

ANÁLISE COMPARATIVA DE MICROORGANISMOS NA GRUTA REI DO MATO, SETE LAGOAS, MINAS GERAIS

Comparative Analysis of Microorganisms in the Rei do Mato Cave, Sete Lagoas, Minas Gerais

Flávia Mara Evangelista

Mestre em Geografia pela PUC Minas. Sócia/Diretora da Ativo Ambiental Ltda.

Orcid: <https://orcid.org/0000-0002-2742-1564>

flaviamevangelista@gmail.com

Luiz Eduardo Panisset Travassos

Doutor em Castologia pela University of Nova Gorica, Eslovênia. Professor do Programam de Pós-Graduação em Geografia da PUC Minas. Bolsista de Produtividade em Pesquisa do CNPq.

Orcid: <https://orcid.org/0000-0001-6264-2429>

luizpanisset@gmail.com

Pedro Oliveira Paulo

Doutor em Geociências e Meio Ambiente pela UNESP. Professor no Programam de Pós-Graduação em Ensino de Ciências da Universidade Estadual de Goiás. Laboratório de Paleobiologia e Geologia/LAPAGEO.

Orcid: <https://orcid.org/0000-0002-2972-8455>

pedro.paulo@ueg.br

Artigo recebido em junho/2025 e aceito em agosto/2025

RESUMO

As cavidades naturais subterrâneas distinguem-se por estabilidade microclimática, baixa disponibilidade de nutrientes e luminosidade reduzida, formando ecossistemas singulares para o estabelecimento e a persistência de comunidades microbianas. No contexto do espeleoturismo, a presença humana pode alterar padrões de deposição de matéria orgânica e de propagação de aerossóis, modificando a composição e a abundância relativa de microrganismos. Este artigo apresenta, em formato contínuo e pronto para periódico, a análise comparativa da distribuição espacial de microrganismos na Gruta Rei do Mato (Sete Lagoas, MG) em dois momentos contrastantes: 22/09/2020, ao final da estação seca e durante o fechamento da visitação por COVID-19, e 16/03/2022, ao final da estação chuvosa após a reabertura controlada. Em ambas as campanhas, foram expostas placas de Petri por sedimentação passiva durante vinte minutos em nove pontos distribuídos entre exterior, entrada, trechos turísticos e setores remotos, utilizando meios seletivos e não seletivos (Manitol Salt Agar para *Staphylococcus aureus*, MYP para *Bacillus cereus*, Cetrimide para *Pseudomonas aeruginosa*, Sabouraud para fungos e leveduras e Plate Count para contagem aeróbia total). Observou-se ausência de crescimento em Cetrimide em todos os pontos e campanhas; crescimento consistente em Manitol em todos os pontos, com maiores cargas nas áreas de maior permanência de visitantes; abundância e diversidade morfológica elevadas em Sabouraud, com registros “incontáveis” junto às passarelas do Lago da Serpente; destaque de *B. cereus* no ponto externo; e contagens totais acompanhando os “hotspots” revelados pelos meios seletivos. As diferenças temporais entre o período de fechamento e o de reabertura com protocolos foram discretas,

sugerindo que o controle de grupos, o uso de máscaras e a higienização com álcool 70% amorteceram potenciais incrementos microbianos associados ao retorno do fluxo turístico. Os resultados reforçam a necessidade de incorporar indicadores microbiológicos às rotinas de monitoramento e gestão de cavernas turísticas, com implicações para manejo de iluminação, ordenamento de visitação e critérios de classificação de relevância.

Palavras-chave: Microbiologia de cavernas; Carste; Turismo subterrâneo; *Staphylococcus aureus*; *Bacillus cereus*; Sabouraud.

ABSTRACT

Subterranean caves are microclimatically stable, oligotrophic ecosystems that host unique microbial communities. Human visitation in show caves can alter the deposition of organic matter and the propagation of aerosols, thereby affecting microbial abundance and composition. This paper presents a continuous, journal-ready comparative analysis of microorganisms in Rei do Mato Cave (Sete Lagoas, MG, Brazil) across two contrasting moments: September 22, 2020 (end of the dry season, when tourism was suspended due to COVID-19) and March 16, 2022 (end of the wet season, when controlled reopening was implemented). In both campaigns, passive air-sedimentation plates were deployed for twenty minutes at nine sites spanning outside, entrance, tourist trail and remote sectors, using selective and non-selective media (Mannitol Salt Agar for *Staphylococcus aureus*, MYP for *Bacillus cereus*, Cetrimide for *Pseudomonas aeruginosa*, Sabouraud for fungi/yeasts and Plate Count for total aerobic count). No growth was observed on Cetrimide at any site or campaign; Mannitol showed consistent growth at all sites, peaking at tourist stopovers; Sabouraud revealed high morphotype diversity with “uncountable” records near the Lago da Serpente walkways; *B. cereus* stood out at the outside site; and total counts mirrored hotspots indicated by selective media. Temporal differences between closure and controlled reopening were small, suggesting that group control, mask use and 70% alcohol hygiene buffered potential increases associated with tourism resumption. Findings support the integration of microbiological indicators into show-cave monitoring and management, informing decisions on lighting, visitation, and cave-relevance classification.

Keywords: Cave microbiology; Karst; Show-cave tourism; *Staphylococcus aureus*; *Bacillus cereus*; Sabouraud.

1. INTRODUÇÃO

Cavernas são ambientes frágeis e altamente especializados. Seu regime microclimático relativamente estável, associado à oligotrofia e à ausência de luz, favorece comunidades microbianas adaptadas a condições de baixa energia e em equilíbrio com os fluxos de água e matéria do sistema cárstico.

Do ponto de vista microbiológico, reconhecem-se cinco grupos principais — bactérias, fungos, algas, protozoários e vírus — que apresentam ampla variação morfológica e de tamanho (de micrômetros a centenas de micrômetros) e organização celular procariótica ou eucariótica, conforme o grupo (Northup; Lavoie, 2004). Em escala global, estimativas indicam que a biosfera da subsuperfície continental abriga comunidades microbianas numerosas e metabolicamente ativas, de

modo que esses habitats respondem por parcela relevante da biomassa do planeta (Whitman; Coleman; Wiebe, 1998; Bar-On; Phillips; Milo, 2018; Engel, 2019).

Embora a disponibilidade de carbono orgânico seja limitada, estudos têm mostrado que a diversidade e a versatilidade metabólica dessas comunidades podem ser elevadas, com consórcios capazes de explorar fontes energéticas discretas e interagir ativamente com os minerais do hospedeiro rochoso (Poulson; Culver, 1969; Culver, 1982; Barton, 2006; Jurado *et al.*, 2009; Hershey; Barton, 2018) hoje bem documentadas graças ao emprego de genética molecular e ferramentas geoquímicas desde os anos 1990 (Engel, 2019). Em cavernas abertas à visitação, a presença humana constitui vetor relevante de perturbação, ao introduzir partículas, bioaerossóis e nutrientes e ao alterar padrões de permanência e circulação do ar (Barton; Northup, 2007; Engel, 2019). Em resposta, a gestão espeleoturística tem incorporado, de modo crescente e sistemático, indicadores microbiológicos e microclimáticos para orientar o manejo, apoiando-se em diretrizes consolidadas em manuais e revisões (Cigna; Burri, 2000; Cigna; Forti, 2013; Travassos, 2019).

Em paralelo, a literatura sobre resistoma ambiental ressalta que a resistência a antibióticos é traço antigo e amplamente distribuído em bactérias ambientais, o que reforça a pertinência de abordagens preventivas e de monitoramento contínuo também em ambientes subterrâneos (Pawlowski *et al.*, 2016; Vanderwolf *et al.*, 2013). Além disso, quimiossíntese e metabolismos litotróficos podem sustentar produtividade primária em sistemas subterrâneos, independentemente da fotossíntese (Sarbu; Kane; Kinkle, 1996; Engel, 2019).

Nesse contexto, a Gruta Rei do Mato (Figura 1), em Sete Lagoas (MG), oferece um “laboratório natural” para testar como o uso turístico e a sazonalidade modulam a distribuição de microrganismos em setores com intensidades de visitação contrastantes. Nas zonas de entrada e penumbra, é comum o estabelecimento de fototróficos; já nas zonas afóticas, predominam comunidades quimioheterotróficas e quimiolitotróficas — estas últimas utilizando compostos inorgânicos como fonte de energia —, em conformidade com o que se descreve para ambientes cavernícolas (Sarbu; Kane; Kinkle, 1996; Northup; Lavoie, 2004). O circuito com passarelas e pontos formais de parada, justaposto a trechos remotos de acesso restrito, cria um gradiente interno de perturbação que permite comparar setores e estimar a contribuição relativa de insumos alóctones (visitantes, poeira, bioaerossóis) e processos endógenos (produção autóctone e interações rocha–microrganismos) para a carga microbiana.

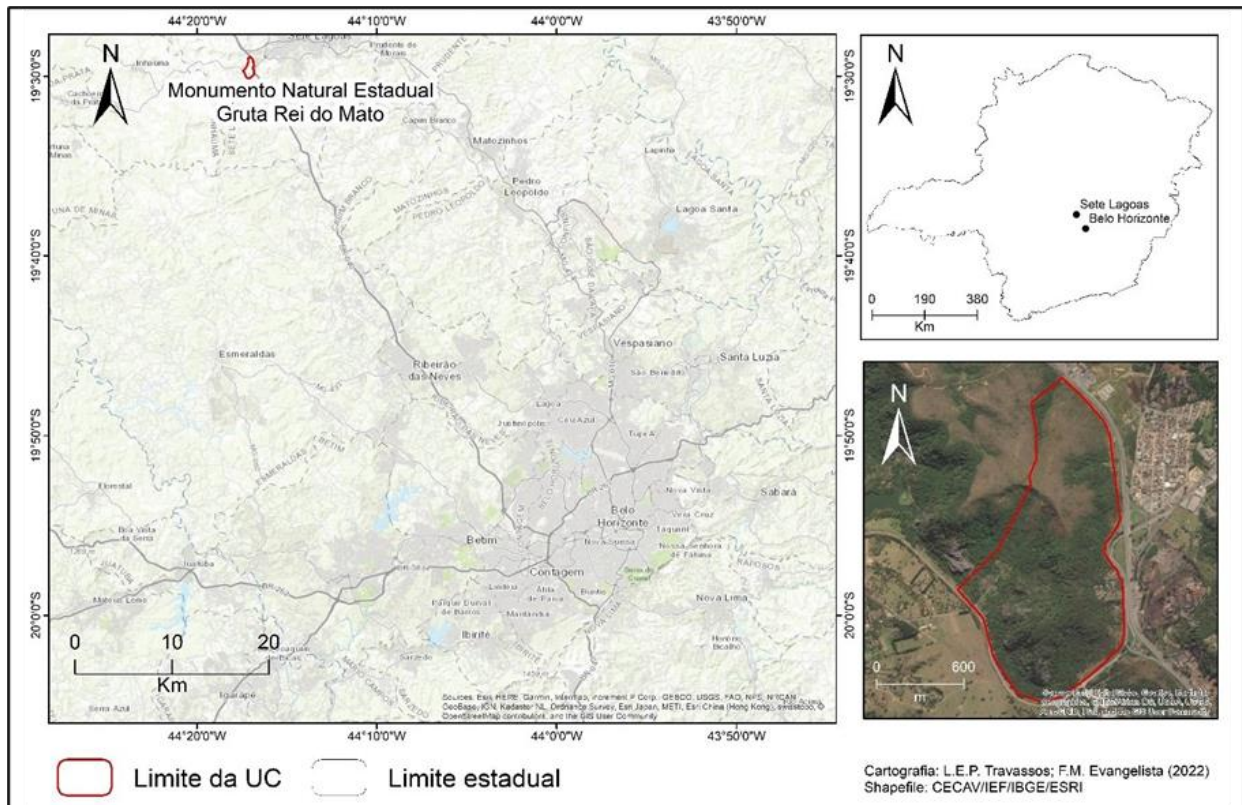


Figura 1 - Mapa de localização Gruta Rei do Mato, em Minas Gerais.

Fonte: Elaborado pelos autores.

Parte-se da hipótese central de que a distribuição espacial da carga microbiana acompanha a intensidade de uso turístico, produzindo gradientes mensuráveis entre áreas de permanência, passagens, entrada e segmentos remotos; e de que o fechamento da visitação durante a pandemia teria reduzido os aportes alóctones, com repercussões detectáveis nas contagens. Os objetivos são: caracterizar a distribuição espacial de microrganismos na Gruta Rei do Mato em pontos representativos do exterior, entrada, passarelas/salões de parada e setores remotos; comparar dois momentos contrastantes — fechamento (2020) e reabertura controlada (2022) — para avaliar variações temporais; avaliar grupos microbianos traçadores por meio de meios seletivos e não seletivos (ênfase em *Staphylococcus aureus* em Manitol e fungos/leveduras em Sabouraud); e discutir implicações para o monitoramento e o manejo de cavernas.

2. MICROBIOLOGIA EM CAVERNAS

Ambientes subterrâneos, como cavernas, caracterizam-se por oligotrofia, ausência de luz e estabilidade microclimática, condições que selecionam comunidades microbianas especializadas, com estratégias metabólicas ajustadas à baixa disponibilidade de energia (Paula, 2014; Hershey; Barton, 2018). Em cavernas epigênicas, o carbono orgânico é predominantemente alóctone e chega em fluxos tênues — muitas vezes como carbono orgânico dissolvido $<0,5$ mg/L —, reforçando o

caráter oligotrófico desses sistemas (Hershey *et al.*, 2018). Nesses contextos, vias quimiolitoautotróficas podem sustentar produção primária na ausência de luz, a partir da oxidação de compostos inorgânicos (Sarbu; Kane; Kinkle, 1996; Engel, 2019). Revisões recentes consolidam esse enquadramento ecológico para sistemas cavernícolas, destacando a interação entre insumos alóctones e processos endógenos na estruturação das comunidades (Engel, 2019).

Essas comunidades microbianas incluem bactérias, arqueias, fungos, leveduras e protozoários, muitos dos quais são capazes de sobreviver em condições extremas, como ambientes com baixa disponibilidade de água, pH ácido ou básico ou pressão elevada (Barns *et al.*, 1994; Ravenschlag *et al.*, 2000). A diversidade microbiana nesses ambientes, ainda pouco conhecida em regiões tropicais (Vanderwolf *et al.*, 2013), inclui organismos residentes adaptados ao meio subterrâneo e transientes, levados por ar, água ou fauna (Northup; Lavoie, 2004)

Micro-organismos desempenham papel ecológico essencial, atuando na decomposição da matéria orgânica, controle de populações, formação de espeleotemas e interação com minerais da rocha hospedeira. Alguns, como certos fungos, são recorrentes mesmo em cavernas pouco ou nada perturbadas, indicando origem autóctone e possível importância em processos geoquímicos subterrâneos (Hershey; Barton, 2018).

Diante dessas características, cavernas representam não apenas laboratórios naturais para o estudo da ecologia microbiana, mas também potenciais reservatórios de microrganismos com interesse biotecnológico, capazes de desenvolver rotas metabólicas únicas (Manfio, 2005; Taylor, 2009). No entanto, o avanço desse campo ainda enfrenta limitações técnicas e logísticas, desde a coleta em ambientes de baixa biomassa até a extração e análise de DNA com mínima contaminação (Barton *et al.*, 2006; Engel, 2019).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

A primeira campanha teve as coletas realizadas no dia 22/09/2020, enquanto a segunda e última campanha de coletas se deu no dia 16/03/2022, após a reabertura da gruta para o turismo. A escolha da Gruta Rei do Mato teve por fundamento suas características e seus atributos, mas também a possibilidade de se obter amostras tanto de áreas mais impactadas quanto de áreas menos impactadas pela ação antrópica.

Outro critério de seleção foi sua extensão e grau de desenvolvimento, somados ao fato de ser uma caverna aberta à visitação e situada nas proximidades de uma das principais rodovias de Minas Gerais. Esse contexto torna especialmente relevante avaliar os efeitos do uso turístico e da proximidade da rodovia — pretéritos, atuais e potenciais — sobre a integridade da cavidade e sobre as comunidades microbianas ali presentes.

Durante o período de estudo, a Gruta Rei do Mato foi fechada em março de 2020 devido à pandemia de COVID-19, reabrindo em maio de 2021 sob protocolos sanitários. Esse hiato permitiu comparar a atividade microbiana entre dois cenários contrastantes: (i) redução drástica do fluxo turístico e do tráfego veicular no entorno e (ii) retomada gradual das atividades.

As coletas foram planejadas para captar a sazonalidade: a primeira ocorreu ao final da estação seca e a segunda ao final da estação chuvosa. Os pontos de amostragem foram previamente definidos e registrados em mapa de controle (Figura 2). A seleção contemplou tanto salões de maior exposição à visitação quanto setores remotos com visitação proibida, representando um gradiente interno de uso.

Além desses pontos internos da Gruta Rei do Mato, foi também definido 01 (um) ponto na área externa da entrada da cavidade, para um comparativo da espacialização externa com a interna da Gruta. As placas de Petri com os meios de cultura selecionados foram pré-identificadas com os pontos definidos de acordo com a Figura 3 e identificadas na Tabela 1.

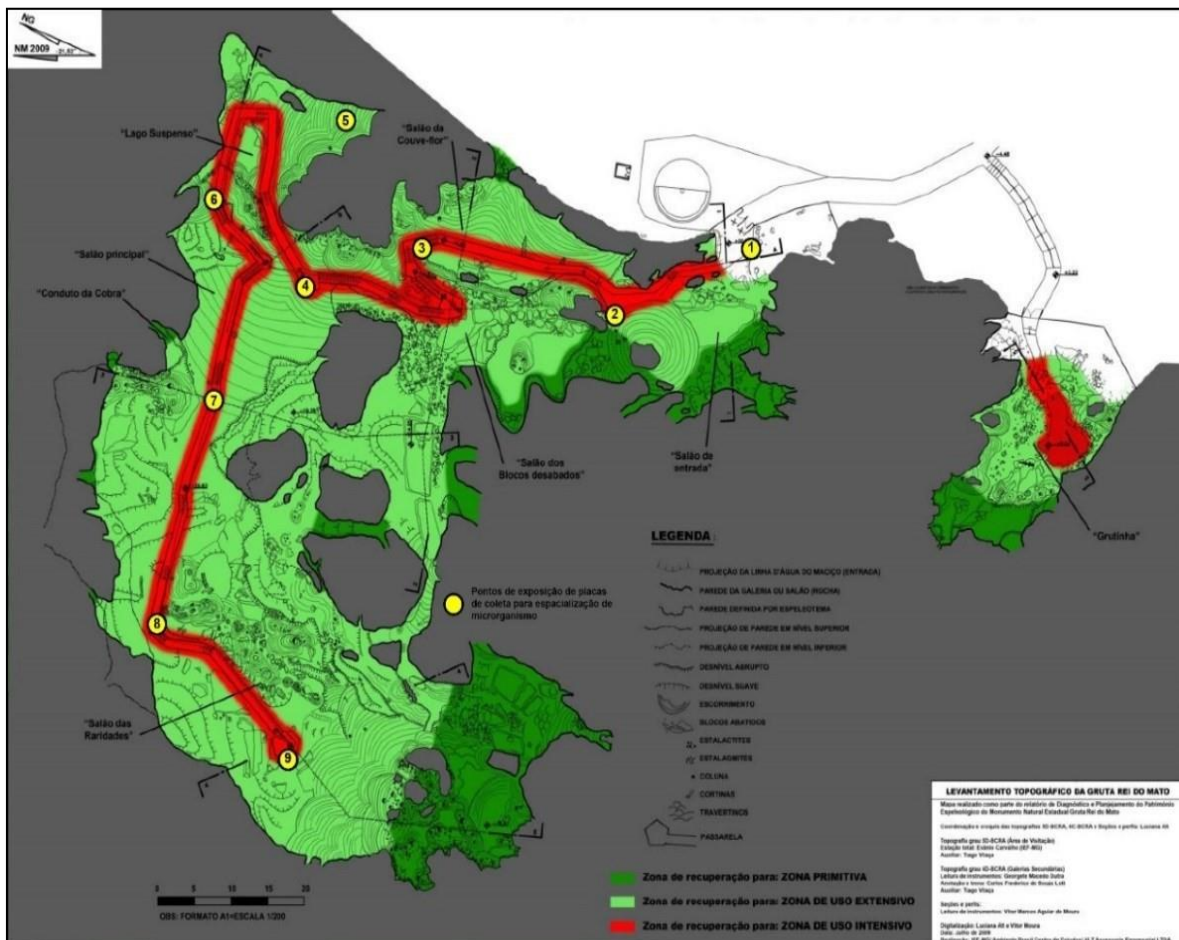


Figura 2 - Pontos de amostragem na Gruta Rei do Mato.
Fonte: Adaptado do Plano de Manejo do MNEGRM (2012).



Figura 3 - Exposição de placas de petri para coleta de microrganismos na aérea externa à entrada da Gruta Rei do Mato.
Fonte: Dados da pesquisa.

Tabela 1: Pontos de coleta da pesquisa.

| PONTO | IDENTIFICAÇÃO LOCAL DA GRUTA REI DO MATO |
|--------------|--|
| 01 | Área externa da entrada da Gruta do Rei do Mato |
| 02 | Interno na entrada da Gruta, próximo a passarela |
| 03 | Salão da Couve-Flor. Afastado da passarela. |
| 04 | Próximo ao “Lago da Serpente” Afastado da passarela |
| 05 | Próximo ao Lago da Serpente, passarela |
| 06 | Piso da passarela salão principal |
| 07 | Conduto remoto entre Salão das raridades e conduto da cobra |
| 08 | Salão das raridades próximo a passarela |
| 09 | Salão das raridades, final da Gruta, proibido acesso de turistas |

Fonte: Elaborada pelos autores.

Conforme ilustrado nas Figuras 4 e 5, as placas de cultura foram expostas ao ar por 20 min (método de sedimentação em placa). Ao término, foram imediatamente fechadas, vedadas com fita adesiva e acondicionadas em caixa térmica, para manutenção da temperatura, até a incubação em laboratório. Os pontos de exposição coincidiram com aqueles monitorados nas duas campanhas anteriores, realizadas em 22/09/2020 e 16/03/2022.



Figura 4 - Exposição de placas de Petri para coleta de microrganismos na área interna Gruta Rei do Mato, Sete Lagoas, MG.

Fonte: Dados da pesquisa.

Para a amostragem por sedimentação passiva em placa (deposição gravitacional), empregaram-se meios de cultura seletivos, escolhidos em função dos grupos microbianos previamente definidos e comumente presentes no ar e no solo. Os meios adquiridos (Laborclin®) estão listados na Tabela 2 e foram preparados conforme as especificações do fabricante. Por definição, meios seletivos contêm componentes que inibem o crescimento de determinados microrganismos e favorecem o de outros, permitindo o isolamento dos grupos de interesse (Alterthum, 2024).

Em cada campanha, placas de Petri foram expostas à sedimentação passiva por 20 min, em nove pontos distribuídos entre: exterior imediato da entrada, boca interna, salões turísticos com e sem passarela, áreas de parada e um setor remoto sem acesso público. Isso foi feito pelo fato da chegada de microrganismos às cavernas ocorrer por múltiplas vias — água corrente, deposição gravitacional/bioaerossóis e advecção por correntes de ar —, além do transporte por animais e visitantes (Northup; Lavoie, 2004).

A estratégia segue recomendações consagradas para amostragem de aerossóis em cavernas e para avaliação de resposta espacial associada a uso/fluxo (Barton, 2006; Taylor *et al.*, 2009; Paula, 2014). Como a maioria dos microrganismos ambientais é de difícil cultivo (<1% em muitas matrizes),

interpretamos os resultados como proxies de deposição e viabilidade em meios específicos, complementares a abordagens independentes de cultivo (Engel, 2019; Ikner *et al.*, 2007).

Após o lacre e o transporte, procedeu-se à incubação de acordo com as especificações de cada meio: Manitol Salt Agar ($35 \pm 2^\circ\text{C}/48$ h) para *Staphylococcus aureus*; MYP ($35 \pm 2^\circ\text{C}/48$ h) para *Bacillus cereus*; Cetrimide ($35 \pm 2^\circ\text{C}/72$ h) para *Pseudomonas aeruginosa*; Sabouraud ($25 \pm 2^\circ\text{C}/7$ dias) para fungos e leveduras; e Plate Count ($35 \pm 2^\circ\text{C}/72$ h) para contagem aeróbia total. Leituras com contador mecânico registraram UFC por unidade de área, adotando-se “NHC” (não houve crescimento/contagem) e “INC” (incontável) quando pertinente.

Tabela 2: Os meios de cultura utilizados para a pesquisa.

| MEIO DE CULTURA | MICROORGANISMO SELETIVO | TEMPO DE INCUBAÇÃO/DIAS | TEMPERATURA (°C) |
|-------------------|----------------------------------|-------------------------|------------------|
| Agar Manitol Salt | <i>Staphylococcus aureus</i> | 02 | 35+/- 2 °C |
| MYP Agar B Cereus | <i>Bacillus cereus</i> | 02 | 35+/- 2 °C |
| Agar Cetrimide | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 03 | 35+/- 2 °C |
| Agar Sabourand D | Fungos e leveduras | 07 | 25+/- 2 °C |
| Agar Plate Count | Contagem total de microrganismos | 03 | 35+/- 2 °C |

Fonte: Elaborada pela autora.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após seguir o tempo de incubação determinado pelo fabricante para cada meio de cultura específico e com auxílio do Contador de Colônias Mecânico CP 602 Phoenix, foi realizada a contagem microbiológica de cada placa exposta, levando-se em conta os dois períodos diferentes de coletas, conforme Figuras 5 e 6 e Tabelas 3 e 4.

Para a leitura das placas, empregou-se contador de colônias compatível com placas de Petri de até 120 mm de diâmetro, equipado com iluminação anular fluorescente (22 W) e lupa de 1,5× em haste flexível, otimizando contraste e visibilidade. O equipamento permite contagem em placas abertas ou fechadas por meio de acionamento mecânico. A plataforma de apoio, em acrílico transparente quadriculado, facilita a localização e o registro do número de colônias (UFC/placa).

Tabela 3: Contagem dos microrganismos da primeira campanha de campo.

| Meio de Cultura | 01 | 02 | 03 | 04 | 05 | 06 | 07 | 08 | 09 |
|-----------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|----------------------|----------------------|
| | UFC/m ² | UFC/m ² | UFC/m ² | UFC/m ² | UFC/m ² | UFC/m ² | UFC/m ² | UFC/m ² | UFC/m ² |
| Cetrimide | NHC | NHC | NHC | NHC | NHC | NHC | NHC | NHC | NHC |
| Manitol | 0,57x 10 ² | 0,36x 10 ² | 0,20x 10 ² | 0,21x 10 ² | 1,13x10 ² | 1,06x 10 ² | 0,18x 10 ² | 0,17x10 ² | 0,14x10 ² |
| Sabouraud | 0,42x 10 ² | 0,14x 10 ² | 0,21x 10 ² | 0,04x10 ² | INC | 0,09x10 ² | 0,02x10 ² | NHC | NHC |
| Plate Count | INC | INC | 0,51x10 ² | 0,16x 10 ² | 1,25x 10 ² | 1,31x10 ² | 0,37x10 ² | 1,11x10 ² | 0,42x10 ² |
| MYP | INC | 0,13x10 ² | 0,18x10 ² | 0,25x10 ² | 0,34x10 ² | 0,47x10 ² | 0,29x10 ² | 0,15x10 ² | 0,01x10 ² |

NHC: Não houve contagem de microrganismo; INC: Incontáveis.

Fonte: Dados da pesquisa.

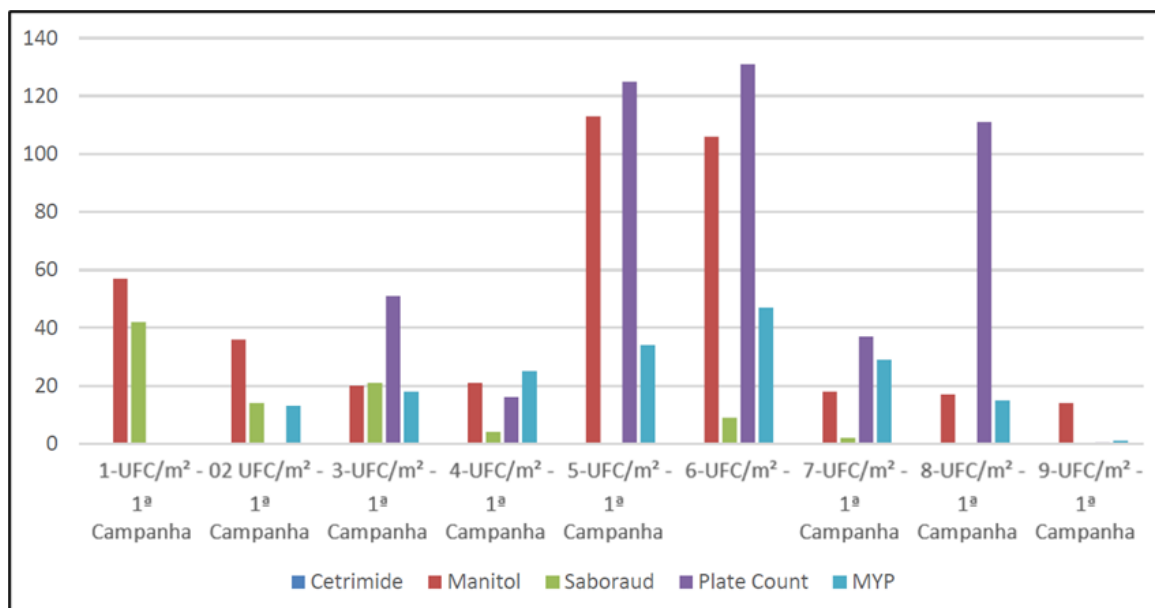


Figura 5: Crescimento dos microrganismos por meio seletivo – Primeira Campanha.

Fonte: Dados da Pesquisa

Tabela 4: Contagem dos microrganismos da segunda campanha de campo.

| Meio de Cultura | 01 | 02 | 03 | 04 | 05 | 06 | 07 | 08 | 09 |
|-----------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|----------------------|
| | UFC/m² | UFC/m² | UFC/m² | UFC/m² | UFC/m² | UFC/m² | UFC/m² | UFC/m² | UFC/m² |
| Cetrimide | NHC | NHC | NHC | NHC | NHC | NHC | NHC | NHC | NHC |
| Manitol | 0,41x 10 ² | 0,29x 10 ² | 0,15x 10 ² | 0,18x 10 ² | 1,x 10 ² | 1,15x 10 ² | 0,27x 10 ² | 0,28x 10 ² | 0,19x10 ² |
| Saboraud | 0,37x 10 ² | 0,19x 10 ² | 0,17x 10 ² | 0,07x10 ² | INC | 0,15x10 ² | 0,09x10 ² | NHC | NHC |
| Plate Count | INC | INC | 0,62x10 ² | 0,10x 10 ² | 1,48x10 ² | 1,08x10 ² | 0,31x10 ² | 1,00x10 ² | 0,31x10 ² |
| MYP | INC | 0,22x10 ² | 0,22x10 ² | 0,31x10 ² | 0,47x10 ² | 0,62x10 ² | 0,19x10 ² | 0,15x10 ² | NHC |

NHC: Não houve contagem de microrganismo; INC: Incontáveis.

Fonte: Dados da pesquisa.

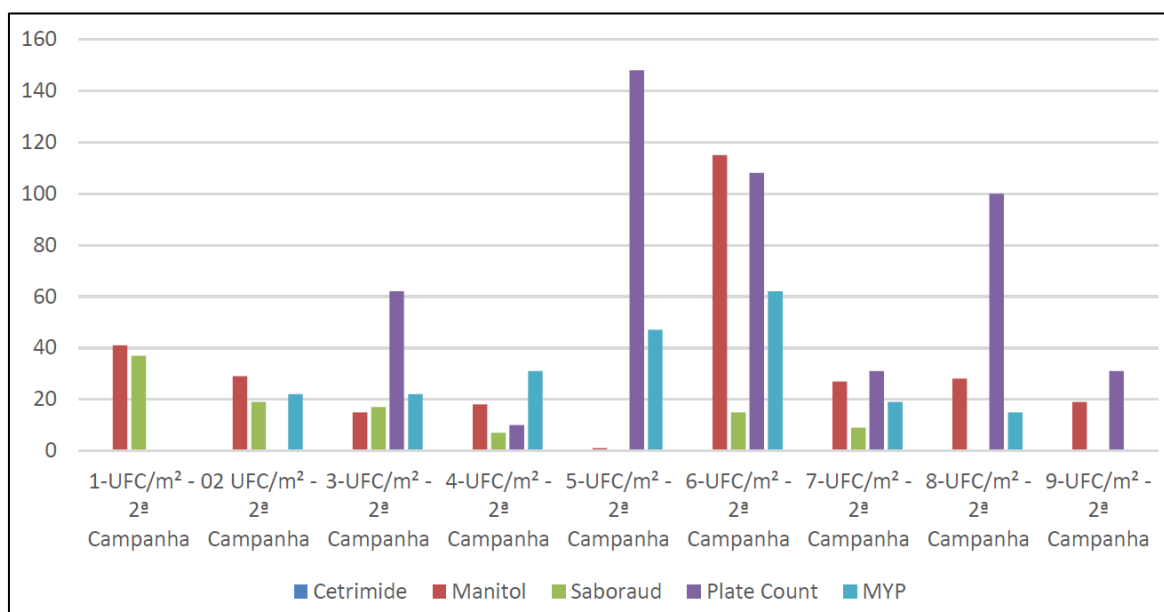


Figura 6: Crescimento dos microrganismos por meio seletivo – Segunda Campanha.

Fonte: Dados da Pesquisa

Na primeira campanha (22/09/2020), a Gruta Rei do Mato encontrava-se fechada à visitação desde março de 2020, em razão da pandemia de COVID-19. Houve, portanto, um hiato de cerca de seis meses sem turistas até a amostragem, realizada ao final da estação seca em termos climatológicos. Nesse intervalo, reduziram-se significativamente os aportes antrópicos e a influência da umidade externa na cavidade, o que se supõe ter afetado a ecologia local — sobretudo por atenuar a introdução de microrganismos alóctones associados à visitação.

Esse período serviu como referência para comparação com a segunda campanha (16/03/2022), conduzida ao final da estação chuvosa e aproximadamente dez meses após a reabertura ao turismo (maio de 2021).

A retomada das visitas após a COVID-19 ocorreu de forma controlada: grupos de até 20 pessoas, uso obrigatório de máscaras e higienização com álcool 70%. Essas medidas podem ter reduzido aportes antrópicos à cavidade (bioaerossóis, material particulado e umidade exógena), interferindo nas contagens microbianas; contudo, tal efeito não pode ser comprovado, pois não há séries de referência anteriores ao fechamento.

Quanto aos resultados, o meio Cetrimide — seletivo e diferencial para *Pseudomonas aeruginosa* — não apresentou crescimento em nenhum dos nove pontos amostrados em ambas as campanhas. Assim, o fechamento e a posterior reabertura não se associaram à detecção desse táxon na cavidade (Figuras 7 e 8).



Figura 7 - Placas de meio de cultura sem contagem de microrganismos.

Fonte: Dados da pesquisa.

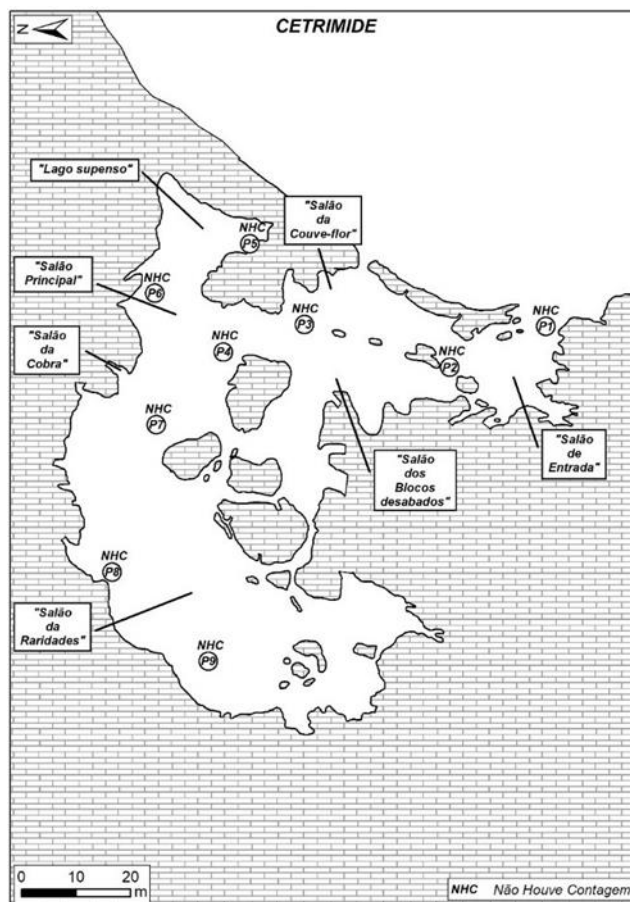


Figura 8 - Análise quantitativa do meio de cultura Cetrimide.
Fonte: Dados da pesquisa.

Já o Meio de cultura Manitol, seletivo para *Staphylococcus aureus*, apresentou crescimento em placas nas duas campanhas e para todos os 09 (nove) pontos amostrados, não variando significativamente a contagem total destes em relação a cada campanha, mantendo-se, portanto, o resultado equilibrado (Figuras 9 e 10), merecendo relevo o fato de que os pontos 01, 02, 05, 06 e 08, acessíveis aos turistas, foram os que mais se destacaram quanto ao crescimento do microrganismo em comento.



Figura 9 - Placas de meio de cultura com microrganismos.
Fonte: Dados da pesquisa.

Convém destacar que *Staphylococcus aureus* integra a microbiota humana — sobretudo de pele e mucosas nasais/orofaríngeas — e figura como patógeno oportunista, com quadros mais frequentes envolvendo pele e trato respiratório. No presente estudo, o táxon foi detectado ao longo de toda a cavidade, inclusive em setores sem acesso público, ainda que com contagens menores nesses trechos. Esse padrão é compatível com aportes alóctones associados à presença humana e com dispersão secundária (p. ex., por correntes de ar ou fauna), sem permitir, contudo, a atribuição inequívoca de origem.

Para o meio de cultura Sabouraud, seletivo para fungos (filamentosos e leveduras), constatou-se que, entre os pontos acessíveis à visitação, apenas o ponto 08 não apresentou crescimento; nos demais (01, 02, 05, 06 e 07) houve desenvolvimento fúngico. No ponto 05, em ambas as campanhas, o crescimento foi tão elevado que inviabilizou a contagem. Nos setores restritos   visitação (03, 04 e 09), observaram-se col nias nos pontos 03 e 04, enquanto o ponto 09 permaneceu sem crescimento nas duas campanhas. Por fim, a ampla variedade de morfotipos fúngicos nas placas ressalta a diversidade ao longo da cavidade (Figura 11).

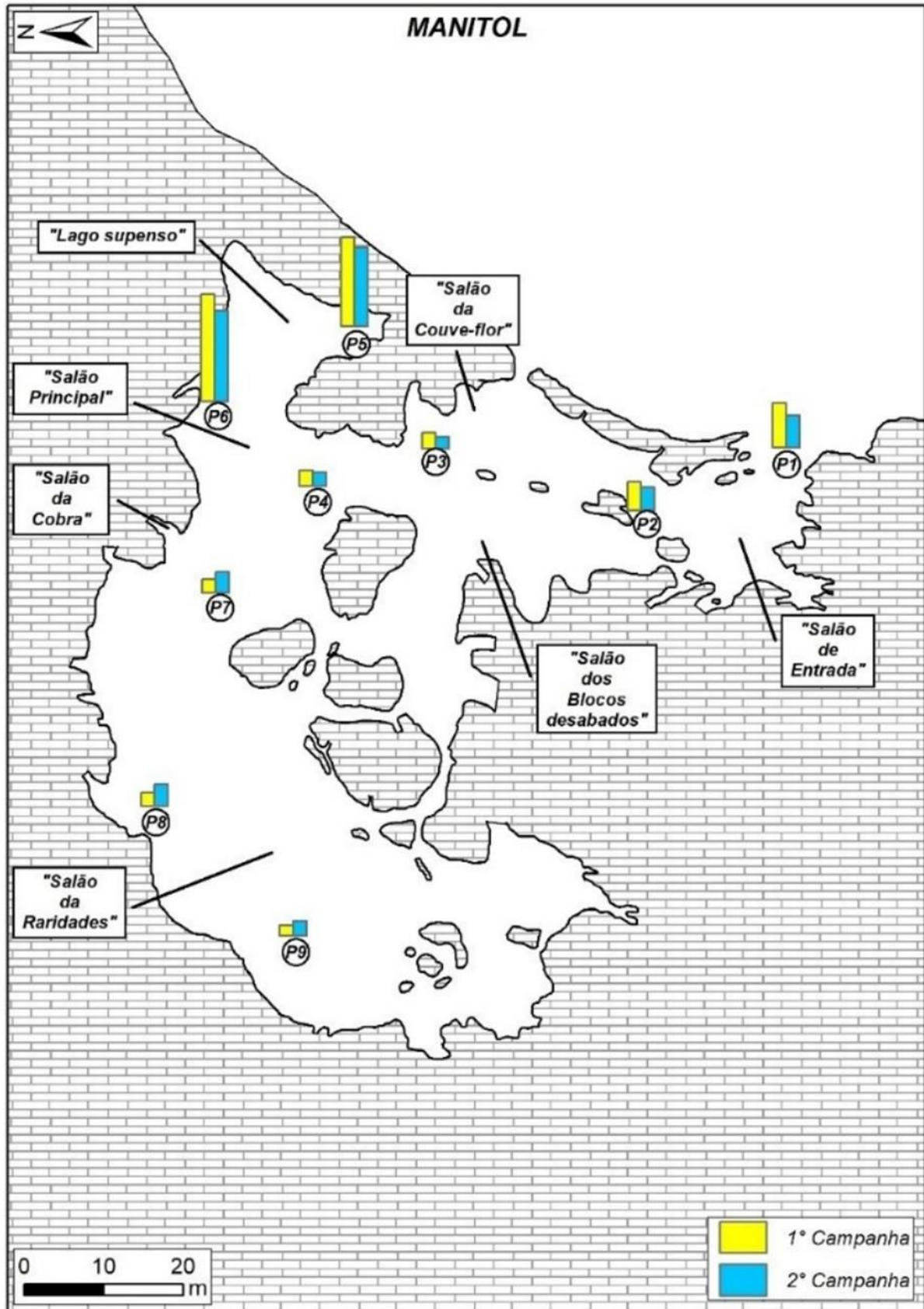


Figura 10 - Análise quantitativa do meio de cultura Manitol.
Fonte: Dados da pesquisa.

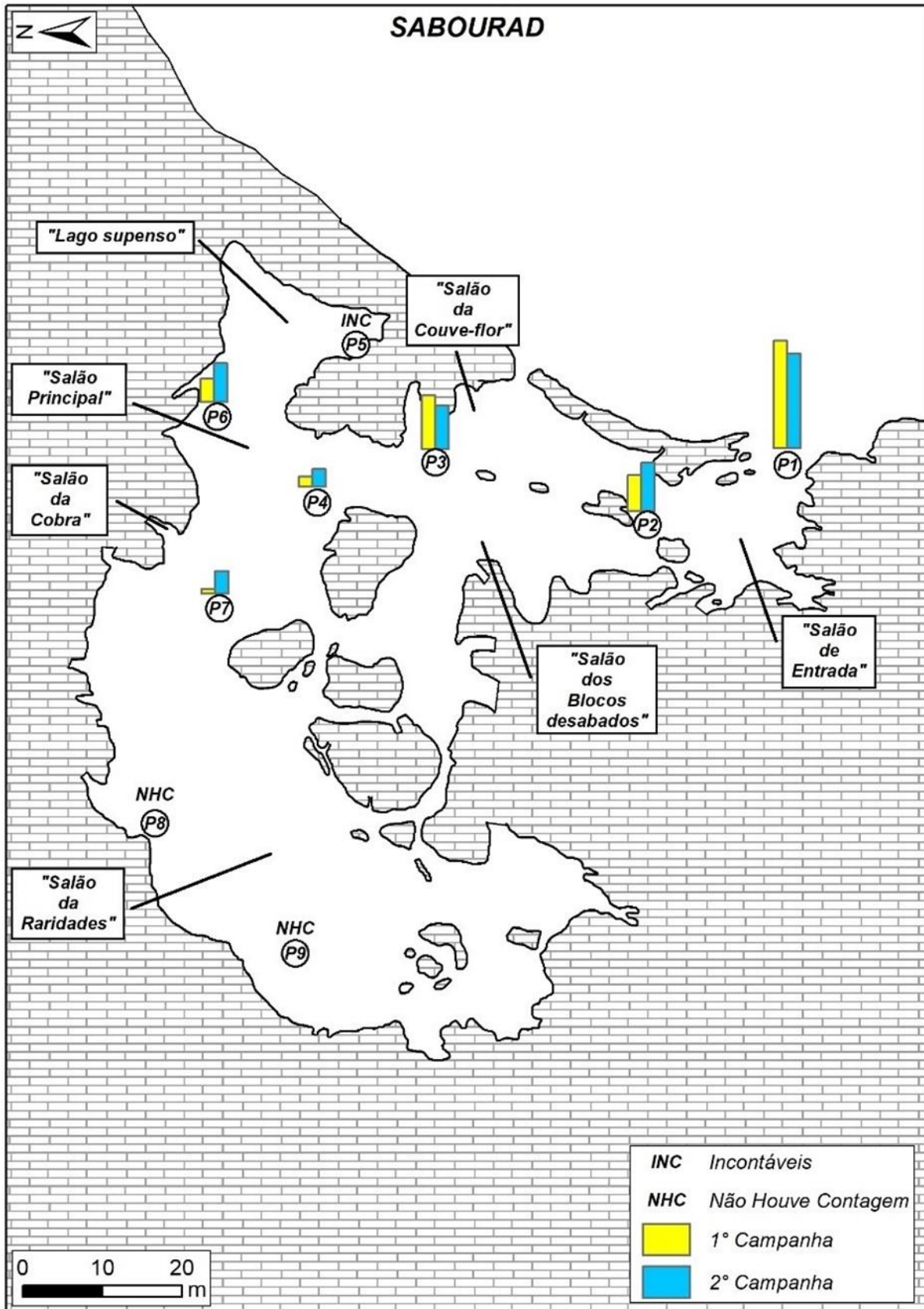


Figura 11 - Análise quantitativa do meio de cultura Sabouraud.
Fonte: Dados da pesquisa.

Para o meio MYP (Mannitol–Egg Yolk–Polymyxin), seletivo/diferencial para o grupo *Bacillus cereus*, observaram-se resultados consistentes entre as duas campanhas, sem diferenças marcantes no padrão de crescimento. No ponto 01 — exterior/entrada da gruta — o crescimento foi abundante em ambas as datas, impossibilitando a contagem (Figura 12). Ressalte-se que *Bacillus cereus* é comum em solos, embora algumas linhagens sejam potencialmente patogênicas ao ser humano.

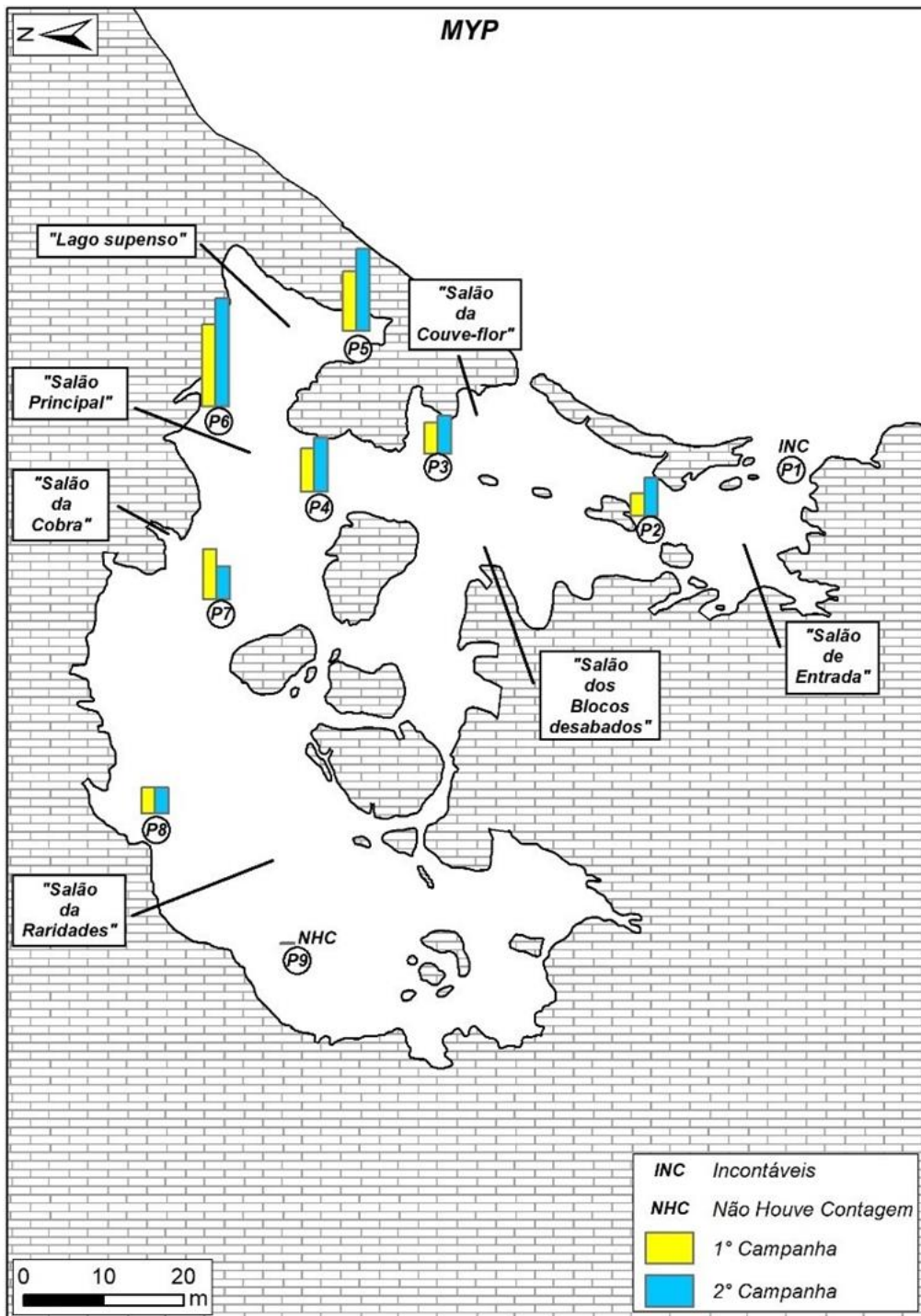


Figura 12: Análise quantitativa do meio de cultura MYP.

Fonte: Dados da pesquisa.

Por fim, no Plate Count Agar (PCA) — destinado à contagem total sem seletividade — os resultados foram semelhantes entre as campanhas, sugerindo estabilidade das cargas microbianas aéreas (Figuras 13 e 14). De forma consistente, os pontos que apresentaram maiores contagens nos meios seletivos também exibiram os maiores totais no PCA, indicando cargas mais elevadas nesses sítios, independentemente do grupo cultivado. Em ambas as campanhas, as maiores contagens concentraram-se nos setores junto às passarelas e salões, onde o tempo de permanência dos visitantes é maior, enquanto os trechos mais distantes e sem acesso público registraram as menores. Esse gradiente espacial é compatível com maior aporte e/ou ressuspensão associados à visitação, embora não permita inferir causalidade.

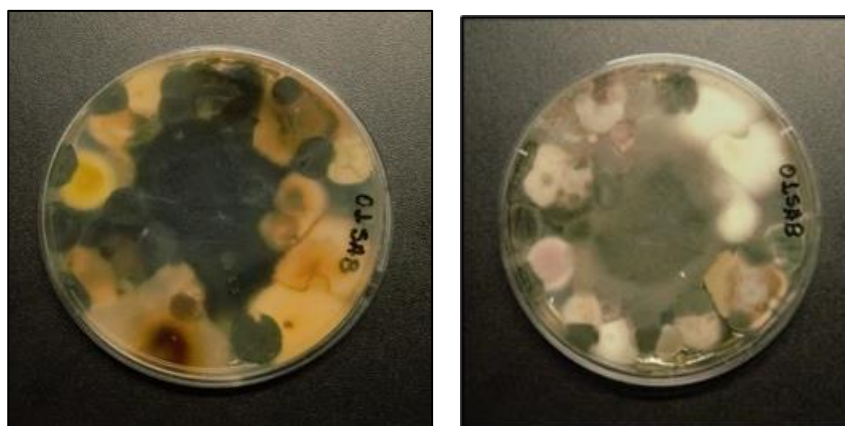


Figura 13 - Placas de meio de cultura PCA com microrganismos.
Fonte: Dados da pesquisa.

Tomadas em conjunto, as evidências indicam um quadro de relativa estabilidade espacial e temporal das cargas microbianas, com variações moduladas pelo grau de desenvolvimento da cavidade e pela proximidade de focos de ação antrópica. Entre a campanha realizada ao final da estação seca e aquela ao término da estação chuvosa, não se observaram diferenças marcantes, mesmo considerando os cenários com e sem presença de visitantes.

Ainda assim, verificou-se discreto aumento das contagens nos pontos de visitação — sobretudo onde há maior tempo de permanência dos grupos —, com destaque para os pontos 05, 07 e 08, embora as variações tenham sido de baixa magnitude. A adoção de protocolos sanitários (uso obrigatório de máscara cobrindo boca e nariz, higienização das mãos com álcool 70% e limitação do tamanho dos grupos) provavelmente reduziu os aportes antrópicos de bioaerossóis e a ressuspensão de partículas, o que, aliado à reconhecida estabilidade microclimática do ambiente cavernícola, pode ter amortecido contrastes entre os períodos comparados.

Em síntese, os dados delineiam um gradiente espacial: maiores contagens nas áreas próximas a passarelas e salões, onde há maior permanência de visitantes, e menores nos setores remotos sem

acesso público — padrão compatível com maior aporte/ressuspensão associados à visitação, sem, contudo, permitir inferência causal conclusiva.

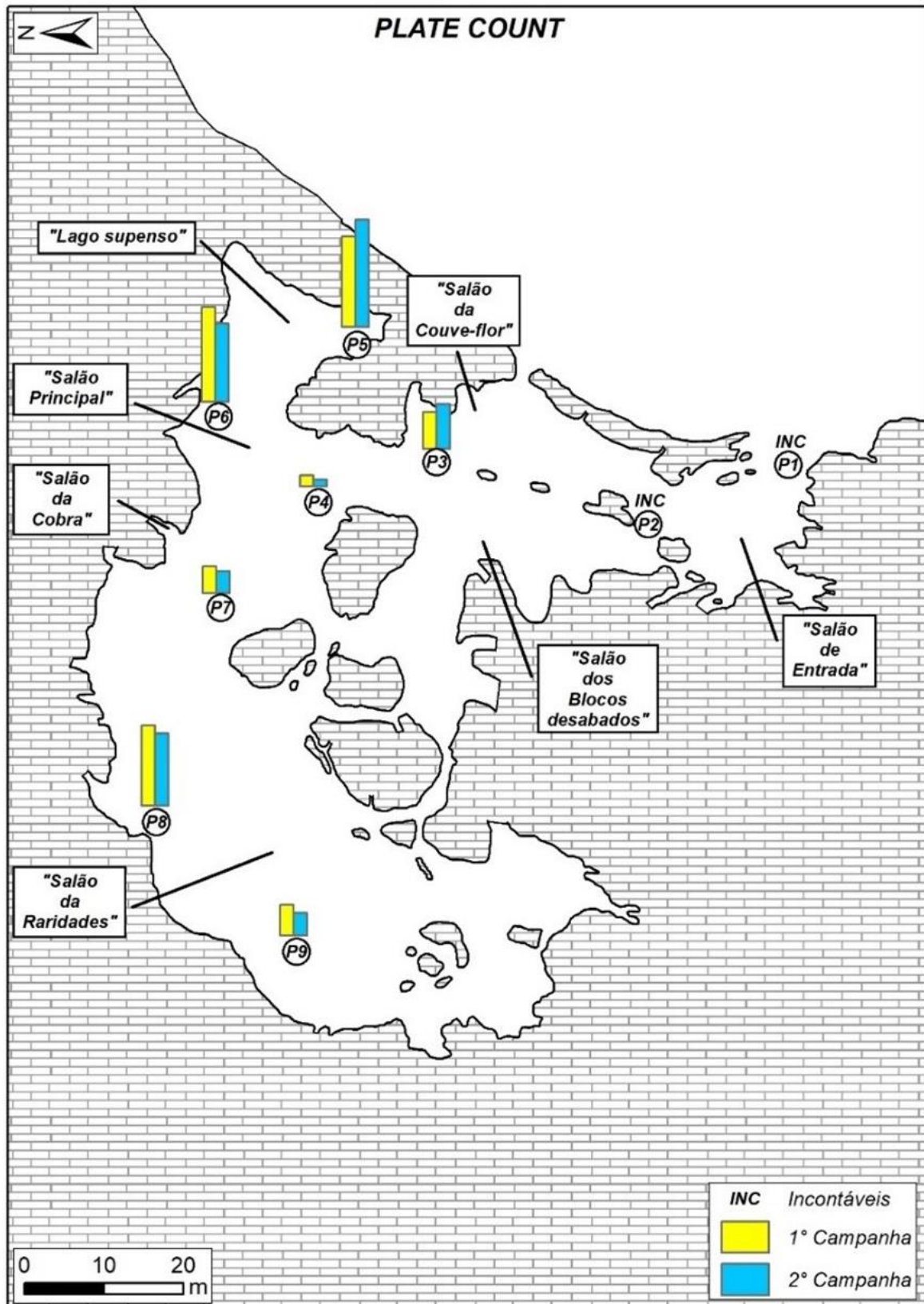


Figura 14 - Análise quantitativa do meio de cultura PCA.

Fonte: Dados da pesquisa.

5. CONCLUSÕES

O ambiente endógeno das cavidades naturais distingue-se profundamente do epígeo em termos químicos, físicos e biológicos, o que justifica o interesse científico — em especial na interface microbiologia–biotecnologia. Neste estudo, buscou-se caracterizar quais microrganismos ocorrem e como se distribuem ao longo do desenvolvimento da Gruta Rei do Mato (Sete Lagoas, MG) em duas campanhas contrastantes: (i) ao final da estação seca, durante o fechamento ao turismo por COVID-19, e (ii) ao final da estação chuvosa, após a reabertura controlada.

Os resultados apontam relativa estabilidade espacial e temporal das cargas microbianas. A comparação entre campanhas não revelou diferenças marcantes, sugerindo que a reconhecida estabilidade microclimática das cavernas tende a amortecer variações de curto prazo. Ainda assim, observou-se discreto incremento de contagens nos pontos de maior permanência dos visitantes — com destaque reiterado para os trechos junto ao Lago da Serpente e ao salão principal —, enquanto setores remotos e sem acesso turístico mantiveram níveis de base substancialmente menores. As medidas sanitárias vigentes na reabertura (uso obrigatório de máscaras, higienização das mãos com álcool 70% e limitação do tamanho dos grupos) provavelmente reduziram o aporte de bioaerossóis e a ressuspensão de partículas, contribuindo para a atenuação de contrastes entre os períodos. À luz do desenho amostral disponível, não foi possível demonstrar um efeito inequívoco da presença humana sobre a biodiversidade microbiana da cavidade; as diferenças detectadas foram discretas e espacialmente coerentes com o padrão de uso.

Do ponto de vista sanitário, confirma-se a presença de microrganismos potencialmente patogênicos, o que recomenda a manutenção de cuidados para visitantes, trabalhadores e pesquisadores (EPI adequado, higiene das mãos, rotinas de limpeza de corrimãos e passarelas).

No âmbito normativo, ressalta-se que a classificação brasileira de cavernas não exige estudos microbiológicos específicos. Considerando o papel funcional dos microrganismos na dinâmica desses habitats e seu potencial biotecnológico, a inclusão de indicadores microbiológicos em avaliações de relevância agregaria valor científico e subsídios de manejo.

Recomenda-se, portanto: (1) incorporar rotineiramente indicadores microbiológicos aos programas de monitoramento (por exemplo, *S. aureus* em Manitol, fungos/ leveduras em Sabouraud e contagem aeróbia total em PCA); (2) estruturar séries temporais com desenho amostral que priorize pontos de parada e passarelas, preservando controles em áreas remotas para aferição do “nível de base”; (3) quando possível, adotar abordagens complementares (p. ex., desenho BACI e métodos moleculares) para fortalecer a inferência sobre efeitos de uso e sazonalidade; e (4) manter boas práticas operacionais já testadas — controle do tamanho dos grupos, limitação do tempo de permanência e rotinas de higienização — por mostrarem compatibilidade com a conservação e a

segurança sanitária. Essas diretrizes alinham-se às recomendações recentes para biomonitoramento microbiano em ambientes cársticos e aos achados desta pesquisa.

AGRADECIMENTOS

Agradece-se à gerência e à equipe do Monumento Natural Estadual Gruta Rei do Mato pelo apoio logístico e em campo, à CAPES pelo fomento, à Ativo Ambiental pelas análises laboratoriais e ao ICMBio e ao IEF/MG pelas autorizações.

REFERÊNCIAS

- ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. São Paulo: Atheneu, 2024. 1012p.
- BARNS, S. M.; FUNDYGA, R. E.; JEON, S.; BUCKLE, E. Remarkable archaeal diversity detected in a Yellowstone National Park hot spring. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, n. 5, p. 1609-1613, 1994.
- BAR-ON, Y. M.; PHILLIPS, R.; MILO, R. The biomass distribution on Earth. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 115, n. 25, p. 6506–6511, 2018.
- BARTON, H. A.; NORTHUP, D. E. Geomicrobiology in cave environments: past, current and future perspectives. **Journal of cave and karst studies**, v. 69, n. 1, p. 163-178, 2007.
- HERSHEY, O.S.; BARTON, H.A. The Microbial Diversity of Caves. In: MOLDOVAN, O. T.; KOVÁCS, L.; HALSE, S. (Eds.). **Cave Ecology**. Cham: Springer, 2018.
- IEF - INSTITUTO ESTADUAL DE FLORESTAS – MINAS GERAIS. **Plano de Manejo do Monumento Natural Estadual Gruta Rei do Mato (MNEGRM)**. Belo Horizonte: IEF, 2012. 63p.
- IKNER, L. A.; TOOMEY, R. S.; NOLAN, G.; NEILSON, J. W.; PRYOR, B. M.; MAIER, R. M. Culturable Microbial Diversity and the Impact of Tourism in Kartchner Caverns, Arizona. **Microb Ecol.**, v. 53, p. 30-42, 2007.
- MANFIO, G. P. Microbiota. In: LEWINSOHN, T. M. **Avaliação do estado do conhecimento da Biodiversidade Brasileira**. Brasília: MMA, 2005. p. 113-145
- NORTHUP, D. E.; LAVOIE, K. H. Microorganisms in caves. In: GUNN, J. (Ed.). **Encyclopedia of caves and karst science**. Routledge, 2004. p. 1083-1089.
- RAVENSCHLAG, K.; SAHM, K.; KNOBLAUCH, C.; AMANN, R. Community structure, cellular rRNA content, and activity of sulfate-reducing bacteria in marine Arctic sediments. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 8, p. 3592-3602, 2000.
- WHITMAN, W. B.; COLEMAN, D. C.; WIEBE, W. J. Prokaryotes: the unseen majority. **Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)**, v. 95, n. 12, p. 6578–6583, 1998.