



# ANAIS do 36º Congresso Brasileiro de Espeleologia

Brasília-DF, 20-23 de Abril de 2022



O artigo a seguir é parte integrando dos Anais do 36º Congresso Brasileiro de Espeleologia (CBE) disponível gratuitamente em [www.cavernas.org.br](http://www.cavernas.org.br).

Sugerimos a seguinte citação para este artigo:

GRISOLIA, M. E.; VICENTE, V. A.; SESSEGOLO, G. C.. Plano de manejo do monumento natural da gruta do Lago Azul, Bonito-MS: Os microorganismos associados às cavidades e sua importância para o uso público. In: MOMOLI, R. S.; STUMP, C. F.; VIEIRA, J. D. G.; ZAMPAULO, R. A. (org.) CONGRESSO BRASILEIRO DE ESPELEOLOGIA, 36, 2022. Brasília. *Anais...* Campinas: SBE, 2022. p.078-083. Disponível em: <[http://www.cavernas.org.br/anais36cbe/36cbe\\_078-083.pdf](http://www.cavernas.org.br/anais36cbe/36cbe_078-083.pdf)>. Acesso em: *data do acesso*.

Esta é uma publicação da Sociedade Brasileira de Espeleologia.  
Consulte outras obras disponíveis em [www.cavernas.org.br](http://www.cavernas.org.br)

## PLANO DE MANEJO DO MONUMENTO NATURAL DA GRUTA DO LAGO AZUL, BONITO/MS: OS MICROORGANISMOS ASSOCIADOS ÀS CAVIDADES E SUA IMPORTÂNCIA PARA O USO PÚBLICO

MANAGEMENT PLAN OF THE NATURAL MONUMENT OF THE LAGO AZUL GROUP, BONITO/MS: THE MICROORGANISMS ASSOCIATED WITH THE CAVITIES AND THEIR IMPORTANCE FOR PUBLIC USE

Maria Eduarda GRISOLIA (1); Vania Aparecida VICENTE (1,2); Gisele Cristina SESSEGOLO (3)

- (1) PPGEBB/UFPR – Pós-graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia
- (2) Coleções Microbiológicas da Rede Taxonline (CMRP/Taxonline).
- (3) GEEP-AÇUNGUI/Ecosystema Consultoria Ambiental

Contato: [duda.grisolia@gmail.com](mailto:duda.grisolia@gmail.com); [vaniava63@gmail.com](mailto:vaniava63@gmail.com); [gisele.sessegolo@gmail.com](mailto:gisele.sessegolo@gmail.com)

### Resumo

As cavernas podem ser consideradas como ambientes oligotróficos extremos que proporcionam nichos ecológicos altamente especializados para uma variedade de microrganismos. Desde o surgimento do Sequenciamento de Nova Geração (NGS), o montante genético do ambiente pôde ser acessado. Neste contexto, este estudo objetivou o uso de metagenômica, para o conhecimento da biodiversidade microbiana em ambientes subterrâneos como subsídio ao planejamento do uso público da unidade de conservação, o Monumento Natural da Gruta do Lago Azul em Bonito/MS. Para o estudo foram coletadas amostras de diferentes substratos da Gruta do Lago Azul (GLA) e da Gruta Nossa Senhora Aparecida (GNSA), sendo de sedimentos, matéria orgânica e guano de diferentes zonas de iluminação e profundidade em cada cavidade. Os resultados revelaram grande diversidade entre as grutas analisadas, observando um compartilhamento em torno de 5,84% considerando o total de abundância das unidades taxonômicas acessada, com 7,72% das espécies fúngicas (79 OTUs) e 3,41% bacterianas (27 OTUs), demonstrando a grande riqueza e especificidades considerando a proximidade geográfica destes ambientes. As análises revelaram alguns fungos considerados patógenos primários de hospedeiros humanos, encontrados em amostras de sedimento, matéria orgânica e guano, principalmente nas zonas de penumbra e afótica. Da mesma forma, entre os gêneros bacterianos destaca-se a presença de *Coxiella* sp em amostras de sedimentos das referidas zonas. Assim, os resultados obtidos subsidiaram decisões relativas ao manejo e zoneamento das cavidades, bem como determinaram as medidas de proteção aos visitantes, inseridas nas normas e no manejo do MNGLA.

**Palavras-Chave:** Monumento Natural da Gruta do Lago Azul; Gruta do Lago Azul; Gruta N.S. Aparecida; Micro-organismos patogênicos; Metagenoma; Plano de Manejo; Turismo

### Abstract

*Caves can be considered as extreme oligotrophic environments that provide highly specialized ecological niches for a variety of microorganisms. Since the emergence of Next Generation Sequencing (NGS), the genetic amount present in the environment could be accessed. In this context, this study aimed to use of metagenomics, for access of microbial biodiversity in underground environments, as a subsidy for the planning of the public use of the conservation unit, the Natural Monument of Gruta do Lago Azul in Bonito/MS. For the study, samples were collected from different substrates from Gruta do Lago Azul (GLA) and Gruta Nossa Senhora Aparecida (GNSA), consisting of sediments, organic matter and guano from different lighting zones and depth in each cave. The results revealed great diversity among the analyzed caves, observing a sharing of 5.84% of the total abundance of taxonomic units accessed, with 7.72% of fungal species (79 OTUs) and 3.41% of bacterial species (27 OTUs), demonstrating the great richness and specificities considering the geographical proximity of these environments. The analyzes revealed some fungi considered as primary pathogens of human hosts in samples of sediment, organic matter, and guano, mainly in the twilight and aphotic zones. Likewise, among the bacterial genera, the presence of *Coxiella* sp. in sediment samples from the mentioned zones. Thus, the results obtained supported decisions regarding the management and zoning of the caves, as well as determined the measures to protect visitors, inserted in the norms and management of the MNGLA.*

**Keywords:** Monumento Natural da Gruta do Lago Azul; Gruta do Lago Azul; Gruta N.S. Aparecida; Pathogenic microorganisms; Metagenomics; Management Plan; Tourism.

## 1. INTRODUÇÃO

As cavernas podem ser consideradas como ambientes oligotróficos extremos e que proporcionam nichos ecológicos altamente especializados para uma considerável variedade de microrganismos (Engel, 2007), dentre eles, fungos filamentosos, devido à alta umidade destes locais e temperaturas ideais. Da mesma forma, bactérias heterotróficas e as denominadas autotróficas que utilizam exclusivamente o CO<sub>2</sub> como fonte de carbono ou oxidam substâncias minerais como única fonte de energia para o seu desenvolvimento, são comunidades que têm sido descritas nestes ambientes (Northup & Lavoie, 2001; Nováková, 2009; Jurado et al., 2010).

Desde o surgimento do Sequenciamento de Nova Geração (NGS), o montante genético presente no ambiente pôde ser sequenciado e avaliado, proporcionando um volume de dados conhecido como metagenômica, contribuído para ampliar dados no que se refere a descrição da comunidade microbiana, além de possibilitar inferências sobre a sua diversidade funcional, por meio da identificação de genes funcionais previamente descritos (Thomas et al., 2012; Barton et al. 2007,2014; Ortiz et al., 2012). Atualmente, são utilizadas duas principais abordagens, a metagenômica conhecida como “shotgun”, onde o DNA total extraído de uma comunidade microbiana é totalmente fragmentado e sequenciado e ferramentas de bioinformática são utilizadas para as análises visando identificar principalmente os genes e suas respectivas funções (SHARPTON, 2014) e a abordagem conhecida como Metagenômica “tag” que utiliza o sequenciamento de uma região específica e conservada de um determinado gene e tem sido muito utilizada para estabelecer inferências sobre comunidades microbianas. O exemplo mais comum do uso deste modelo é o baseado em análise total ou parcial da sequência do DNAr (DNA ribossomal) usando as regiões 16S para bactérias e 18S e regiões Inter espaçadoras (ITS) do gene ribossomal no caso de fungos e outros organismos eucariotes (SHARPTON, 2014). A partir do sequenciamento parcial do gene DNAr é possível desvendar o potencial taxonômico e a abundância relativa presente em qualquer amostra ambiental (Pace et al., 1986), sem necessidade de representantes cultivados. Além disso, a presença de região conservada e de regiões hipervariáveis permitem a realização de análises de ordem filogenética e

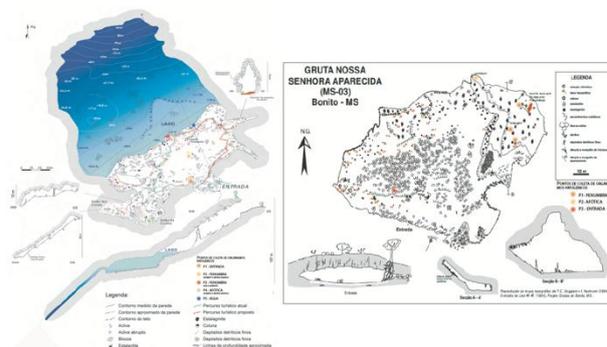
evolutiva (ChakravortyHAKRAVORTY et al., 2007).

Neste contexto, este estudo objetivou o uso de metagenômica, a fim de contribuir com o conhecimento sobre a biodiversidade microbiana em ambientes subterrâneos, nas grutas do Lago Azul e N.S. Aparecida, como subsídio ao planejamento do uso público na unidade de conservação, o Monumento Natural da Gruta do Lago Azul, situado em Bonito/MS.

Outras cavernas brasileiras foram objeto de estudos similares (SESSEGOLO et al., 2004; 2007 a e b), visando subsidiar o manejo, tais como Gruta do Maroaga e Gruta do Batismo/AM; Gruta do Bacaetava/PR, Gruta do Lago Azul/ MT, entre outras, com metodologias diferentes, porém visando o mesmo objetivo.

## 2. METODOLOGIA

Para a confecção do banco de metagenoma foram coletadas amostras de diferentes substratos da Gruta do Lago Azul (GLA) e da Gruta Nossa Senhora Aparecida (GNSA), sendo de sedimentos, matéria orgânica e guano, totalizando 15 amostras, de diferentes zonas de iluminação e profundidade em cada gruta (meio externo, zona de entrada, penumbra e afótica) conforme a Figura 1. Todas as amostras foram submetidas a extração de DNA total pelo kit de extração E.Z.N.A.® Soil DNA Kit (Omega Bio-tek), seguindo instruções do fabricante, identificadas e armazenadas no centro de Coleções Microbiológicas da Rede Taxonline CMRP/Taxonline.



**Figura 1. Local de amostragem e Pontos de coletas nas grutas Gruta do Lago Azul (GLA) e Gruta Nossa Senhora Aparecida (GNSA).**

A construção das bibliotecas foi realizada a partir do sequenciamento do gene 16S para bactérias e das regiões interespaçadoras (ITS) do gene que codifica o RNA ribossomal para fungos, anelados ao indexador Illumina Nextera, para sequenciamento

na plataforma MiSeq da Illumina Inc. seguindo as recomendações do fabricante.

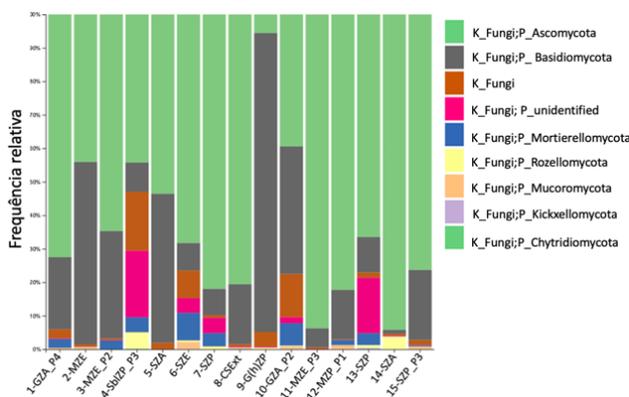
As sequências foram analisadas utilizando o programa Qiime2 (v.2017.6.0), seguindo o pipeline Casava 1.8 paired-end demultiplexed fastq e o “Atacama soil microbiome tutorial”. A classificação taxonômica foi feita utilizando o feature-classifier classify-sklearn (Pedregosa, F. et al. 2011), que utiliza VSEARCH global alignment, e o banco UNITE v8.2020 foi utilizado para a classificação.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Diversidade fúngica

Na diversidade taxonômica presente e estabelecida entre as zonas de luminosidade de cada caverna, os filios de importância médica encontrados foram (considerando a abundância >1%), Ascomycota, representando uma média de 64,538% do total de OTUs, com a abundância variando entre 67,33% na caverna GNSA e 61,33% na caverna GLA, e Murcoromycota representando 0,45% do total de OTUs (Figura 2).

Ascomycota é o filo que compreende fungos com hifas septadas e algumas leveduras, com cerca de 32.300 espécies, com algumas espécies associadas a infecção sistêmica, subcutânea, cutânea, superficial ou oportunista (de Hoog GS, 2019). As infecções fúngicas sistêmicas são profundas e não são restritas a nenhuma região particular, mas podem afetar vários tecidos e órgãos, e geralmente são causadas pela inalação de esporos suspensos dos fungos que vivem no solo, iniciando no pulmão e se difundindo aos outros tecidos do organismo.



**Figura 2. Frequência relativa de filios do reino fungi por amostras procedentes da Gruta do Lago Azul (GLA) e Gruta Nossa Senhora Aparecida (GNSA).** GLA (1 a 7): 1-GZA\_P4 (amostra de guano coletado no ponto 4 da zona afótica); 2-MZE (amostra de matéria orgânica da zona de entrada); 3-MZE\_P2 (amostra de matéria orgânica do ponto de coleta 2 da zona de penumbra); 4-SblZP\_P3 (amostra de sedimentos da beira do lago azul, zona de penumbra ponto 3); 5-SZA (amostra de sedimentos da zona afótica); 6-SZE (amostra de sedimentos da zona de entrada); 7-SZP (sedimentos da zona de penumbra); NSA (8 a 15): 8-CSExt (amostra controle de sedimentos da zona externa); 9-G(h)ZP (amostra de guano da zona de penumbra); 10-GZA\_P2 (amostra de guano da zona afótica ponto

2); 11-MZE\_P3 (amostra de matéria orgânica da zona de penumbra, ponto 3); 12-MZP\_P1 (amostra de matéria orgânica da zona de penumbra, ponto 1); 13-SZP (amostra de sedimentos da zona de penumbra); 14-SZA (amostra de sedimentos, zona afótica), 15-SZP\_P3 (amostra de sedimentos, zona de penumbra, ponto 3).

A GNSA apresentou 437 OTUs e a de GLA 464 OTUs. Avaliando todas as OTUs a nível de gênero e espécie com relevância de risco microbiológico, foram encontradas as espécies apresentadas na Tabela 1, com destaque para os fungos da ordem Mucorales encontrado em uma frequência de 3,21% na GNSA e 3,1% na GLA e da família Ajellomycetaceae, com frequência de 2.242% em guano da zona afótica da GLA e 1.902% em sedimentos da zona de penumbra da GLA, e 2,845% em sedimentos da zona de penumbra da GNSA.

**Tabela 1. Heat map de fungos de importância médica encontrados por ponto de coleta na Gruta do Lago Azul e Gruta Nossa Senhora Aparecida – Mato Grosso do Sul/ Brasil.**

Espécie	Gruta	Zonas de profundidade (%)						
		SEx	SE	ME	SP	GP	SbP	GA
<i>Absidia anomala</i>	NSA	0.3		0.3				
	GLA		2.1					
<i>A. koreana</i>	GLA			0.1				
	NSA				1.7			
<i>Acremonium furcatum</i>	NSA			0.4				
	GLA		5.3		1.1	0.4		
<i>Aspergillus flavipes</i>	NSA				0.2			
	NSA				0.4			
<i>Candida glabrata</i>	NSA				3.3			
	GLA							1.1
<i>Chrysosporium lobatum</i>	NSA		0.2					
	NSA				0.3			
<i>C. mephiticum</i>	GLA							1.0
	NSA				0.4			
<i>C. minutisporosum</i>	NSA	47						
	NSA					0.3		
<i>C. queenslandicum</i>	GLA				4.4			17
	NSA				3.2			
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	GLA		0.6	0.2	1.4			1.5
	GLA		0.1					
Ajellomycetaceae	GLA				1.9			2.2
	NSA				2.8			
<i>Exophiala brunnea</i>	NSA			0.2				
<i>Kodamaea ohmeri</i>	GLA						2.7	
<i>Mucor minutus</i>	GLA							0.4

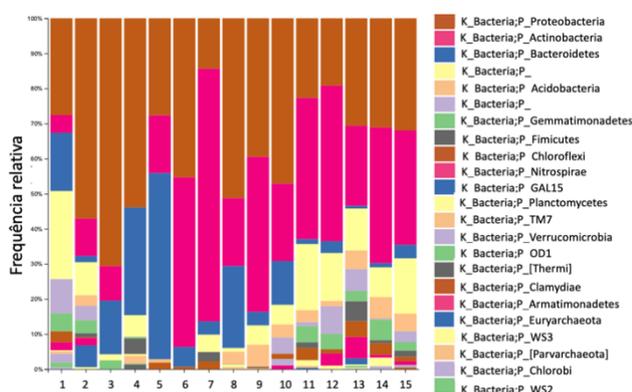
Legenda: SEx = Sedimento, zona externa; SE = Sedimento, zona de entrada; ME = Matéria orgânica, zona de entrada; SP = Sedimento, zona de penumbra; GP = Guano, zona de penumbra; SbP = Sedimento beira do lago, zona de penumbra; GA = Guano, zona afótica.

Considerando o total de unidades taxonômicas encontradas (1013), verificou se uma grande diversidade fúngica entres as cavernas analisadas, sendo somente 79 unidades taxonômicas compartilhadas entre elas, onde a GNSA possui 437 OTUs e a GLA 464 OTUs. A zona externa compartilha sua diversidade fúngica com a zona de entrada (duas OTUs) e penumbra (cinco OTUs), sendo essas: uma a nível de ordem Chaetothyriales, e espécies dos gêneros *Penicillium* spp., *Chrysosporium* spp. e *Pleopassalora acaciae*. Somente duas OTUs (*Cladosporium cladosporioides* e *Virgaria nigra*) foram compartilhadas com a zona afótica, passando antes pela zona de penumbra, demonstrando uma cadeia de compartilhamento de acordo com a zona de

luminosidade e profundidade. Nenhuma OTU foi compartilhada entre todas as zonas. Das 79 OTUs compartilhadas entre as duas cavernas (NSA e GLA) os principais OTUs presentes são *Apiotrichum laibachii* (18%), *Volatilis patellis* (7%), *Trichoderma* (6%), dentre outros.

### 3.2 Diversidade bacteriana

Quanto à diversidade bacteriana presente e estabelecida entre as zonas de luminosidade de cada caverna, os principais filos encontrados foram (considerando a abundância >1%): Proteobacteria, representado uma média de 37,98% do total de OTUs, com a abundância variando entre 40,4% na GNSA e 35,225% na GLA, e Actinobacteria, representando uma média de 28,46% do total de OTUs, Figura 3.



**Figura 3. Frequência relativa de OTUs por amostras analisadas na Gruta do Lago Azul (GLA) e na Gruta Nossa Senhora Aparecida (GNSA):** 1 = GLA (sedimentos da beira do lago, zona de penumbra ponto 3); 2 = GLA (amostra de guano, zona afótica ponto 4); 3 = GNSA (amostra de matéria orgânica, zona de penumbra ponto de coleta 2); 4 = GNSA (amostra de guano, zona de penumbra); 5 = GLA (amostra de matéria orgânica, zona de entrada ponto 2); 6 = GLA (amostra de matéria orgânica, zona de entrada); 7 = GNSA (amostra de matéria orgânica, zona de entrada ponto 3); 8 = GNSA (amostra de matéria orgânica, zona de penumbra ponto 1); 9 = GNSA (amostra controle de matéria orgânica, zona externa); 10 = GLA (amostra de sedimentos, zona afótica); 11 = GLA (amostra de sedimentos, zona de entrada); 12 = GLA (amostra de sedimentos, zona de penumbra); 13 = GNSA (amostra de sedimentos, zona afótica); 14 = GNSA (amostra de sedimentos, zona de penumbra ponto 3); 15 = GNSA (amostra de sedimentos, zona de penumbra).

O filo Proteobacteria inclui a maioria das bactérias gram-negativas de maior grupo taxonômico bacteriano e são separadas em cinco classes: alfa-proteobactérias, beta-proteobactérias, gama-proteobactérias, delta-proteobactérias e epsilon-proteobactérias. O filo Actinobacteria é detentor das bactérias gram-positivas e diversos gêneros patogênicos importantes são encontrados neste filo (Rizzatti et al., 2017).

Avaliando todas as OTUs a nível de gênero e espécie com relevância de risco microbiológico encontramos as espécies da Tabela 2, com destaque para as bactérias *Coxiella burnetii*, *Elizabethkingia* sp., *Bordetella holmesii*, *Aeromonas* sp. e

*Pseudomonas* sp. A *Coxiella burnetii* está presente nas duas cavernas estudadas na GLA em uma frequência relativa de 0,46% em sedimentos da GLA na zona de entrada e em 0,102% em sedimentos da zona afótica da GNSA.

**Tabela 2. Heat map de bactérias de importância médica encontradas por ponto de coleta na Gruta do Lago Azul e na Gruta Nossa Senhora Aparecida – Mato Grosso do Sul/ Brasil.**

Espécie	Gruta	Zonas de profundidade (%)				
		SE	MP	SP	GP	SA
<i>Coxiella burnetii</i>	GNSA					0.11
	GLA	0.43				
<i>Elizabethkingia</i> sp.	GNSA				1.14	
	GLA					2.05
<i>Bordetella holmesii</i>	GNSA		0.54			
<i>Aeromonas</i> sp.	GNSA				5.41	
<i>Pseudomonas</i> sp.	GNSA			15.2	12.3	
	GLA			0.65		3.01

Legenda: SE = Sedimento, zona de entrada; MP = Matéria orgânica, zona de Penumbra; SP = Sedimento, zona de penumbra; GP = Guano, zona de penumbra; SA = Sedimento, zona afótica.

A *C. burnetii* é uma bactéria de alto risco, transmissível pelo ar e possui a menor dose infecciosa bacteriana conhecida (Dragan, A.L. & Voth, D.E., 2019), e foi encontrada nas duas cavernas, ressaltando a importância de estudos de investigação microbiológica nas cavernas brasileiras.

Os resultados indicam a importância de se estabelecer medidas de segurança biológica diferenciada para visitação. As medidas de segurança biológica vão desde o uso de máscara (N92) para turistas visitantes até EPIs completos e quando possível a vacinação para os guias turísticos e pesquisadores sujeitos a um maior tempo de exposição.

Esses resultados foram considerados, junto com os obtidos nos demais meios, na determinação do zoneamento das cavernas e nas regras para o uso público, visando ampliar a segurança do visitante, bem como reduzir os riscos e os impactos ambientais decorrentes (GEEP-Açungui, 2021).

### 4. CONCLUSÕES

Neste estudo, observou-se uma grande diversidade entre as duas grutas analisadas no estado do Mato Grosso do Sul, observando um compartilhamento em torno de 5,84% considerando o total de abundância das unidades taxonômicas acessada, com 7,72% das espécies fúngicas (79 OTUs) e 3,41% das bacterianas (27 OTUs), demonstrando a grande riqueza e especificidades destes ambientes, com uma ecologia única mesmo diante de sua proximidade geográfica. Entretanto, as análises revelaram a presença de alguns fungos considerados patógenos primários de hospedeiros humanos, capazes de induzir infecção através da

inalação dos seus propágulos, encontrados em amostras de sedimento, matéria orgânica e guano, principalmente nas zonas de penumbra e afótica nas duas cavernas investigadas. Da mesma forma, entre os gêneros bacterianos, destaca-se a identificação da espécie *Coxiella burnetti*, uma bactéria de alto risco e transmissível pelo ar, presente em amostras de sedimentos coletados nas zonas de penumbra e afótica respectivamente. A qual também foi encontrada em ambas as grutas investigadas, sendo que na GLA foi encontrada em sedimentos na zona de entrada (0,46%), enquanto na GNSA foi detectada em sedimento da zona afótica (0,102%). Estes resultados sugerem um fluxo de contaminação externa vinculado pela circulação de animais, escoamento de água e sedimentos para o interior da caverna. Estes aspectos somente poderão ser confirmados através de um estudo amostral maior e ao longo de um período no mínimo anual.

Os resultados obtidos subsidiaram decisões relativas ao manejo e zoneamento das cavidades, bem como determinaram as medidas de proteção aos

visitantes, inseridas nas normas e no manejo do MNGLA (GEEP-Açungui, 2021).

Como em outros estudos microbiológicos similares efetuados visando o manejo das cavidades, o conhecimento dos microorganismos associados a esses ambientes, apoiaram a definição do uso público, do zoneamento e das normas de uso do patrimônio espeleológico envolvido. Aspectos essenciais para a proteção do meio cavernícola e para garantia da segurança dos visitantes (SESSEGOLO et al, 2004; 2007 a e b).

## 5. AGRADECIMENTOS

Ao IMASUL e ao GEEP-Açungui pela oportunidade de desenvolvimento do trabalho. À Livia Cordeiro pelo auxílio nas atividades de coleta biológica e ao CMRP/Taxonline (<https://www.cmrp-taxonline.com/>) pela colaboração nas análises de metagenômica.

## REFERÊNCIAS

- Barton, H. A., Giarrizzo, J. G., Suarez, P., Robertson, C. E., Broering, M. J., Banks, E. D., Vaishampayan, P. A., & Venkateswaran, K. (2014). Microbial diversity in a Venezuelan orthoquartzite cave is dominated by the Chloroflexi (Class Ktedonobacterales) and Thaumarchaeota Group I.1c. *Frontiers in microbiology*, 5, 615. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00615>
- Barton, Hazel A.; Nicholas M. Taylor; Michael P. Kreate; Austin C. Springer; Stuart A. Oehrle; and Janet L. Bertog. (2007). The impact of host rock geochemistry on bacterial community structure in oligotrophic cave environments. *International Journal of Speleology*, 36: 93-104. <https://digitalcommons.usf.edu/ijsvol36/iss2/5>
- De Hoog GS, Guarro J, Gené J, Ahmed S, Al-Hatmi AMS, Figueras MJ & Vitale RG (2019) Atlas of Clinical Fungi, 3rd e-edition. Utrecht / Reus.
- Dragan, A. L., & Voth, D. E. (2020). *Coxiella burnetii*: international pathogen of mystery. *Microbes and infection*, 22(3), 100–110. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2019.09.001>
- Engel, A.S. (2007) Observations on the biodiversity of sulfidic karst habitats. *Journal of Cave and Karst Studies*, 69, 187–206. <https://doi.org/10.1.1.546.9365>.
- GEEP-Açungui. Plano de Manejo do Monumento Natural da Gruta do Lago Azul, Bonito – MS. Curitiba, 2021.
- Jurado V., Laíz L., Rodriguez-Nava V., Boiron P., Hermosin B., Sanchez-Moral S., SaizJimenez C. (2010) Pathogenic and opportunistic microorganisms in caves. *International Journal of Speleology*, 39(1), 15-24.
- Northup D.E., Lavoie K.H. (2001) Geomicrobiology of caves: a review. *Geomicrobiology Journal*; 18, 199-222.

- Novaková A. (2009) Microscopic fungi isolated from the Domica Cave system (Slovak Karst National Park, Slovakia): a review. *International Journal of Speleology*, 38(1), 71- 82
- Ortiz M, Neilson WM, Legatzki A, Byrne A, Yu Y, Wing RA, Soderlund CA, Pryor BM, Pierson III LS, Maier RM (2012) Profiling bacterial diversity and taxonomic composition on speleothem surfaces in Kartchner caverns, AZ. *Microbial Ecology*, 65(2), 371-383.
- Pace, N. R. (1986). The Analysis of Natural Microbial Populations by Ribosomal RNA Sequences. In: MARSHALL, K. C. (Ed.). *Advances in Microbial Ecology*. Boston, MA: Springer US. p.1-55. ISBN 978-1-4757-0611-6.
- , Fabian et al. (2017). Proteobacteria: a common factor in human diseases. *BioMed research international*, 2017.
- Sharpton T. J. (2014). An introduction to the analysis of shotgun metagenomic data. *Frontiers in plant science*, 5, 209. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00209>
- SESSEGOLO, Gisele Cristina; PRIES, Daniele Cristina; ROCHA, Luis Fernando Silva da; ROCHA, Ricardo Pinto da; ZAKRZEWSKI, Darci P. Manejo da Caverna do Maroága, Presidente Figueiredo/AM. In: IV CONGRESSO BRASILEIRO DE UNIDADES DE CONSERVAÇÃO, 2004, Curitiba. Anais – Trabalhos Técnicos. Curitiba: Rede Pró-UC, 2004. v. I, p. 399-405.
- SESSEGOLO, Gisele Cristina. Indicativos para proteção e manejo do Patrimônio Espeleológico do Parque Estadual da Gruta da Lagoa Azul - MT. In: II ENCONTRO BRASILEIRO DE ESTUDOS DO CARSTE, 2007, São Paulo. Resumos Expandidos e Simples. São Paulo: Redespeleo Brasil, 2007 (a). v. 1, p. 132-135.
- SESSEGOLO, Gisele Cristina; PRIES, Daniele Cristina; ROCHA, Luis Fernando Silva da. Plano de Manejo Espeleológico do Sítio Arqueológico Gruta do Batismo - Presidente Figueiredo, AM. In: II ENCONTRO BRASILEIRO DE ESTUDOS DO CARSTE, 2007 (b), São Paulo/SP. Resumos Expandidos e Simples. São Paulo/SP: REDESPELEO BRASIL, 2007 (b). v. 1, p. 128-131.
- Thomas, T., Gilbert, J., & Meyer, F. (2012). Metagenomics - a guide from sampling to data analysis. *Microbial informatics and experimentation*, 2(1), 3. <https://doi.org/10.1186/2042-5783-2-3>