



35^o
Bonito - MS

ANAIS do 35º Congresso Brasileiro de Espeleologia
19 - 22 de julho de 2019 - ISSN 2178-2113 (online)



O artigo a seguir é parte integrando dos Anais do 35º Congresso Brasileiro de Espeleologia disponível gratuitamente em www.cavernas.org.br.

Sugerimos a seguinte citação para este artigo:

GUERRA, L.C.C. et al. Potencial biotecnológico de bactérias cultiváveis obtidas a partir da Gruta Martimiano II, Parque Estadual do Ibitipoca – MG. In: ZAMPAULO, R. A. (org.) CONGRESSO BRASILEIRO DE ESPELEOLOGIA, 35, 2019. Bonito. *Anais...* Campinas: SBE, 2019. p.599-610. Disponível em: http://www.cavernas.org.br/anais35cbe/35cbe_599-610.pdf. Acesso em: *data do acesso*.

Esta é uma publicação da Sociedade Brasileira de Espeleologia.
Consulte outras obras disponíveis em www.cavernas.org.br

POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE BACTÉRIAS CULTIVÁVEIS OBTIDAS A PARTIR DA GRUTA MARTIMIANO II, PARQUE ESTADUAL DO IBITIPOCA – MG

*BIOTECHNOLOGICAL POTENTIAL OF CULTIVATING BACTERIA OBTAINED FROM GRUTA
MARTIMIANO II CAVE, PARQUE ESTADUAL DO IBITIPOCA – MG*

Lara Chaves Carvalho GUERRA (1,2); Camila Gracyelle de Carvalho LEMES (1); Paulo Eduardo Santos LIMA (2); Leandro Marcio MOREIRA (1)

- (1) Laboratório de Genômica e Interação Bactérias-Ambiente, Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto MG.
(2) Sociedade Excursionista Espeleológica, Ouro Preto MG.

Contato: laraguerra.bio@gmail.com; camilalemes.mail@gmail.com; padusl.13@gmail.com; lmmorei@gmail.com.

Resumo

A Gruta Martimiano II é a maior caverna quartzítica do Brasil. Apresenta 4170 metros de projeção horizontal e está localizada no Parque Estadual do Ibitipoca – Minas Gerais. As condições ambientais únicas e o baixo aporte energético das cavidades atuam como pressões seletivas nos organismos que as habitam. A microbiota tem grande importância ecológica e na biotecnologia, uma vez que microrganismos cultiváveis são amplamente utilizados como recursos na agricultura, indústria farmacêutica e de bioprocessos. Entretanto, são poucos os estudos sobre a microbiota cavernícola e seu potencial biotecnológico, e quando existentes, em sua maioria são feitas em cavernas carbonáticas, o que aumenta a importância da realização de estudos sobre a microbiota em cavernas quartzíticas. Embora ainda em fase inicial, esta pesquisa objetivou a bioprospecção e análise do potencial biotecnológico de bactérias associadas a piso, teto e parede da Gruta Martimiano II. Um total de 15 amostras oriundas de 4 áreas da caverna foram obtidas, e em laboratório as amostras foram lavadas com água de torneira autoclavada. O lavado foi plaqueado em meio de cultura rico e após 3 dias as colônias foram isoladas e preservadas. Foram obtidos 72 isolados bacterianos que constituem hoje o primeiro banco de isolados bacterianos desta caverna. 3 isolados tiveram a capacidade em fixar nitrogênio e 1 em solubilizar fosfato, componentes fundamentais ao desenvolvimento das plantas. O ineditismo desta pesquisa corrobora o potencial de geração de novos conhecimentos acompanhado do desenvolvimento de novos produtos, agregando valor a serviços ecossistêmicos oriundos de um patrimônio genético desconhecido.

Palavras-Chave: microbiota; bioprospecção; potencial biotecnológico; caverna em quartzito; Gruta Martimiano II; Parque Estadual do Ibitipoca.

Abstract

The Gruta Martimiano II is the largest quartzite cave in Brazil, which 4170 meters of horizontal length and is located at the Parque Estadual do Ibitipoca – Minas Gerais. The unique environmental conditions and the low energy contribution of the cavities act as selective pressures on the organisms that inhabit them. The microbiota has great ecological and biotechnological importance, since cultivable microorganisms are widely used as resources in agriculture, pharmaceutical industry and bioprocesses. However, there are few studies on the caves microbiome and its biotechnological potential, and when found, most are made in carbonate caves, which increases the importance of studies on the microbiota of quartzite caves. Although still at an early stage, this research aimed at bioprospecting and analyzing the biotechnological potential of bacteria associated with the floor, ceiling and wall of the Martimiano II cave. A total of 15 samples from four cave areas were obtained, and in the laboratory the samples were washed with autoclaved faucet water. The wash solution was plated in rich medium (LB), and 3 days later, the colonies were isolated and preserved. It was obtained 72 bacterial isolates which constitute the first bacterial isolates bank of this cave. 3 isolates had the ability to fix nitrogen and 1 to solubilize phosphate, which are fundamental components to the development of plants. The novelty of this research corroborates the potential of generating new knowledge accompanied by the development of new products, adding value to ecosystem services from an unknown genetic patrimony.

Keywords: microbiota; bioprospecting; biotechnological potential; quartzite cave; Gruta Martimiano II; Parque Estadual do Ibitipoca.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Caracterização da área de estudo

O Parque Estadual do Ibitipoca (PEIB) foi criado em 1973, por meio da lei 6.126 do Governo de Minas Gerais, abrange as cidades de Lima Duarte, Santa Rita de Ibitipoca e Bias Fortes, totalizando 1488 hectares de extensão. Gerido pelo Instituto Estadual de Florestas (IEF), conta com diversas atrações turísticas como mirantes, quedas d'água, riachos e cavernas. O PEIB se localiza ao sul de Minas Gerais, no domínio fitogeográfico da Mata Atlântica, na região denominada Zona da Mata. A vegetação é associada aos afloramentos quartzíticos, apresentando campos rupestres de

altitude e grande influência de elementos de Mata Atlântica (INSTITUTO ESTADUAL DE FLORESTA, 2007).

Segundo o Cadastro Nacional de Cavernas (CNC), gerido pela Sociedade Brasileira de Espeleologia, o parque tem 40 cavernas conhecidas. Por isso, é reconhecido por muitos autores como um importante distrito espeleológico mundial (PEREZ & GROSSI, 1987; NUMMER, 1991; CORREA-NETO & FILHO, 1997; NUMMER, 2012; BENTO, 2015). Entre essas cavidades, destaca-se a Gruta Martimiano II, considerada a mais extensa caverna em quartzito do Brasil, com 4.170 m de projeção horizontal e 170 m de desnível.

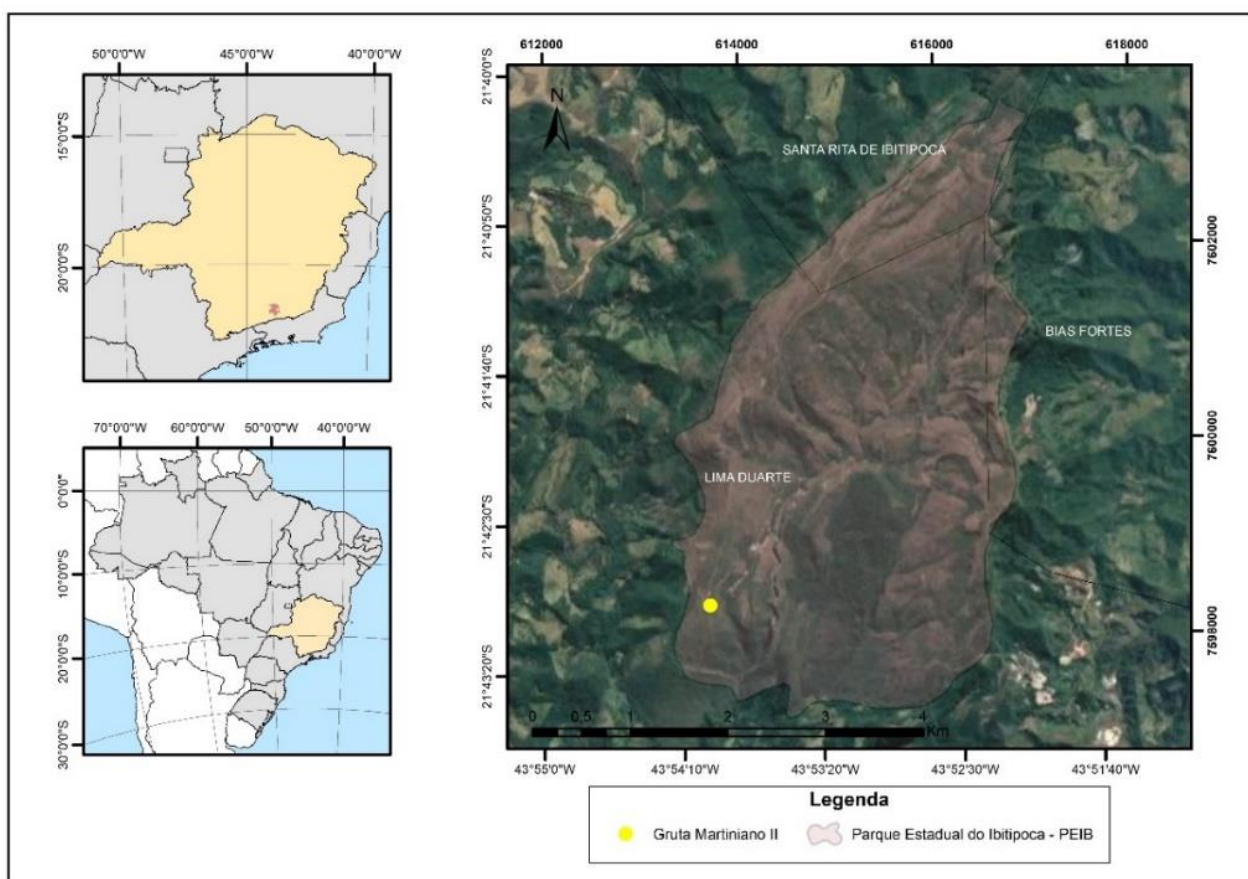


Figura 1: Mapa de localização da Gruta Martimiano II no Parque Estadual do Ibitipoca.

A gruta coleciona características únicas que a fazem notória no cenário nacional. Além do grande desenvolvimento, pouco comum para as rochas siliciclásticas, possui morfologia com feições freáticas, com partes ativas e inativas. Os condutos e salões são volumosos e os espeleotemas, de coloração avermelhada, chamam atenção por sua

variedade e frequência (LIMA et al., 2017). Nesse contexto, a Gruta Martimiano II pode se apresentar como um importante reservatório de microbiota com função biológica específica, ressaltando a importância de estudos de bioprospecção nesta caverna.

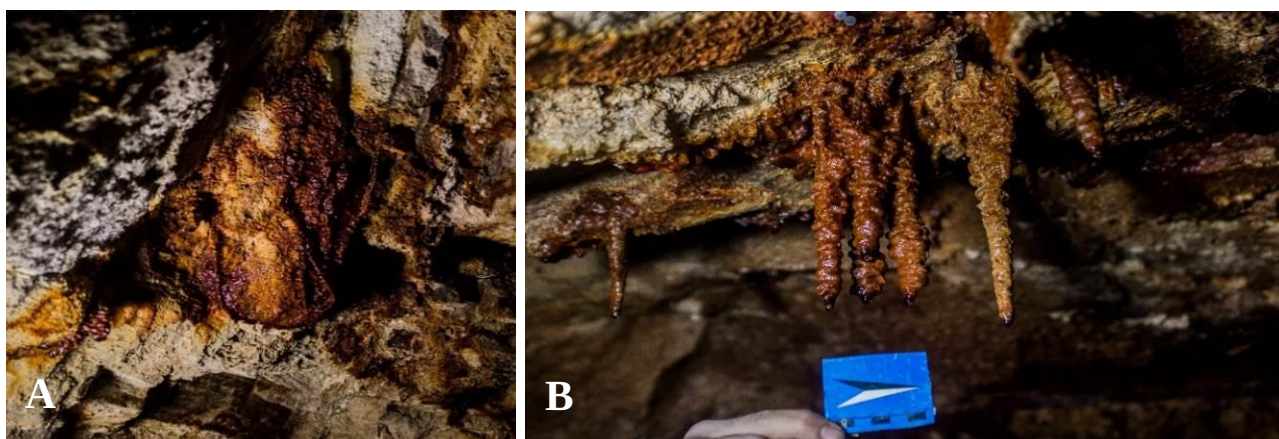


Figura 2: Espeleotemas avermelhados da Gruta Martiniano II. A) cortina; B) estalactites. (Fotos: Gabriel Lourenço).

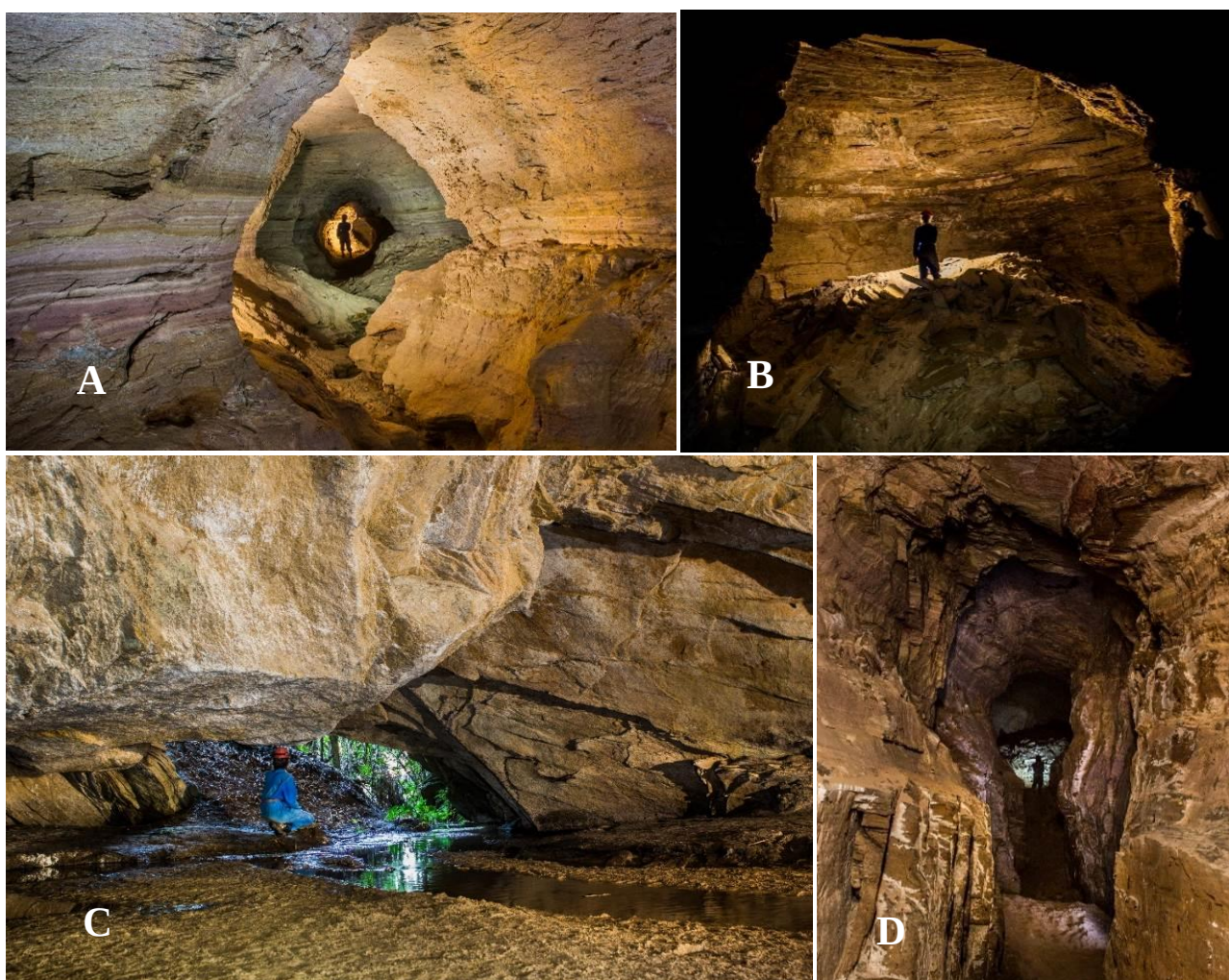


Figura 3: Gruta Martiniano II. A) extenso conduto; B) salão da clarabóia; C) segunda entrada; D) conduto da fechadura. (Fotos: Gabriel Lourenço).

1.2 Ambiente cavernícola

Cada caverna apresenta características biológicas, químicas e físicas únicas (GHOSH et al., 2017). As cavernas são caracterizadas pela ausência de luz nas zonas mais profundas, escassez

nutricional, taxas de umidade próximas a saturação e a temperatura do meio hipógeo se aproxima da média anual de temperatura do ambiente epígeo. Sendo que, os parâmetros ambientais, são de grande relevância para o estudo da biologia subterrânea, por

propiciarem as especiações a este ambiente (CULVER, 1982; TRAJANO & MOREIRA, 1991; FERREIRA & POMPEU, 1997; GOMES et al., 2000).

Segundo Ghosh (2017), as cavernas podem ser divididas em 4 zonas de acordo, principalmente, com a incidência luminosa: 1) a zona de entrada; 2) a zona crepuscular; 3) a zona de transição; 4) a zona profunda. A ocorrência de organismos fotossintetizantes é limitada a zona de entrada e impossibilitada pela ausência de luz no interior das cavernas (FERREIRA & POMPEU, 1997; HOENEN, 1997; FERREIRA & MARTINS, 1999). Dessa forma, na maioria das cavernas, a entrada dos recursos alimentares é feita especialmente pela importação provocada por enxurradas, cursos d'água e águas de percolação (GILBERT et al., 1994). Além disso, os animais presentes no ambiente cavernícola, geram recursos alimentares para outros organismos (FERREIRA, 2005) e os microrganismos presentes participam da produção primária e secundária de energia no ambiente hipógeo (FERREIRA et al., 2000).

Estas características propiciam um habitat microbiano único, com pressões evolutivas diferentes do ambiente epígeo (BARTON et al., 2007). Com isso, os organismos presentes são mais especializados ao baixo aporte energético das cavernas, o que aumenta o interesse na identificação de microrganismos e estudos de caracterização biotecnológica.

1.3 Importância da microbiota em um contexto ecológico

Os microrganismos estão presentes em todos os ambientes e apresentam grande importância num contexto ecológico (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006). Devido à enorme diversidade metabólica, os microrganismos participam ativamente de todos os ciclos biogeoquímicos e desempenham a função de reciclar grande parte da matéria na biosfera (GAYLARDE, 2005). Os fatores abióticos e bióticos do ambiente influenciam diretamente na comunidade microbiana. Neste contexto, é fundamental o conhecimento das condições ambientais para um completo conhecimento sobre a composição microbiana e seu funcionamento metabólico em diferentes ambientes (LEMES, 2018).

As cavernas são consideradas ambientes extremos, por propiciarem formas de vida especializadas (CANDIROGLU, 2017). Embora suas peculiaridades sejam chamariz para novos estudos biotecnológicos, são ambientes pouco

estudados do ponto de vista microbiológico, especialmente no Brasil. O que coloca a proposta deste trabalho em evidência na busca de novos organismos e conhecimentos biológicos que possam ser utilizados na geração de produtos e serviços.

1.4 Bioprospecção

A bioprospecção abrange diversas áreas da biologia e consiste na identificação, avaliação e exploração sistemática da diversidade de vida em determinado ambiente objetivando a busca de recursos genéticos para fins comerciais. Para isso, os organismos são identificados e classificados, e genes e enzimas de interesse são estudados para posterior aplicação biotecnológica (EMBRAPA, 2015). O Brasil abriga cerca de 13% das espécies existentes no mundo (LEWINSOHN; PRADO, 2006), mas o potencial biotecnológico do país ainda é pouco estudado.

Diversos pesquisadores voltam as suas atenções para ambientes incomuns, onde uma adaptação de sua biota é esperada (FILHO, 2014). As condições ambientais únicas do ambiente cavernícola aumentam as chances de se encontrar novas espécies e novos produtos advindos dos microrganismos existentes, ressaltando a importância da bioprospecção nestes ambientes.

1.4 Métodos de prospecção dependentes de análises após cultivo

Apesar de sua vasta distribuição e importância na manutenção da biosfera, os microrganismos ainda são pouco conhecidos. No caso de bactérias e arqueas, é estimado que menos de 1% da diversidade seja conhecido (CANHOS; MANFIO, 2001), e menos de 10% dos microrganismos existentes no planeta foram caracterizados e descritos (STALEY, 2001). Isso é justificado pelo fato de que apenas cerca de 1 a 3% dos microrganismos terem a capacidade de cultivo em condições laboratoriais (STREIT; SCHMITZ, 2004). Apesar disso, os métodos dependentes de cultivo continuam sendo utilizados, por possibilitarem a realização de experimentos *in vitro* e *in vivo* com os isolados obtidos (HILL et al., 2000).

1.5 Potencial biotecnológico dos microrganismos

Na biotecnologia, a diversidade e o potencial bioquímico dos microrganismos é essencial para o desenvolvimento de produtos e serviços com aplicações em praticamente todos os setores industriais. Os produtos microbianos são usados, por exemplo, como antibióticos, agentes tumorais e imunossupressores em indústrias farmacêuticas,

sendo que, as cavernas apresentam alto potencial para a descoberta de compostos bacterianos bioativos e produção de novas drogas (GHOSH et al., 2017).

Muitas bactérias possuem a capacidade de facilitar o crescimento e o desenvolvimento de plantas (CALVO et al., 2014), podem ser utilizadas como biocontroladores e até mesmo na produção de organismos transgênicos de interesse econômico (PEREIRA; MARTINS, 2016). São empregadas como agentes de processamento alimentício no setor da agricultura e alimentício (DEMAIN; ADRIO, 2008). Bactérias também podem ser utilizadas na biolixiviação de metais (FRANCISCO, 2007), e na biorremediação de ambientes contaminados, permitindo a remoção ou redução dos níveis de poluentes, algumas vezes gerando por meio de processos metabólicos complexos, outros subprodutos de interesse comercial (GAYLARDE, 2005).

Fatores como baixo custo de produção, alta produtividade, estabilidade a temperaturas extremas, especificidade, pH ou outras condições fisiológicas fazem com que o estudo de bactérias em ambientes peculiares, como o cavernícola, seja uma alternativa em destaque que leva ao desenvolvimento de programas de triagem de alto rendimento (PRAKASH et al., 2013).

Tendo em vista o contexto ecológico, o estudo da microbiota cavernícola se torna necessário, devido à escassez de pesquisas relacionadas ao tema, quando comparado aos demais estudos de biologia subterrânea. Somado a isto, ao fato de a maioria dos estudos envolverem a microbiota de cavernas carbonáticas (BARTON et al., 2007), o presente estudo propõe pela primeira vez a bioprospecção e análise do potencial biotecnológico da maior caverna em quartzito do Brasil, a Gruta Martimiano II.

2. METODOLOGIA

2.1 Coleta do material microbiológico

Uma análise do mapa topográfico da Gruta Martimiano II foi previamente estabelecida para determinação dos pontos de relevância para a realização de coletas de solo e rochas (Figura 4). Foram considerados fatores fundamentais para seleção dos pontos de coletas: área fótica, área afótica, regiões secas e úmidas, isolamento geográfico, e reduzidos sinais de pisoteio.

Foram utilizados materiais esterilizados para a coleta, como espátulas para a retirada das amostras

e tubos Falcon de 50 mL para o transporte do material coletado. Para cada ponto da caverna foram coletados pelo menos uma amostra de piso, uma de parede e uma de teto, geralmente em torno de 50 g de material sólido. Após essa etapa, as amostras foram levadas para o Laboratório de Genômica e Interação Bactérias-Ambiente da Universidade Federal de Ouro Preto.

2.2 Isolamento das colônias bacterianas

A partir das amostras coletadas, 1g de material foi lavado em 10 mL de água de torneira autoclavada. As soluções dos lavados foram diluídas em fatores de 1:10 e 1:100, e 100 µL desta solução diluída foi plaqueada em placas de Petri contendo meio de cultura Luria-Bertani (LB) seletivo para fungos (FELESTRINO, 2017). As placas foram incubadas a temperatura de 28°C por um período de até três dias, e as colônias que apresentaram diferentes morfologias foram repicadas em novas placas de Petri contendo o mesmo meio a fim de isolá-las. Cada isolado foi preservado em meio LB líquido contendo glicerol, em uma concentração final de 15%, e estocado em freezer -20°C. Para a realização dos ensaios bioquímicos foram geradas placas matrizes, colocou-se 200 µL de meio LB líquido em placas de 96 poços onde os preservados foram novamente cultivados para posterior inoculação e realização dos ensaios.

2.3 Potencial biotecnológico

Com objetivo de testar o potencial biotecnológico dos microrganismos coletados após esses processos, foram realizados os seguintes ensaios bioquímicos:

2.3.1 Ensaio de fixação de nitrogênio

Partindo das placas matrizes, os isolados foram inoculados em meio de cultura Baz semi-sólido, livre de N₂, por 14 dias a 28°C. As bactérias que modificaram a coloração do meio de amarelo para esverdeado indicam a potencial capacidade de fixar nitrogênio (DOBEREINER et al., 1976).

2.3.2 Ensaio de solubilização de fosfato

A capacidade de solubilização de fosfato foi avaliada mediante uso do meio National Botanical Research Institute's Phosphat (NBRI-P) (NAUTIYAL, 1999), e após 14 dias a 28°C a formação de um halo transparente ao redor da colônia indica o potencial do isolado em solubilizar fosfato.

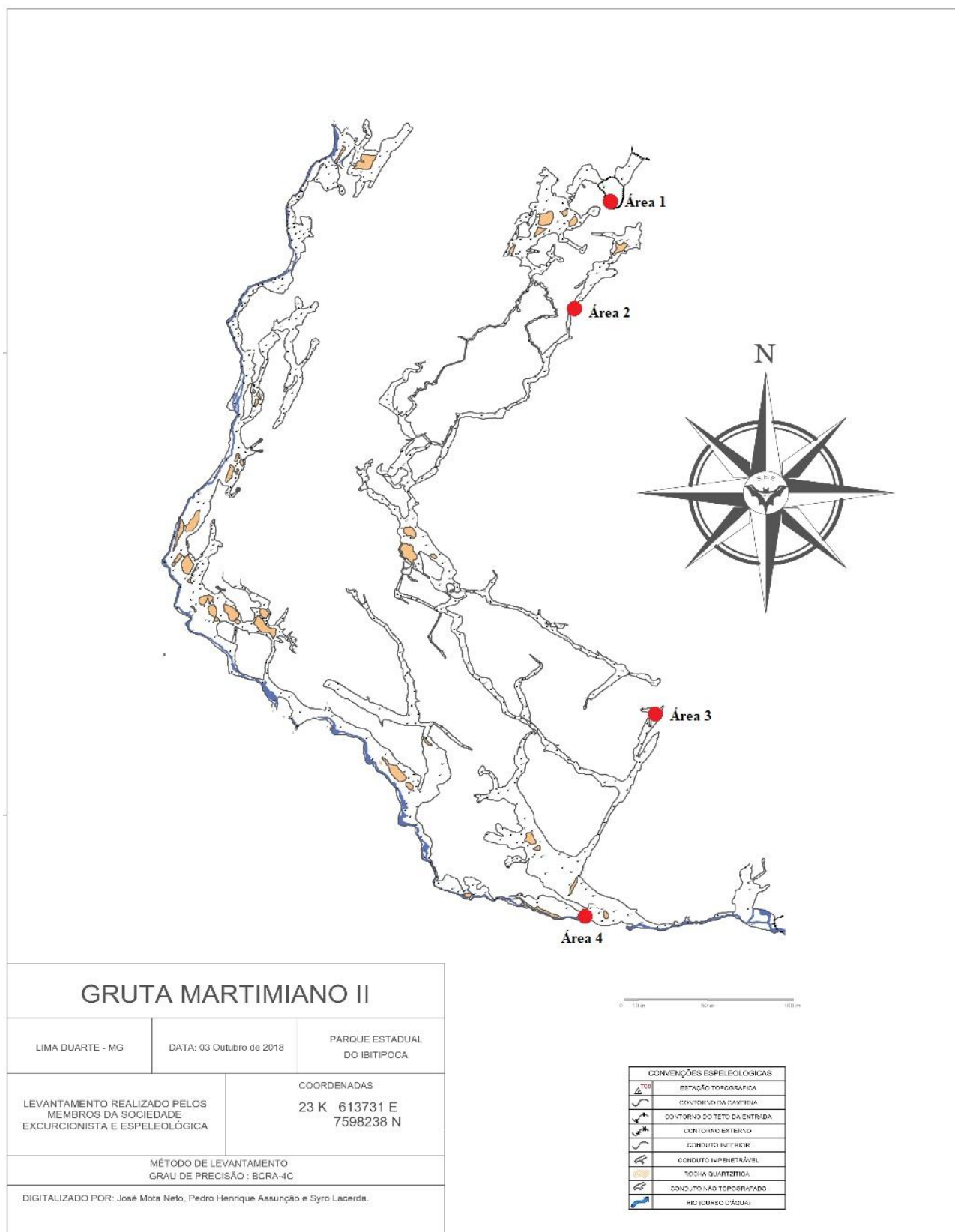


Figura 3: Mapa topográfico da Gruta Martimiano II, os círculos vermelhos indicam as áreas onde foram realizadas as coletas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 Isolados Bacterianos

Para melhor representar as áreas de coleta foram feitos cortes transversais (Figura 5) e descrições espeleológicas de cada área (Tabela 1), a fim de possibilitar uma representação morfológica e

explicitar as diferenças no habitat da microbiota coletada. Cada área apresenta peculiaridades, como incidência e ausência de luz, diferenças no aporte energético, drenagem ativa e percolação de água, o que proporciona condições variadas para a microbiota local.

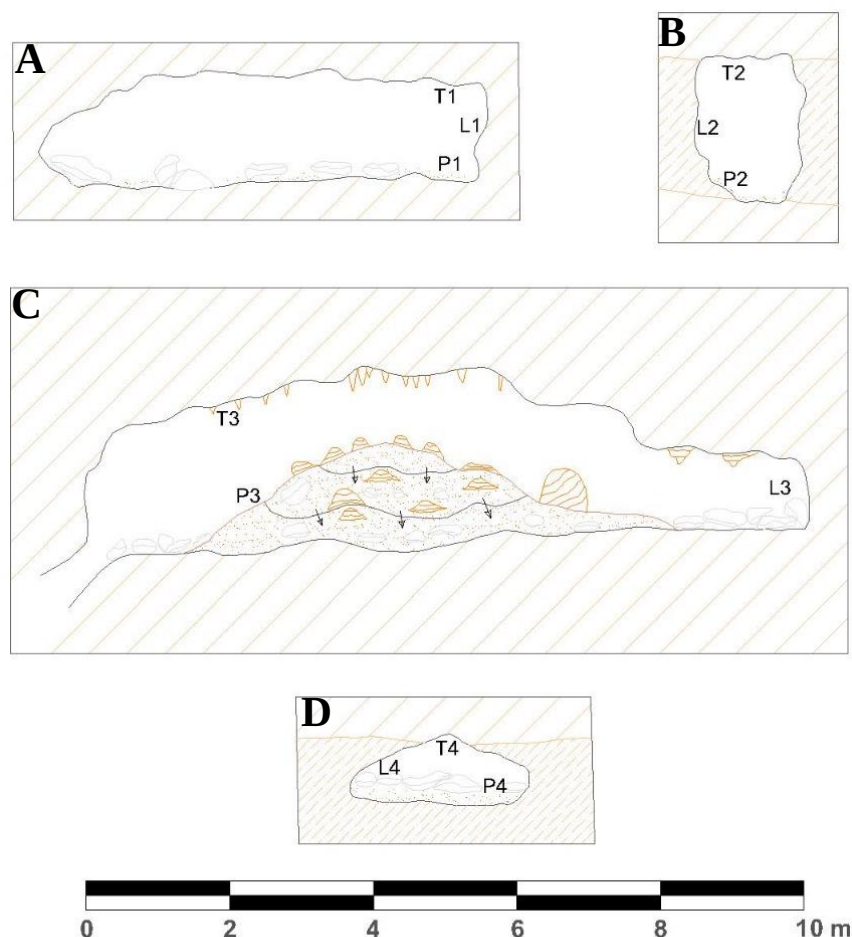


Figura 4: Cortes transversais das áreas de coleta. A - Área 1; B - Área 2; C - Área 3; D - Área 4.

A partir do cultivo em meio LB das colônias bacterianas, obteve-se um total de 72 isolados bacterianos (Tabela 1). Na figura 6, é possível observar que a área 4 apresentou maior número de colônias isoladas, tal fato pode ser explicado pela proximidade da área a uma drenagem ativa, por onde ocorre o carreamento de matéria orgânica e

outros elementos do ambiente externo para dentro da caverna.

As colônias isoladas neste trabalho possibilitaram a criação do primeiro banco de isolados bacterianos da maior caverna em quartzito do Brasil, a Gruta Martimiano II, que ficará acessível para novas pesquisas no laboratório.

Tabela 1: Descrição das áreas de coleta e relação com os isolados bacterianos.

ÁREA DE COLETA	ZONA DE INCIDÊNCIA LUMINOSA	DESCRIÇÃO DA ÁREA	PONTO DE COLETA	ISOLADOS BACTERIANOS
1	Zona de entrada/ Zona Crepuscular	Boca da Gruta Martimiano II, conduto com desenvolvimento em quartzito grosseiro sacaroidal, com serapilheira depositada no piso resultando em maior concentração de matéria orgânica.	Piso	4
			Teto	6
			Parede	7
2	Zona profunda	Conduto com teto e parede se desenvolvendo em quartzito fino feldspático, com presença de escorrimentos marcando percolação de água próximo ao local de coleta e baixo aporte energético.	Piso	5
			Teto	5
			Parede	8
3	Zona profunda	Salão dos espeleotemas vermelhos, com desenvolvimento em quartzito grosseiro sacaroidal, com percolação de água constante.	Piso	12
			Teto	3
			Parede	1
4	Zona profunda	Conduto com teto e piso com desenvolvimento em quartzito grosseiro sacaroidal e parede em quartzito fino feldspático, próxima a uma drenagem ativa, com presença de matéria orgânica carregada pela mesma.	Piso	10
			Teto	6
			Parede	5
TOTAL DE ISOLADOS BACTERIANOS				72

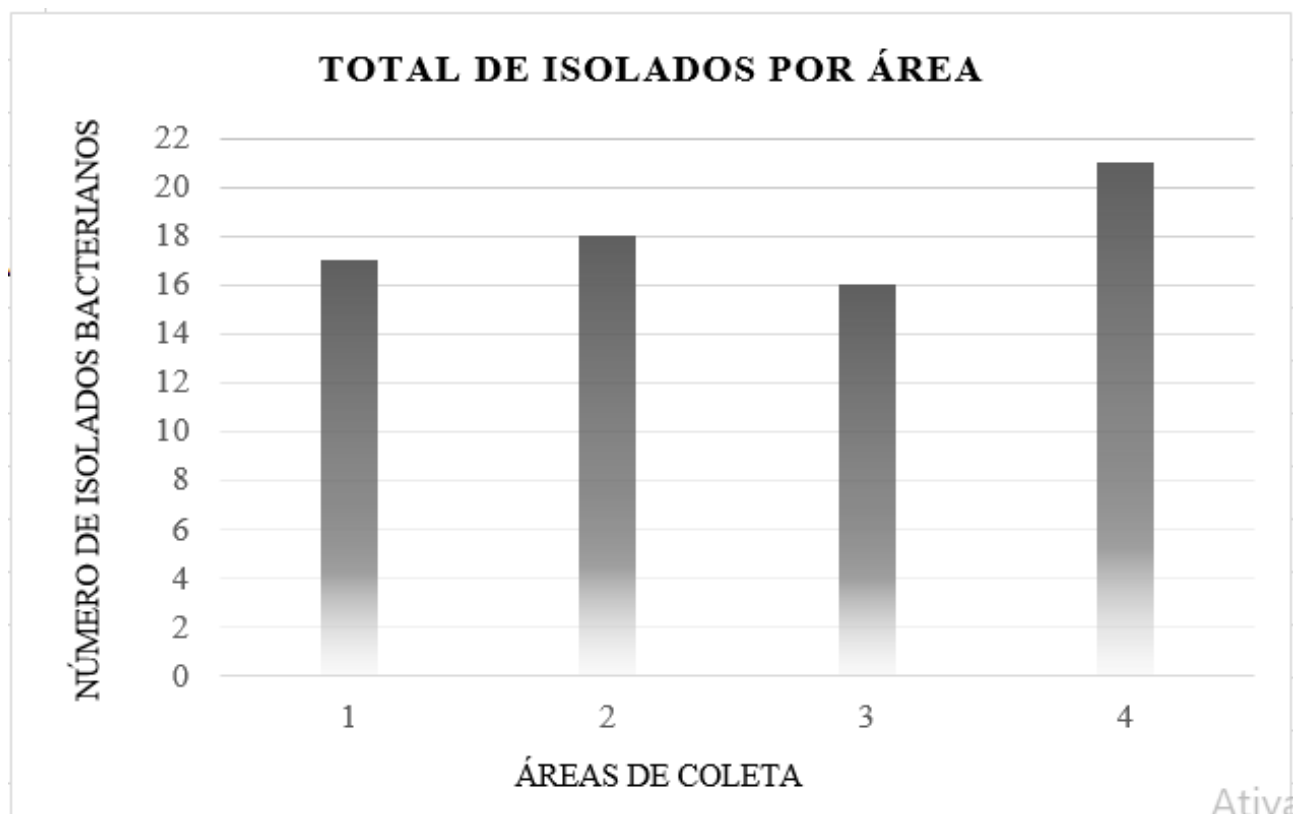


Figura 5: Gráfico de colunas do total de isolados bacterianos por área de coleta.

2.3 Potencial Biotecnológico

A bioprospecção de microrganismos e seu potencial biotecnológico pode apresentar grande importância para o desenvolvimento de uma agricultura sustentável. Com isso, os ensaios realizados neste trabalho visam a descoberta de biofertilizantes.

2.3.1 Fixação de Nitrogênio

Segundo Pajares e Bohannan (2016), a microbiota do solo desempenha um papel fundamental nos processos do ciclo do nitrogênio, que é um elemento fundamental para todos os organismos. A fixação biológica do nitrogênio consiste em um processo bioquímico de redução do nitrogênio gasoso para amônia, que pode ser absorvida pelas plantas. No ensaio de fixação de nitrogênio três isolados bacterianos foram capazes de realizar o processo de fixação de nitrogênio, como é possível observar pela mudança de coloração no meio de cultivo (Figura 7). O isolado GMT1.5, coletado no teto da entrada da caverna, área 1; o isolado GMP4.27, coletado no piso da área 4; e o isolado GMT1.6, coletado no teto da área 1. Esta capacidade metabólica, indica um potencial para desenvolvimento de biofertilizantes, entretanto necessita de estudos mais específicos para viabilizar tal aplicabilidade.



Figura 6: Ensaio de fixação de nitrogênio, mostrando resultado positivo para três isolados bacterianos (coloração esverdeada).

2.3.2 Solubilização de Fosfato

O fósforo é o segundo elemento mais importante para as plantas após o nitrogênio, por ser fundamental em praticamente todos os processos metabólicos das plantas, como a respiração e a fotossíntese (KHAN et al., 2010). Apesar de sua abundância no solo, encontra-se indisponível para a absorção das plantas (SHARMA et al., 2013). Menos que 5% do teor de fósforo de solos é

biodisponível para as plantas, diante disso, estratégias para melhorar a disponibilidade e absorção de fosfato podem contribuir significativamente para o desenvolvimento das plantas (BULGARELLI, 2013). No ensaio de solubilização de fosfato o isolado bacteriano GML4.14, coletado na parede da área 4, foi o único que apresentou tal capacidade (Figura 8), o que sugere seu potencial como biofertilizante.

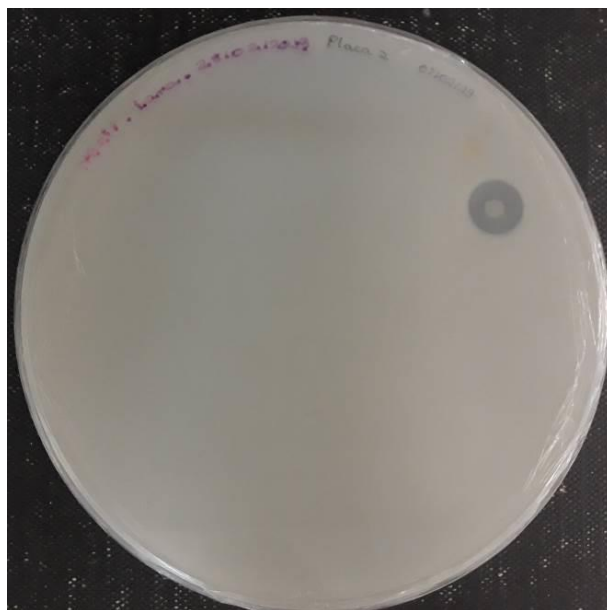


Figura 7: Ensaio de solubilização de fosfato, com formação de halo em um dos isolados microbianos, o que indica resultado positivo para o ensaio.

4. CONCLUSÕES

Embora ainda em fase inicial, este estudo faz parte de um trabalho de conclusão de curso de bacharelado em Ciências Biológicas na Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP, que gerou o primeiro banco de isolados bacterianos da Gruta Martimiano II e abriu a perspectiva para o desenvolvimento de pesquisas voltadas para o potencial biotecnológico de bactérias desta gruta. O número de isolados com capacidade biofertilizante pode ser justificado pela ausência de raízes de plantas que consigam penetrar na caverna. Outros ensaios para caracterização biotecnológica ainda serão realizados no decorrer desta pesquisa, como por exemplo para verificar a resistência de diferentes antibióticos, além disso, serão identificados os isolados com maior potencial biotecnológico por sequenciamento do gene 16S usando NGS (Sequenciamento de Nova Geração).

5. AGRADECIMENTOS

Agradecemos a Sociedade Excursionista e Espeleológica (SEE) pelo auxílio na realização das atividades de campo. Ao Laboratório de Genômica e Interação Bactérias-Ambiente da Universidade

Federal de Ouro Preto pelo apoio técnico-científico. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo fomento (Projeto BIGA, CFP 51/2013, processo 3385/2013). LMM é bolsista de produtividade pelo CNPq.

REFERÊNCIAS

- BARTON, H.A. et al. The impact of rock geochemistry on bacterial community structure in oligotrophic cave environments. **International Journal of Speleology**, v.36, n. 2, p. 93-104, 2007.
- BENTO, L.C.M.; TRAVASSOS, L.E.P.; RODRIGUES, S.C. Considerações sobre as cavernas quartzíticas do Parque Estadual do Ibitipoca, Minas Gerais, Brasil. **Caminhos de Geografia**, v. 16, n. 54, 2015.
- BULGARELLI, D.; SCHLAEPPI, K.; SPAEPEN, S.; VER LOREN VAN THEMAAT, E; SCHULZE-LEFERT, P. Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. **Annu Rev Plant Biol** 64, 807–838 (2013).
- CALVO, P.; NELSON, L.; KLOEPPER, J.W. Agricultural uses of plant biostimulants. **Plant and Soil**, v. 383, n. 1, p. 3-41, October 01 2014.
- CANDIROGLU, B.; GUNGOR, N.D. Cave Ecosystems: Microbiological View. **European Journal of Biology**, v. 76, n. 1, p. 36-42, 2017.
- CANHOS, V.P.; MANFIO, G.P. **Recursos Microbiológicos para Biotecnologia**, 2001.
- CORRÊA-NETO, A.V.; FILHO, J.B. Espeleogênese em quartzito da Serra de Ibitipoca, Sudeste de Minas Gerais. **Anuário do Instituto de Geociências**, v. 20, n. DI, p. 75–87, 1997.
- CULVER, D.C. **Cave Life. Evolution and Ecology**. Harvard University Press. Cambridge, Massachusetts and London, England. 189 pp, 1982.
- DEMAIN, A.L.; ADRIO, J.L. Contributions of microorganisms to industrial biology. **Mol Biotechnol**, v. 38, n. 1, p. 41-55, 2008.
- DOBEREINER, J.; MARRIEL, I.E.; NERY, M. Ecological distribution of *Spirillum lipoferum* Beijerinck. **Can J Microbiol**, v. 22, n. 10, p. 1464-73, 1976.
- EMBRAPA. Agroenergia. Bioprospecção Microbiana. **Embrapa**, 2015.
- FELESTRINO, E.B.; et al. Plant growth promoting bacteria associated with *langsdorffia hypogaea*-rhizosphere-host biological interface: a neglected model of bacterial prospection. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 172, 2017.
- FERREIRA, R.L.; MARTINS, R.P. Guano de Morcegos: fonte de vida em cavernas. **Ciência Hoje**, V.25, n.146, p.34-40, 1999.
- FERREIRA, R.L.; POMPEU, P.S. Fatores que influenciam a riqueza e a diversidade da fauna associada a depósitos de guano na Gruta Taboa, Sete Lagoas, MG, Brasil. **O Carste**, V.9, n.2, p.30-33, 1997.
- FERREIRA, R.L. A vida subterrânea nos campos ferruginosos. **O Carste** 17(3):106-115, 2005.

- FILHO, S.A.; et al. Bioprospecção e biotecnologia. **Parc.Estrat.**, v. 19, n. 38, p. 45–80, 2014.
- FRANCISCO JR, W.E.; BEVILAQUA, D.; GARCIA JR, O. Microbiological oxidative dissolution of a complex mineral sample containing pyrite (FeS₂), pyrrhotite (Fe_{1-x}S) and molybdenite (MoS₂). **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1095-1099, 2007.
- GAYLARDE, C.C.; BELLINASSO, M.L.; MANFIO, G.P. Biorremediação. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v.34, p. 36-43, 2005.
- GHOSH, S.; KUISIENE, N.; CHEEPHAM, N. The cave microbiome as a source for drug discovery: Reality or pipe dream?. **Biochemical pharmacology**, v. 134, p. 18-34, 2017.
- GILBERT, J.; DANIELPOL, D.L.; STANFORD, J.A. **Groundwater Ecology**. Academic Press Limited, San Diego, California. 571 pp, 1994.
- GOMES, F.T.M.C.; FERREIRA, R.L.; JACOBI, C.M. Comunidade de artrópodes de uma caverna calcária em área de mineração: composição e estrutura. **Rev. bras. De Zoociências**, V.2, n.1, p.77-96, 2000.
- HILL, G.T.; et al. Methods for assessing the composition and diversity of soil microbial communities. **Applied Soil Ecology**, v. 15, n. 1, p. 25–36, 2000.
- HOENEN S. Conhecimento atual sobre o bagre cavernícola, *Pimelodella kronei*, da Província Espeleológica do Vale do Ribeira, SP. **Espeleo-Tema**, V.18, p.31-41, 1997.
- INSTITUTO ESTADUAL DE FLORESTA. **Plano de manejo do Parque Estadual do Ibitipoca**. Belo Horizonte, 2007.
- KHAN, M.S.; ZAIDI, A.; AHMED, M.; OVES, M.; WANI, P.A. Plant growth promotion by phosphate solubilizing fungi – current perspective. **Archives of Agronomy and Soil Science** 56, 73–98, 2010.
- LEMES, C.G.C. **Diversidade metagenômica e potencial biotecnológico de cavernas de canga do Qaudrilátero Ferrífero**. 85 (Mestrado em Biotecnologia). Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2018.
- LEWINSOHN, T.M.; PRADO, P.I. Síntese do Conhecimento Atual da Biodiversidade Brasileira. **Ministério do Meio Ambiente**, p. 21–109, 2006.
- LIMA, P.E.S.; et al. Caracterização geoespeleológica preliminar da Gruta Martimiano II, Santa Rita de Ibitipoca – MG. 34 **Congresso Brasileiro de Espeleologia**, 2017. Disponível em: <http://www.cavernas.org.br/anais34cbe/34cbe_253-259.pdf>.
- MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo** 2a. Lavras. ISBN 85-87692-33-x, 2006.
- NAUTIYAL, C.S. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. **FEMS Microbiol Lett**, v. 170, n. 1, p. 265-70, 1999.
- NUMMER, A.R.; et al. Potencial geoturístico do Parque Estadual da Serra do Ibitipoca, Sudeste do Estado de Minas Gerais. **Anuário do Instituto de Geociências**, v. 35, n. 1, p. 112–122, 2012.
- NUMMER, A.R. **Análise Estrutural e estratigráfica do grupo Andrelândia na região de Santa Rita do Ibitipoca-Lima Duarte, sul de Minas Gerais**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1991.
- PAJARES, S.; BOHANNAN, B.J.M. Ecology of Nitrogen Fixing, Nitrifying, and Denitrifying Microorganisms in Tropical Forest Soils. **Front Microbiol** 7, 1045 (2016).

- PEREIRA, E.L.; MARTINS, B.A. Processos biotecnológicos na produção de bioinseticidas. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, Três Corações, v. 14, n. 2, p. 714-734, ago/dez. 2016.
- EREZ, R.C.; GROSSI, W.R. The quartzitic speleological district of the Parque Florestal Estadual do Ibitipoca, Minas Gerais, Brazil, **International Congress of Speleology**, 1987.
- SHARMA, S.B.; SAYYED, R.Z.; TRIVEDI, M.H.; GOBI, T.A. Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. **Springerplus** 2, 587, 2013.
- STALEY, J.T.; REYSENBACH, A.L. Biodiversity of Microbial Life: Foundation of Earth's Biosphere. **New York: Wiley Series in Ecological and Applied Microbiology**, 2001.
- STREIT, W.R.; SCHMITZ, R.A. Metagenomics - The key to the uncultured microbes. **Current Opinion in Microbiology**, v. 7, n. 5, p. 492–498, 2004.
- TRAJANO, E.; MOREIRA, J.R.A. Estudo da fauna de cavernas da província espeleológica arenítica Altamira-Itaituba, Pará. **Rev. Bras. Biol.**, V.51, n.1, p.13-29, 1991.