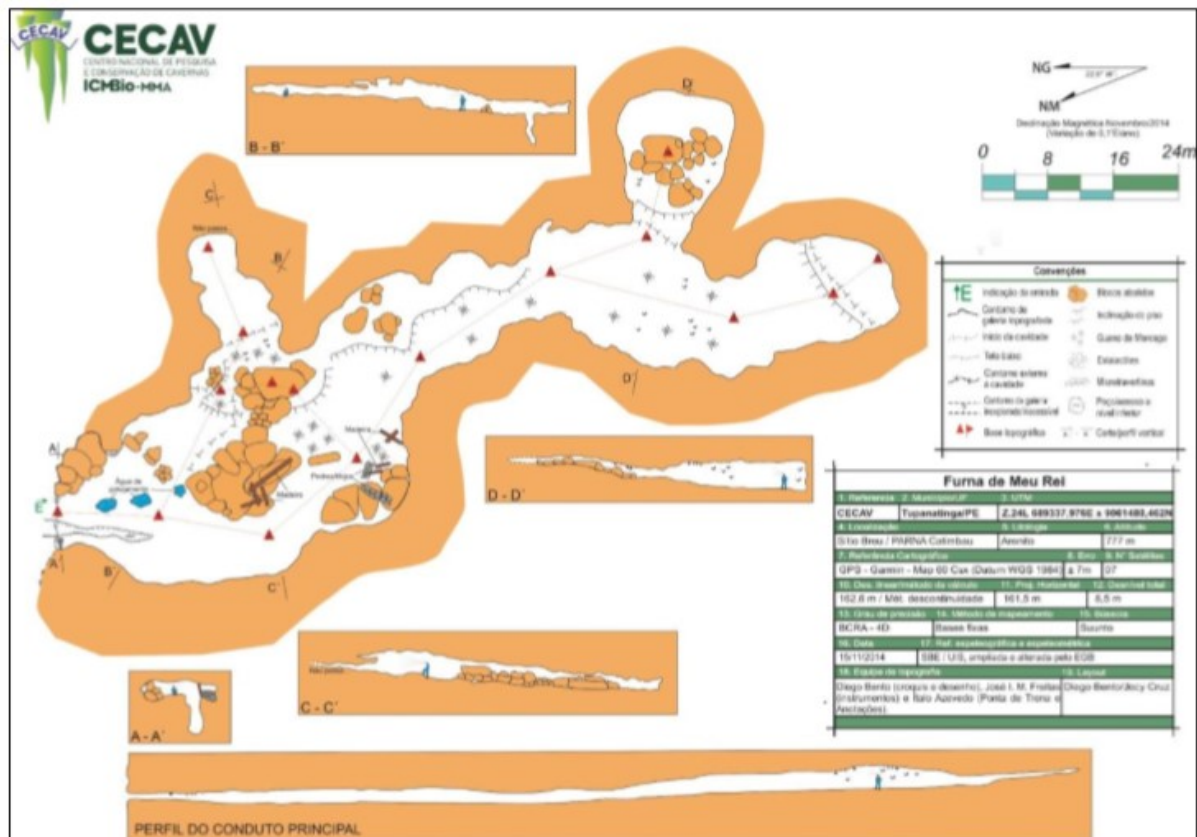
Conforme comunicação pessoal (E. Bernard), estima-se que mais de 5.000 morcegos, de pelo menos nove espécies, usam esta caverna como abrigo. Estudos conferem a Caverna “Meu Rei” como de Máxima Relevância de proteção, já que possui características de dimensões e extensão notáveis, área e/ou volume e espeleotemas únicos e que seu estado de conservação é considerado “Relativamente Estável” (AZEVEDO, 2010).

Figura 2- Entrada da caverna “Meu Rei”, no Parque Nacional do Vale do Catimbau, Tupanatinga, Pernambuco, Brasil.



Fonte: A autora (2019).

Figura 3- Mapa e dimensões da caverna “Meu Rei”, no Parque Nacional do Catimbau, Pernambuco, Brasil.



Fonte: Adaptado do Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Cavernas (CECAV) (2014).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Área de estudo

O Parque Nacional do Catimbau (IUCN Categoria II) está localizado no estado de Pernambuco, Nordeste do Brasil ($8^{\circ}24'00''$ @ e $8^{\circ}36'03''$ @ S; $37^{\circ}00'30''$ @ e $37^{\circ}10'40''$ @ W) e faz parte do domínio da Caatinga - a maior e mais rica região de floresta tropical seca da América do Sul. Ocupando 62.292 ha, o Parque está dentro dos limites administrativos de três municípios (Buiúque, Ibimirim e Tupanatinga) e a vegetação encontrada é um mosaico de floresta seca e arbustos, incluindo espécies xéricas e não xéricas. O clima da região é classificado como semiárido quente (Bsh, de acordo com a classificação Köppen-Geiger), com uma temperatura média de 23 °C e precipitação média anual variando de 486-975 mm, com chuvas concentradas entre abril e junho (SPECHT et al., 2019). No entanto, como em outras regiões da Caatinga, as chuvas anteriores foram irregulares e podem ocorrer longos períodos de seca.

Meu Rei é uma caverna de arenito localizada no Parque Nacional do Catimbau (município de Tupanatinga), com cerca de 162 m de comprimento, com uma única entrada, e dividida em quatro câmaras principais (CECAV, 2014; AZEVEDO, 2015). Esta caverna é considerada uma caverna de morcegos devido à grande colônia que a utiliza como abrigo. A colônia às vezes atinge ~ 120.000 indivíduos, consistindo principalmente de morcegos insetívoros *Pteronotus gymnonotus* (família Mormoopidae). As medições nas porções centrais e mais profundas da caverna registraram um ambiente médio temperatura de 25 °C e 28 °C e umidade relativa de 80% e 87%, respectivamente (DELGADO-JARAMILLO et al., 2018). O campo-trabalho foi autorizado por licenças do MMA / ICMBio (SISBIO números 43816–1 e 43816– 2) e Comitê de Ética em Pesquisa Animal - UFPE (número 23076.027916 / 2015-13) e foi realizado em setembro de 2017. Os métodos de captura e manejo de morcegos seguiram as diretrizes da American Society of Mammalogists (SIKES, 2016).

3.2 Coleta e isolamento dos fungos do ar

A caverna está naturalmente subdividida em quatro câmaras nomeadas em 1, 2, 3 e 4 (Figura 4) que diferem em umidade e temperatura. As coletas foram realizadas em setembro de 2017, no período noturno, após a saída dos morcegos da caverna. Para isolamento dos fungos

foi utilizado o método de sedimentação em placas - “*gravity settling method*” - e em cada uma das quatro câmaras foram determinados seis pontos para exposição das placas de Petri de 90mm de diâmetro, contendo 20mL dos meios de cultura Ágar Dicloran Rosa Bengala Cloranfenicol (DRBC – três placas) e Ágar BHI (Brain Heart Infusion– três placas) (LACAZ et al., 2002). Desta forma, o total de placas expostas para cada câmara, foram 6 placas, totalizando no final da coleta 24 placas.

As placas foram abertas a 1 m do chão por 20 minutos em cada uma das câmaras, após a saída dos morcegos. Para as coletas foram confeccionadas hastes de sustentação de 1m de comprimento, feitas de PVC, onde foram colocadas as placas de Petri (Figura 5). Após a exposição, as placas foram fechadas, identificadas e levadas para o Laboratório de Micologia Ambiental, do Departamento de Micologia, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). As placas foram incubadas a 28°C por um período de sete dias, no escuro, para posterior contagem e isolamento das UFC. Em seguida, as colônias foram repicadas para os tubos de ensaio contendo Sabouraud Dextrose Ágar (SBA) com Cloranfenicol a 0,01g /L para purificação (LACAZ et al., 2002) e isolamento das culturas.

Figura 4- Croquis da Caverna “Meu Rei”. Na figura, destacam-se as câmaras da caverna onde os fungos foram coletados.



Fonte: Adaptado do Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Cavernas (CECAV) (2014).

Figura 5: Hastes de sustentação feitas de PVC confeccionadas para a coleta dos fungos do ar na caverna “Meu Rei”.



Fonte: A autora (2019).

3.3 Coleta e isolamento dos fungos dos morcegos

Os morcegos foram capturados com utilização de puçás (Figura 6) dentro da caverna, no período da tarde, enquanto hibernavam. Os puçás garantiram mais rapidez e praticidade na coleta dos indivíduos que pertenciam a duas espécies: *Carollia perspicillata* e *Diphylla ecaudata*.

Para coleta dos fungos dos morcegos, foram realizados esfregaços a partir da cavidade oral, pelos e asas (Figura 7) utilizando cotonetes estéreis (Swabs) imersos em uma solução de 5mL de água destilada esterilizada, suplementados de 0,01g de antibiótico Cloranfenicol, contidas em tubos Falcon de 15mL (VANDERWOLF, 2013b – adaptado). Após amostragem, os Swabs foram identificados e acondicionados em caixas térmicas e em seguida, conduzidos para o laboratório. Após este processo, foi realizado o plaqueamento direto de 2 mL da solução contida nos tubos Falcon, na superfície dos meios de cultura Ágar Sabouraud e Ágar BHI contidos em placas de Petri, em 3 repetições, incubadas por 7 dias, no escuro, em temperaturas de 28°C para o Ágar Sabouraud e 37°C para o Ágar BHI, para posterior contagem e isolamento das UFC (VANDERWOLF, 2013b). Em seguida, as colônias foram repicadas para purificação

das culturas em tubos de ensaio contendo Batata Dextrose Ágar (BDA) suplementado com 0,01g /L antibiótico Cloranfenicol, a fim de inibir o desenvolvimento de bactérias.

Figura 6- Exemplo de Puçá utilizado para captura dos morcegos na caverna “Meu Rei”.



Fonte: lognature.com.br

Figura 7- Coleta dos fungos a partir de esfregaços na cavidade oral e asas dos morcegos na caverna “Meu Rei”.



Fonte: A autora (2019).

3.4 Coleta e isolamento dos fungos do guano

Para detecção dos fungos do guano, foram coletadas amostras de guano fresco e velho de morcegos de hábitos alimentares insetívoro, hematófago e frugívoro (Figura 8). Em laboratório, 1 g de cada amostra foi colocada em frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo 9 mL de água destilada esterilizada, com adição de 0,1 mg de Cloranfenicol. As suspensões foram agitadas em Vortex durante 5 minutos e posteriormente, 1 mL da solução foi espalhada por meio de diluição seriada (10^{-4}) em placas de Petri contendo meios de cultura Ágar DRBC e Ágar Saboraud, ambos também preparados com adição de Cloranfenicol para inibição de crescimento de bactérias (OGÓREK, 2016).

A placas foram incubadas a 25° C por sete dias, no escuro para posterior contagem e isolamento das UFC. Em seguida, as colônias foram repicadas para tubos de ensaio contendo Batata Dextrose Ágar (BDA), suplementado com 0,01g /L antibiótico Cloranfenicol para purificação (OGÓREK, 2016 – Adaptado).

Figura 8- Guano de morcegos frugívoros que se abrigam na caverna “Meu Rei”.



Fonte: A autora (2019).

3.5 Caracterização morfológica dos fungos

Para análise das características morfológicas das culturas isoladas, cultivos em meios de cultura específicos foram realizados para observação das características macroscópicas, onde foram observadas o aspecto, superfície, presença ou ausência de exsudato, pigmentação do meio, coloração e diâmetro das colônias e através da técnica de microcultivo em lâminas confeccionadas com ácido láctico para análises das características microscópicas (estruturas somáticas e reprodutivas). A análise das características morfológicas foi observada baseada em literatura especializada, como Roper e Thom (1949), Pitt (1991), Domch e Gams (1993), Samson & Frisvald (2004), Bensch, Braun e Crous (2012), Damm, Cannon e Crous (2012).

3.6 Extração do rDNA

A biomassa dos isolados foi obtida a partir do cultivo das culturas em BDA contido em placa de Petri, mantidos a 25°C por até quatro dias, para obtenção do micélio jovem no Laboratório de Biologia Molecular da Micoteca URM do Departamento de Micologia, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco. Este micélio foi transferido para microtubos de 2 mL com tampa de rosca, acrescidos de quatro esferas de vidro com 3mm de diâmetro e 600 microlitros da solução *Nuclei Lysis Solution* do Kit de extração de DNA genômico da Promega (Wizard Genomic DNA Purification Kit) para melhor maceração das células fúngicas, utilizando o equipamento L-Beader 6 (Loccus) e os passos seguintes foram realizados de acordo com o protocolo do fabricante do Kit.

3.6.1 PCR e sequenciamento

Para identificação dos fungos, as reações de PCR foram realizadas de acordo com as condições e *primers* determinados em estudos prévios e dependendo do grupo de fungos a ser estudado. Para amplificar parte das regiões ITS do rDNA, foram utilizados os *primers* ITS5 / ITS4 (White *et al*, 1990). Para as leveduras, a região LSU foi amplificada pela utilização dos os *primers* LR0 e LR5 e seguiu-se as condições de PCR de acordo com Bezerra *et al*. (2017).

Para os fungos identificados como pertencentes aos gêneros *Penicillium* e *Talaromyces*, além da região ITS, foram amplificados os genes β -tubulina, a partir dos *primers* 2A e 2B.

Os produtos obtidos da amplificação foram purificados com utilização da enzima Exosapillustra™ ExoProStar™ 1-Step (GE Healthcare Life Sciences) e sequenciados na plataforma de sequenciamento do LABCEN/CB na Universidade Federal de Pernambuco (Recife, Brasil).

3.6.2 Alinhamento das sequências e análises filogenéticas

As sequências de nucleotídeos das amostras foram editadas no programa Bio Edit e as sequências consenso comparadas no banco de dados do GenBank – NCBI utilizando o programa Mega BLAST. As sequências obtidas foram adicionadas ao conjunto de sequências de espécies similares obtidas no Genbank e alinhadas no programa MUSCLE® (EDGAR, 2004) no programa MEGA v. 6 (TAMURA et al., 2013). As novas sequências foram depositadas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

A análise de Inferência Bayesiana (BI) foi realizada pelo o método da cadeia de Markov Monte Carlo (MCMC). Os modelos de substituição de nucleotídeos serão selecionados através do Mr. MODELTEST 2.3 (POSADA E BUCKLEY, 2004), estimados separadamente para cada região gênica de acordo com Akaike Information Criterion (AIC). A análise de BI foi concluída com Mr. Bayes v.3.1.1 (RONQUIST E HUELSENBECK, 2003) a 10.000.000 de gerações com uma árvore amostrada a cada 1.000 gerações, resultando em 10.000 árvores. As primeiras 2.500 árvores com menores valores de probabilidade foram descartadas da análise e os valores de probabilidade posterior (RANNALA E YANG, 1996) serão determinados da árvore consenso através das 7.500 árvores remanescentes. A árvore filogenética resultante foi visualizada no software FigTree (RAMBAUT, 2009).

3.7 Análises ecológicas e estatísticas

Os isolados identificados foram organizados em tabelas de acordo com cada tipo de substrato. Foram calculados os índices de abundância, riqueza (S) e de diversidade Shannon-Wiener (H') para cada comunidade. A abundância absoluta foi definida como número total de

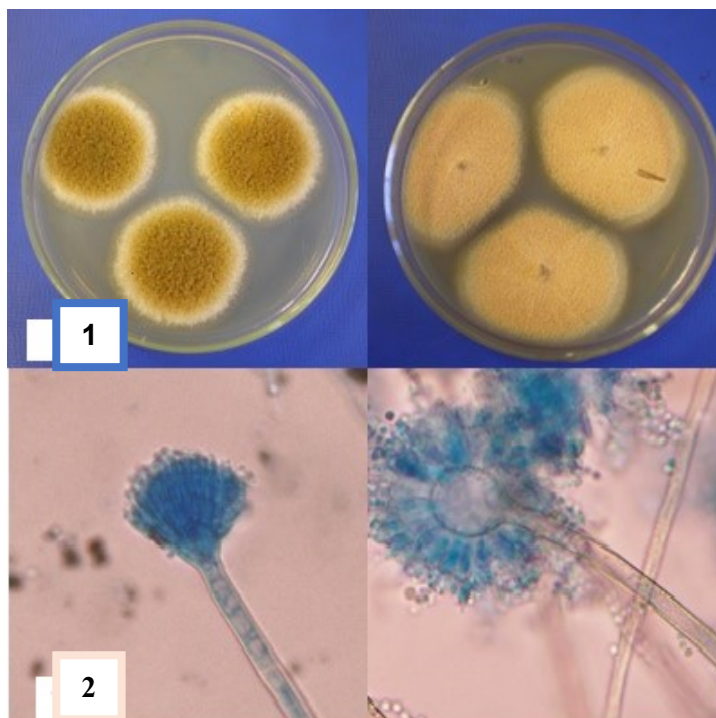
UFC por amostra, enquanto que riqueza foi definida como o número de espécies. Já o índice de diversidade Shannon-Wiener para estimativa de amostras aleatórias das espécies por substrato.

4.RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Riqueza dos fungos

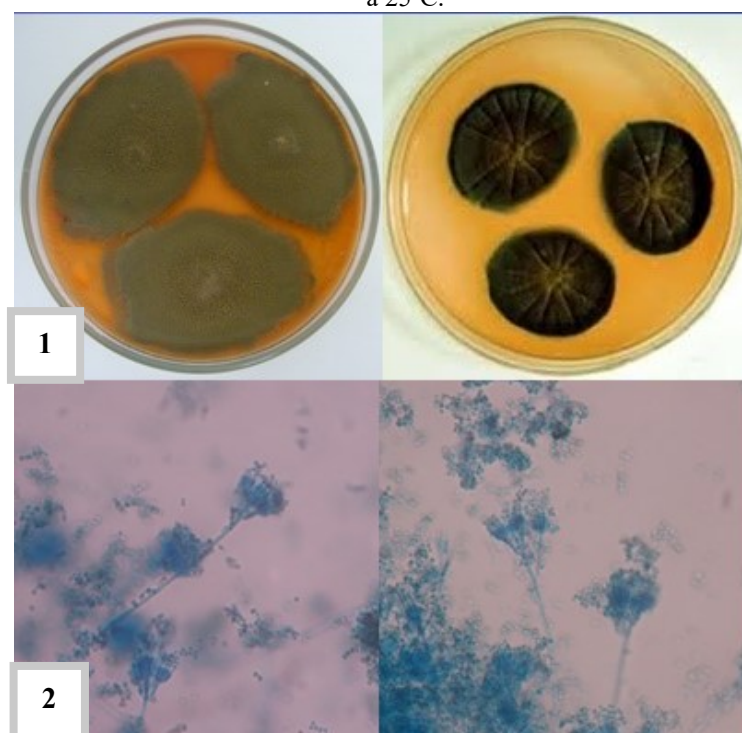
Este estudo de isolamento e identificação dos fungos que ocorrem na caverna “Meu Rei” pode ser considerado como pioneiro, sobretudo no Nordeste brasileiro. De todos os substratos analisados, foram obtidos 170 isolados e identificados 158, pertencentes a 35 gêneros e 27 espécies sendo a maior frequência de ocorrência entre todos os substratos do estudo o gênero *Aspergillus* (25 isolados) (Figura 9), o que pode ser explicado por sua natural capacidade de sobrevivência em ambientes adversos e diferentes tipos de substratos, seguido de *Talaromyces* (23), *Candida* (16), *Penicillium* (Figura 10), *Cladosporium* (14) e *Purpureocillium* (9).

Figura 9- Morfologia macroscópica (1) e microscópica (2) de um dos isolados do gênero *Aspergillus* da caverna “Meu Rei”, PARNA do Catimbau, Pernambuco, Brasil, cultivado em MEA por sete dias a 25°C.



Fonte: A autora (2019).

Figura 10- Morfologia macroscópica (1) e microscópica (2) do gênero *Penicillium* isolado da caverna “Meu Rei”, PARNA do Catimbau, Pernambuco, Brasil, cultivado em MEA por sete dias a 25°C.



Fonte: A autora (2019).

Aspergillus sydowii, *Penicillium citrinum* e *Talaromyces allahabadensis* foram as espécies isoladas a partir de todos os substratos da caverna. No entanto, os substratos apresentaram micobiotas distintas, variando de sete a 18 espécies. *Histoplasma capsulatum* e *Pseudogymnoascus destructans* não foram isolados a partir das amostras de ar, cavidade oral, pelos e asa dos morcegos e do guano da caverna “Meu Rei”.

A tabela 1 apresenta os dados de frequência absoluta e relativa das comunidades observadas no estudo. Segundo Nováková (2009), fungos são considerados uma parte importante da microbiota cavernícola, podendo ser isolados de vários substratos em cavernas, tais como sedimentos, guano, material orgânico em decomposição, entre outros. Sendo assim, dependendo do local de isolamento, a composição das espécies de fungos é diferente.

Tabela 1- Frequência absoluta (F) e relativa (Fr) dos fungos identificados por substrato da caverna “Meu Rei”, PARNA do Catimbau, Pernambuco, Brasil.

(Continua)

	AR		MORCEGOS		GUANO	
	<i>F</i>	<i>Fr</i>	<i>F</i>	<i>Fr</i>	<i>F</i>	<i>Fr</i>
<i>Schizophyllum commune</i>	3	1,89 %	0	0	0	0
<i>Cladosporium sp.</i>	2	1,26 %	11	7,59 %	0	0

Tabela 1- Frequência absoluta (F) e relativa (Fr) dos fungos identificados por substrato da caverna “Meu Rei”, PARNA do Catimbau, Pernambuco, Brasil.
(Conclusão)

	AR		MORCEGOS		GUANO	
	<i>F</i>	<i>Fr</i>	<i>F</i>	<i>Fr</i>	<i>F</i>	<i>Fr</i>
<i>Trametes vilosa</i>	1	0,63 %	0	0	0	0
<i>Aspergillus spp.</i>	12	7,59 %	7	5,06 %	7	4,43 %
<i>Humicola sp.</i>	2	1,26 %	0	0	1	0,63%
<i>Diaporthe sp.</i>	2	1,26 %	0	0	0	0
<i>Penicillium spp.</i>	2	1,26 %	3	2,53 %	8	5,06 %
<i>Myceliophthora sp.</i>	1	0,63 %	0	0	0	0
<i>Talaromyces spp.</i>	1	0,63 %	14	8,86 %	7	4,43 %
<i>Sarocladium sp.</i>	1	0,63 %	0	0	0	0
<i>Aplosporella sp.</i>	1	0,63 %	0	0	0	0
<i>Beauveria bassiana</i>	1	0,63 %	0	0	0	0
<i>Irpex lacteus</i>	1	0,63 %	0	0	0	0
<i>Phaeosphaeriopsis sp.</i>	1	0,63 %	0	0	0	0
<i>Kwoniella dendrophila</i>	0	0	1	0,63 %	0	0
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	0	0	6	3,79 %	0	0
<i>Candida spp.</i>	0	0	15	10,12 %	0	0
<i>Meyerozyma sp.</i>	0	0	2	1,26 %	0	0
<i>Sakaguchia sp.</i>	0	0	1	0,63 %	0	0
<i>Purpureocillium spp.</i>	0	0	9	5,69 %	0	0
<i>Paraphaeosphaeria sp.</i>	0	0	1	0,63 %	0	0
<i>Paraconiothyrium sp.</i>	0	0	1	0,63 %	0	0
<i>Geosmithia carolliae</i>	0	0	1	0,63%	0	0
<i>Nodulisporium sp.</i>	0	0	1	0,63 %	0	0
<i>Fusarium sp.</i>	0	0	5	3,16 %	0	0
<i>Ochroconis spp.</i>	0	0	3	1,89 %	0	0
<i>Polyschema sp.</i>	0	0	1	0,63 %	0	0
<i>Rhizopus</i>	0	0	2	1,26 %	0	0
<i>Chondrostereum sp.</i>	0	0	1	0,63 %	0	0
<i>Paecilomyces formosus</i>	0	0	6	3,16 %	1	0,63 %
<i>Gymnoascus dankaliensis</i>	0	0	1	0,63 %	0	0
<i>Deniquelata sp.</i>	0	0	1	0,63 %	0	0
<i>Rhinocladiella similis</i>	0	0	1	0,63 %	0	0
<i>Rigidoporus sp.</i>	0	0	0	0	1	0,63 %
<i>Phoma sp.</i>	2	1,26 %	2	1,26 %	0	0
Total	33		100		25	

4.2 Identificação dos fungos do ar

As quatro câmaras da caverna “Meu Rei” apresentaram uma composição distinta das micobiotas (Tabela 2), pois os gêneros presentes diferem de uma câmara para outra e a

ocorrência varia de duas a nove espécies (Tabela 3) o que pode estar associado à circulação de ar e distribuição heterogênea das espécies de morcegos dentro da caverna. Dos gêneros de fungos anemófilos isolados, a maioria é considerada de importância médica, já que podem causar riscos à saúde humana, pois podem ser responsáveis por infecções respiratórias e causadores de micoses (ARMSTRONG, 1993). De acordo com os dados obtidos, todas as câmaras da caverna “Meu Rei” são consideradas de risco microbiológico, uma vez que apresentaram conídios de fungos considerados patogênicos ou oportunistas de acordo com literatura conhecida.

Tabela 2 - Relação da distribuição dos gêneros de fungos identificados do ar nas câmaras da Caverna “Meu Rei”, PARNA do Catimbau-PE, Brasil.

Câmara 1	Câmara 2	Câmara 3	Câmara 4
<i>Aspergillus bertholletiae</i>	<i>Diaporthe sp.</i>	<i>Cladosporium</i>	<i>A. bertholletiae</i>
<i>Aspergillus ochraceus</i>	<i>Phoma sp.</i>	<i>Beauveria bassiana</i>	<i>Aplasporella sp.</i>
<i>Aspergillus wentii</i>	<i>S. comunne</i>	<i>Penicillium citrinum</i>	
<i>Aspergillus sydowii</i>	<i>Myceliophthora sp.</i>	<i>S. commune</i>	
<i>Cladosporium</i>	<i>Irpex lacteus</i>		
<i>Penicillium</i>	<i>Humicola sp.</i>		
<i>Schizophyllum commune</i>	<i>Talaromyces allahabadensis</i>		
<i>Humicola sp.</i>	<i>Sarocladium sp.</i>		
<i>Trametes vilosa</i>	<i>Phaeosphariopsis sp.</i>		

Tabela 3 - Ocorrência e distribuição dos gêneros de fungos identificados do ar por meio de cultura nas câmaras da Caverna “Meu Rei”, PARNA do Catimbau-PE, Brasil.

GÊNEROS	CÂMARA 1		CÂMARA 2		CÂMARA 3		CÂMARA 4	
	DRBC	BHI	DRBC	BHI	DRBC	BHI	DRBC	BHI
<i>Apergillus bertholletiae</i>	1	2	-	-	-	-	1	-
<i>Apergillus ochraceus</i>	2	2	-	-	-	-	-	-
<i>Apergillus sp nv 1</i>	1	-	-	-	-	-	-	-
<i>Apergillus sp.</i>		1	-	-	-	-	-	-
<i>Apergillus sydowii</i>	-	1	-	-	-	-	-	-
<i>Apergillus wentii</i>	1	-	-	-	-	-	-	-
<i>Aplosporella sp</i>	-	-	-	-	-	-	1	-

(Continua)

<i>Beauveria bassiana</i>	-	-	-	-	1	-	-	-
<i>Cladosporium</i> sp.	-	1	-	-	-	1	-	-

Tabela 3 - Ocorrência e distribuição dos gêneros de fungos identificados do ar por meio de cultura nas câmaras da Caverna “Meu Rei”, PARNA do Catimbau-PE, Brasil.

GÊNEROS	CÂMARA 1		CÂMARA 2		CÂMARA 3		CÂMARA 4	
	DRBC	BHI	DRBC	BHI	DRBC	BHI	DRBC	BHI
<i>Diaporthe</i> sp	-	-	-	2	-	-	-	-
<i>Humicola</i> sp	-	1	-	1	-	-	-	-
<i>Irpex lacteus</i>	-	-	1	-	-	-	-	-
<i>Myceliophthora</i> sp	-	-	-	1	-	-	-	-
<i>Penicillium citrinum</i>	-	-	-	-	1	-	-	-
<i>Penicillium</i> sp	-	1	-	-	-	-	-	-
<i>Phaeosphaeriopsis</i> sp	-	-	1	-	1	-	-	-
<i>Phoma</i> sp	-	-	1	1	-	-	-	-
<i>Sarocladium</i> sp	-	-	1	-	-	-	-	-
<i>Schizophyllum commune</i>	-	1	-	1	1	-	-	-
<i>Talaromyces allahabadensis</i>	-	-	-	1	-	-	-	-
<i>Trametes vilosa</i>	1	-	-	-	-	-	-	-
Ocorrência (N)	6	10	4	7	4	1	2	0

A maior riqueza e diversidade de espécies nas câmaras 1 e 2 (Tabela 4) pode estar relacionada com a sua localização próxima a saída da caverna, temperatura (25°C) e umidade (89%) que diferem das outras câmaras, conforme registro com termo-higrômetro feito no dia da coleta.

Tabela 4 - Relação da Abundância, Riqueza e Diversidade das espécies da Caverna “Meu Rei”, PARNA do Catimbau-PE, Brasil.

	ABUNDÂNCIA (N)	RIQUEZA (S)	DIVERSIDADE (H')
CÂMARA 1	16	11	2.22
CÂMARA 2	11	9	2.15
CÂMARA 3	5	5	1.61
CÂMARA 4	2	2	0.69
Total	34	20	2.86

No entanto, o menor número de espécies observadas na câmara 4 pode estar associado ao fato de que nesta câmara, a espécie predominante de morcegos é *Pteronotus gymnonotus*

(Com. Pess. E. Bernard). Desta forma, sem uma diversidade de espécies de morcegos, pode estar ocorrendo uma seleção natural das espécies fúngicas na área e segundo Voyron et al. (2011), a composição de fungos anemófilos isolados de cavernas é provavelmente determinada por fatores, como o fluxo de ar e pela presença de artrópodes, morcegos e visitantes que podem trazer fungos secundários para a caverna.

A partir dos fungos do ar, com base em pesquisas de similaridade e identidade a partir da ferramenta BLASTn e com bases nas análises filogenéticas, fez-se o isolamento de uma provável espécie nova de *Aspergillus*, cuja sequência de ITS a aproximou da espécie *Aspergillus wentii* (96%).

No presente estudo, o gênero predominante foi *Aspergillus*, isto pode ser explicado pelo fato de que espécies deste gênero são mais resistentes a sobreviverem em ambientes adversos. Conforme nossos resultados, Wang et al. (2011) trabalhando com fungos anemófilos isolados da Gruta de Mogao, Dunhuang, China, isolaram 11 diferentes gêneros. Embora *Cladosporium* tenha sido o gênero que mais prevaleceu, *Aspergillus* também foi o mais isolado, seguido por *Penicillium*, *Fusarium* e *Alternaria*. Esporos pertencentes aos três últimos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e a espécie *Cladosporium cladosporioides* são comumente isolados do ar, e muitos deles capazes de provocar respostas alérgicas em seres humanos (LACAZ, 2009). Em estudo realizado na caverna de Nerja, sul da Espanha, Docampo et al. (2011) identificaram *Aspergillus* e *Penicillium* sendo os mais abundantes, seguido por *Cladosporium*.

Ogórek et al. (2013) fizeram a primeira avaliação da micobiota do ar da caverna Niedźwiedzia, localizada na Polônia. Estes autores isolaram nove espécies de fungos filamentosos (*Acremonium strictum*, *Aspergillus niger*, *Beauveria bassiana*, *Cladosporium herbarum*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium expansum*, *Rhizopus stolonifer*, *Sclerotinia sclerotiorum* e *Ulocladium alternariae*) e uma espécie de levedura (*Candida albicans*). No entanto, *Rhizopus stolonifer* foi a espécie mais frequentemente isolada do ar. Destes, podemos comparar *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicillium* como gêneros comuns, inclusive a espécie *Beauveria bassiana*, isolada do ar da câmara 3 da caverna “Meu Rei”.

Estudos sobre levantamento de fungos em cavernas no mundo desenvolvidos por Vanderwolf et al. (2013a), além de *Histoplasma capsulatum* e *Pseudogymnoascus destructans*, as espécies frequentemente relatadas foram: *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum*, *Cladosporium cladosporioides*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus ustus*, *Aspergillus flavus*, *Fusarium solani*, *Geomyces pannorum*, *Trichoderma viride*, *Beauveria bassiana*, *Cephalotrichum stemoniti*, *Cladosporium herbarum*, *Alternaria alternata*,

Aureobasidium pullulans, *Paecilomyces lilacinus*, *Penicillium brevicompactum*, *Penicillium simplicissimum* e *Rhizopus stolonifer* var. *stolonifer*.

Assim como no presente estudo, na caverna Lapa Nova-MG, em um estudo para elaboração de planos de gestão da caverna, Taylor et al. (2013), isolaram dez gêneros de fungos que ocorrem no ar: no entanto, *Histoplasma capsulatum* não foi isolada, vários isolados de onze espécies foram consideradas possíveis espécies patogênicas: *Aspergillus flavus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus ustus*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Mucor* sp, *Purpureocillium lilacinum*, *Rhizopus* sp. e *Thricoderma viride*. Os gêneros mais diversos foram *Aspergillus* com oito espécies identificadas e *Penicillium*, sete das espécies totais isoladas a partir do ar. Estas espécies já têm sido associadas com várias infecções fúngicas oportunistas em seres humanos (Lacaz et al., 2002).

Histoplasma capsulatum e *Pseudogymnoascus destructans* não foram isolados a partir das amostras de ar das câmaras da caverna “Meu Rei”. Isto pode ser explicado devido à baixa concentração de esporos nos meios em que foram cultivados neste trabalho ou sua verdadeira ausência no ambiente. Segundo Bass e Richards (2011), algumas espécies podem não crescer em meios de cultura ou podem estar presentes em números muito pequenos para serem contabilizados.

De acordo com o inventário realizado por Vanderwolf et al. (2013a), estes autores também observaram que a maioria dos trabalhos sobre a micobiota tem sido conduzido em climas temperados, especialmente na Europa. Os estudos sobre a micobiota cavernícola no Brasil são considerados escassos. Os trabalhos realizados, geralmente, focam no isolamento de *Histoplasma capsulatum* e *Geomyces destructans*, o que dificulta a comparação dos nossos resultados.

A falta de estudos sobre a composição da micobiota em ambientes cavernícolas confirma a necessidade de inventários deste tipo. As *bat caves*, por serem sistemas fechados com condições ambientais específicas, favorecem o crescimento e ocorrência de fungos, inclusive espécies não descritas.

Estudos que questionam se visitas em cavernas influenciam na diversidade de fungos de ambientes subterrâneos, Vaughan-Martini et al. (2000) observaram que uma caverna italiana com alta taxa de visita humana apresentou um maior número de isolados de leveduras quando compara a duas outras cavernas com uma baixa taxa.

Wang et al. (2010), analisando a micobiota de cavernas chinesas, também observaram uma correlação positiva entre a quantidade de esporos de fungos anemófilos com o número de visitantes. No entanto, Fernandez-Cortes et al. (2011) e Adetutu et al. (2011) descobriram que a micobiota foi alterada com o aumento da visitação.

Desta forma, os níveis de conídios devem ser monitorados e as visitas devem ser realizadas em condições controladas, evitando que os visitantes também fiquem expostos à fungos considerados patogênicos.

4.3 Identificação dos fungos dos morcegos

Os morcegos capturados para coleta dos fungos pertencem a duas espécies: *Carollia perspicilata* e *Diphylla ecaudata*. As três superfícies estudadas a partir dos morcegos da caverna “Meu Rei” apresentaram composição e ocorrência de espécies comuns e distintas entre elas (Tabela 5), porém, a asa demonstrou maior diversidade e riqueza de espécies que as demais (Tabela 6), o que pode estar associado à presença de dípteros ectoparasitas nos morcegos.

Tabela 5 - Relação dos táxons e ocorrência de fungos identificados por partes dos morcegos da Caverna “Meu Rei”, PARNA do Catimbau-PE, Brasil.

TÁXONS	CAV. ORAL	PELO	(Continua)
			ASA
<i>Kwoniella dendrophila</i>	1	-	-
<i>Rhodotorulla mucilaginosa</i>	3	-	3
<i>Candida parapsilosis</i>	4	3	3
<i>Candida orthopsilosis</i>	3	1	-
<i>Meyerozyma sp.</i>	-	2	-
<i>Sakaguchia sp.</i>	-	-	1
<i>Purpureocillium sp.</i>	-	1	2
<i>Purpureocillium lilacinum</i>	-	3	3
<i>Paraphaerosphaeria sp.</i>	1	-	-
<i>Paraconiothyrium sp.</i>	-	-	1
<i>Nodulisporium sp.</i>	-	1	-
<i>Fusarium sp.</i>	3	1	1
<i>Ochroconis sp.</i>	1	-	-
<i>Ochroconis musae</i>	-	2	-
<i>Rhizopus sp.</i>	-	1	1

<i>Rhizopus oryzae</i>	-	-	1
<i>Paecilomyces formosus</i>	-	1	5

Tabela 5 - Relação dos táxons e ocorrência de fungos identificados por partes dos morcegos da Caverna “Meu Rei”, PARNA do Catimbau-PE, Brasil.
(Conclusão)

TÁXONS	CAV. ORAL	PELO	ASA
<i>Polyschema sp</i>	-	1	-
<i>Rhinocladiella similis</i>	-	-	1
<i>Arachniotus dankaliensis</i>	-	-	1
<i>Geosmithia carolliae</i>	-	-	1
<i>Chrondrostereum sp.</i>	-	-	1
<i>Deniquelata sp.</i>	-	-	1
<i>Cladosporium sp.</i>	3	1	5
<i>Cladosporium tenuissimum</i>	1	1	1
<i>Penicillium sp.</i>		1	-
<i>Penicillium citrinum</i>	1	-	2
<i>Aspergillus sp.</i>	1	1	-
<i>Aspergillus ochraceus</i>	1	-	-
<i>Aspergillus niger</i>	-	1	2
<i>Aspergillus sydowii</i>	-	1	-
<i>Talaromyces sp.</i>	-	1	-
<i>Talaromyces amestolkiae</i>	-	3	1
<i>Talaromyces allahabadensis</i>	-	4	5
<i>Phoma sp.</i>	-	1	1
Ocorrência (N)	23	32	43

Tabela 6 - Relação de Abundância, Riqueza e Diversidade de fungos identificados por partes dos morcegos da Caverna “Meu Rei”, PARNA do Catimbau-PE, Brasil.

	Abundância (N)	Riqueza (S)	Diversidade (H')
Cavidade Oral	22	11	2.24
Pelos	30	21	2.89
Asa	46	22	3.00
Total	98	34	3.19

Das espécies encontradas, a maioria é considerada patogênica ou com capacidade de causar micoses oportunistas, principalmente a depender do estado imunológico do indivíduo. Destas, as espécies *Rhodotorulla mucilaginosa*, *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, *Ochroconis musae*, *Rhinocladiella similis*, *Arachniotus dankaliensis* (*Gymnoascus dankaliensis*), *Cladosporium tenuissimum*, *Aspergillus ochraceus*, entre outras, merecem maior destaque por causarem risco a saúde humana.

Também foi a partir do isolamento de fungos dos morcegos que pode observar, maior número de possíveis espécies novas com base em pesquisas de similaridade e identidade a partir da ferramenta BLASTn e com base nas análises filogenéticas, como o *Chrondrostereum* sp. (93%), *Deniquelata* sp. (96%)., *Polyschema* sp. (91%) e a descrita no presente estudo, *Geosmithia carolliae*, isolada a partir da asa do morcego da espécie *Carollia perspicilata*.

As espécies *Candida parapsilosis* e *Candida orthopsilosis* foram isoladas a partir da cavidade oral, pelos e asas e estas possuem destaque patogênico para morcegos. Para detectar uma possível relação entre fungos do solo e fungos de morcego, Wai Yin Mok et al. (1982) isolaram fungos de morcegos da bacia amazônica, do fígado, baço e pulmões dos morcegos, encontraram *Candida*, *Trichosporon*, *Torulopsis*, *Kluyveromyces* e *Geotrichum*. Destes, espécies patogênicas conhecidas: *Candida parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *C. albicans*, *C. stellatoidea*, *C. pseudotropicalis*, *Trichosporon beigeli* e *Torulopsis glabrata*.

Assemelhando-se com nossos resultados, já que as espécies *Candida parapsilosis* e *Candida orthopsilosis* foram isoladas a partir da cavidade oral, pelos e asas e que possuem destaque patogênico aos morcegos. Assim como o presente estudo, obtiveram resultados que também apresenta colonização igual em múltiplos órgãos/substratos ou colonização mista.

Histoplasma capsulatum e *Pseudogymnoascus destructans* não foram isolados a partir das amostras da cavidade oral, pelos e asa dos morcegos da caverna “Meu Rei”. Semelhante aos nossos resultados, estudos da micobiota cavernícola a partir da pele de morcegos realizados por Veilleux (2008), Chaturvedi et al. (2010) Courtin et al. (2010) em cavernas do estado de Nova York, registraram os gêneros *Aspergillus*, *Cladosporium* sp., *Fusarium* sp., *Pseudogeomyces* spp., *Helicostylums*, *Mortierella* sp., *Mucor* sp. e *Penicillium*. Simonovicova et al. (2011) em cavernas na Eslováquia isolaram *Cladosporium*, *Isaria* e *Alternaria* nos morcegos. Nestes dois, também não foram isolados as *H. capsulatum* e *P. destructans*.

Para entendimento da ecologia e dos processos ecossistêmicos que podem ser cruciais na transmissão da doença Síndrome do Nariz Branco, Zhang et al. (2014) utilizando 90

amostras de quatro minas e duas cavernas, em Nova York e Vermont, a partir do ar, pele, cadáveres dos morcegos e do solo das cavernas, isolaram fungos representantes de diferentes filos, dentre eles, espécies também isoladas em nosso estudo, como *Penicillium brevicompactum* e *Beauveria bassiana*, além do compartilhamento de ocorrência dos gêneros *Candida*, *Gymnoascus*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Fusarium* e *Phoma*.

4.4 Identificação dos fungos do guano

Quanto aos fungos do guano pode-se verificar que não houve diferença significativa da ocorrência das espécies no guano fresco e velho, entretanto apenas o guano velho dos morcegos de hábito alimentar hematófago teve diversidade e riqueza menor quando comparado ao de morcegos de hábitos alimentares insetívoro e frugívoro (Tabela 7).

Tabela 7 - Ocorrência das espécies de fungos em guano fresco e velho de morcegos de hábitos alimentares diferentes da Caverna “Meu Rei”, PARNA do Catimbau-PE, Brasil.

TÁXONS	Insetívoro		Frugívoro		Hematófago	
	Fresco	Velho	Fresco	Velho	Fresco	Velho
<i>Penicillium brevicompactum</i>	-	-	-	1	-	-
<i>Penicillium citrinum</i>	-	-	-	-	2	-
<i>Penicillium simplicissimum</i>	2	2	-	-	1	-
<i>Talaromyces allahabadensis</i>	-	-	2	2	2	1
<i>Rigidoporus sp</i>	-	1	-	-	-	-
<i>Humicola sp</i>	-	-	-	1	-	-
<i>Aspergillus subgenus Polypaecilum</i>	2	1	-	-	-	-
<i>Aspergillus tubingensis</i>	-	-	1	-	-	2
<i>Aspergillus sydowii</i>	-	-	1	-	-	2
<i>Paecilomyces formosus</i>	1	-	-	-	-	-
Ocorrência (N)	5	5	4	4	4	5

Pode-se confirmar que não houve diferença significativa quanto aos índices de abundância, riqueza e diversidade entre os fungos das amostras do guano fresco e velho e dos diferentes hábitos alimentares (Tabela 8). Desta forma, pode-se concluir que as espécies estão distribuídas de maneira homogênea e consideradas espécies de nicho ecológico diversificado. *Histoplasma capsulatum* não foi isolada partir das amostras de guano da caverna “Meu Rei”.

A partir dos fungos do guano, com base em pesquisas de similaridade e identidade a partir da ferramenta BLASTn, fez-se o isolamento de três isolados do gênero *Aspergillus* a partir do guano de morcegos insetívoros uma provável espécie nova de *Aspergillus*, cuja

sequência de ITS a aproximou de *Polypaecilum* (93%) considerado um subgênero em *Aspergillus*.

Tabela 8 - Relação Abundância, Riqueza e Diversidade de fungos isolados de amostras de guano fresco e velho de morcegos de hábitos alimentares diferentes da Caverna “Meu Rei”, PARNA do Catimbau-PE, Brasil.

HÁBITOS ALIMENTARES		ABUNDÂNCIA	RIQUEZA (S)	DIVERSIDADE (H')
INSETÍVORO	Fresco	4	3	1.05
	Velho	5	3	1.04
FRUGÍVORO	Fresco	4	3	1.04
	Velho	4	3	1.04
HEMATÓFAGO	Fresco	5	3	1.05
	Velho	3	2	0.63
Total		25	17	2.03

Em estudo realizado por Emerson & Roark (2007) que analisaram a composição química do guano de morcegos de mesmos hábitos alimentares que o presente estudo, observaram que o guano do morcego hematófago continha menos fósforo do que o guano das outras duas espécies e continha mais carbono que o frugívoro e este último, continha menos nitrogênio. Desta forma, concluiu-se que estas diferenças na composição do guano podem afetar a estrutura e a dinâmica do ecossistema.

Rivera-Neves et al. (2009), em três cavernas no sudoeste de Porto Rico, observaram os gêneros *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Gliocladium*, *Hirtusela*, *Neurospora*, *Paecilomyces*, *Scopulariopsis*, *Sepedonium* e *Trichoderma*., sendo *Circinella umbellata* a mais representativa, seguida de *Absidia*, *Circinella*, *Cunninghamella*, *Mucor* e *Rhizopus*, assim como nosso estudo, onde foram isolados os gêneros *Penicillium*, *Aspergillus* e *Paecilomyces*.

Ogórek et al. (2016) a partir do guano de morcegos em cavernas na Eslováquia, isolaram *Penicillium roseopurpureum* e *Rhodotorula glutinis* apenas de guano, enquanto que *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea*, *Cladosporium herbarum*, *Epicoccum nigrum*, *Gliocladium roseum*, *Penicillium lanosocoeruleum*, *Penicillium urticae* e *Phoma fimeti* foram encontrados exclusivamente nas amostras de ar.

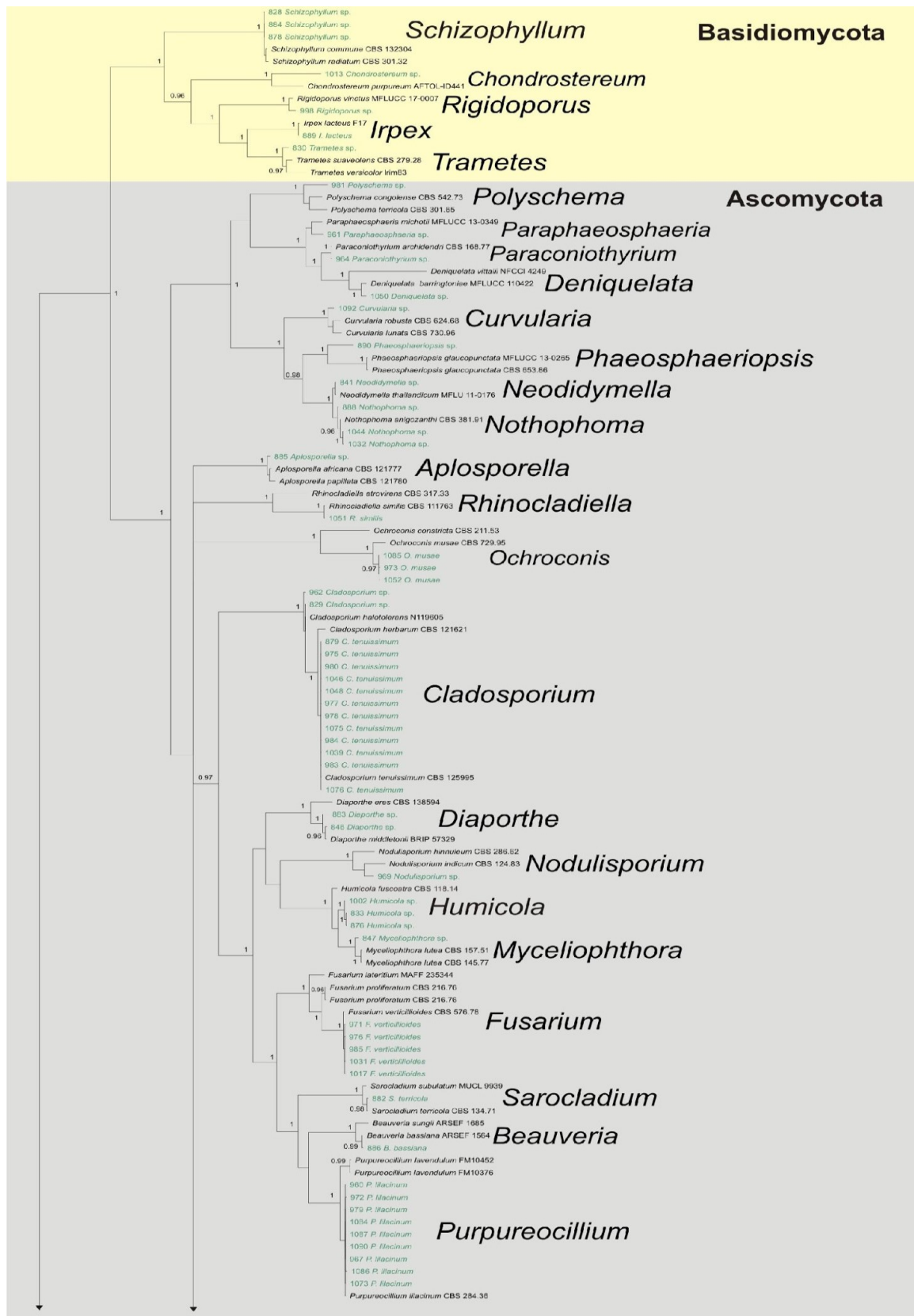
Quando comparados aos nossos dados, em comum, isolou-se representantes do gênero *Penicillium* para o guano e *Cladosporium*, *Penicillium* e *Phoma* das amostras de ar.

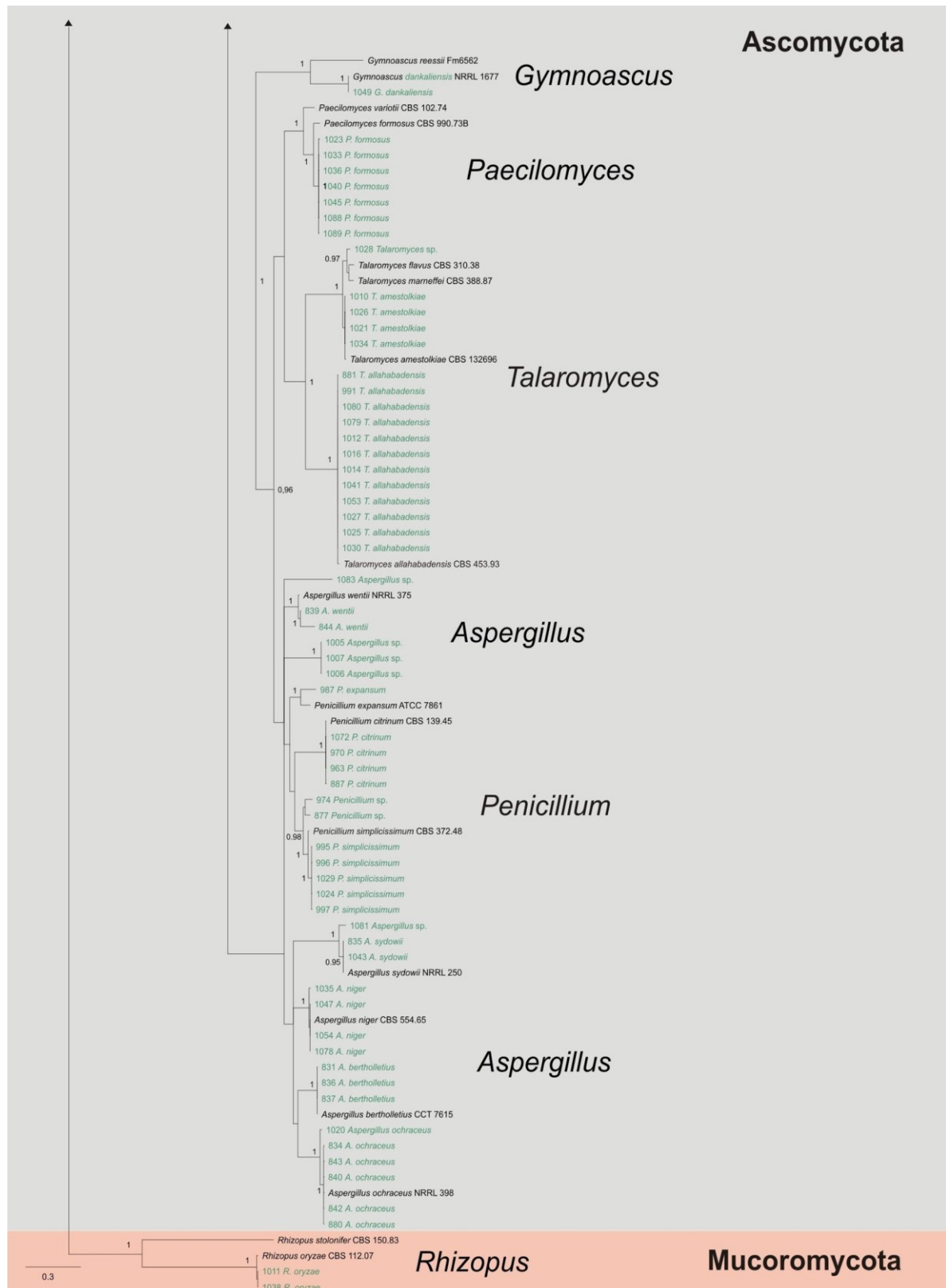
4.5 Análises filogenéticas

Para confirmar os resultados obtidos nas pesquisas BLASTn, as análises filogenéticas realizadas baseadas em ML e BI mostraram a presença de espécies pertencentes aos filos Ascomycota, Basidiomycota e Mucoromycota (Figura 11). Um total de 158 sequências dos fungos isolados no estudo foi utilizado para compor as análises filogenéticas (Figura 12).

Para todos os fungos identificados previamente pela morfologia, como pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Talaromyces*, foi realizada a amplificação, além da região ITS, a região gênica β -tubulina (Figura 13). Todas as sequências obtidas neste estudo foram utilizadas para realizar busca das sequências mais similares depositadas no banco de dados GenBank.

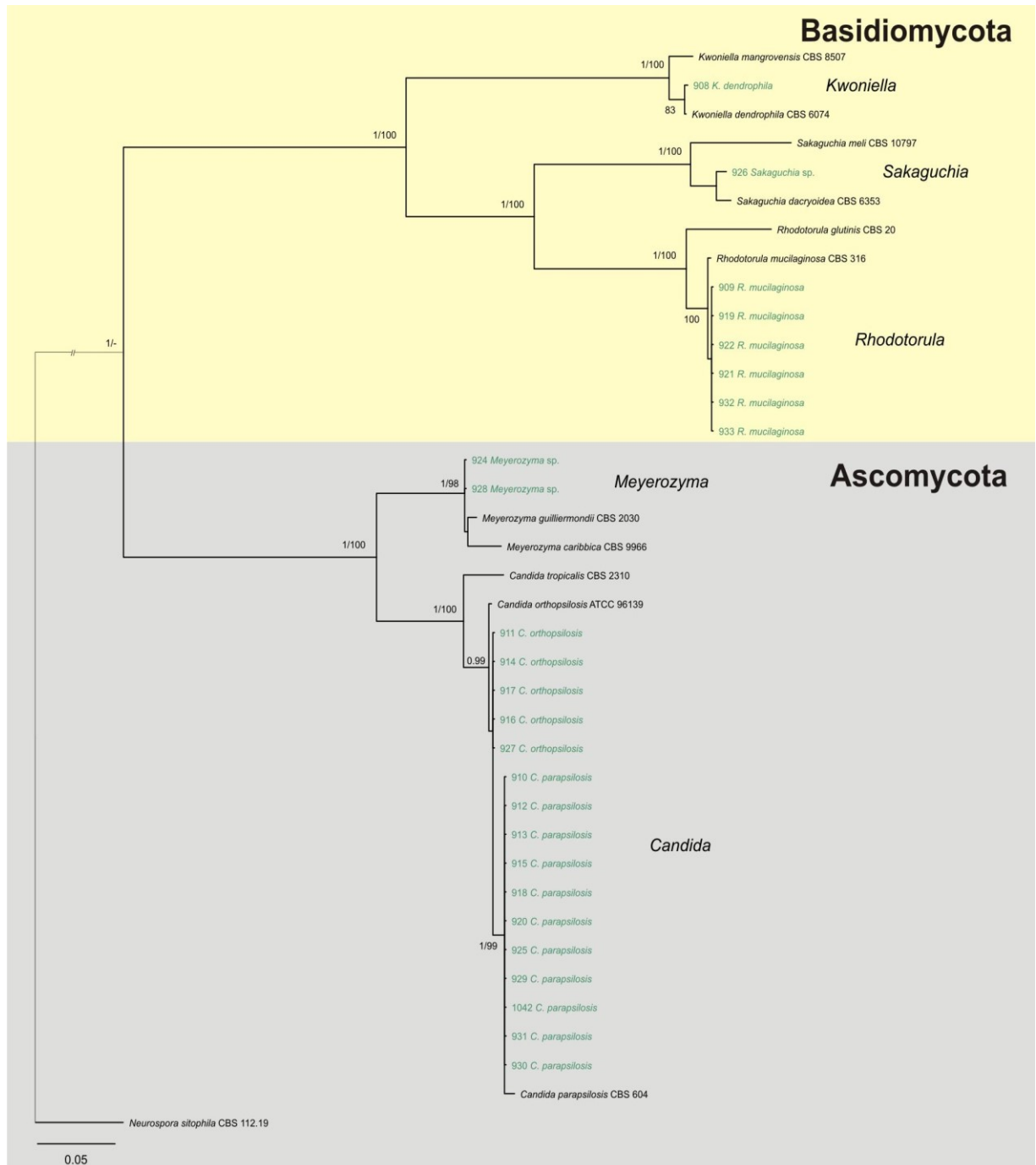
Figura 11- Árvore de inferência bayesiana (IB) utilizando sequências de ITS do rDNA de 133 fungos isolados de morcegos e do ar. Representantes de Mucoromycota foram utilizados como grupo externo. O modelo de substituição nucleotídica GTR+I+G foi utilizado para a análise de IB. Valores de probabilidade posterior a partir de 0.95 estão incluídos próximos dos nós. Fungos obtidos nesse estudo estão em verde.





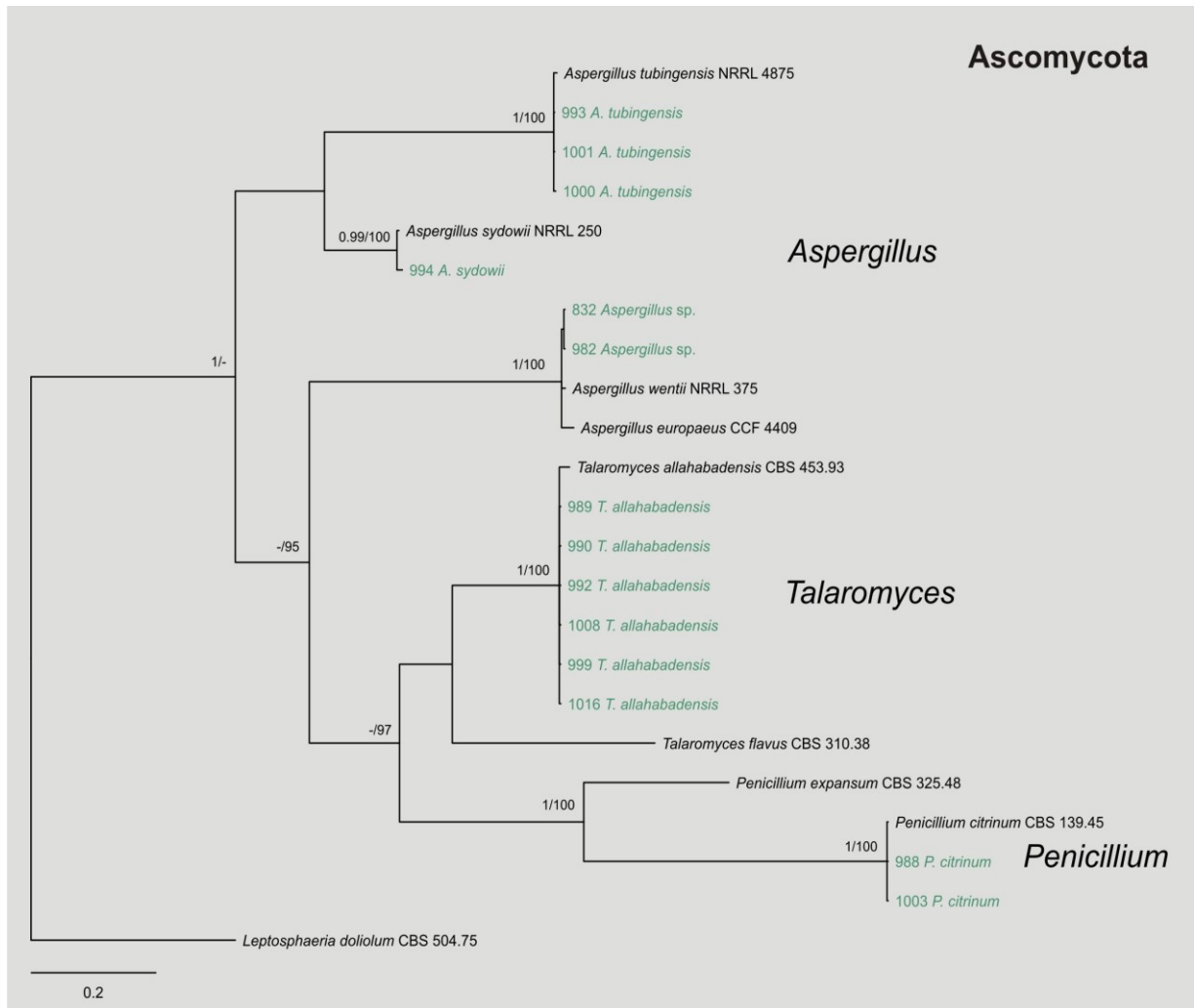
Fonte: A autora (2019).

Figura 12- Árvore de inferência bayesiana (IB) utilizando sequencias de LSU (D1/D2) do rDNA de 25 leveduras isoladas de morcegos. *Neurospora sitophila* CBS 112.19 foi utilizada como grupo externo. O modelo de substituição nucleotídica GTR+G foi utilizado para a análise de IB e GTR+I+G para a análise de verossimilhança. Valores de probabilidade posterior a partir de 0.95 e de bootstrap a partir de 70% estão incluídos próximos dos nós. Fungos obtidos nesse estudo estão em verde.



Fonte: A autora (2019).

Figura 13- Árvore de inferência bayesiana (IB) utilizando sequências do gene tubulina de 25 fungos isolados do guano. *Leptosphaeria doliolum* CBS 504.75 foi utilizada como grupo externo. O modelo de substituição nucleotídica SYM+G foi utilizado para a análise de IB e GTR+I+G para a análise de verossimilhança. Valores de probabilidade posterior a partir de 0.95 e de bootstrap a partir de 70% estão incluídos próximos dos nós. Fungos obtidos nesse estudo estão em verde.



Fonte: A autora (2019).

5 CONCLUSÕES

- O gênero *Aspergillus* foi o gênero mais abundante, estando presente em todos os substratos estudados, seguido de *Candida*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Purpureocillium* e *Talaromyces*;
- Foi observada uma elevada riqueza de espécies de fungos na Caverna “Meu Rei”;
- A menor abundância de fungos foi observada nas amostras de guano quando relacionadas às amostras do ar e dos morcegos;
- A caverna “Meu Rei” apresenta circulação de fungos de potencial patogênico importantes e de caráter oportunista que podem causar danos à saúde de eventuais visitantes da caverna;
- As *Bat caves* devem ser monitoradas e visitas realizadas em condições controladas, de forma a prevenir que visitantes fiquem expostos a estes micro-organismos potencialmente patogênicos;
- Os dados aqui apresentados confirmam a necessidade de estudos deste tipo, pois contribuem para o estabelecimento de um plano de gestão e visitação segura para esta caverna e para o PARNA Catimbau;

REFERÊNCIAS

- ADETUTU E.M, et al. Phylogenetic diversity of fungal communities in areas accessible and not accessible to tourists in Naracoorte Caves. **Mycologia**, 103 (5): 959-968, 2011.
- ALVAREZ, I. A.; OLIVEIRA, A. R. **Portal Dia de Campo. Artigos especiais**. Manejo da Caatinga é essencial ao desenvolvimento do Semiárido, 2013.
- ARMSTRONG D- *Treatment of Opportunistic Fungal Infections. Clinical Infectious Diseases*, 16 (1):1-7. 1993.
- ANDRADE-LIMA, D. The Caatingas dominium. **Revista Brasileira de Botânica**, v.4, n.2, p.149163. 1981.
- AZEVEDO, I.S.; BERNARD E. Avaliação do nível de relevância e estado de conservação da caverna “meu rei” no PARNA Catimbau – Pernambuco, Recife, 2014. **Rev Bras Espeleol**. 2015;1: 1-23.
- BARNES PD, MARR KA. Aspergillosis: spectrum of disease, diagnosis, and treatment. **Infect Dis Clin North Am**. 20(3): 545-61, VI, 2006;
- BARTON, H. A. Introduction to cave microbiology: A review for the non-specialist. **Journal of Cave and Karst Studies**, Highland Heights, v. 68, n. 2, p. 43 – 54, ago, 2006. Disponível em: <<http://www.karstportal.org/FileStorage/JCKS/v68n2-Barton.pdf>>. Acesso em: 17 dezembro de 2018.
- BARTON, H. A & NORTHUP. D.E. Geomicrobiology in cave environments: past, current and future perspectives. **Journal of Cave and Karst Studies**, v.69, no.1.193-178., 2007.
- BASS D. & RICHARDS T.A. *Three reasons to re-evaluate fungal diversity ‘on Earth and in the ocean’*. **Fungal Biology Reviews**, 25: 159-164, 2011.
- BRASINDOOR. Capacitação para inspeção e controle sanitário da qualidade do ar em ambientes fechados. Sociedade Brasileira de meio ambiente e de controle do ar de interiores, 1999.
- BENSCH, K., BRAUN, U., GROENEWALD, J.Z., CROUS, P.W. The genus *Cladosporium*. **Studies in Mycology** 72: 1–401. 2012.
- BERGAMIM, A. F., KIMATI. H., AMORIM, L. **Manual de fitopatologia**. Volume 1. Princípios e conceitos. 3ª edição. São Paulo SP. Editora Agronômica Ceres, 1995.
- BEZERRA, J. M.; MOURA, G. B. A.; SILVA, B. B.; LOPES, P. M. O.; SILVA, E. F. F. Parâmetros biofísicos obtidos por sensoriamento remoto em região semiárida do estado do Rio Grande do Norte, Brasil. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, 18 (1), 73–84. doi: 10.1590/ S1415-43662014000100010, 2014.
- BEZERRA, J. D. P., de AZEVEDO, J. L., SOUZA-MOTTA, C. M. Why Study Endophytic Fungal Community Associated with Cacti Species? In Diversity and Benefits of Microorganisms from the Tropics (pp. 21-35). **Springer International Publishing**. 2017.

CARMO, E.S. et al. Microbiota fúngica presente em diversos setores de um hospital público em Campina Grande – PB, 2007.

CASTELLETTI, C. H. M., SILVA, J. M. C. D., TABARELLI, M., SANTOS, A. M. M. Quanto ainda resta da Caatinga? Uma estimativa preliminar. *Ecologia e conservação da Caatinga*. Recife: Editora da Universidade Federal de Pernambuco, 719-734. 2003.

CECAV. Projeto monitoramento e avaliação de impactos sobre o patrimônio espeleológico. 2014. In: **CECAV- Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Cavernas [Internet]**. Brasília: CECav ICMBio-MMA - [about 4 screens]. Available from: <https://www.icmbio.gov.br/cecav/projetos-e-atividades/monitoramento-do-patrimonio-espeleologico.html>

CHAPMAN, J.A. **How relevant are pollen and mold spore counts to clinical practice?** *Ann. Allergy Asthma Immunol.*, 84: 467-468, 2000.

CHATURVEDI, V. CHATURVEDI, S. Editorial: What is in a name? A proposal to use geomycosis instead of White Nose Syndrome (WNS) to describe bat infection caused by *Geomyces destructans*. **Mycopathologia** 171: 231–233. 2011.

CHATURVEDI, V., D.J. *et al.* Morphological and molecular characterizations of psychrophilic fungus *Geomyces destructans* from New York bats with white nose syndrome (WNS). **PLoS ONE** 5:e10783. Available online at doi:10.1371/journal.pone.0010783, 2010.

COURTIN, F., et al. Pathologic findings and liver elements in hibernating bats with White-Nose Syndrome. **Veterinary Pathology** 47:214–219, 2010.

CURTIS, L.; LIEBERMAN, A.; STARK, M.; REA, W.; VETTER, M. Adverse health effect of indoor moulds. **Journal of Australian College of Nutritional & Environmental Medicine**, 23(1):3-8. 2004.

CULVER D.C. Cave Life, Evolution and Ecology. **Cambridge, Massachusetts and London, England: Harvard University Press**. 189 p., 1982.

CURY G.C., FILHO A.D., CRUZ A.G.C. & HOBAlKA A.B.S. Surto de histoplasmose em Pedro Leopoldo, Minas Gerais, Brasil. **Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 34 (5): 483-486, 2001.

DAVIS, B.D. *et al.* **Microbiology**. 4 th Ed. Filadelfia: J.B. Lippincott, 1990.

DOBY-DUBOIS M, CHEVREL ML, DOBY JM, LOUVET M. Premier cas humain d'adidaspiromycose, par *Emmonsia crescens*, Emmons et Jellison, 1960. **Bulletin de la Société de Pathologie Exotique** 57:240-244, 1964.

DAMM, U. CANNON, P.F., & CROWS, P. *Colletotrichum*: complex species or species complex. **Studies in Mycology** 73: September, 2012.

DELGADO JÚNIOR, D., CAROLINO, G., BURIL, M. T., ALVES, M. Convolvulaceae of National Park Catimbau, Pernambuco, Brazil. **Rodriguésia**, 65(2), 425-442. 2014.

DELGADO-JARAMILLO, M.; BARBIER, E.; BERNARD, E. New records, potential distribution, and conservation of the Near Threatened cave bat *Natalus macrourus* in Brazil. **Oryx**. 2018;52: 579-586. <https://doi.org/10.1017/S0030605316001186>

DOCAMPO, S. et al. Fungal spore content of the atmosphere of the Cave of Nerja (southern Spain): Diversity and origin. **Science of the Total Environment**. 409 835–843, (2011) Journal homepage: www.elsevier.com/locate/scitotenv. Acesso em dezembro de 2018.

DOMCH, K.H., GAMS, W. **Compendium of soil fungi**. Vol. 1. IHW-Verlog. Reprint, 1993.

EMERSON, J. K. & ROARK, A. M. Composition of guano produced by frugivorous, sanguivorous and insectivorous bats. **Acta Chiropterologica**, 9(1): 261–267, 2007 PL ISSN 1508-1109 © Museum and Institute of Zoology PAS. 2007.

EMMONS, C. W. Association of bats with histoplasmosis. **Public Health Rep.** 73:590-595. 1958.

EMMONS, C. W., P. D. KLITE, G. M. BAER, AND W. B. HILL, JR. Isolation of *Histoplasma capsulatum* from bats in the United States. **Am. J. Epidemiol.** 84:103-109. 1966.

ENGEL A.S., STEM A.L. & BENNETT P.C. Microbial contributions to cave formation: new insights into sulfuric acid speleogenesis. **Geology**, 32 (5): 369-372, 2004.

ENGLISH, M.P. *Trichophyton persicolor* infection in the field vole and *Pipistrelle* bat. **Sabouraudia** 4:219–222, 1966.

ESTRADA-BÁRCENAS D., et al. - Biological activity of the mite *Sancassania* sp. (Acari: Acaridae) from bat guano associated with the pathogenic fungus *Histoplasma capsulatum*. **Memoires do Instituto Oswaldo Cruz**, 105 (2): 127-131, 2010.

FERNANDEZ-CORTES A, CALAFORRA JM, MARTIN-ROSALES W, GONZALEZ-RIOS M. Cavidades turísticas de Andalucía. In: Calaforra Chordí JM, Berrocal JA, editors. El Karst de Andalucía. **Geoespeleologia, Bioespeleologia y Presencia Humana**. Consejería de Medio Ambiente de la Junta de Andalucía; p. 105–16. 2011.

FERREIRA, J. V., FABRICANTE, J. R., FILHO, J. A. S. **Checklist preliminar de Bromeliaceae do Parque Nacional do Catimbau, Pernambuco, Brasil**. 2015.

FOLEY, J. CLIFFORD, D. CASTLE, K. CRYAN, P. OSTFELD, R.S. Investigating and managing the rapid emergence of white-nose syndrome, a novel, fatal, infectious disease of hibernating bats. **Conserv Biol** 25: 223–231. 2011.

FURTADO, M.S.S; FERRARONI, J.J. Fungos anemófilos em ambientes hospitalares da cidade de Manaus, **Revista Amazonas Ciência e Cultura**,34:42-47, 1998.

GARGAS, A. TREST, M.T. CHRISTENSEN, M. VOLK, T.J. BLEHER, D.S. *Geomyces destructans* sp. nov. associated with Bat white-nose syndrome. **Mycotaxon** 108: 147–154. 2009.

GAMBALE, W. Fungos Contaminantes. In: **Compêndio de Micologia Médica**, 2010.

- GNASPINI-NETTO, P. Bat guano ecosystems: a new classification and some considerations with special references to Neotropical data. **Memoirs de Biospéologé**. 19:135–138. 1992.
- GOMPERTZ, L. R. et al. (Eds.) **Microbiologia**. 4th ed. São Paulo, SP: Editora Atheneu: 487-493, 1999.
- GOMPERTZ O.F.; GAMBALE W.; RODRIGUES P.C. & CORRÊA B. Micologia Especial e Clínica -Micoses Sistêmicas, 2004
- GRUMACH, A.S. **Alergia e imunologia na infância e na adolescência**. São Paulo: Atheneu, 2001.
- GUIMARÃES A.J., NOSANCHUK J.D. & ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R.M. *Diagnosis of Histoplasmosis*. **Brazilian Journal of Microbiology**, 37:1-13, 2006.
- GUNDE-CIMERMAN N., ZALAR P. & JERAM S. Mycoflora of cave cricket *Troglophilus neglectus* cadavers. **Mycopathologia**, 141: 111-114, 1998.
- HAUFF, S. N. Representatividade do Sistema Nacional de Unidades de Conservação na Caatinga. **Programa das Nações Unidas Para o Desenvolvimento**, Brasília, Brazil, 54. 2010.
- HOLZ, P.H. LUMSDEN, L.F. MARENDAMS, BROWNINGGF, HUFSCHEMID J. Two subspecies of bent-winged bats (*Miniopterus orianae bassanii* and *oceanensis*) in southern Australia have diverse fungal skin flora but not *Pseudogymnoascus destructans*. **PLoS ONE** 13(10): 2018.
- HOOG, G.S; GUARRO, I.; GUENÉ, J.; FIGUERAS, M. J. **Atlas of Clinical Fungi**. Central Bureau voor schimmelcultures. Universitat Roivira I Virgilia, 1995.
- HORNER, W. E. *et al.* Fungal allergens. **Clinical Microbiology**, 1995.
- HOLSINGER, J.R.; CULVER, D.C. **The invertebrate cave fauna of Virginia and a part of Eastern Tennessee: Zoogeography and ecology**. *Brimleyana*, v.14, p.1-162, 1988.
- IBAMA. Decreto, s/n, de 13 de dezembro de 2002. Dispõe sobre a criação do Parque Nacional do Catimbau, nos Municípios de Ibimirim, Tupanatinga e Buíque, no Estado de Pernambuco e dá outras providências. Brasília. 2002
- ICMBIO. Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. Caatinga. Disponível em: <<http://www.icmbio.gov.br/portal/unidadesdeconservacao/biomas-brasileiros/caatinga>>. 2018.
- IUCN -. Guidelines for Minimizing the Negative Impact to Bats and Other Cave Organisms from Guano Harvesting. **International Union for Conservation of Nature** Ver. 1.0. Mar. 2014.
- KASUGA, T. et al. Phylogeography of the fungal pathogen *Histoplasma capsulatum*. **Molecular Ecology**, 12: 3383-3401. 2003.

KIILL, L.H.P. Bioma Caatinga. AGEITEC – Agência Embrapa de Informação Tecnológica. Disponível <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/bioma_caatinga/arvore/CONT000glz1ehqv02wx5ok0f7mv200nvg0xn.html>. Acesso em outubro de 2018.

KOUSHI M, TADI R & SOUBANI A; Pulmonary aspergillosis: a clinical review; **European Respiratory Review**; 20; 121; 156-174, 2011.

KUMAR, R.M. Moderate and severe forms of allergic bronchopulmonary aspergillosis – a clinical and serologic evaluation. **Chest** (2): 124-890, 2003.

LACAZ, C.S. Micologia médica: fungos, actinomicetos e algas de interesse médico. 7ed. São Paulo: **Sarvier**, 1984.

LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J.C.E. **Tratado de Micologia médica**. 9. Ed. São Paulo: **Sarvier**, 2002.

LADLE, R. J.; FIRMINO, J. V. L.; MALHADO, A. C. M. Unexplored Diversity and Conservation Potential of Neotropical Hot Caves. **Conservation biology**, 2012.

LARCHER, G., BOUCHARA, J.P., PAILLEY, P., MONTFORT, D., BÉGUIN, H., DE BIÈVRE C. & CHABASSE D. - Fungal biota associated with bats in Western France. **Journal de Mycologie Médicale**, 13: 29-34. 2003.

LEAL, I.R., SILVA, J.M.C., TABARELLI, M., LACHER JR., T.E. Mudando o curso da conservação da biodiversidade na Caatinga do Nordeste do Brasil. **Megadiversidade** 1(1): 139-146. 2005.

LOBATO, R. C.; VARGAS, V. S.; SILVEIRA, E. S. **Sazonalidade e prevalência de fungos anemófilos em ambiente hospitalar no sul do Rio Grande do Sul, Brasil**. Revista faculdade de ciências médicas de Sorocaba, Rio Grande, v. 11, n. 2, p. 21 – 28, out./abr. 2009.

LORCH, J.M. et al. **Experimental infection of bats with *Geomyces destructans* causes white-nose syndrome**. *Nature* 480:376–378, 2011.

MAIA, L.C. Diversidade de fungos e líquens e sucessão fúngica na Reserva Ecológica de Dois irmãos in Reserva Ecológica de Dois Irmãos: Estudo em um remanescente de Mata Atlântica em Área urbana. Recife. UNIVERSITÁRIA. 85-113, 1998.

MAIA, J. M. *et al.* Motivações socioeconômicas para a conservação e exploração sustentável do bioma caatinga. **Desenvolvimento e Meio Ambiente**, v. 41, p. 295-310, DOI: 10.5380/dma.v41i0.49254. Agosto 2017.

MARTINKOVA, N. BACKOR, P. BARTONICKA, T. BLAZKOVA, P. CERVENY, J. Increasing incidence of *Geomyces destructans* fungus in bats from the Czech Republic and Slovakia. **PLoS One** 5: e13853. 2010.

MENEZES, E. A. *et al.* Airborne fungi causing respiratory allergy in patients from Fortaleza, Ceará, Brazil. **Jornal brasileiro de patologia médica e laboratorial**. Ceará, v. 40, n. 2, ago./abr. 2004. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/jbpml/v40n2/a06v40n2.pdf>>. Acesso em: Dezembro de 2018.

MEZZARI, A. et al. Airborne fungi in the city of porto alegre, Rio Grande do Sul, Brazil. **Rev. Int. Med. Trop. S. Paulo** 44(5):269-272, september-october, 2000.

MEZZARI, A. et al. Os fungos anemófilos e sensibilização em indivíduos atópicos em Porto Alegre, RS. **Revista da associação médica brasileira**, Rio Grande do Sul, v. 49, n. 3, p. 270 – 273, jul. /jan. 2003.

MINNIS, A. M. LINDNER, D. L. Phylogenetic evaluation of *Geomyces* and allies reveals no close relatives of *Pseudogymnoascus destructans*, comb.nov., in bat hibernacula of eastearn North America. **Fungal Biol** 117:638-649. 2013.

MMA, Ministério do Meio Ambiente. Decreto de 13 de dezembro de 2002. Criação do Parque Nacional do Catimbau. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/dnn/2002/Dnn9771.html Acesso em novembro de 2018.

MMA, Ministério do meio ambiente. 2018. Caatinga. Disponível em <http://www.mma.gov.br/biomas/caatinga>. Acesso em: 10 de outubro de 2018.

MURRAY, PR.; DREW, W.L.; KOBAYASHI, G.S.; THOMPSON JR, J.H. **Microbiologia médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

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

NOVÁKOVÁ, A. KUBÁTOVÁ, A. FRANTIŠEK SKLENÁŘ, VÍT HUBKA. **Czech mycology** 70(2): 101–121, AUGUST 19, (Online Version, ISSN 1805-1421). 2018.

NOWAK, R. M. **Walker's mammals of the world**, 6th edition. Johns Hopkins University Press, Baltimore, MD, 2015 pp. 1999.

OEKO. 2017. Disponível em: <http://www.oeco.org.br/reportagens/refugio-tatu-bola-deixa-deexistir/>.

OGORÉK, R., LEJMAN, A., MATKOWSKI, K. Fungi isolated from Niedźwiedzia Cave in Kletno (Lower Silesia, Poland). **International Journal of Speleology**. 42(2),161-166, Tampa, FL (USA), May-2013.

OGOREK, R. DYLA, M. KOZAK, B. VISNOVSKA, Z. TANCINOVA, D. AND LEJMAN, A. Fungi isolated and quantified from bat guano and air in Harmanecka' and Driny Caves (Slovakia). **Journal of Cave and Karst Studies**, v. 78, no. 1, p. 41–49. DOI: 10.4311/2015MB0108. 2016.

PAUPITZ, J. Elementos da estrutura fundiária e uso da terra no Semiárido Brasileiro. In: Gariglio, M. A.; Sampaio, E. V. S. B.; Cestaro, L. A.; Kageyama, P. Y. (Orgs.). **Uso sustentável e conservação dos recursos florestais da Caatinga**. Brasília: Serviço Florestal Brasileiro, 2010.

PELCZAR, M. et al. **Microbiologia**. São Paulo: Mc Graw – Hill do Brasil. Vol 1. 1980.

PFALLER M.A. & DIEKEMA D.J. Rare and emerging fungal pathogens: concern for resistance beyond *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. **Journal of Clinical Microbiology**, 42 (10): 4419-4431, 2004.

PEREIRA, B. F. P.; MELO, L. E.; COSTA, P. F. Fungos Anemófilos Isolados Na Cidade De Belém, Estado Do Pará – Brazil. **Revista eletrônica de Biologia**, Pará, v. 6, n. 1, 2013.

PITT, J.I. A laboratory Guide to Common *Penicillium* Species. North Wales: Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization – **Division of Food Processing**; 1991.

PITT, J. I. Mycotoxins and toxigenic fungi. **Med. Mycol.** 38:41-46, 2000.

PORTER, M.L. et al. Productivity- Diversity Relationships from Chemolithoautotrophically Based Sulfidic Karst Systems. **International Journal of Speleology**. 38 (1), 27-40, Bologna, Italia, January, 2009.

PUECHMAILLE SJ, VERDEYROUX P, FULLER H, GOUILH MA, BEKAERT M, et al. White-nose syndrome fungus (*Geomyces destructans*) in bat, France. **Emerg Infect Dis** 16: 290–293. 2010.

RAPER, K.B & THOM, C. **A manual of the *Penicillia***. Baltimore. 1949.

REIS, N. R., AND W. Y. MOK. *Wangiella dermatitidis* isolated from bats in Manaus, Brazil. **Sabouraudia** 17:213-218. 1979.

RIVERA-NEVES. Á.M., SANTOS-FLORES, C.J., DUGAN, F.M. & MILLER, T.E. Guanophilic fungi in three caves of southwestern Puerto Rico. **International Journal of Speleology**, 38 (1), 61-70. Bologna (Italy). ISSN 0392-6672. 2009.

Rodriguez, J. D. *Histoplasma capsulatum* in bats in Guayas Province (Ecuador). **Rev. Ecuador Hyg. Med. Trop.** 26:95-101. 1969.

RIZZINI, C.T. Nota prévia sobre a divisão fitogeográfica do Brasil. **Revista Brasileira de Geografia, Rio de Janeiro: IBGE**, ano 25, n. 1, p. 3-64, jan./mar. 1963.

RODAL, M.J.L.; ANDRADE, K.V.S.; SALES, M.F. GOMES, A.P.S. Fitossociologia do componente lenhoso de um refúgio vegetacional no município de Buíque, Pernambuco. **Revista Brasileira de Biologia** 58: 517-526. 1998.

SAMSON, R.A. FRISVAD, J.C. *Penicillium Subgenus Penicillium*: new Taxonomics Schemes, Mycotoxins and Other Extrolites. **Stud Mycol**; 49:1-260. 2004.

SÁNCHEZ-AZOFEIFA, G. A., QUESADA, M., RODRIGUEZ, J. P., NASSAR, J. M., STONER, K. E., CASTILLO, A., E FAJARDO, L. Research Priorities for Neotropical Dry Forests1. **Biotropica**, 37(4), 477-485. 2005.

SHIRAKAWA, M.A. et al. The development of a method to evaluate bioreceptivity of indoor mortar plastering to fungal growth. **International Biodeterioration and Biodegradation** 51, 83 e 97, 2003.

SNE. Sociedade Nordestina de Ecologia. Projeto Técnico para a Criação do Parque Nacional do Catimbau/PE. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Meio Ambiente de Pernambuco – SECTMA, Recife. 2002.

SIDRIM, J. J.C., ROCHA M. F.G. **Micologia médica: À luz de autores contemporâneos**, 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 388p, 2004.

ŠIMONOVÍČOVÁ A, GÓDYOVÁ M, ŠEVC J. Airborne and soil microfungi as contaminants of stone in a hypogean cemetery. **Int Biodeterior Biodegradation**; 54:7-11, 2004.

SINGH, J. Toxic Moulds and indoor air quality. **J. indoor Built Environ**; 14(34): 229-234, 2005.

SIKES, R.S. 2016. Guidelines of the American Society of Mammalogists for the use of wild mammals in research and education. **J Mammal**. 2016;97: 663-688. doi: 10.1093/jmammal/gyw078

SILVA, A. C. C.; PRATA, A. P. N.; SOUTO, L. S.; MELLO, A. A. Aspectos de ecologia de paisagem e ameaças à biodiversidade em uma unidade de conservação na Caatinga, em Sergipe. **Revista Árvore**, 37(3), 479-490, doi: 10.1590/ S0100-67622013000300011, 2013.

SIQUEIRA, G. R. Avaliação da Implementação do Parque Nacional do Catimbau-PE: análise do desenvolvimento sustentável na perspectiva do ecoturismo e da comunidade local. Recife, Universidade Federal de Pernambuco, **CFCH Geografia**. 2006.

SOUZA, A. E. F.; VIEIRA, K. V. M.; GOMES, L. F. A. V. Isolamento e identificação da microbiota fúngica anemófila em diversos setores do centro de ciências biológicas e da saúde da universidade estadual da Paraíba. **Revista de biologia e farmácia**, Paraíba, v. 2, n. 2, p. 31 – 49, 2008.

SOUZA-SILVA M., Dinâmica de disponibilidade de recursos alimentares em uma caverna calcária. Dissertação de mestrado em ecologia (conservação e manejo da vida silvestre), Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), 2008.

SPECHT, M.J. et al. Socioeconomic differences among resident, users and neighbour populations of a protected area in the Brazilian dry forest. **J Environ Manage**. 2019;232: 607-614. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.11.101>

TRAJANO, E.; MOREIRA, J. R. A. Estudo da fauna de cavernas da Província Espeleológica Arenítica Altamira-Itaituba, Pará. **Revista Brasileira de Biologia** 51(1):13–29. 1991

TAYLOR, E.L.S.; STOIANOFF, M.A.R; FERREIRA, R.L. Mycological study for a management plan of a neotropical show cave (Brazil). **International Journal of Speleology** 42 (3) 267-277 Tampa, FL (USA), 2013.

TAKAYASU S., AKAGI M. & SHIMIZU Y. *Cutaneous mycosis caused by Paecilomyces lilacinus*. **Archives of Dermatology**, 113 (12):1687-1690, 1977.

TRABULSI, L. R. et al. Microbiologia. 3 ed. São Paulo: **Atheneu**, p. 421-422, 1999.

- ULLOA, M., P. LAPPE, S. AGUILAR, H. PARK, A. PÉREZ-MEJÍA, C. TORIELLO AND M.L. TAYLOR. 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** 77:153–168, 2006.
- VAUGHAN-MARTINI A, ANGELINI P, ZACCHI L. The influence of human and animal visitation on the yeast ecology of three Italian caverns. **Ann Microbiol**; 50:133–40, 2000.
- VANDERWOLF, K. J. et al. A world review of fungi, yeasts and slime molds in caves. **International Journal of Speleology** 42(1), 77-96, Tampa, FL (USA), January, 2013a.
- VANDERWOLF, K. J. et al. Ectomycota Associated with Hibernating Bats in Eastern Canadian Caves prior to the Emergence of White-nose Syndrome. **North eastern naturalista**, Canadá, v. 20, n. 1, p. 115 – 130, 2013b.
- VANDERWOLF, K. J. MALLOCH, D. IVANOVA, N.V. AND MCALPINE, D.F. – Lack of cave-associated mammals influences the fungal assemblages of insular solution caves in Eastern Canada. **Journal of Cave and Karst Studies**, v. 78, no. 3, p. 198–207. DOI: 10.4311/2016MB0122. 2016.
- VASCONCELOS, G. C. L., MELO, J. I. M. Flora do Parque Nacional do Catimbau, PE, Brasil: Loranthaceae. **Hoehnea**, São Paulo, v. 43, n. 2, p. 317-323. 2016.
- VAUGHAN-MARTINI, A., ANGELINI, 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.
- VEILLEUX, J.P. Current status of white-nose syndrome in the northeastern United States. **Bat Research News** 49:15–17, 2008.
- VERALDI, S., CHIARATTI A. & HARAK H. *Onychomycosis caused by Aspergillus versicolor*. **Mycoses**, 53 (4): 363-365, 2010.
- VOYRON, S. et al. First mycological investigation on Italian bats. **Hystrix It. J. Mamm.** (n.s.) 22(1) 2011: 189-197, 2011.
- <https://g1.globo.com/distrito-federal/noticia/bombeiros-do-df-sao-infectados-durante-treinamento-em-caverna.ghml>
- WAI YIN MOK; REGINA, C. C.; LUIZA O.; MARIA DO SOCORRO BARRETO DA SILVA. **Applied and environmental microbiology**, Sept., p. 570-575. 1982.
- WALSH T.J. et al. Treatment of aspergillosis: clinical practice guidelines of the Infectious Diseases Society of America. **Clin Infect Dis**. 46(3):327-60, 2008.
- WANG, W. et al. Molecular characterization of airborne fungi in caves of the Mogao Grottoes, Dunhuang, China. **International Biodeterioration & Biodegradation**. 65, 726 e

731, 2011. Disponível Journal homepage: www.elsevier.com/locate/ibiod. Acesso em dezembro, 2018.

WHITE, T.J, BRUNS, T., LEE, S., TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR Protocols: a guide to methods and applications. (Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, eds). **Academic Press**, New York,USA: 315–322, 1990.

WIBBELT, G., KURTH, A., HELLMANN, D., WEISHAAR, M., BARLOW, A. White-nose syndrome fungus (*Geomyces destructans*) in bats, Europe. **Emerg Infect Dis** 16: 1237–1243. 2010.

YODER J.A., BENOIT J.B., CHRISTIENSEN B.S., CROXALL T.J. & HOBBS H.H. *Entomopathogenic fungi carried by the cave orb weaver spider, Meta ovalis (Araneae, Tetragnathidae), with implications for mycoflora transfer to cave crickets.* **Journal of Cave and Karst Studies**, 71 (2): 116-120, 2010.

ZHANG, T.; TANYA R. VICTOR.; SUNANDA S. RAJKUMAR.; XIAOJIANG LI.; JOSEPH C. OKONIEWSKI. et al. Mycobiome of the Bat White Nose Syndrome Affected Caves and Mines Reveals Diversity of Fungi and Local Adaptation by the Fungal Pathogen *Pseudogymnoascus (Geomyces) destructans*. **PLOS ONE**. September, Vol. 9. Issue 9. E108714, 2014.

APÊNDICE A – FUNGAL PLANET DESCRIPTION SHEETS:785

Fungal Planet description sheets:785

Geosmithia carolliae A.O.B. Cunha, A.R. Machado & Souza-Motta, *sp. nov.*

Etymology. The name refers to the host from which it was isolated, *Carollia perspicillata*.

Classification — *Incertae sedis*, *Hypocreales*, *Sordariomycetes*.

On MEA, 25 °C, 7 d: *Hyphae* hyaline, smooth, septate, 2–7.5 µm wide. *Conidiophores* hyaline, tall, septate, erect, solitary, often branched, mono- to quaterverticillate, verrucose, borne on hyphae, (23.5–)65–80(–104) × 1–1.5 µm. *Stipe* verrucose, (10.5–)26–49.5(–65) × 1–1.5 µm; branch (rami) verrucose, (10.5–)13–20.5(–26) × 1–1.5 µm. *Metulae* verrucose, (9.5–)10.5–11.5(–12.5) × 2–2.5 µm. *Phialides* verrucose, cylindrical to ellipsoidal, (4–)6.5–8.5 × 1.5–2 µm. *Conidia* hyaline, cylindrical to ellipsoid, smooth-walled, rounded at both ends, 4–5.5 × 2–2.5 µm; conidial chains up to 53 µm long, not persistent.

Culture characteristics — Colonies at 25 °C for 7 d. On MEA, the colonies are plane, dense, velutinous, opaque, ranging from rose vinaceous to rose greyish; reverse umber to pale brown; irregular margins, narrow and diffuse, ranging from salmon to white colours; pigmentation and exudate are absent, growing up to 50 mm. On CYA, the colonies are similar to MEA, but are pale vinaceous and the reverse vinaceous brown to dark brown, growing fast up to 70 mm. On CDA, the colonies are irregular, centrally filamentous, yeast-like aspect at the borders, umber to dark brown and margins salmon to white; reverse pale brown to yellowish; slight yellowish pigmentation around the colony, exudate absent, growing up to 20 mm. Colonies at 37 °C for 7 d. On MEA and CYA are similar, planes, dense, velutinous to floccose, opaque, ranging from pale brown to greyish, reverse umber to dark brown; margins, narrow and diffuse, ranging from pale vinaceous to buff, pale brown to pale yellow; pigment and exudate absent, growing up to 0.5 mm. On CDA, the colonies are similar to CDA at 25 °C, but are white to pale cream and the reverse umber to dark brown, growing up to 0.6 mm.

Typus. BRAZIL, Pernambuco state, Tupanatinga, Catimbau National Park, Bat cave ‘Meu Rei’, 08°29'14.1"S, 37°16'48.8"W, isolated from the bat wing of *Carollia perspicillata*, 20 Sep. 2017, A.O.B. Cunha & E. Barbier (holotype URM 91977, culture ex-type URM 7929, ITS, LSU and *tub2* sequences GenBank MH989506, MH989510 and MH989534, MycoBank MB827978).

Additional material examined. BRAZIL, Pernambuco state, Tupanatinga, Catimbau National Park, Bat cave ‘Meu Rei’, 08°29'14.1"S, 37°16'48.8"W, isolated from the bat wing of *Carollia perspicillata*, 20 Sep. 2017, A.O.B. Cunha & E. Barbier, URM 7930 and URM 7931. URM 7930: ITS, LSU and *tub2* sequences GenBank MH989507, MH989511 and MH989535; URM 7931: ITS, LSU and *tub2* sequences GenBank MH989508, MH989512 and MH989536.

Notes — The genus *Geosmithia* was proposed by Pitt (1979) to accommodate *Penicillium lavendulum* and related species. Since its description, 20 species were included in it according to Index Fungorum and MycoBank databases (25 Sep. 2018). BLASTn searches using ITS sequences of *G. carolliae* demonstrated that they are identical to sequences deposited as *Geosmithia* sp. living in association with bark beetles in the Mediterranean area (Kolarík et al. 2007). These sequences grouped together with our sequences in the phylogenetic tree, and here they are named as *G. carolliae*.

The LSU sequences have high identities (99 %) to sequences from *G. lavendula* (e.g. GenBank MH867927.1, Vu et al. 2019), amongst other. The *tub2* sequences have *G. morbida* (GenBank KF853911.1) as the closest identity (89 %). *Geosmithia carolliae* is phylogenetic related and morphologically similar to *G. lavendula*, but differ from it by culture characteristics (growth on MEA and CYA at 25 °C up to 35 mm and on CYA at 37 °C up to 12 mm), and by the size and ramification of conidiophores (200–400 µm × 3–3.5 µm), rami (15–25 µm × 3–3.5 µm), metulae (12–15 µm × 3–3.5 µm), phialides (10–12 µm × 2.2–2.5 µm) and conidia (4–5.5 µm × 2–2.5 µm) (Pitt 1979). Also, *G. carolliae* differs from *G. rufescens* by culture characteristics (growth on MEA at 25 °C up to 30 mm and on CYA up to 22 mm; no growth at 37 °C), and by the size and ramification of conidiophores (30–70 µm), rami (15–30 µm × 2–3 µm), metulae (9–11 µm × 2–2 µm), phialides (8.5–11.5 µm × 2–2.5 µm) and conidia (3–5 µm × 1.5–2.5 µm) (Kolarík et al. 2010).

Colour illustrations. *Carollia perspicillata* during collection in the Catimbau National Park; colony on MEA after 7 d at 25 °C, conidiophores and conidia. Scale bars = 10 µm.

Aline O. B. Cunha, Alexandre R. Machado & Cristina M. Souza-Motta, Departamento de Micologia Prof. Chaves Batista, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil; e-mail: alineobcunha@hotmail.com, alexanderm.agro@yahoo.com.br & cristina.motta@ufpe.br

Eder Barbier & Enrico Bernard, Departamento de Zoologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil; e-mail: barbier.eder@gmail.com & enricob2@gmail.com

**APÊNDICE B – LIVING IN THE DARK: BAT CAVES AS HOTSPOTS OF FUNGAL
DIVERSITY**

Living in the dark: bat caves as hotspots of fungal diversity

Aline O. B. Cunha^{1¶}, Jadson D. P. Bezerra^{2¶*}, Thays G. L. Oliveira^{1&}, Eder Barbier^{3&}, Enrico Bernard³,
Alexandre R. Machado¹, Cristina M. Souza-Motta^{1*}

¹ Departamento de Micologia Prof. Chaves Batista, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco,
Recife, Brazil

² Setor de Micologia, Departamento de Biociências e Tecnologia, Instituto de Patologia Tropical e Saúde
Pública, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Brazil

³ Laboratório de Ciência Aplicada à Conservação da Biodiversidade, Departamento de Zoologia, Centro de
Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil

* Corresponding authors

E-mails: jadsondpb@gmail.com, jadsonbezerra@ufg.br (JDPB)

E-mail: souzamotta@yahoo.com.br (CMSM)

¶ These authors contributed equally to this work.

& These authors also contributed equally to this work.

Abstract

Bat caves are very special roosts that harbour thousands of bats resulting in large guano deposits. Such sites may hold an incredible “dark fungal diversity” which is still underestimated. We explored the culturable fungal richness in the air, on bats, and in the guano in a bat cave in Brazil’s Caatinga dry forest. Fungal abundance was higher in the guano (683 colony forming units (CFU)) than in the air (673 CFU). Based on morphological and phylogenetic analysis of ITS, LSU, and *TUB2* sequences, fungal isolates of 59 taxa belonging to 37 genera in the phyla Ascomycota (28 genera including *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, and *Talaromyces*), Basidiomycota (eight including *Rhodotorula*), and Mucoromycota (one, *Rhizopus*) were identified. The fungal richness on the bodies of bats was the highest (36 taxa), especially in their wing membranes (21 taxa, nine of which were exclusively found in this microhabitat). Eight (21.6 %) of the 37 genera and 17 (53.1 %) of the 32 identified fungal species are reported for the first time in caves. Our results highlight bat caves in Brazil as hotspots of high fungal diversity, emphasizing the need to protect such special roosts.

Introduction

Bat caves are special habitats which harbour large bat communities that frequently surpass 100,000 individuals [e.g. 1-2]. Such caves provide specific microclimatic conditions that favour many species of bats to use these underground environments [2-4]. As a consequence of such large number of individuals together, bat caves usually contain large deposits of bat guano, supporting rich and complex cave biotas [5]. Cave biotas are frequently identified as being highly diverse and specialized (for e.g. troglobiont, eutroglophile, subtroglophile, and troglaxene) [6-7], and are known to show extreme endemism and often, a myriad of unknown species are discovered [8-10]. This is true for fungi as well.

In recent years, fungal diversity associated with bats and caves has received much attention because several bat species have been affected by the white-nose syndrome caused by an ascomycetous fungal species (*Pseudogymnoascus destructans* (Blehert & Gargas) Minnis & D.L. Lindner) [11-12]. Although nearly 2,000 fungal species have been recorded from caves and similar environments [5, 13-18], our knowledge of their richness and diversity in these environments are far from complete. A recent study from karst caves in China described 20 new fungal species belonging to 18 genera in Ascomycota [16], concluding that the sampled caves harbour a high fungal diversity [see 16-17].

A better understanding of the origin and evolution of fungal diversity in caves is still a scientific challenge. Recently, Zhang et al. [7] studied the divergence time of suspected troglobitic fungi in karst caves in China and concluded that this mycobiome came from other environments. Other studies have indicated that several fungal species discovered from caves, on bats, and in guano are fungi known from other habitats, and have suggested that external vectors from epigeal environment (troglodite animals, for example) may have a role in shaping the fungal community in caves [11, 16, 19, 20]. In addition to the effect of air currents, water movement, and visitors [7, 11, 16, 21], bats are probably the most important vector in the dispersal of fungal species in caves [22-23].

Brazil harbours 182 bat species [24] and at least 72 of these are reported to use caves [25-26]. Fungal diversity of caves in Brazil is still poorly explored, and this needs to be studied to contribute to the Brazilian and global fungal estimations. Studies conducted in Brazilian caves have focused on verifying the environmental quality for tourism proposals and, therefore, their search was directed towards finding pathogenic fungal species [21, 27-28]. The first report of fungal species from caves in Brazil (in the Amazon forest) was published by Castrillón et al. [29] who isolated fungi from soils and identified these as belonging to eight ascomycetous

genera, including a rare dermatophyte, *Microsporium amazonicum* (currently *Arthroderma amazonicum* (Moraes, Borelli & Feo) Y. Gräser & de Hoog), and several other isolates without any taxonomic identification rank (e.g. yeasts and unknown fungi). Later, Taylor et al. [21, 24] studied cave fungi from the air, guano, and various sediments and found species mainly belonging to genera such as *Aspergillus* and *Penicillium* of the phylum Ascomycota. In consequence of a possible infection of eight biologists by *Histoplasma capsulatum* Darling after an expedition to a cave, Rocha-Silva et al. [28] highlighted the importance of verifying the presence of this species before authorization for public visitation. On the other hand, Paula et al. [30-31] demonstrated the high cellulolytic activities of fungal isolates (including *Aspergillus*, *Penicillium*, and *Talaromyces*) from the soil of a cave, pointing to some biotechnological potential. To the best of our knowledge, there are no studies on the fungal species richness from bat caves in Brazil (including fungi that are airborne, found on bats, and in the guano), particularly in the Brazilian tropical dry forest.

The Brazilian territory occupies more than 53% of South America and is recognised as one of the most megadiverse countries in the world [32-33]. The Caatinga, located in Northeastern Brazil, is part of the so-called Dry Diagonal of South America and is recognized as one of the most diverse dry forests globally [34]. Further, the most number of known bat caves in Brazil are located in this region [2]. The fauna, flora, and fungi of the Caatinga dry forest have recently received a lot of attention as a result of several studies describing new taxa, ecological patterns, and behaviour of species [35-37], and also because of the anthropic pressure and plans for conservation of natural areas [38-39]. Nevertheless, the Caatinga's fungal diversity is better known in association with soil, plants, and as decomposers [40-41], but the mycodiversity associated with bats, which is about 96 species in this biogeographic region [2, 42], is still unexplored.

Given the fungal diversity associated with bats, their habitats and substrates being poorly known and studied, and considering that this is even more critical in megadiverse and continental-sized countries like Brazil, in this study we 1) assessed the fungal species richness of airborne fungi from a bat cave in a poorly-sampled part of the country, 2) analysed the fungal presence in three microhabitats on the body of bats (oral cavity, fur, and wing membrane), and 3) detected fungi associated with guano (fresh and non-fresh) from bats with different eating habits (insectivorous, frugivorous, and hematophagous).

Material and methods

Study area

The Catimbau National Park (IUCN Category II) is located in the state of Pernambuco, North-eastern Brazil (8°24'00" and 8°36'35" S; 37°0'30" and 37°1'40" W) and it is part of the Caatinga domain—the largest, most species-rich tropical dry forest region in South America [37, 43]. With 62,292 ha, the Park falls within the administrative boundaries of three municipalities (Buíque, Ibimirim, and Tupanatinga) and the vegetation found here is a mosaic of dry forest and shrubs, including xeric and non-xeric species [43-44]. The region's climate is classified as hot semiarid climate (Bsh, according to the Köppen-Geiger classification), with an annual mean temperature of 23 °C and annual mean precipitation ranging from 486–975 mm, with rainfall being concentrated between April and June [45]. However, like the other regions of the Caatinga, rainfall is historically irregular and there may be long periods of drought.

Meu Rei is a sandstone cave localized in the Catimbau National Park (Tupanatinga municipality, Pernambuco state, Brazil), about 162 m long, with a single entrance, and divided into four main chambers [4, 46] (Figs 1 and 2). This cave is considered a bat cave due to the large colony using it as a shelter. The colony sometimes reaches ~120,000 individuals,

constituting mainly of the insectivorous bat *Pteronotus gymnonotus* (family Mormoopidae) [2]. In addition to *P. gymnonotus*, at least nine other bat species belonging to the Natalidae and Phyllostomidae families—including frugivorous, sanguinivorous, nectarivorous, and omnivorous species—use this cave for shelter [2, 47]. Measurements collected in the central and deepest portions of the cave recorded an average ambient temperature of 25 °C and 28 °C and relative humidity of 80% and 87%, respectively [47]. Fieldwork was authorized by licenses from MMA/ICMBio (SISBIO numbers 43816-1 and 43816-2) and the Ethics Committee on Animal Care–UFPE (number 23076.027916/2015-13) and was conducted in September 2017. Bat captures and handling methods followed the guidelines of the American Society of Mammalogists [48].

Fig 1. *Meu Rei* bat cave. A. The geographical location of the cave at the Parque Nacional do Catimbau [Catimbau National Park], Tupanatinga municipality, Pernambuco state, Brazil. B. Cave sketch showing the entrance (E), presence of guano (#), and the four sampling points (1, 2, 3, and 4). Cave sketch was prepared based on the sketch drawn by the CECAV/ICMBio-MMA, Brazil.

Fig 2. *Meu Rei* bat cave at the Parque Nacional do Catimbau [Catimbau National Park], Pernambuco state, Brazil. A. Outside frontal view of the cave. B. Detail of the cave entrance. C. Petri dishes that were used to sample airborne fungi at the sampling point 2 (cave floor was composed of soil and guano). D. Sampling point 4 showing cave floor covered with bat guano. E. Sample collection of fungi from the wing membrane of *Diphylla ecaudata*. F. Sample collection of fungi from the oral cavity of *D. ecaudata*. G. Frugivorous guano of *C. perspicillata* (some seeds can be seen). H. Hematophagous guano of *Diphylla ecaudata* on a rock (fungal

mycelia were observed colonising the guano). Photos were taken by A.O.B. Cunha, E. Barbier, and N.T. Pimentel.

Sampling stations

In order to verify the diversity of fungi along the linear development of the cavity, we sampled at four points: 15 m (point 1), 45 m (point 2), 75 m (point 3), and 135 m (point 4) from the cave entrance (Figs 1 and 2). Samples to evaluate airborne fungi and, whenever possible, guano samples were collected at these four pre-defined points. These points were defined not only because they represent a gradient of light, airflow, temperature, humidity, and entrance distance, but because they also harbour bat colonies of different species, as follow: Point 1 = *Diphylla ecaudata*; Point 2 = *Carollia perspicillata* and *Glossophaga soricina*; Point 3 = *Lonchorhina aurita* and *Tonatia bidens*; and Point 4 = *Anoura geoffroyi*, *Natalus macrourus*, *P. gymnonotus*, and *P. personatus*. *Desmodus rotundus* sporadically used point 1 as shelter but they were not observed when we were sampling.

Airborne fungi sampling and isolation

Airborne fungi sampling was performed during the night (~ 7:00 pm) after the bats left the cave for foraging (Fig 2C). The gravity settling method using 90 mm Petri dishes with Dichloran-Rose Bengal Chloramphenicol (DRBC) agar and Brain Heart Infusion (BHI) agar culture media was used for the isolation of fungi from the cave air [see 16, 21]. Six Petri dishes (three for each culture medium) were randomly distributed at each point (see Sampling stations section). At each sampling point, the Petri dishes were positioned 1 m above the ground level and opened simultaneously. These were left open for 20 min, after which, the plates were closed, labelled, and taken to the laboratory. The incubation of the plates was carried out at 28

°C for at least seven days in the dark. Selected fungal colonies were sub-cultured using Sabouraud dextrose agar medium plus chloramphenicol (100 mg/L) to restrict bacterial growth.

Capturing bats, sampling, and fungal isolation

Bats were captured inside the cave between 4:00 pm and 4:30 pm, using a hand net. Three individuals of *C. perspicillata* (frugivore) and four of *D. ecaudata* (sanguivore) were captured during this study and released once samples were taken (Fig 2E-F). From each individual, samples were collected from three microhabitats on the bat's body: oral cavity, fur (belly and back), and wing membrane (ventral and dorsal surface). Samples were collected using sterile swabs that were pre-moistened with sterilized water plus chloramphenicol (0.1 mg/L). These were gently introduced in the oral cavity, and were rolled back-and-forth three times across the bat fur and wing membrane. Swabs were then individually placed in sterilized 15 mL conical centrifuge tubes containing water plus chloramphenicol (0.1 mg/L), labelled, stored chilled, and shipped for processing. At the laboratory, conical centrifuge tubes were shaken and 2 mL of the solution was used to inoculate Petri dishes containing the BHI and Sabouraud dextrose agar media. Petri dishes containing BHI were incubated at 28 °C and the plates containing Sabouraud dextrose agar at 37 °C, both for at least seven days in the dark. Fungal growth was observed every day, and all the colonies were isolated and purified using Sabouraud dextrose agar medium supplemented with chloramphenicol (100 mg/L).

Guano sampling and fungal isolation

Fresh and non-fresh guano were collected from bats with different eating habits: insectivorous (*Pteronotus* spp.), frugivorous (*C. perspicillata*), and hematophagous (*D. ecaudata*) (Fig 2G-H). The guano from these bat species were chosen due to the individuals' fidelity to certain places inside the cave, allowing a correct association with the bat and due to

the availability of the samples. At the laboratory, 1 g from each guano pile was placed into a 250 mL Erlenmeyer flask containing 9 mL of distilled and sterilized water plus chloramphenicol (0.1 mg/L). Erlenmeyer flasks (9 mL water + guano) were manually shaken and used to make a dilution up to 10^{-4} from which 1 mL was used to inoculate Petri dishes with DRBC agar and Sabouraud dextrose agar plus chloramphenicol (100 mg/L) [see 16, 21]. Petri dishes were incubated at 28 °C for at least seven days in the dark, and representative isolates of the total fungal colonies grown were isolated and purified using Sabouraud dextrose agar plus chloramphenicol (100 mg/L).

Fungal identification

Fungal isolates obtained in this study were first grouped into morphospecies based on macro and micromorphological features. Thereafter, molecular analyses were undertaken. Colonies were grown on potato dextrose agar (PDA) or malt extract agar (MEA); after at least seven days of incubation at 28 °C in the dark these were used to perform DNA extraction following the manufacturer's protocol for the Wizard Genomic DNA Purification Kit. The primers ITS5/ITS4 [49], LR0R/LR5 [50-51], and Bt2a/Bt2b [52] were used to amplify the ITS rDNA region, part of the LSU (D1/D2 domains) region, and the *TUB2* gene, respectively. The amplifications (PCR analyses) were conducted following the protocols as described by Bezerra et al. [53]. The manufacturer's instructions for the BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit v.3.1 were used for the amplicon sequencing using the same primer sets. Sequence assembly and edition were performed using MEGA v.7 [54] and later deposited in GenBank (S1 Table).

Phylogenetic analyses were performed using sequences obtained in this study with reference sequences obtained from the GenBank database and following taxonomic papers for each genus. Selected sequences were aligned with our sequences using the online tool MAFFT v.7 [55] and edited manually using MEGA v.7 [54]. First, DNA sequences were organised by

fungal groups (e.g. each genus, genera from the same family/order, or sections in genera such as *Aspergillus* and *Penicillium*) producing about 35 small sequence alignments, which were analysed independently using the maximum likelihood (ML) analysis. These analyses were performed using only ITS (filamentous fungi), LSU (D1/D2 domains) (yeasts), or *TUB2* (selected strains of the filamentous fungi *Aspergillus*, *Penicillium*, and *Talaromyces*) (data not shown). Next, all the small ITS, LSU, and *TUB2* alignments were used to construct three big alignments using sequences from GenBank (ITS = 351, LSU = 78, and *TUB2* = 49) and the sequences obtained in this study (ITS = 121, LSU = 26, and *TUB2* = 15) which were analysed using Bayesian inference (BI) analysis. BI and ML analyses were conducted with MrBayes v 3.2.7a [56] on XSEDE and RAxML-HPC BlackBox v 8.2.12 [57], respectively, at the CIPRES Science Gateway [58]. The best nucleotide model for the BI analysis was estimated using the program MrModelTest v.2.3 [59] (ITS and LSU = GTR + I + G, and *TUB2* = HKY + I + G). The GTR + I + G model was used for the ML analysis. BI analysis was conducted with 1×10^7 generations, a burning value of 40%, and chains were sampled every 1000 generations; ML analysis was conducted with 1,000 bootstrap replicates. Values equal or higher than 0.95 BI posterior probability (BPP) are shown near nodes. Alignments were deposited in TreeBASE (study ID S26796).

Data analyses

The fungal abundance was considered as the total number of colonies (colony forming units, CFU) and the values were submitted to ANOVA using the F test with a probability level of 0.05 and 0.01; for the significant results, Tukey test was done. Airborne fungi and those in guano were evaluated as the total number of CFU and richness of fungal species, while those on the body of the bats were quantified by the richness and abundance (CFU) of each species. We tested for statistically significant differences among the fungal species found in the air,

guano, and on bats. Bray-Curtis coefficient was employed to verify the similarity among fungal communities. We also checked for possible differences between the richness of fungi associated with the oral cavity, fur, and bat wing (using the data for *C. perspicillata* and *D. ecaudata* together). Furthermore, we looked for differences in the composition of fungal species associated with the same bat species, but found in different microhabitats (i.e. oral cavity, fur, and wing). For these analyses, we used Kruskal-Wallis test (H) followed by a post-hoc Dunn's test for multiple paired comparisons. Lastly, we compared the fungal species richness found on *C. perspicillata* and *D. ecaudata*, but this was done individually for each of the three sampled micro-habitats. For these, we used the Mann-Whitney U test. In all analyses, we used the SigmaPlot version 14.0 (Systat Software, San Jose, CA) with a significance level of $P \leq 0.05$.

Results

General fungal abundance and richness

The fungal abundance (total number of CFU) was highest in guano samples (683 colonies), followed by air (673), and bats (105) (Fig 3, S2 Table). Fungal isolates (bats = 104 isolates, air = 34, and guano = 26) were identified using phylogenetic analysis of DNA sequences in 59 taxa. The phylum Ascomycota was the most common with 50 taxa, followed by Basidiomycota (eight), and Mucoromycota (one) (Figs 4 and 5, S3 Table). In Ascomycota (28 genera), the genus *Aspergillus* presented the largest number of taxa (12), followed by *Penicillium* (five), *Cladosporium* (three), and *Talaromyces* (three). Other ascomycetous genera were represented by at least one or two taxa. All genera (eight) in Basidiomycota were represented by one taxon, *Rhodotorula* cf. *mucilaginosa* (isolated from bats), which was the most abundant (six isolates). *Rhizopus arrhizus* (only isolated from bats) was the only representative of Mucoromycota (Fig 6, S3 Table). Fungal community similarity (Bray-Curtis coefficient) showed that although the fungal richness in the air and guano samples were about

25% similar, the difference was sufficient to make them cluster differently from that of samples taken from bats (Fig 7).

Fig 3. Fungal abundance (CFU). Mean number of colonies (CFU) observed in the samples that were collected to determine airborne fungi (A), those on bats (B), and those found in the guano (C) from the *Meu Rei* bat cave, Catimbau National Park, Caatinga dry forest, Pernambuco state, Brazil. Cp = *Carollia perspicillata* and De = *Diphylla ecaudata*. F = fresh and NF = non-fresh guano. Different minuscule letter on the bars differ by the Tukey's test at 5% probability (A); different minuscule and capitalized letters on the bars differ by the Tukey's test at 5% probability (B and C).

Fig 4. ITS tree. Bayesian inference tree of ITS sequences from fungal isolates of Ascomycota, Basidiomycota, and Mucoromycota found as airborne and isolated from bats and guano in the *Meu Rei* bat cave located in the Parque Nacional do Catimbau [Catimbau National Park], Pernambuco state, Northeastern region, Brazil. Isolates obtained in this study are in bold. *Septoglomus constrictum* (08-48-12 and 08-48-17) was used as the outgroup.

Fig 5. LSU tree. Bayesian inference tree of LSU sequences from isolates of yeasts from the Ascomycota and Basidiomycota phyla that were isolated from bats in the *Meu Rei* bat cave, located in the Parque Nacional do Catimbau [Catimbau National Park], Pernambuco state, Northeastern region, Brazil. Isolates obtained in this study are in bold. *Neurospora sitophila* (CBS 112.19) was used as the outgroup.

Fig 6. General fungal richness. Richness of airborne fungi and fungal species associated with bats and guano in the *Meu Rei* bat cave at the Parque Nacional do Catimbau [Catimbau National Park], Pernambuco state, Brazil.

Fig 7. Fungal community similarity. Bray-Curtis coefficient showing the similarity of fungal communities that were airborne, with those associated with bats and their guano in the *Meu Rei* bat cave at the Parque Nacional do Catimbau [Catimbau National Park], Pernambuco state, Brazil.

Airborne fungi

From the samples collected to study airborne fungi we obtained 673 CFU, (527 were obtained using BHI and 146 using DRBC culture media). The sampling point 4 had the highest

fungal abundance ($F = 8.13$ at 1% probability) (Fig 3A, S2 Table). The richness of airborne fungi was the second-highest (23 taxa) (Fig 6). Considering the sampling points defined from the cave entrance, point 1 presented a fungal richness of 11 taxa, followed by point 2 (10 taxa), point 3 (four taxa), and by point 4 (two taxa). With five taxa, *Aspergillus* was the most representative genus in Ascomycota (mainly reported at point 1), and each genus in Basidiomycota was represented by one taxon (recorded at points 1, 2, and 3). Other genera commonly reported as airborne, such as *Cladosporium* and *Penicillium*, were also obtained at points 1 and 3 (S1 Fig, S3 and S4 Tables). At points 2, 3, and 4 we found *Aplosporella* sp., *Diaporthe* sp., and *Neodidymella* sp., which have been mainly reported in association with plant species, and *Beauveria bassiana*, a species commonly recorded as entomopathogenic fungus. Isolates belonging to *Aplosporella*, *Neodidymella*, and *Nothophoma*, which have never been reported in caves earlier, were also found to be airborne in this cave (S3 Table).

Bat fungi

Bats had the lowest fungal abundance (105 CFU) (Fig 3B, S2 Table); on the other hand, they had the highest fungal richness. While all the captured bats showed fungal associations, we found a greater fungal abundance in the vampire bat *D. ecaudata*. The wing membrane had the largest number of fungi (45 CFU of 21 taxa, of which nine were exclusive), followed by the bat fur (35 CFU of 20 taxa, of which nine were exclusive), and the oral cavity (25 CFU of 11 taxa, of which four were exclusive) (Figs 6 and 8, S2 Fig, S3 and S5 Tables). Interestingly, all yeasts obtained in this study were isolated from bats, the largest number of taxa (four) being recorded in the oral cavity. The yeast species *Candida* spp. was isolated from all three bat microhabitats that we studied, and *Rhodotorula* cf. *mucilaginosa* was found in the oral cavity and on wing membranes (three isolates from each microhabitat). *Aspergillus* was the most representative genus (seven taxa) and the bat fur had four of these taxa. The unique

Mucoromycota species, *Rhizopus arrhizus*, was found on the fur of *C. perspicillata* and on the wing membrane of *D. ecaudata*. Five taxa found as bat fungi were also observed as airborne and four others were also isolated from guano. *Deniquelata quercina* and *Rhinocladiella similis* on *D. ecaudata*; *Fusarium* sp. *F. fujikuroi* complex and *Ochroconis* cf. *musae* on *C. perspicillata* and *D. ecaudata*, which are commonly found as plant pathogens, as endophytes, saprobes, or opportunistic pathogens, and *Paecilomyces* cf. *formosus* on *D. ecaudata*; and *Purpureocillium* cf. *lilacinum* on *C. perspicillata* and *D. ecaudata*, which are reported as thermophiles or as entomopathogens, were also isolated from the bats (Fig 9). Similar to air samples, bats had six fungal taxa—*D. quercina*, *Nothophoma* sp., *Polyschema* sp., “*Chondrostereum* sp.”, *Kwoniella* cf. *dendrophila*, and *Sakaguchia* sp.—which are being reported from a cave environment for the first time (S3 and S5 Tables).

Fig 8. Fungal communities in the different microhabitats on the body of bats. Fungal richness (A) and taxa distribution (B) associated with different microhabitats (oral cavity, fur, and wing membrane) of the bats *Carollia perspicillata* (Cp) and *Diphylla eucadata* (De) in the *Meu Rei* bat cave, located at the Parque Nacional do Catimbau [Catimbau National Park], Pernambuco state, Northeastern region, Brazil.

Fig 9. Fungal genera that were found on bats. Selected fungal genera exclusively associated with different microhabitats (oral cavity, fur, and wing membrane) of the bats *Carollia perspicillata* and *Diphylla eucadata* in the *Meu Rei* bat cave, in the Parque Nacional do Catimbau [Catimbau National Park], Pernambuco state, Brazil. Fungal illustrations were mainly redrawn from book “The genera of hyphomycetes”.

Guano fungi

Guano had the highest fungal abundance (683 CFU); the guano of frugivorous species was significantly different from the guano of insectivorous and hematophagous, which did not differ from each other significantly ($F = 16.93$ at 1% probability) (Fig 3C, S2 Table). The fungal

richness did not differ greatly between insectivorous, frugivorous, and hematophagous bats or between fresh and non-fresh guano. A total of 10 taxa were identified, of which five were exclusively found only in the guano (Fig 10). The guano of insectivorous and frugivorous had two exclusive taxa each (*Aspergillus* sp. 4 section *Polypaecilum* and *Paecilomyces* cf. *formosus* in the insectivorous bat guano and *A. sydowii* and *H. cf. seminuda* in the frugivorous bat guano), while hematophagous had one (*P. citrinum*). Interestingly, *Aspergillus* sp. 4 section *Polypaecilum*, *P. cf. formosus*, and “*Rigidoporus* sp.” were isolated from guano of insectivorous bats while *Aspergillus* and *Penicillium* taxa were the main taxa isolated from the other guano samples (Fig 10, S6 Table).

Fig 10. Fungi from bat guanos. Fungal richness associated with bat guano (insectivorous, frugivorous, and hematophagous) in the Meu Rei bat cave, in the Parque Nacional do Catimbau [Catimbau National Park], Pernambuco state, Brazil.

Comparing fungus species richness

There was a highly significant statistical difference in the fungal species richness recorded in the air, bat, and guano samples ($H = 23.948$, $P < 0.001$), indicating the segregation of species within the cave environment. When analysed together (i.e. fungal species in *C. perspicillata* and *D. ecaudata*), there was a difference in the mycobiota associated with the microhabitats in the bats’ body ($H = 6.687$, $P = 0.035$), suggesting that certain fungal species showed a preference for specific areas. Analysing the fungal species richness in the microhabitats separately for each bat species, there was no significant difference for *D. ecaudata* ($H = 5.806$, $P = 0.063$) (S7 Table). Also, the fungal species richness found in oral cavities, fur, or wings did not differ significantly between *C. perspicillata* and *D. ecaudata* (see S8 Table for details).

Discussion

Worldwide, only few mycological studies have been undertaken in bat caves, and there is a gap in our knowledge of this mycobiome in tropical and subtropical countries [5, 18]. Our study indicated a high fungal species richness and diversity associated with a bat cave in Brazil's Caatinga drylands. Further, the highest fungal species richness was observed on the bat's bodies, particularly on their wing membranes, which highlights the possible role of bats as the main spore vectors between the epigeal and subterranean parts. The airborne speleomycology of the *Meu Rei* bat cave in Brazil was estimated at four sampling points at increasing distance from the cave entrance, and we found that the fungal abundance was lower near the cave entrance and increased inwards to the fourth point (135 m from the cave entrance), where *A. geoffroyi*, *N. macrourus*, *P. gymnonotus*, and *P. personatus* were found in abundance. On the other hand, the fungal richness was higher near the cave entrance and decreased towards the interior of the cave.

In a Brazilian cave, the number of terrestrial filamentous fungi was found to be higher deeper inside than at the entrance of the cave [30]. Similar results of airborne fungi were found in an active gold mine in South Africa [60]. Our findings are not in congruence with studies which showed that the fungal abundance is higher near cave entrances than in the interiors of the cave. However, our findings agree with the higher fungal richness near the cave entrance [e.g. 5, 27, 61]. Thus, in our study, the higher fungal richness at the cave entrance may be the result of fungal material being transported in the wind. But deeper inside the cave, material transported solely by the wind would not be able to reach the most distant parts, and bats would then become the main dispersal agent. Considering that the largest bat colonies are located in the deepest parts of the *Meu Rei* cave, this could explain the higher fungal densities that were observed there.

Studying a bat reserve in Poland with nearly 38,000 bats from 12 species, Kokurewicz et al. [11] found that most of the airborne fungi were isolated from inside the underground corridors than from the external environment. The authors also showed that the fungal concentration increased with the increase in the number of bats in the cave, showing that bats are the primary factor that determines the number of airborne fungi in hibernation sites [11]. Other authors have also highlighted that the mycobiome in caves may be influenced by the presence of bats which are responsible for the fungal dispersion [5, 13, 22, 62].

The most commonly found airborne fungi in caves worldwide (*Aspergillus*, *Penicillium*, and *Cladosporium*) were also found in the *Meu Rei* bat cave. Species belonging to these genera were commonly found by speleomycological studies in European and in tropical and subtropical countries [5]. For example, *Penicillium urticae* (currently *P. griseofulvum*) was the most frequently found species in a cave in Slovakia [20]. Similar results were found in Poland (where, in addition, *Cladosporium* was one of the most isolated fungi) [11], in a show cave in Spain [63], and from karst caves in China [16]. In Brazil, *Aspergillus* and *Penicillium* were the most abundant fungi found in different substrates of caves [e.g. soil and dry sediment] [21, 27, 29-31]. Other fungal taxa also reported in association with plants or as entomopathogenic fungus were also found as airborne fungi in our study [e.g. 5, 13, 16, 18].

Bats had the lowest fungal abundance and the highest species richness. The fungal abundance and richness for each bat microhabitat was also distinct, with the wing membrane showing higher values for both. Fur and skin of live bats can harbour a surprisingly higher fungal diversity than cave soils, which may be explained by the movement of bats between the surface and subterranean environments [5, 13, 64]. In the USA, wings of 30 bats from five bat hibernacula were found to be dominated by *Cladosporium*, *Fusarium*, *Geomyces*, *Mortierella*, *Penicillium*, and *Trichosporon*; *Geomyces* isolates were mainly obtained from damaged wings

[87]. Based on their discovery, Johnson et al. [87] highlighted that fungi found on bat wings rather than the fungi actively growing in this environment were an important reservoir of fungal spores in caves. The authors also suggested that some of these fungi, mainly *Geomyces* species, may act as minor pathogens living on bat wings.

The patterns of fungal species distribution on bats that we recorded in our study were also observed in other studies. A large number of fungi commonly reported to be free-living in the environment or as being associated with plants were also found on the skin and fur of two subspecies of bent-winged bats in Australia [22]. The authors also showed that although all the bats that were examined carried fungi, the fungal community of some bats was dominated by a single species (e.g. *Aspergillus flavus*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Sporobolomyces roseus*, or *Ulocladium chartarum*). Similar to our work, species of yeasts were commonly isolated from bats and *R. mucilaginosa* was the most frequently isolated species in Australia [22]. New species were also described from bats; for example, a new cold-tolerant *Malassezia* species was isolated from the skin of bats in the subfamily Myotinae [23], and we also described a new *Geosmithia* species isolated from wing membrane of the frugivore bat *C. perspicillata* [65].

The role of the guano deposits produced by bats in harbouring fungi is also an important aspect to consider. In our study, guano had the highest fungal abundance (CFU), but the lowest richness. Non-fresh insectivorous and hematophagous guanos had the highest number of CFUs, while the fresh frugivorous guano had the lowest number. Bat guano is one of the most important reservoirs of nutrients in the cave environment and it is also a valuable source for invertebrate communities that may eat it directly or feed on the fungal species growing on the guano piles [5, 66-67]. The origin (frugivorous, insectivorous, or hematophagous bats) and type (fresh and non-fresh) of the guano may also influence its composition (e.g. carbon, nitrogen, phosphorous, and polysaccharides) and pH [67-69].

Although, in general, fresh guano is basic (pH 8.5–9.0) and non-fresh guano is acidic (pH 5.0–5.5), the pH may vary with the deposition volume of urine, and with the age and depth of guano piles [67-69]. Some studies have highlighted that bat guano may also affect the fungal abundance and richness in caves because guano can act as a common organic source for fungi and other organisms like invertebrates [5, 20, 70].

The number of fungal isolation can vary due to the point of collection, and the origin and type of guano. In a show cave in Brazil, the largest number of fungal colonies was found in a fresh mixed guano deposition than as airborne [21] and a similar amount was found from non-fresh bat guano in two Slovakian caves [71]. An interesting result was obtained in Romania where, in caves with 3–10 bat species (varying from 200–7,000 individuals), a maximum number of fungi were obtained from bat guano [70]. In our study, the difference of fungal abundance in fresh and non-fresh insectivorous, frugivorous, and hematophagous guanos is an interesting finding which could help future studies identify and use distinct composition and pH of culture media to recover a larger number of fungi. Fungal species can also require special compounds (e.g. carbon source) and specific incubation temperature to grow in artificial conditions. Different methods have been used to isolate or to observe fungi living in guano samples, and these may also influence the observation of culturable fungal abundance and richness [16, 21, 70-72]. Metagenomic methods can also help in the study of fungal diversity in caves [e.g. 12, 22, 61, 73].

Samples collected from the bat's body (first) and from the air (second) had more fungal richness than bat guano (nine taxa, *Aspergillus* (three) and *Penicillium* (two) were the most common). Species of *Aspergillus* and *Penicillium* were commonly found in bat guano in Puerto Rico [72], Brazil [21], and Slovakia [71] along with other species of *Cladosporium*, *Purpureocillium*, *Trichoderma*, and *Xylaria*. In insectivorous bat guano, records of *Aspergillus*

sp. 2 section *Polypaecilum*, *Paecilomyces* cf. *formosus* (Ascomycota), and “*Rigidoporus* sp.” (Basidiomycota) are noteworthy, showing that the guano composition may influence and determine fungal growth. Species placed in *Aspergillus* section *Polypaecilum* are mainly treated as xerotolerant/xerophilic and halotolerant/halophilic and found in built environments [74]. However, a recent species was described from marine sediments in Mexico [75]. Species of *Paecilomyces* were found in acidic habitats and can tolerate microaerophilic conditions; however, *P. formosus* can also be found causing plant diseases and as an opportunistic pathogen in humans [76-78]. Basidiomycota taxa needs substrates rich in nutrients (such as wood and dung) to grow in cave environments, and species included in the genus *Rigidoporus* are mainly found as plant pathogens [5, 72, 79]. Interestingly, new species of *Amphichorda*, *Gymnoascus*, and *Microascus* were found on bat guano in China [16], and like in our study, none of these studies reported the presence of *Histoplasma* associated with bat guano.

Clinical importance of fungal taxa in the *Meu Rei* bat cave

The mycobiome of the *Meu Rei* bat cave harbours fungal genera which have species that are suspected to be causative agents of allergies or are potential opportunistic pathogenic fungi. Species of *Aspergillus* were the most isolated species in our study and requires special attention because they can cause aspergilloses in immunosuppressed people [80-81]. *Cladosporium* and *Candida* isolates were mainly found on bats, and some species in these genera are also known to be medically important as allergenic or opportunistic pathogens [80, 82], respectively. *Rhodotorula* species, which we found on bats, are common in environmental samples, but have emerged as opportunistic pathogens of humans [80, 83]. Other examples of genera found in the *Meu Rei* bat cave mycobiome and having species of clinical importance are *Purpureocillium* [84], *Rhinocladiella* [80, 85], and *Rhizopus* [80, 86].

Fungal diversity and bat cave conservation

Caves like *Meu Rei* are exceptional bat roosts, frequently harbouring high bat species richness. This is particularly true in the Caatinga dry forest in Brazil [2, 4]. Here, for the first time in Brazil, the speleomycology of a bat cave was unravelled, revealing a remarkable diversity. Eight (21.6 %) of the 37 genera (Ascomycota = *Aplosporella*, *Deniquelata*, *Neodidymella*, *Nothophoma*, and *Polyschema* and Basidiomycota = “*Chondrostereum*”, *Kwoniella*, and *Sakaguchia*) and 17 (53.1 %) of the 32 identified species are being reported for the first time from caves worldwide, and all fungi discovered in this study are formally recorded for the first time in a bat cave. In the world review of cave fungi, Vanderwolf et al. [5] listed 1,029 species from 518 genera and showed that about 59% of the taxa were reported from a single location, and many species were rarely isolated. Subsequently, other studies added more fungal taxa to that list, increasing the number of fungi found in caves [e.g. 11, 15-18, 20-27, 64, 71, 87-88]. In two karst caves in China, Zhang et al. [16] reported that 28 (24%) of the 116 genera and 111 (59 %) of the 188 identified species were reported for the first time in cave environments. Subsequently, Zhang et al. [18] described 33 new fungal species and found about 30% of the genera and 53% of the species for the first time in karst caves in China. Thus, the known number of fungal species documented from cave environments has increased to nearly 2,000 fungal species. Such examples highlight the large potential such sites may have to harbour unknown fungal species.

Our study of the culturable mycobiome in a Brazilian bat cave revealed a remarkable fungal diversity, including taxa unknown in cave environments and new species that will be described in further detail elsewhere. The fungal diversity in caves has a distinct distribution pattern which can be influenced by cave apertures, air current, bats presence, and guano deposition, among other factors; however, several common species found in these environments are also reported from outside the cave, mainly in association with plants and soil. Bats had the most important contribution to the fungal abundance and richness in a bat cave in the Caatinga

dry forest, and this finding should be considered in future speleomycological studies. As shown by Zhang et al. [7], fungal communities in these locations are from land surface and it explains common fungal species found in that biome, as ‘the geographic history of caves appeared to be too short for fungal speciation’. The inclusion of methods to study the non-culturable fungal diversity in caves will also help in the recovery of fungi that remain undetected in these subterranean environments. Further studies are being carried out in other caves in Brazil’s Caatinga drylands, which will help in the understanding of fungal community composition, will contribute to the national and global fungal estimation, and augment appeals for the preservation of the Caatinga.

Acknowledgments

We are grateful to the teams from the “Laboratório de Ciência Aplicada à Conservação da Biodiversidade” and the “Programa de Pesquisas Ecológicas de Longa Duração – PELD Catimbau” (especially Marcelo Tabarelli and Inara Leal) for their logistical and fieldwork support. We also would like to acknowledge Fundação Grupo Boticário de Proteção à Natureza and Anglo American for providing financial support for field work. We thank Capan and CECAV/ICMBio for all their support. We also thank Isaías de Oliveira Junior (MSc.), Tiago Cavalcante da Silva (MSc.), and reviewers for their comments for this paper.

References

1. Ladle RJ, Firmino JVL, Malhado ACM, Rodríguez-Durán A. Unexplored diversity and conservation potential of Neotropical hot caves. *Conserv Biol.* 2012;26: 978-982. doi: 10.1111/j.1523-1739.2012.01936.x

2. Otálora-Ardila A, Torres JM, Barbier E, Pimentel NT, Leal ESB, Bernard E. Thermally-assisted monitoring of bat abundance in an exceptional cave in Brazil's Caatinga drylands. *Acta Chiropterol.* 2019;21: 411-423.
<https://doi.org/10.3161/15081109ACC2019.21.2.016>
3. Taboada SG. Los murciélagos de Cuba. 1st ed. Cuba: Editorial Academia La Habana; 1979.
4. Azevedo IS, Bernard E. Avaliação do nível de relevância e estado de conservação da caverna “Meu Rei” no PARNA Catimbau, Pernambuco. *Rev Bras Espeleol.* 2015;1: 1-23.
5. Vanderwolf KJ, Malloch D, McAlpine DF, Forbes GJ. A world review of fungi, yeasts, and slime molds in caves. *Int J Speleol.* 2013;42: 77-96. doi: 10.5038/1827-806X.42.1.9
6. Chagas-Jr A, Bichuette ME. Synopsis of centipedes in Brazilian caves (Arthropoda, Myriapoda, Chilopoda), a hidden diversity to be protected. *ZooKeys.* 2018;737: 13-56.
<https://doi.org/10.3897/zookeys.737.20307>
7. Zhang Z-F, Zhao P, Cai L. Origin of cave fungi. *Front Microbiol.* 2018;9: 1407. doi: 10.3389/fmicb.2018.01407
8. Monro AK, Bystriakova N, Fu L, Wen F, Wei Y. Discovery of a diverse cave flora in China. *PLoS ONE.* 2018;13: e0190801. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190801>
9. Bystriakova N, Melo PHA, Moat J, Lughadha EN, Monro AK. A preliminary evaluation of the Karst flora of Brazil using collections data. *Sci Rep.* 2019;9: 17037.
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-53104-6>
10. Mammola S, Cardoso P, Culver DC, Deharveng L, Ferreira RL, Fišer C, et al. Scientist’s warning on the conservation of subterranean ecosystems. *BioScience.* 2019;69: 641-650. <https://doi.org/10.1093/biosci/biz064>

11. Kokurewicz T, Ogórek R, Pusz W, Matkowski K. Bats increase the number of cultivable airborne fungi in the “Nietoperek” bat reserve in Western Poland. *Microb Ecol.* 2016;72: 36-48. doi: 10.1007/s00248-016-0763-3
12. Sharma L, Sousa M, Faria AS, Nunes-Pereira M, Cabral JA, Phillips AJL, et al. Worldwide recombination in emergent white-nose syndrome pathogen *Pseudogymnoascus destructans*. *bioRxiv.* 2019; 868331. doi: <https://doi.org/10.1101/868331>
13. Vanderwolf KJ, McAlpine DF, Malloch D, Forbes GJ. Ectomycota associated with hibernating bats in Eastern Canadian caves prior to the emergence of white-nose syndrome. *Northeast Nat.* 2013;20: 115-130. <https://doi.org/10.1656/045.020.0109>
14. Chen YY, Maharachchikumbura SSN, Liu JK, Hyde KD, Nanayakkara RR, Zhu GS, et al. Fungi from Asian Karst formations I. *Pestalotiopsis photinicola* sp. nov., causing leaf spots of *Photinia serrulata*. *Mycosphere.* 2017;8: 103-110. doi: 10.5943/mycosphere/8/1/9
15. Jiang J-R, Cai L, Liu F. Oligotrophic fungi from a carbonate cave, with three new species of *Cephalotrichum*. *Mycology.* 2017;8: 164-177. doi: 10.1080/21501203.2017.1366370
16. Zhang ZF, Liu F, Zhou X, Liu XZ, Liu SJ, Cai L. Culturable mycobiota from Karst caves in China, with descriptions of 20 new species. *Persoonia.* 2017;39: 1-31. doi: 10.3767/persoonia.2017.39.01
17. Zhang JF, Liu JK, Hyde KD, Yang W, Liu ZY. Fungi from Asian Karst formations II. Two new species of *Occultibambusa* (Occultibambusaceae, Dothideomycetes) from Karst landforms of China. *Mycosphere.* 2017;8: 550-559. doi: 10.5943/mycosphere/8/4/4
18. Zhang Z-F, Zhou S-Y, Eurwilaichitr L, Ingsriswang S, Raza M, Chen Q, et al. Culturable mycobiota from Karst caves in China II, with descriptions of 33 new species. *Fungal Divers.* 2020. <https://doi.org/10.1007/s13225-020-00453-7>

19. Nováková A, Kolařík M. *Chrysosporium speluncarum*, a new species resembling *Ajellomyces capsulatus*, obtained from bat guano in caves of temperate Europe. *Mycol Prog.* 2010;9: 253-260.
20. Ogórek R, Višňovská Z, Tančinová D. Mycobiota of underground habitats: case study of Harmanecká cave in Slovakia. *Microb Ecol.* 2016;71: 87-99. doi: 10.1007/s00248-015-0686-4
21. Taylor ELS, Resende-Stoianoff MA, Ferreira RL. Mycological study for a management plan of a Neotropical show cave (Brazil). *Int J Speleol.* 2013;42: 267-277. <http://dx.doi.org/10.5038/1827-806X.42.3.10>
22. Holz PH, Lumsden LF, Marenda MS, Browning GF, Hufschmid J. Two subspecies of bent-winged bats (*Miniopterus orianae bassanii* and *oceanensis*) in southern Australia have diverse fungal skin flora but not *Pseudogymnoascus destructans*. *PLoS ONE.* 2018;13: e0204282. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0204282>
23. Lorch JM, Palmer JM, Vanderwolf KJ, Schmidt KZ, Verant ML, Weller TJ, et al. *Malassezia vespertilionis* sp. nov.: a new cold-tolerant species of yeast isolated from bats. *Persoonia.* 2018;41: 56-70. <https://doi.org/10.3767/persoonia.2018.41.04>
24. Nogueira MR, Lima IP, Garbino GST, Moratelli R, Tavares VC, Gregorin R, et al. Updated checklist of Brazilian bats: version 2018.1. Comitê da Lista de Morcegos do Brasil - CLMB. 2018 [cited 18 may 2020]. In: Sociedade Brasileira para o Estudo de Quirópteros (Sbeq) [Internet]. Available from: www.sbeq.net/lista-de-especies.
25. Guimarães MM, Ferreira RL. Morcegos cavernícolas do Brasil: novos registros e desafios para a conservação. *Rev Bras Espeleol.* 2014;2: 1-33.
26. Oliveira HFM, Oprea M, Dias RI. Distributional patterns and ecological determinants of bat occurrence inside caves: a broad scale meta-analysis. *Diversity.* 2018;10: 49. <https://doi.org/10.3390/d10030049>

27. Taylor ELS, Ferreira RL, Cardoso PG, Stoianoff MAR. Cave entrance dependent spore dispersion of filamentous fungi isolated from various sediments of iron ore cave in Brazil: a colloquy on human threats whilecaving. *Amb Sci.* 2014;1: 16-28. doi: 10.21276/ambi.2014.01.1.ra02
28. Rocha-Silva F, Figueiredo SM, Silveira TTS, Assunção CB, Campolina SS, Pena-Barbosa JPP, et al. Histoplasmosis outbreak in Tamboril cave-Minas Gerais state, Brazil. *Med Mycol Case Rep.* 2014;4: 1-4. doi: 10.1016/j.mmcr.2013.12.002
29. Castrillón AL, Moraes MAP, Furtado MSS. Isolamento de *Microsporium amazonicum* do solo do estado do Amazonas, Brasil. *Acta Amazon.* 1976;6: 487-490.
30. Paula CCP, Montoya QV, Rodrigues A, Bichuette ME, Seleguim MHR. Terrestrial filamentous fungi from Gruta do Catão (São Desiderio, Bahia, Northeastern Brazil) show high levels of cellulose degradation. *J Cave Karst Stud.* 2016;78: 208-217. doi: 10.4311/2016MB0100
31. Paula CCP, Montoya QV, Meirelles LA, Sanchez CF, Rodrigues A, Seleguim MHR. High cellulolytic activities in filamentous fungi isolated from an extreme oligotrophic subterranean environment (Catão cave) in Brazil. *An Acad Bras Cienc.* 2019;91: e20180583. doi: 10.1590/0001-3765201920180583
32. Lewinsohn TM, Prado PI. How many species are there in Brazil? *Conserv Biol.* 2005;19: 619-624.
33. Mittermeier RA, Myers N, Thomsen JB, Da Fonseca GAB, Olivieri S. Biodiversity hotspots and major tropical wilderness areas: approaches to setting conservation priorities. *Conserv Biol.* 1998;12: 516-520.
34. Silva JMC, Leal IR, Tabarelli M. Caatinga: the largest tropical dry forest region in South America. 1st ed. Cham, Switzerland: Springer International Publishing; 2017.

35. Leal IR, Tabarelli M, Silva JMC. Ecologia e conservação da Caatinga. Recife, Brasil: Editora Universitária, Universidade Federal de Pernambuco; 2003.
36. Siqueira Filho JA. Flora das Caatingas do Rio São Francisco: história natural e conservação. Rio de Janeiro: Andrea Jacobsson Estúdio Editorial; 2012.
37. Silva JMC, Barbosa LCF, Leal IR, Tabarelli M. The Caatinga: understanding the challenges. In: Silva JMC, Leal IR, Tabarelli M, editors. Caatinga: The largest tropical dry forest region in South America. Cham, Switzerland: Springer International Publishing; 2017. pp. 3-19. doi: 10.1007/978-3-319-68339-3
38. Bernard E, Penna LAO, Araújo E. Downgrading, downsizing, degazettement, and reclassification of protected areas in Brazil. *Conserv Biol.* 2014;28: 1523-1739.
39. Oliveira U, Soares-Filho BS, Paglia AP, Brescovit AD, de Carvalho CJB, Silva DP, et al. Biodiversity conservation gaps in the Brazilian protected areas. *Sci Rep.* 2017;7: 9141. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08707-2>
40. Maia LC. Fungos do Parque Nacional do Catimbau [recurso eletrônico]. Recife: Editora UFPE; 2014.
41. Barbosa RN, Bezerra JDP, Santos ACS, Melo RFR, Houbraken J, Oliveira NT, et al. Brazilian tropical dry forest (Caatinga) in the spotlight: an overview of species of *Aspergillus*, *Penicillium* and *Talaromyces* (Eurotiales) and the description of *P. vascosobrinhou* sp. nov. *Acta Bot Bras.* 2020;34: 409-429. <https://doi.org/10.1590/0102-33062019abb0411>
42. Silva UBT, Delgado-Jaramillo M, Aguiar LMS, Bernard E. Species richness, geographic distribution, pressures, and threats to bats in the Caatinga drylands of Brazil. *Biol Conserv.* 2018;221: 312-322. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2018.03.028>
43. Rito KF, Arroyo-Rodríguez V, Queiroz RT, Leal IR, Tabarelli M. Precipitation mediates the effect of human disturbance on the Brazilian Caatinga vegetation. *J Ecol.* 2017;105: 828-838. doi: 10.1111/1365-2745.12712.

44. Ministério do Meio Ambiente (MMA), Brasil. Secretaria de Biodiversidade e Florestas. Biodiversidade brasileira: avaliação e identificação de áreas e ações prioritárias para a conservação, utilização sustentável e repartição dos benefícios da biodiversidade nos biomas brasileiros. Brasília: MMA/SBF; 2002.
45. Specht MJ, Santos BA, Marshall N, Melo FPL, Leal IR, Tabarelli M, et al. Socioeconomic differences among resident, users and neighbour populations of a protected area in the Brazilian dry forest. *J Environ Manage*. 2019;232: 607-614. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.11.101>
46. CECAV. Projeto monitoramento e avaliação de impactos sobre o patrimônio espeleológico. 2014 [cited 13 June 2020]. In: CECAV- Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Cavernas [Internet]. Brasília: CECAV ICMBio-MMA - [about 4 screens]. Available from: <https://www.icmbio.gov.br/cecav/projetos-e-atividades/monitoramento-do-patrimonio-espeleologico.html>.
47. Delgado-Jaramillo M, Barbier E, Bernard E. New records, potential distribution, and conservation of the Near Threatened cave bat *Natalus macrourus* in Brazil. *Oryx*. 2018;52: 579-586. <https://doi.org/10.1017/S0030605316001186>
48. Sikes RS. 2016 Guidelines of the American Society of Mammalogists for the use of wild mammals in research and education. *J Mammal*. 2016;97: 663-688. doi: 10.1093/jmammal/gyw078
49. White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor L. Amplification and direct sequencing of fungal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, editors. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. San Diego: Academic Press; 1990. pp. 315-322.

50. Vilgalys R, Hester M. Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. J Bacteriol. 1990;172: 4239-4246.
51. Vilgalys R, Sun BL. Ancient and recent patterns of geographic speciation in the oyster mushroom *Pleurotus* revealed by phylogenetic analysis of ribosomal DNA sequences. Proc Natl Acad Sci USA. 1994;91: 4599-4603.
52. Glass NL, Donaldson GC. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. Appl Environ Microbiol. 1995;61: 1323-1330.
53. Bezerra JDP, Oliveira RJV, Paiva LM, Silva GA, Groenewald JZ, Crous PW, et al. Bezerromycetales and Wiesneriomycetales ord. nov. (class Dothideomycetes), with two novel genera to accommodate endophytic fungi from Brazilian cactus. Mycol Prog. 2017;16: 297-309. <https://doi.org/10.1007/s11557-016-1254-0>
54. Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. Mol Biol Evol. 2016;33: 1870-1874.
55. Katoh K, Standley DM. MAFFT Multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. Mol Biol Evol. 2013;30: 772-780. doi: 10.1093/molbev/mst010
56. Ronquist F, Teslenko M, van der Mark P, Ayres DL, Darling A, Höhna S, et al. MrBayes 3.2: Efficient bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. Syst Biol. 2012;61: 539-542. doi: 10.1093/sysbio/sys029
57. Stamatakis A, Hoover P, Rougemont J. A rapid bootstrap algorithm for RAxML web-servers. Syst Biol. 2008;57: 758-771.

58. Miller MA, Pfeiffer W, Schwartz T. Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. In: 2010 Gateway Computing Environments Workshop (GCE). 2010. pp 1-8.
59. Nylander JAA. MrModeltest Version 2. Program Distributed by the Author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University; 2004.
60. Pohl CH, Kriel W, Venter P, Van Heerden E, Albertyn J. The diversity of culturable airborne fungi in an active South African gold mine. S Afr JSci. 2007;103: 277-278.
61. Vaughan MJ, Nelson W, Soderlund C, Maier RM, Pryor BM. Assessing fungal community structure from mineral surfaces in Kartchner Caverns using multiplexed 454 pyrosequencing. Microb Ecol. 2015;70: 175-187. doi: 10.1007/s00248-014-0560-9
62. Johnson LJA, Miller AN, McCleery RA, McClanahan R, Kath JA, Lueschow S, et al. Psychrophilic and psychrotolerant fungi on bats and the presence of *Geomyces* spp. on bat wings prior to the arrival of white nose syndrome. Appl Environ Microbiol. 2013;79: 5465-5471. doi: 10.1128/AEM.01429-13
63. Fernandez-Cortes A, Cuezva S, Sanchez-Moral S, Cañaveras JC, Porca E, Jurado V, et al. Detection of human-induced environmental disturbances in a show cave. Environ Sci Pollut Res. 2011;18: 1037-1045. <http://dx.doi.org/10.1007/s11356-011-0513-5>
64. Ogórek R, Kurczaba K, Cal M, Apoznanski G, Kokurewicz T. A culture-based ID of Micromycetes on the wing membranes of greater Mouse-Eared bats (*Myotis myotis*) from the “Nietoperek” site (Poland). Animals. 2020;10: 1337. doi: 10.3390/ani10081337
65. Crous PW, Luangsa-ard JJ, Wingfield MJ, Carnegie AJ, Hernández-Restrepo M, Lombard L, et al. Fungal Planet description sheets: 785–867. Persoonia. 2018;41: 238-417. doi: 10.3767/persoonia.2018.41.12

66. Poulson TL, Lavoie KH. The trophic basis of subsurface ecosystems. In: Wilkens H, Culver DC, Humphreys WF, editors. *Ecosystems of the world, subterranean ecosystems*. Amsterdam: Elsevier; 2000. pp. 231-249.
67. Moulds TA. The seasonality, diversity, and ecology of cavernicolous guano dependent arthropod ecosystem in southern Australia. PhD Thesis, The University of Adelaide. 2006. Available from:
<https://digital.library.adelaide.edu.au/dspace/handle/2440/37815>
68. Harris JA. Dynamics of a bat-guano cave ecosystem: with particular reference to the guano mite *Uroobovella coprophila* (Womersley). PhD Thesis, The University of Queensland. 1971. Available from: <https://espace.library.uq.edu.au/view/UQ:366058>
69. Iskali G, Zhang Y. Guano subsidy and the invertebrate community in Bracken Cave: the world's largest colony of bats. *J Cave Karst Stud*. 2015;77: 28-36. doi: 10.4311/2013LSC0128
70. Borda DR, Năstase-Bucur RM, Spînu M, Uricariu R, Mulec J. Aerosolized microbes from organic rich materials: Case study of bat guano from caves in Romania. *J Cave Karst Stud*. 2014;76: 114-126.
71. Ogórek R, Dylag M, Kozak B, Višňovská Z, Tančinová D, Lejman A. Fungi isolated and quantified from bat guano and air in Harmanecká and Driny Caves (Slovakia). *J Cave Karst Stud*. 2016;78: 41-49. doi: 10.4311/2015MB0108
72. Nieves-Rivera AM, Santos-Flores CJ, Dugan FM, Miller TE. Guanophilic in three caves of southwestern Puerto Rico. *Int J Speleol*. 2009;38: 61-70.
<http://dx.doi.org/10.5038/1827-806X.38.1.7>
73. Lorch JM, Lindner DL, Gargas A, Muller LK, Minnis AM, Blehert DS. A culture-based survey of fungi in soil from bat hibernacula in the eastern United States and its

implications for detection of *Geomyces destructans*, the causal agent of bat white-nose syndrome. *Mycologia*. 2013;105: 237-252. <https://doi.org/10.3852/12-207>

74. Tanney JB, Visagie CM, Yilmaz N, Seifert KA. *Aspergillus* subgenus *Polypaecilum* from the built environment. *Stud Mycol*. 2017;88: 237-267.
75. González-Martínez S, Galindo-Sánchez C, López-Landavery E, Paniagua-Chávez C, Portillo-López A. *Aspergillus loretoensis*, a single isolate from marine sediment of Loreto Bay, Baja California Sur, México resulting as a new obligate halophile species. *Extremophiles*. 2019;23: 557-568. <https://doi.org/10.1007/s00792-019-01107-6>
76. Samson RA, Houbraken J, Varga J, Frisvad JC. Polyphasic taxonomy of the heat resistant ascomycete genus *Byssochlamys* and its *Paecilomyces* anamorphs. *Persoonia*. 2009;22: 14-27. doi: 10.3767/003158509X418925
77. Heshmatnia J, Marjani M, Mahdavian SA, Adimi P, Pourabdollah M, Tabarsi P, et al. *Paecilomyces formosus* infection in an adult patient with undiagnosed chronic granulomatous disease. *J Clin Immunol*. 2017;37: 342-346. <https://doi.org/10.1007/s10875-017-0395-5>
78. Sabernasab M, Jamali S, Marefat A, Abbasi S. Molecular and pathogenic characteristics of *Paecilomyces formosus*, a new causal agent of oak tree dieback in Iran. *For Sci*. 2019;65: 743-750. <https://doi.org/10.1093/forsci/fxz045>
79. CABI. *Rigidoporus microporus* (white root disease of rubber). 2020 [cited 21 May 2020]. In: CABI Invasive Species Compendium [Internet]. CAB International – [about 4 screens]. Available from: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/47610>.
80. de Hoog GS, Gene H, Figueras MJ. Atlas of Clinical Fungi. 2nd ed. Spain: Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht/Universitat Rovira i Virgili; 2000.
81. Klich MA. Medically important species of *Aspergillus*. 6th International *Aspergillus* Meeting. 2009 [cited 22 May 2020]. In: *Aspergillus* et Aspergillosis Website [Internet].

Available from: <https://www.aspergillus.org.uk/content/medically-important-species-aspergillus>.

82. Magalhães YC, Bomfim MR, Melônio LC, Ribeiro PC, Cosme LM, Rhoden CR, et al. Clinical significance of the isolation of *Candida* species from hospitalized patients. *Braz J Microbiol*. 2015;46: 117-123. <https://doi.org/10.1590/S1517-838246120120296>
 83. Wirth F, Goldani LZ. Epidemiology of *Rhodotorula*: an emerging pathogen. *Interdiscip Perspect Infect Dis*. 2012; 465717. <https://doi.org/10.1155/2012/465717>
 84. Luangsa-Ard J, Houbraken J, van Doorn T, Hong S-B, Borman AM, Hywel-Jones NL, et al. *Purpureocillium*, a new genus for the medically important *Paecilomyces lilacinus*. *FEMS Microbiol Lett*. 2011;321: 141-149. doi: 10.1111/j.1574-6968.2011.02322.x
 85. Heidrich D, González GM, Pagani DM, Ramírez-Castrillón M, Scroferneker ML. Chromoblastomycosis caused by *Rhinocladiella similis*: Case report. *Med Mycol Case Rep*. 2017;16: 25-27. <https://doi.org/10.1016/j.mmcr.2017.04.002>
 86. Gryganskyi AP, Golan J, Dolatabadi S, Mondo S, Robb S, Idnurm A, et al. Phylogenetic and phylogenomic definition of *Rhizopus* species. *G3 (Bethesda)*. 2018;8: 2007-2018. <https://doi.org/10.1534/g3.118.200235>
 87. Nováková A, Kubátová A, Sklenář F, Hubka V. Microscopic fungi on cadavers and skeletons from cave and mine environments. *Czech Mycol*. 2018;70: 101-121.
- Held BW, Salomon CE, Blanchette RA. Diverse subterranean fungi of an underground iron ore mine. *PLoS ONE*. 2020;15(6): e0234208. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0234208>