

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA**

MAYANNE KARLA DA SILVA

**DIVERSIDADE E BIOPROSPECÇÃO DE ENZIMAS, SURFACTANTES E
HERBICIDAS DE FUNGOS PRESENTES EM SEDIMENTOS MARINHOS DO
OCEANO AUSTRAL AO LONGO DA ANTÁRTICA MARÍTIMA**

BELO HORIZONTE

2023

MAYANNE KARLA DA SILVA

**DIVERSIDADE E BIOPROSPECÇÃO DE ENZIMAS, SURFACTANTES E
HERBICIDAS DE FUNGOS PRESENTES EM SEDIMENTOS MARINHOS DO
OCEANO AUSTRAL AO LONGO DA ANTÁRTICA MARÍTIMA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais - Pampulha, como requisito para obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

Orientador: Dr. Luiz Henrique Rosa

Departamento de Microbiologia da UFMG

Co-orientador: Dr. Alysson Wagner Fernandes Duarte

Universidade Federal de Alagoas, Arapiraca

BELO HORIZONTE

2023

043

Silva, Mayanne Karla da.

Diversidade e bioprospecção de enzimas, surfactantes e herbicidas de fungos presentes em sedimentos marinhos do oceano austral ao longo da Antártica marítima [manuscrito] / Mayanne Karla da Silva. – 2023.

121 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Dr. Luiz Henrique Rosa. Co-orientador: Dr. Alysson Wagner Fernandes Duarte.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia.

1. Microbiologia. 2. Regiões Antárticas. 3. Extremófilos. 4. Bioprospecção. 5. Taxonomia. I. Rosa, Luiz Henrique. II. Duarte, Alysson Wagner Fernandes. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 579



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE **MAYANNE KARLA DA SILVA**

Nº REGISTRO: **2021662025**

Às 09:00 horas do dia **27 de abril de 2023**, reuniu-se por via remota, a Comissão Examinadora composta pelos Drs. Nalu Teixeira de Aguiar Peres (Departamento de Microbiologia/ICB/UFMG), Betania Barros Cota (Instituto René Rachou - FIOCRUZ-MG), Prof. Dr. Luiz Henrique Rosa (Orientador) e o Prof. Dr. Alysson Wagner Fernandes Duarte, para julgar o trabalho final "**Diversidade e bioprospecção de enzimas, surfactantes e herbicidas de fungos presentes em sedimentos marinhos do Oceano Austral ao longo da Antártica marítima**", da aluna **Mayanne Karla da Silva**, requisito final para a obtenção do Grau de **MESTRA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Dr. Luiz Henrique Rosa - orientador, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para a apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. A candidata foi considerada **APROVADA**. O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. A candidata tem 60 (sessenta) dias, a partir desta data, para entregar a versão final da dissertação ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da UFMG e requerer seu diploma.

Belo Horizonte, 27 de abril de 2023

Membros da banca:

Profa. Dra. Nalu Teixeira de Aguiar Peres

Dra. Betania Barros Cota

De acordo:

Prof. Dr. Luiz Henrique Rosa

(Orientador)

Prof. Dr. Alysson Wagner Fernandes Duarte

(Coorientador)

Profa. Dra. Daniele da Glória de Souza
(Coordenadora do Programa de Pós-graduação
em Microbiologia)



Documento assinado eletronicamente por **Luiz Henrique Rosa, Professor do Magistério Superior**, em 27/04/2023, às 12:52, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Alysson Wagner Fernandes Duarte, Usuário Externo**, em 27/04/2023, às 13:44, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Nalu Teixeira de Aguiar Peres, Professora do Magistério Superior**, em 27/04/2023, às 13:44, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Daniele da Glória de Souza, Coordenador(a) de curso de pós-graduação**, em 27/04/2023, às 16:07, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Betania Barros Cota, Usuário Externo**, em 27/04/2023, às 17:27, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2214952** e o código CRC **349EB887**.

COLABORADORES:

Dra. Rosemary Vieira

Dr. Arthur Ayres Neto

Universidade Federal Fluminense, RJ

Dra. Micheline Carvalho-Silva

Dr. Paulo E. A. S. Câmara

Universidade de Brasília, DF

Dr. Fábio S. de Oliveira

Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG

Dr. Fabyano A. C. Lopes

Universidade Federal do Tocantins, Porto Nacional, TO

Dr. Peter Convey

University of Johannesburg, South Africa

AGRADECIMENTOS

Gratidão pela minha vida, pela força incomum e os valores que carrego comigo, por ser abençoada na realização dos meus objetivos pessoais e profissionais, gratidão por tudo meu querido senhor Jesus! Obrigada a toda a minha família, minha mãe, meu pai, meu irmão e os meus filhotes de quatro patas (Mel, Scooby e a Mulher) por serem meu lar nesse mundão, meus suportes e geradores da minha alegria. Direi isto por todo o meu viver: “sem vocês, eu NADA seria”, especialmente os meus pais que nunca tiveram tantas possibilidades e que diariamente abdicam de algo para me proporcionar o privilégio de estudar e de me capacitar, certamente todo o meu caminhar é por e para vocês. Estamos chegando lá, juntos!!

Gostaria de agradecer a todos os docentes do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da UFMG pelas orientações e momentos de aprendizado, vocês são inspiradores! E também a Débora e ao Tiago da coordenação que me forneceram um suporte essencial para a minha adaptação ao programa. Agradeço também a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por conceder o auxílio financeiro que tornou possível minha manutenção para o desenvolvimento dessa pesquisa. Meu agradecimento ao Laboratório de Microbiologia Polar e Conexões Tropicais por permitir conduzir este estudo, foi um prazer passar quase 2 anos dentro deste cantinho! Incluindo todos os seus integrantes, sairei com um carinho mais do que especial pela Débora, Livia, Elisa, Stephanie, Eldon, Natana, Láuren, Vívian e Graciely por todo o suporte e por terem tornado o percurso mais leve. Incluindo a Gisele, Ana, Flávia, Luíza e a Bárbara, obrigada pelas boas trocas!! Bem como a Tayná, Glenda e a Letícia por terem sido maravilhosas comigo, amei conhecê-las, as levarei para a vida!!

Aos meus amigos de longa data, Thalia e Célio por sempre estarem comigo, admiro vocês demais!! Gostaria de agradecer a todas as pessoinhas que conheci durante a minha passagem por Belo Horizonte, em particular todos os integrantes da república que convivi, os quais se tornaram muito especiais para mim, cada um do seu jeitinho! Obrigadão por tudo!

E, por fim, agradeço imensamente ao professor Luiz, por ter topado me orientar nesta etapa, por todo o acolhimento, paciência, ensinamentos e suporte para a condução desta pesquisa. Não há palavras que expressem a minha gratidão pela confiança no meu trabalho e quão essencial foi poder fazer parte do seu grupo e ser sua orientanda! Agradeço também ao professor Alysson pela coorientação e a manutenção da nossa parceria! Os levo como exemplos, é um privilégio poder contar com vocês! Obrigada por tudo!!

RESUMO

A diversidade das comunidades fúngicas presentes em sedimentos marinhos da Antártica ainda é pouco conhecida e escassas são as informações acerca da sua real riqueza, ecologia e potencial biotecnológico. Nesse sentido, essa dissertação objetivou identificar fungos presentes em sedimentos marinhos do Oceano Austral por meio das técnicas independente (DNA *metabarcoding*) e dependente de cultivo (obtenção de culturas), bem como prospectar exoenzimas, biossurfactantes e metabólitos herbicidas produzidos pelos fungos cultiváveis. As amostras de sedimento marinho utilizadas foram coletadas de diferentes profundidades (Walker Bay: 52 m, Whalers Bay: 151 m e English Strait: 404 m) ao longo do Oceano Austral na Antártica Marítima. Para a caracterização dos fungos não cultiváveis foi realizada a extração de DNA total, amplificação e sequenciamento da região ribossomal ITS2 a partir das amostras de sedimentos e os táxons atribuídos após a análise bioinformática das sequências obtidas em comparação com os bancos de dados curados UNITE e GenBank. Os fungos cultiváveis foram obtidos a partir da inoculação das amostras de sedimentos nos meios de cultura ágar marinho glicose (MAG), ágar sabouraud (SAB), ágar extrato de malte (MEA), ágar dicloran rosa bengala (DRBC) e ágar dicloran glicerol 18 (DG18) e incubados a 15 °C por 60 dias. Os fungos cultiváveis foram identificados por meio da taxonomia polifásica e triados para averiguar sua capacidade de produção de enzimas, biossurfactantes e metabólitos herbicidas. Para os fungos não cultiváveis, um total de 193.436 *reads* de DNA foram detectadas nos sedimentos de 52 m (48.112), 151 m (104.704) e 404 m (40.620) de profundidade e identificados 133 táxons, 88 detectados a 52 m, 32 a 151 m e 59 a 404 m de profundidade. A comunidade fúngica não cultivável foi dominada por táxons dos filos *Ascomycota* e *Basidiomycota*, bem como aqueles pertencentes ao reino Straminopila (filogeneticamente próximo aos fungos), os quais em termos de ecologia funcional foram caracterizados como saprotróficos, patogênicos e simbióticos. Os táxons não cultiváveis dominantes foram *Thelebolus balaustiformis*, *Ciliophora* sp., *Pseudogymnoascus* sp., Fungi sp. 1, *Agaricomycetes* sp. (Fungi) e *Chaetoceros* sp. 1 (Straminopila). Entre a comunidade de fungos cultiváveis, os gêneros predominantes foram *Meyerozyma*, *Penicillium*, *Antarctomyces*, *Thelebolus*, *Pseudeurotium* e *Cladosporium*. As espécies cultiváveis dominantes foram *Meyerozyma guilliermondii*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium* cf. *palitans*, *Pseudeurotium* cf. *bakeri* e *Thelebolus balaustiformis*. A maioria dos fungos cultiváveis exibiu atividade positiva para mais de uma enzima avaliada, principalmente para proteases (63 isolados - 92%), invertases (58 - 85%), celulases (37 - 54%), lipases (36 - 52%), carragenases (35 - 51%), agarases (32 - 47%), pectinases (30 - 44%) e esterases (11 - 16%),

com destaque aos isolados de *Penicillium* sp. Além disso, os isolados de *M. guilliermondii* UFMGCB 19667 e 19651 exibiram os melhores Índices Enzimáticos para invertase e protease (3,05 e 2,76, respectivamente). Quatro isolados demonstraram atividade biossurfactante significativa, em especial *Antarctomyces* sp. UFMGCB 19617, com maior valor de IE₂₄ (81,38%), em comparação ao controle positivo (84,56%) em SDS 1%. Todos os extratos obtidos dos isolados de *P. cf. palitans* (24) exibiram efeito herbicida contra *Lactuca sativa* (alface crespa) e *Allium schoenoprasum* (cebolinha), destacando-se os isolados UFMGCB 19623 e 19625 que exibiram fitotoxicidade para ambos os alvos na concentração de 1 mg mL⁻¹; já os demais isolados desta espécie tiveram atividade seletiva apenas contra as sementes de *A. schoenoprasum* nas concentrações de 1 a 0,5 mg mL⁻¹. Os resultados encontrados indicam que os sedimentos marinhos da região Antártica são capazes de abrigar um significativo grupo taxonômico de fungos cultiváveis e não cultiváveis, revelados pelas técnicas independente e dependente de cultivo, os quais podem possuir diferentes papéis ecológicos nos sedimentos do Oceano Austral. Além disso, os táxons dos cultiváveis foram capazes de produzir exoenzimas ativas, biossurfactantes e metabólitos herbicidas que podem representar recursos interessantes em aplicações biotecnológicas industriais e agrícolas.

Palavras-chave: Extremófilos; Polar; eDNA; Taxonomia; Bioprospecção; Oceano Austral.

ABSTRACT

The diversity of fungal communities present in Antarctic marine sediments is still little known and information about their real richness, ecology and biotechnological potential is scarce. In this sense, this dissertation aimed to identify fungi present in marine sediments of the Southern Ocean through independent (DNA *metabarcoding*) and culture-dependent (obtaining cultures) techniques, as well as prospecting exoenzymes, biosurfactants and herbicidal metabolites produced by cultivable fungi. The marine sediment samples used were collected from different depths (Walker Bay: 52m, Whalers Bay: 151m and English Strait: 404m) along the Southern Ocean in Maritime Antarctica. For the characterization of non-cultivable fungi, total DNA extraction, amplification and sequencing of the ITS2 ribosomal region were performed from the sediment samples and the assigned taxa after bioinformatic analysis of the sequences obtained in comparison with the UNITE and GenBank curated databases. The cultivable fungi were obtained from the inoculation of sediment samples in the culture media glucose marine agar (MAG), sabouraud agar (SAB), malt extract agar (MEA), dicloran rose bengal agar (DRBC) and dichloran glycerol agar 18 (DG18) and incubated at 15 °C for 60 days. Cultivable fungi were identified using polyphasic taxonomy and screened to determine their ability to produce enzymes, biosurfactants and herbicidal metabolites. For non-cultivable fungi, a total of 193.436 DNA *reads* were detected in sediments at 52 m (48.112), 151 m (104.704) and 404 m (40.620) depths and identified 133 taxa, 88 detected at 52 m, 32 at 151 m and 59 to 404 m deep. The non-cultivable fungal community was dominated by taxa of the phyla *Ascomycota* and *Basidiomycota*, as well as those belonging to the kingdom Straminopila (phylogenetically close to fungi), which in terms of functional ecology were characterized as saprotrophic, pathogenic and symbiotic. The dominant non-cultivable taxa were *Thelebolus balaustiformis*, *Ciliophora* sp., *Pseudogymnoascus* sp., Fungi sp. 1, *Agaricomycetes* sp. (Fungi) and *Chaetoceros* sp. 1 (Straminopile). Among the cultivable fungal community, the predominant genera were *Meyerozyma*, *Penicillium*, *Antarctomyces*, *Thelebolus*, *Pseudeurotium* and *Cladosporium*. The dominant cultivable species were *Meyerozyma guilliermondii*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium* cf. *palitans*, *Pseudeurotium* cf. *bakeri* and *Thelebolus balaustiformis*. Most cultivable fungi exhibited positive activity for more than one evaluated enzyme, mainly for proteases (63 isolates - 92%), invertases (58 - 85%), cellulases (37 - 54%), lipases (36 - 52%), carrageenans (35 - 51%), agarases (32 - 47%), pectinases (30 - 44%) and esterases (11 - 16%), with emphasis on *Penicillium* sp. Furthermore, the *M. guilliermondii* UFMGCB 19667 and

19651 isolates exhibited the best Enzyme Indexes for invertase and protease (3,05 and 2,76, respectively). Four isolates showed significant biosurfactant activity, especially *Antarctomyces* sp. UFMGCB 19617, with a higher IE₂₄ value (81,38%), compared to the positive control (84,56%) in 1% SDS. All extracts obtained from *P. cf. palitans* (24) exhibited herbicidal effect against *Lactuca sativa* (curly lettuce) and *Allium schoenoprasum* (onion), highlighting the UFMGCB 19623 and 19625 isolates that exhibited phytotoxicity for both targets at a concentration of 1 mg mL⁻¹; the other isolates of this species had selective activity only against *A. schoenoprasum* seeds at concentrations of 1 to 0,5 mg mL⁻¹. The results found indicate that marine sediments from the Antarctic region are capable of harboring a significant taxonomic group of cultivable and non-cultivable fungi, revealed by cultivation-independent and cultivation-dependent techniques, which may have different ecological roles in Southern Ocean sediments. In addition, taxa of cultivables were able to produce active exoenzymes, biosurfactants and herbicidal metabolites that may represent interesting resources in industrial and agricultural biotechnological applications.

Keywords: Extremophiles; Polar; eDNA; Taxonomy; Bioprospecting; Southern Ocean.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Área de coleta dos sedimentos marinhos no Oceano Austral Antártico. Visão geral do continente Antártico, destacando a Península Antártica (a) e as ilhas do arquipélago Shetland do Sul (b) indicados pelo retângulo amarelo. (c) Locais de amostragem em Walker Bay (Livingston), Whalers Bay (Deception) e English Strait, a 52, 151 e 404 m de profundidade, respectivamente. Imagens de satélite obtidas pelo *Google Earth* (<https://earth.google.com>).....33

Figura 2. Gráfico Kronas com as abundâncias de diferentes níveis taxonômicos de fungos detectados em sedimentos marinhos coletados no Arquipélago Shetland do Sul, Antártica marítima. **a.** Walker Bay (Livingston) a 52 m, **b.** Whalers Bay (Deception) a 151 m e **c.** English Strait a 404 m de profundidade52

Figura 3. Mapa de calor das abundâncias relativas da biblioteca fúngica. As intensidades das cores variam do vermelho (maior abundância relativa) ao verde (menor abundância relativa). Esses valores representam porcentagens de leituras de DNA fúngico obtidas de amostras de sedimentos de Walker Bay (Livingston), Whalers Bay (Deception) e English Strait. O mapa de calor da abundância de ASV foi criado usando os seguintes parâmetros: Average Linkage, Spearman Rank Correlation e Z-score entre amostras para cada ASV.....54

Figura 4. Diagrama de Venn demonstrando a distribuição de variantes de sequência *amplicon* fúngica (ASVs) nas amostras de sedimentos obtidas em Walker Bay, Whalers Bay e English Strait, em Ilhas da Shetland do Sul, Antártica marítima. Na legenda, o código de cores representa táxons dominantes (verde), de abundância intermediária (azul) e membros raros da comunidade fúngica (laranja). Diagrama gerado em <http://jvenn.toulouse.inra.fr/app/example.html> (BARDOU *et al.*, 2014).....55

Figura 5. Curvas de rarefação, com limites de confiança de 95%, de variantes de sequência de *amplicon* de fungos (ASVs) obtidas das três amostras de sedimentos marinhos analisadas56

Figura 6. Morfologia das colônias fúngicas recuperadas a 15 °C por cultivo de sedimentos marinhos, no Oceano Austral, Antártica marítima: **a.** *Meyerozyma*, **b.** *Penicillium* sp. **c.** *Pseudeurotium*, **d.** *Thelebolus*, **e.** *Antarctomyces* sp., **f.** *Cladosporium* sp. Fotos: Mayanne Karla da Silva, 2023.....57

Figura 7. Diagrama de Venn com a comparação taxonômica dos fungos recuperados de sedimentos oceânicos profundos na Antártica marítima, em Walker Bay (52m), Whalers Bay (151 m) e English Strait (404 m). Diagrama gerado em <http://jvenn.toulouse.inra.fr/app/example.html> (BARDOU *et al.*, 2014).....60

Figura 8. Enzimas extracelulares produzidas a 15 °C durante 7 dias por fungos antárticos isolados de sedimentos marinhos de profundidade do Oceano austral: **a.** protease, **b.** invertase **c.** celulase, **d.** lipase,

e. carragenase, **f.** agarase, **g.** pectinase e **h.** esterase. As setas indicam os halos de hidrólise. Fotos:
Mayanne Karla da Silva, 2023.....61

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Locais de amostragem, características, dados físico-químicos dos sedimentos e índices de diversidade das assembleias de fungos detectados nos três sedimentos marinhos analisados das Ilhas no Arquipélago Shetland do Sul, Antártica marítima.....51
- Tabela Suplementar 2.** Abundâncias relativas das variantes de sequência *amplicon* fúngica (ASVs) detectadas nos três sedimentos marinhos amostrados na Shetland do Sul, Antártica marítima. Verde indica abundância relativa dominante (> 10%); azul intermediária (1 - 10 %) e laranja rara (< 1%).....107
- Tabela Suplementar 3.** Perfis ecológicos obtidos do banco de dados FUNGuild e citações específicas em nível de gênero dos fungos detectados em amostras de sedimentos marinhos obtidas de Walker Bay (a 52 m de profundidade), Whalers Bay (151 m de profundidade) e English Strait entre Robert e Greenwich (404 m de profundidade).....113
- Tabela 4.** Média das Unidades Formadoras de Colônias (UFC's) a 10^{-4} , densidades e índices de diversidade ecológica de fungos obtidos em diferentes meios de crescimento a 15 °C a partir de sedimentos marinhos de diferentes profundidades em Walker Bay/Livingston (52 m), Whalers Bay/Deception (151 m) e English Strait (404 m) no Oceano Austral, Península Antártica. *As triplicatas dos sedimentos de cada local foi usado para definir a média das UFC's por meio.^a ágar dicloran glicerol 18; ^b ágar dicloran rosa bengala; ^c ágar marinho; ^d ágar extrato de malte; ^e ágar *sabouraud*.....58
- Tabela Suplementar 5.** Fungos isolados de sedimentos marinhos da Península Antártica identificados a partir de regiões do DNAr pela similaridade com sequências depositadas no banco de dados NCBI GenBank utilizando o BLAST_n. *Unidade formadora de colônia. ^aUFMGCB = Código na Coleção de Microrganismos e Células da UFMG. Táxons depositados no GenBank indicados como similares pela análise BLAST_n com base nas sequências das regiões do DNAr: ^bITS, ^cPolimerase II, ^d β -tubulina e ^eD1/D2. ^fTaxonomia proposta para os isolados pelas sequências de ^gITS, ^hPolimerase II e ⁱ β -tubulina.....116
- Tabela 6.** Perfil de produção e Índice Enzimático (IE) das enzimas protease, invertase, celulase, lipase, carragenase, agarase, pectinase e esterase produzidas a 15 °C por fungos isolados de sedimentos marinhos de profundidade na Península Antártica em um período de sete dias. ^aUFMGCB = Código na Coleção de Microrganismos e Células da UFMG; ^b Média das duplicatas utilizadas no teste, calculado pela razão entre o diâmetro do halo de atividade extracelular pelo da colônia em milímetro. (+) Resultado positivo, (-) Resultado negativo. *Valores não mensurados. (O código de cores indica o número de enzimas produzidas: (8) azul, (7) creme, (6) laranja, (5) lilás, (4) amarelo, (3)

rosa, (2) verde e (1) cinza).....62

Tabela 7. Produção de biossurfactantes por fungos recuperados de sedimentos marinhos a distintas profundidades na Península Antártica detectados pela atividade emulsificante em querosene.

^aUFMGCB = Código na Coleção de Microrganismos e Células da UFMG; ^bCN = Controle negativo (meio de cultivo livre de inóculo); ^cSDS 1% = Controle positivo (dodecil sulfato de sódio a 1%).

*Média das triplicatas utilizadas no experimento com o desvio padrão (\pm).....66

Tabela 8. Atividade herbicida contra *Lactuca sativa* (alface crespa) e *Allium schoenoprasum* (cebolinha) de extratos obtidos de espécies fúngicas isoladas de sedimentos marinhos do Oceano Austral, na Península Antártica.....69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABI	<i>Applied Biosystems Life Technologies</i>
Al	Alumínio
ASV	<i>Amplicon Sequence Variant</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
cm	Centímetro
Ca	Cálcio
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
Ca(OAc) ₂	Acetato de cálcio
CTAB	Brometo de cetil trimetilamônio
CTC	Capacidade de troca catiônica
dag kg ⁻¹	Decagrama por quilograma
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNA _r	Ácido desoxirribonucleico ribossomal
dNTP	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
dsDNA	Ácido desoxirribonucleico fita dupla
DG18	<i>Dichloran glycerol agar 18</i>
DRBC	<i>Dichloran rose bengal agar</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
eDNA	<i>Environmental DNA</i>
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
°C	Graus Celcius
g	Gramas
g L ⁻¹	Gramas por litro
GYMP	Glucose-Yeasts Extract-Malt Extract-Fosfato de Potássio
h	Altura
H	Hidrogênio
H ₃ BO ₃	Ácido bórico
HTS	<i>High Throughput Sequencing</i>
ID	Identidade
IE	Índice Enzimático
ITS	<i>Internal Transcribed Spacer</i>
ITS1-5.8S-ITS2	Região Transcrita Interna do Gene do rRNA
K	Potássio
KBr	Brometo de potássio
KCl	Cloreto de potássio
KH ₂ PO ₄	Fosfato monopotássico
km	Quilômetros
km ²	Quilômetros quadrados
L	Litro
m	Metro
μL	Microlitro
μL mL ⁻¹	Microlitro por mililitro
μM	Micromolar
M	Molar
Mg	Magnésio
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
MgSO ₄	Sulfato de magnésio
mg	Miligrama

mg dm ⁻³	Miligramma por decímetro cúbico
mg L ⁻¹	Miligramas por litro
mg mL ⁻¹	Miligramas por mililitro
mL	Mililitro
mm	Milimetro
mM	Milimolar
MAG	<i>Marine Agar Glucose</i>
MIC	<i>Minimum Inhibitory Concentration</i>
ng	Nanograma
ng µL ⁻¹	Nanograma por microlitro
ng mL ⁻¹	Nanograma por mililitro
nm	Nanômetro
NaCl	Cloreto de sódio
NaF	Fluoreto de sódio
NaHCO ₃	Bicarbonato de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
Na ₂ HPO ₄	Fosfato dissódico
Na ₂ SiO ₃	Silicato de sódio
Na ₂ SO ₄	Sulfato de sódio
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NH ₄ NO ₃	Nitrato de amónio
OPERANTAR	Operação Antártica
P	Fósforo
pb	Pares de bases
PBS	<i>Base saturation percentage</i>
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PCR-MST	PCR microssatélite
rcf	<i>Relative centrifugal force</i>
rpm	Rotações por minuto
%	Por cento
pH	Potencial hidrogênico
SAB	<i>Sabourand Dextrose Agar</i>
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SrCl ₂	Cloreto de estrôncio
TBE	Tris-Borato-EDTA
TOC	<i>Total Organic Carbon</i>
UV	Ultravioleta
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UFMGCB	Coleção de Microrganismos e Células da UFMG
V	Volts
v/v	Volume por volume
MEA	<i>Malt Extract Agar</i>
YM	<i>Yeast Malt</i>
YMA	<i>Yeast Malt Agar</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
1.1. O ambiente Antártico e os fungos	19
1.2. Fungos em sedimentos marinhos antárticos	21
1.3. Bioprospecção de metabólitos potencialmente relevantes de fungos extremófilos	23
1.3.1. Exoenzimas ativas	25
1.3.2. Biossurfactantes	27
2. JUSTIFICATIVA	30
3. OBJETIVOS	31
3.1. Geral	31
3.2. Específicos	31
4. MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1. Coleta das amostras de sedimentos marinhos	32
4.2. Determinação das características físico-químicas dos sedimentos	32
4.3. Fungos não cultiváveis: avaliação taxonômica pelo eDNA por meio da técnica de <i>metabarcoding</i>	33
4.3.1. Extração de DNA, construção da biblioteca Illumina e sequenciamento	33
4.3.2. Análise de dados e identificação taxonômica dos fungos não cultiváveis	34
4.3.3. Análise da diversidade e ecologia dos fungos não cultiváveis	35
4.4. Fungos cultiváveis	36
4.4.1. Isolamento para obtenção das culturas puras	36
4.4.2. Preservação das culturas puras	37
4.4.3. Identificação dos fungos cultiváveis	38
4.4.3.1. Identificação de fungos filamentosos	38
4.4.3.1.1. Extração de DNA total	38
4.4.3.1.2. Amplificações de regiões do rDNA	39
4.4.3.1.2.1. Amplificação utilizando o iniciador (GTG) ₅	39
4.4.3.1.2.2. Amplificação da região ITS	40
4.4.3.1.2.3. Amplificação do gene da β -tubulina	40
4.4.3.1.2.4. Amplificação do gene da RNA polimerase II	40
4.4.3.2. Identificação de leveduras	41
4.4.3.2.1. Extração de DNA total	41
4.4.3.2.2. Amplificação do domínio D1/D2	42
4.4.3.3. Purificação dos <i>amplicons</i>	42
4.4.3.4. Sequenciamento	43
4.4.3.5. Análise computacional das sequências	43
4.4.3.6. Análise da diversidade dos fungos cultiváveis	44
4.4.4. Detecção das substâncias produzidas pelos fungos cultiváveis	44
4.4.4.1. Triagem enzimática	44
4.4.4.1.1. Agarases	45
4.4.4.1.2. Amilases	45
4.4.4.1.3. Carragenases	45

4.4.4.1.4. Celulases	45
4.4.4.1.5. Esterases	45
4.4.4.1.6. Invertases	46
4.4.4.1.7. Lipases	46
4.4.4.1.8. Pectinases	46
4.4.4.1.9. Proteases	46
4.4.4.2. Atividade biossurfactante	46
4.4.4.2.1. Preparação do inóculo fúngico	46
4.4.4.2.2. Determinação da atividade de emulsificação	47
4.4.4.3. Atividade herbicida	47
4.4.4.3.1. Cultivo dos fungos e obtenção dos extratos brutos	47
4.4.4.3.2. Ensaio herbicida	48
5. RESULTADOS	50
5.1. Fungos não cultiváveis: diversidade e avaliação taxonômica pelo eDNA meio da técnica de <i>metabarcoding</i>	50
5.1.1. Ecologia dos fungos não cultiváveis	56
5.2. Fungos cultiváveis: isolamento e identificação	57
5.3. Detecção das substâncias produzidas pelos fungos cultiváveis	60
5.3.1. Triagem enzimática	60
5.3.2. Atividade biossurfactante	66
5.3.3. Atividade herbicida	68
6. DISCUSSÃO	71
6.1. Fungos não cultiváveis: diversidade e avaliação taxonômica pelo eDNA por meio da técnica de <i>metabarcoding</i>	71
6.1.1. Ecologia dos fungos não cultiváveis	73
6.2. Fungos cultiváveis: isolamento e identificação	74
6.3. Detecção das substâncias produzidas pelos fungos cultiváveis	80
6.3.1. Triagem enzimática	80
6.3.2. Atividade biossurfactante	84
6.3.3. Atividade herbicida	86
7. CONCLUSÃO	89
REFERÊNCIAS	90
APÊNDICES	106

1. INTRODUÇÃO

1.1. O ambiente Antártico e os fungos

Localizada na porção mais ao sul do planeta, a Antártica possui uma área aproximada de 14 milhões de km² e é circundada pelo Oceano Austral, o qual confere um importante grau de isolamento geográfico pela influência do dinamismo das suas correntes, mas que ao mesmo tempo faz comunicação com os demais oceanos (TONELLI *et al.*, 2021). Quase todo o continente está a 3 km acima do nível do mar, com elevadas altitudes médias em torno de 2.500 m, possuindo cadeias montanhosas, vales, *icebergs* e geleiras de 2 a 5 km de profundidade que conservam o maior percentual de água continental do planeta (SHIVAJI & PRASAD, 2009; BOCKHEIM, 2015).

Três zonas biogeográficas são reconhecidas no território antártico; cada uma delas com parâmetros climáticos particulares, as quais correspondem a Antártica continental, marítima e a sub-Antártica (CONVEY, 2011). A porção continental representa a maior massa terrestre, com as condições mais severas conhecidas, registrando periodicamente baixas temperaturas onde quase é superior a 0 °C por todo o ano e escassas precipitações pluviométricas. Por sua vez, concentrada no lado ocidente, reunindo a Península e os arquipélagos das Orcadas, Shetland e Sandwich do Sul, está a Antártica Marítima que possui precipitação líquida mais frequente e temperaturas mais amenas, ao atingir valores superiores aos 10 °C durante o verão. Enquanto a região sub-Antártica abrange um conjunto de ilhas (Geórgia do Sul, Heard, Kerguelen, Macquarie e Prince Edward) que se localizam ao longo do Oceano Austral. Por decorrência das características mais receptivas, as zonas marítimas e sub-Antártica apresentam uma composição mais rica em termos de biodiversidade quando em comparação com a continental, restrita a poucas comunidades vegetais e endolíticas (HUISKES *et al.*, 2006; CONVEY, 2011).

Apesar dessas singularidades bioclimáticas, a Antártica é um ambiente prontamente extremo em toda a sua extensão, considerada a região mais fria conhecida, marcada pela recorrência das temperaturas baixas que podem variar de 0-15 °C a -30 °C nas áreas costeiras ou valores ainda menores na parte mais interna do continente que podem atingir até -92 °C (ALBERDI *et al.*, 2002; BRASIL, 2006; NASA, 2013). Somado aos ciclos sazonais de congelamento-descongelamento da água continental e do gelo marinho, períodos prolongados de escuridão ou luz intermitente entre os meses de invernos e verões, respectivamente, bem como por ventos fortes, altos níveis de radiação ultravioleta (280 - 400 nm) e prevalência de substratos que variam nutricionalmente de oligotróficos a ultraoligotróficos (ALBERDI *et al.*, 2002; SIMÕES, 2011; CONVEY *et al.*, 2014).

Sucintamente, a Antártica exibe um perfil ambiental extremo, caracterizado por ser o continente mais remoto, alto, frio, seco e ventoso e, desse modo, limitado a poucas formas de vida aptas a suportar tais intempéries (RUISI *et al.*, 2007; CONVEY *et al.*, 2014). Apesar das condições extremas, os ecossistemas da Antártica abrigam uma significativa variedade biológica, incluindo comunidades de animais, plantas e micro-organismos, os quais são encontrados principalmente nas áreas em que os nutrientes estão mais disponíveis e nas livres de gelo permanente e nos seus habitats aquáticos (SHIVAJI & PRASAD, 2009; CONVEY *et al.*, 2014).

A vida microbiana antártica inclui grupos importantes para os diversos processos ecológicos e incluem procariotos (bactérias) a eucariotos (fungos e protistas) que exibem potentes versatilidades metabólicas e adaptativas frente às exigências climáticas impostas (ROSA *et al.*, 2019a). Diferentes estudos taxonômicos, ecológicos e biotecnológicos têm sido conduzidos com a peculiar biota antártica, sobretudo com os micro-organismos lá encontrados (SHIVAJI & PRASAD, 2009; SILVA *et al.*, 2018; ROSA *et al.*, 2019a; de CARVALHO *et al.*, 2019). Entre os micro-organismos, os fungos ocorrem virtualmente em diferentes ecossistemas marinhos e terrestres do planeta, os quais exercem importantes papéis ecológicos, incluindo talvez o mais importante conhecido – a ciclagem de nutrientes, especialmente o carbono orgânico; vivem livremente dispersos ou estabelecem diferentes interações simbióticas como mutualistas, parasitas ou patógenos. Influenciados pela ação dos ventos, correntes oceânicas e animais, os fungos são dispersados facilmente por meio de seus esporos e/ou fragmentos hifais que os permitem alcançar ambientes variados, incluindo as áreas polares da Antártica (SHIVAJI & PRASAD, 2009; BUZZINI & MARGESIN, 2014).

Os crioambientes antárticos são fortemente prejudiciais à vida microbiana do ponto de vista estrutural e energético, devido a possibilidade de danos celulares pela rigidez causada pelas baixas temperaturas, formação de cristais de gelo, poucas taxas de transferência de massa de água líquida e baixo teor nutricional disponível (YARZÁBAL, 2016; RAFIQ *et al.*, 2019). Logo, para uma colonização eficiente, os micro-organismos residentes na região antártica são estimulados a exibirem versáteis estratégias para lidar com essas diferentes pressões ambientais (RUISI *et al.*, 2007; RIZZO & LO GIURDICE, 2020). É sabido que os fungos modulam a morfo-fisiologia celular e seus processos metabólicos em resposta a tais estressores ao manter a integridade e fluidez da membrana pelo aumento das insaturações lipídicas, eficiência nas taxas catalíticas enzimáticas e síntese de moléculas protetoras intra- e extracelularmente como glicerol, pigmentos, proteínas anticongelantes, entre outras substâncias (HASSAN *et al.*, 2016; RAFIQ *et al.*, 2019). Por essas habilidades, os fungos têm se mostrado hábeis em ocupar os variados habitats antárticos com representantes já detectados em rochas, solos, plantas, líquens, neve,

gelo e substratos aquáticos de amostras de lagos, água marinha, macroalgas (ROSA *et al.*, 2019a). Contudo, ainda são poucos os estudos e relatos da diversidade fúngica presentes nos sedimentos marinhos da Antártica (GONÇALVES *et al.*, 2013; OGAKI *et al.*, 2020a;2021a). Os táxons fúngicos mais recorrentes neste continente são pertencentes aos filos *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Chytridiomycota*, *Glomeromycota*, *Mortierellomycota* e *Mucoromycota* (BRIDGE & SPOONER, 2012; ROSA *et al.*, 2019a). Ademais, alguns filos crípticos, como *Rozellomycota*, vem sendo reportados por meio de estudos de DNA ambiental (ROSA *et al.*, 2020; de SOUZA *et al.*, 2021; de MENEZES *et al.*, 2021b; OGAKI *et al.*, 2021a,b).

É estimado que mais de mil espécies de fungos ocorram na Antártica, em sua maioria representado por táxons cosmopolitas e psicrotolerantes que crescem em faixas térmicas mais flexíveis (≥ 20 °C), com um pequeno percentual de endêmicos e psicrófilos estritos capazes de crescimento < 20 °C (RUISI *et al.*, 2007; BRIDGE & SPOONER, 2012). Apesar das estimativas e do excedente de estudos dos últimos anos, aqueles com fungos antárticos ainda carecem de mais investigações, uma vez que muito do que é conhecido resulta dos métodos dependentes de cultivo associados a identificações morfológicas tradicionais e análises de regiões gênicas específicas como as ribossomais (ROSA *et al.*, 2019a).

1.2. Fungos em sedimentos marinhos antárticos

Os ecossistemas aquáticos da Antártica são compostos por lagos, lagoas e córregos terrestres, gerados principalmente pelo derretimento de geleiras e da neve durante os verões, bem como todo o Oceano Austral (TONELLI *et al.*, 2021). Apesar das condições poliextremófilas, os ambientes marinhos antárticos são bastante complexos e permanecem praticamente inexplorados, principalmente quanto a investigação das comunidades microbianas, incluindo os fungos que, por suas versatilidades metabólicas, exercem papéis críticos na ciclagem nutricional e na cadeia trófica marinha (ROSA *et al.*, 2019b; VARRELLA *et al.*, 2021).

Os fungos que habitam o meio marinho podem conter um estilo de vida obrigatório ou facultativo. No primeiro caso, dependem exclusivamente do habitat aquático para crescer e esporular; entretanto, poucas espécies foram descritas como obrigatórias até o momento (JONES *et al.*, 2015, 2019). Por outro lado, fungos caracterizados como facultativos (equivalentes às linhagens “derivadas do mar”) são terrestres ou habitam águas continentais, mas são capazes de se desenvolverem no ambiente marinho; categoria esta que enquadra a maioria das espécies marinhas catalogadas, em especial os *Ascomycota* e alguns *Basidiomycota*

(NICOLETTI & ANDOLFI, 2018; ROSA *et al.*, 2019b). Entretanto, pela dificuldade de estimar com precisão tais modos de vida, uma espécie fúngica marinha é definida como aquela que repetidamente é recuperada dos habitats marinhos em razão de sua capacidade de crescimento, adaptação metabólica e de formar relações ecológicas (NICOLETTI & ANDOLFI, 2018).

Os nichos marinhos antárticos são desafiadores devido à sua ampla extensão e heterogeneidade, impondo intensas condições, visualizadas pelas temperaturas baixas, alta pressão hidrostática, elevada concentração salina, limitada incidência luminosa e fluxo de matéria orgânica, somado a influência da composição e taxas de sedimentação nas áreas mais ao fundo do Oceano Austral (NAGANO *et al.*, 2010). É sabido que, de algum modo, os fungos marinhos podem estar adaptados genética e fisiologicamente, mediante controle do potencial hídrico celular pelo acúmulo de osmólitos (polióis) no citoplasma, melanização da parede celular, neutralização dos níveis de íons sódio pela compartimentação vacuolar ou ação da ATPase (NICOLETTI & ANDOLFI, 2018). Além disso, fungos marinhos também podem formar agregados poliméricos para manter as enzimas despolimerizantes próximas à célula para assimilação dos nutrientes ou, em condições anóxicas, adotem vias alternativas através da desnitrificação anaeróbica (NICOLETTI & ANDOLFI, 2018).

As águas costeiras e oceânicas, bem como os sedimentos marinhos de diferentes profundidades, correspondem aos habitats aquáticos que se estendem a partir de qualquer oceano circulante (RÉDOU *et al.*, 2015). Nesses habitats, os fungos marinhos podem ser encontrados livres na coluna d'água ou colonizando animais e macroalgas, conseqüentemente, interagindo como mutualistas, comensais ou patógenos (RAGHUKUMAR *et al.*, 2010; DUARTE *et al.*, 2013, 2016; GONÇALVES *et al.*, 2012, 2017), além de ocuparem os sedimentos mais rasos e de profundidade (OGAKI *et al.*, 2020a). Os sedimentos correspondem a depósitos formados por diferentes materiais particulados advindos da erosão de rochas, solos, atividade vulcânica ou de produtos da matéria orgânica biológica marinha ou terrestre que adentram no oceano e se acumulam continuamente nos gradientes de fundo (KUMAR *et al.*, 2021). Por suas tarefas ecológicas, os propágulos fúngicos que permeiam em sedimentos podem atuar como decompositores dos materiais concentrados e chegam a ser apontados como os eucarióticos mais dominantes abaixo da coluna d'água inferior (NICOLETTI & ANDOLFI, 2018).

O primeiro isolamento de fungos em sedimentos de profundidade foi realizado a 4.450 m no fundo no Oceano Atlântico (ROTH *et al.*, 1964). Depois disso, os fungos foram evidenciados em sedimentos por todo o globo (ZHANG *et al.*, 2014, 2015; RÉDOU *et al.*, 2015; NAGANO *et al.*, 2017). Contudo, o papel preciso e a diversidade de fungos em sedimentos marinhos ainda

carecem de mais pesquisas, incluindo os do Oceano Austral que permanecem quase desconhecidos e podem hospedar uma biodiversidade inédita e críptica (ROSA *et al.*, 2019b; VARRELLA *et al.*, 2021).

Dos poucos registros de fungos em sedimentos marinhos antárticos tem-se aqueles baseados prioritariamente em cultivo-dependente como os de Vaz *et al.* (2011), Duarte *et al.* (2013), Gonçalves *et al.* (2013, 2015), Laich *et al.* (2013), Vieira *et al.* (2018), Wentzel *et al.* (2018) e Ogaki *et al.* (2020a) e outros por técnicas independente de cultivo moleculares com biblioteca de clones (LÓPEZ-GARCÍA *et al.*, 2001) ou *metabarcoding* ambiental (DNA ambiental – eDNA) via sequenciamento de alto rendimento (OGAKI *et al.*, 2021a). Por meio de ambas as abordagens, a diversidade dos fungos marinhos nos sedimentos amostrados revelou táxons conhecidos e de ocorrência frequente, destacando-se aqueles dos gêneros *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Glaciozyma*, *Leucosporidium*, *Mortierella*, *Metschnikowia*, *Penicillium*, *Pseudogymnoascus* e *Rhodotorula*, com alguns mais restritos na Antártica como *Holtermanniella*, *Humicola*, *Paraconiothyrium*, *Phenoliferia*, *Pseudocercospora*, *Toxicocladosporium* e *Tricoderma* (WENTZEL *et al.*, 2018; ROSA *et al.*, 2019b; VARRELLA *et al.*, 2021).

Entretanto, pelo número limitado de estudos explorando a presença fúngica, juntamente com a dificuldade de simular as condições do fundo oceânico que estabelece limites e desafios à recuperação desses eucariotos, os sedimentos antárticos seguem subexplorados e podem resguardar uma microbiota bem mais complexa do que a conhecida até o momento (VARRELLA *et al.*, 2021; OGAKI *et al.*, 2021a). Ainda assim, muitos fungos não são cultiváveis ou crescem discretamente como estruturas visíveis que impede o isolamento pelos meios convencionais. Desse modo, a compreensão sobre diversidade, ecologia, mecanismos adaptativos e potencial biotecnológico desses micro-organismos marinhos está sendo ampliada pela adoção de técnicas moleculares cada vez mais aprimoradas para a detecção taxonômica, com vistas a entender suas composições ao longo dos gradientes ambientais (TEDERSOO *et al.*, 2018), principalmente no que diz respeito as comunidades micológicas nas inexploradas profundezas marinhas da Antártica (ROSA *et al.*, 2019b, 2020; OGAKI *et al.*, 2021a).

1.3. Bioprospecção de metabólitos potencialmente relevantes de fungos extremófilos

As comunidades micológicas de regiões frias são interessantes para a busca de novos metabólitos bioativos, genes e proteínas, uma vez que em resposta às condições severas impostas pelo ambiente, exibem adaptações importantes que envolvem a modulação da

expressão gênica e rotas metabólicas diferenciadas (de PASCALE *et al.*, 2012; GODINHO *et al.*, 2015; TIAN *et al.*, 2017). Pelas várias abordagens e ferramentas metodológicas, o advento das técnicas modernas oferecem ótimas oportunidades para explorar e biosprospectar novos metabólitos de ecossistemas extremos, expandindo as análises bioquímicas microbianas e sofisticação dos procedimentos de bioprospecção (TIAN *et al.*, 2017; RIZZO & LO GIURDICE, 2020; WANG *et al.*, 2020).

Apesar das condições abióticas severas, os habitats oceânicos são dotados de uma forte biodiversidade adaptada, com capacidade de produzir uma variedade de moléculas bioativas (MAYER *et al.*, 2013; CORINALDESI *et al.*, 2017). Nas últimas décadas, a partir de organismos marinhos descobriu-se mais de 30 mil produtos naturais, dos quais cerca de 2% deles vindos de micro-organismos do fundo do mar, destacando-se os metabólitos bioativos de fungos isolados dos substratos como os sedimentos e águas de profundidade (WANG *et al.*, 2020).

Dentre os primeiros metabólitos de fungos marinhos conhecidos estão os antibacterianos: cefalosporina C, um β -lactâmico derivado do fungo *Acremonium chrysogenum* (sinônimo: *Cephalosporium*) (ABRAHAM *et al.*, 1953) e a gliotoxina, um antibiótico dicetopiperazina produzido por uma linhagem de *Aspergillus* sp. (OKUTANI, 1977). Desde então, muitos outros produtos naturais foram e continuam sendo detectados de fungos marinhos. Esses micro-organismos são considerados uma fonte subestimada de metabólitos a serem descobertos, já que apresentam alto desempenho em realizar biotransformações variadas, com destaque para aqueles predominantes das regiões polares cuja diversidade metabólica microbiana não foi totalmente investigada (de PASCALE *et al.*, 2012; TIAN *et al.*, 2017; TRIPATHI *et al.*, 2018b).

Alguns fungos extremófilos já foram avaliados quimicamente quanto à biossíntese de diferentes metabólitos, os quais correspondem a substâncias orgânicas geradas a partir de diferentes vias do metabolismo desses organismos, com baixo peso molecular, alta atividade específica e estruturas químicas complexas (PETERSEN *et al.*, 2020). Alcalóides, policetídeos, terpenos, quinonas, pigmentos e antibióticos estão entre as moléculas produzidas pelos fungos (MAYER *et al.*, 2013), que frequentemente são consideradas únicas para um organismo ou um grupo taxonômico específico e fornecem suporte ao micro-organismo no seu ambiente de crescimento, aumentando as probabilidades de sobrevivência ao conferir benefícios fisiológicos e ecológicos significativos devido as várias funções que exibem, muitas das quais são interessantes em aplicabilidades médicas, industriais e agrícolas (SANTIAGO *et al.*, 2012; GODINHO *et al.*, 2015; PETERSEN *et al.*, 2020).

Os fungos recuperados de diferentes habitats da Antártica já demonstraram serem

capazes de produzir diferentes biomoléculas que incluem de enzimas ativas (DUARTE *et al.*, 2018a) a metabólitos com atividades biológicas promissoras como antimicrobianos, antiparasitários, antivirais, antioxidantes, antitumorais, com ação citotóxica, fotoprotetora e herbicida (VAZ *et al.*, 2011; DIMITROVA *et al.*, 2013; GONÇALVES *et al.*, 2015; CUI *et al.*, 2016; GOMES *et al.*, 2018), incluindo aqueles avaliados de sedimentos marinhos (PURÍĆ *et al.*, 2018; VIEIRA *et al.*, 2018; OGAKI *et al.*, 2020a). Peptaibóis (asperelinas), geomicinas, terpenóides, penilactonas (policetídeos), micosporinas e outras moléculas diversas consistem em exemplos já produzidas por fungos antárticos (TIAN *et al.*, 2017; ZHANG *et al.*, 2018; NÚÑEZ-PONS *et al.*, 2020). Contudo, ainda é baixo o percentual de espécies marinhas investigadas quimicamente na Antártica, reforçando mais estudos sobre seus perfis metabólicos (DING *et al.*, 2016; OGAKI *et al.*, 2020a).

1.3.1. Exoenzimas ativas

Os fungos desenvolvem sistemas enzimáticos específicos para lidar com as imposições dos ambientes marinhos antárticos, sobretudo frente à salinidade, baixas temperaturas, faixas variadas de pH, iluminação, pressão, conteúdo mineral e a rápida difusão na coluna d'água marinha (VARRELLA *et al.*, 2021). Tais fatores influenciam diretamente a atividade catalítica e, para tanto, exibem enzimas com funcionalidades apropriadas que os permitem acessar as fontes nutricionais disponíveis e, conseqüentemente, sobreviver nesses sistemas complexos. Essas enzimas de fungos marinhos são consideradas mais estáveis e ativas do que aquelas derivadas de vegetais, animais ou micro-organismos terrestres e de regiões mais quentes (ZHANG & KIM, 2010).

Grande parte das pesquisas sobre bioprospecção enzimática é centrada em procariotos e há pouca informação sobre as enzimas de eucariotos que habitam os sistemas antárticos (VARRELLA *et al.*, 2021). Todavia, isolados fúngicos produziram uma variedade de enzimas ativas em temperaturas baixas e moderadas, em diferentes substratos/habitats marinhos (esponjas, macroalgas, água e sedimentos) e terrestres (liquens, solos e madeira) da Antártica, principalmente as classes das hidrolases (com relatos para protease, amilase, asparaginase, celulase, quitinase, glucosidase, invertase, lipase, pectinase, subtilase, tannase e xilanase) e das oxidoreduases como lacase e superóxido dismutase (DUARTE *et al.*, 2018a).

O alto desempenho nas catálises advém de flexibilidades estruturais pronunciadas na configuração primária e tridimensional dessas moléculas, envolvem modificações nos sítios ativos ou próximo deles ou nas unidades de aminoácidos (tipo e quantidade) e no

número/intensidade de suas interações intramoleculares; aspectos que determinam as características catalíticas e estabilidade frente várias condições físico-químicas de pH, temperatura e salinidade (BONUGLI-SANTOS *et al.*, 2015; RAFIQ *et al.*, 2019; PARVIZPOUR *et al.*, 2021).

A adaptabilidade dos fungos na Antártica indica depender significativamente da produção de enzimas ativas ao frio, uma vez que as temperaturas baixas predominam em quase todos os seus ambientes, incluindo os aquáticos (DUARTE *et al.*, 2018a). Assim, para manter a atividade enzimática, a quantidade de ligações (dissulfeto e hidrogênio) são reduzidas entre as subunidades e na conformação secundária ocorre mais alfa-hélices do que estruturas beta pregueadas e *loops* maiores e numerosos (PARVIZPOUR *et al.*, 2021). Ademais, há um aumento da entropia da molécula, com maior hidrofobicidade na superfície do que no núcleo, devido a alterações pontuais nos aminoácidos, prevalecendo mais resíduos de glicina contra uma menor proporção de arginina, lisina e prolinas que possuem grupos radicais mais complexos (DUARTE *et al.*, 2018a; RAFIQ *et al.*, 2019; PARVIZPOUR *et al.*, 2021). Tais modificações permitem maior acessibilidade ao sítio ativo e uma diminuição da energia livre de ativação para as reações, o que garante que as taxas catalíticas aconteçam mesmo na condição térmica limitante (SANTIAGO *et al.*, 2016; NANDANWAR *et al.*, 2020).

Nos habitats marinhos, os fungos parecem atuar principalmente como agentes consumidores da biomassa animal e vegetal residual pelo seu papel como sapróbios, isto é, como decompositores da matéria orgânica pela produção de enzimas degradativas extracelulares (BALABANOVA *et al.*, 2018; NICOLETTI & ANDOLFI, 2018). Assim, por decorrência das modulações mencionadas, conseguem produzir diferentes tipos de enzimas especializadas para degradar os polímeros disponíveis e absorver suas unidades constituintes, o que os auxilia no processo de nutrição e, por concomitância, permite-os contribuir com a regeneração de nutrientes e transferência de carbono e energia para os demais níveis tróficos (BALABANOVA *et al.*, 2018; VARRELLA *et al.*, 2021).

Alguns fungos isolados de diferentes substratos marinhos, como invertebrados, algas, madeira em decomposição, água do mar e sedimentos foram relatados como produtores de enzimas incluindo amilases, celulasas, quitinases, inulinases, queratinases, ligninases, lipases, proteases e xilanases (BONUGLI-SANTOS *et al.*, 2015; DUARTE *et al.*, 2018a). Além de enzimas com especificidade para substratos poliméricos marinhos, a exemplo do ágar, alginato, carrageninas, fucoidanos e laminarinas (BONUGLI-SANTOS *et al.*, 2015).

Essas variadas enzimas detectadas em fungos antárticos exibem propriedades marcantes de estrutura e características estereoquímicas, que lhes fornecem termolabilidade e boa atividade

nas condições de frio intenso dos habitats antárticos (VARRELLA *et al.*, 2021). Por isso, são consideradas diferenciadas de enzimas homólogas vindas de outras fontes biológicas, sendo apreciáveis para fins biotecnológicos com possíveis aplicações nas indústrias alimentícia, têxtil e farmacêutica (NICOLETTI & ANDOLFI, 2018). Esses biocatalisadores são opções benéficas e mais ecológicas, uma vez que podem ser úteis para ampliar a eficiência de processos, por gerar economia no uso de energia das reações, diminuição do tempo e custos empregados, bem como na redução de contaminantes, geração de menos subprodutos e incremento no rendimento e qualidade dos produtos (ZHANG & KIM, 2010; DUARTE *et al.*, 2018a; VARRELLA *et al.*, 2021).

1.3.2. Biossurfactantes

Os surfactantes são moléculas distintas que agem rompendo a tensão superficial, com perfil de emulsificação em soluções aquosas e estão entre os produtos mais utilizados rotineiramente, em formulações de limpeza, alimentos e medicamentos, por exemplo (LIEPINS *et al.*, 2021). Apesar disso, quase todos disponíveis no mercado são derivados do petróleo e, pelas tendências emergentes de usos para produtos mais ecologicamente corretos, em prol da bioeconomia, a busca por novas fontes naturais está em expansão e uma alternativa promissora de substituição desses tensoativos sintéticos são aqueles provenientes de organismos biológicos (TRIPATHI *et al.*, 2018a; LIEPINS *et al.*, 2021).

Desse modo, sendo principalmente de origem microbiana, os biossurfactantes correspondem a uma classe de moléculas anfipáticas compostas de porções hidrofílicas (com açúcares, fosfatos ou aminoácidos) e hidrofóbicas (de ácidos graxos ou hidrocarbonetos) que interagem com diferentes superfícies, membranas e outros componentes de microrganismos e substratos, podendo alterar seus aspectos físico-químicos (LIEPINS *et al.*, 2021). Eles podem estar presentes na superfície de suas células ou serem liberados extracelularmente e conferir vantagens aos micro-organismos produtores, ao desempenhar funções específicas na adesão aos substratos de crescimento, metabolismo, mediação de interações, efeito antimicrobiano, atividade conjunta com outras moléculas (enzimas) e aumentar a disponibilidade de moléculas hidrofóbicas para captação celular (CERESA *et al.*, 2021).

Os biossurfactantes possuem atividades compatíveis aos seus correspondentes sintéticos, mas com baixa toxicidade, maior biodegradabilidade, alta seletividade e eficiência em diferentes faixas de temperatura, níveis de pH e salinidade, além da possibilidade de serem sintetizados a

partir de matérias-primas residuais como a biomassa lignocelulósica (CORREA *et al.*, 2020; CHAVES *et al.*, 2021). Por essas propriedades funcionais podem ser potencialmente destinados para aplicações em indústrias de detergência, alimentos, cosmética, medicina, agricultura e até para fins de remediação ambiental em processos de desintoxicação de solos e no tratamento de efluentes e áreas sujeitas a contaminação por óleos (da SILVA *et al.*, 2021).

Essas biomoléculas são categorizadas estruturalmente em glicolípideos, lipopeptídeos, fosfolípideos, lipídeos neutros e substâncias poliméricas, com as bactérias dominando de maneira significativa os processos biossintéticos dessas substâncias (CERESA *et al.*, 2021). No entanto, já foi demonstrado que alguns fungos são ótimos produtores de biossurfactantes, como *Starmerella bombicola* (fonte de sofrólípidios) e diversas espécies de *Candida* (*C. lipolytica*) e *Rhodotorula* (*R. arctica*, *R. mucilaginosa* e *R. psychrophenolica*) que também são recorrentes em áreas frias e tem se mostrado hábeis em expressar eficientemente glicolípídios (JEZIERSKA *et al.*, 2017; PERFUMO *et al.*, 2018). Além dessas, a levedura *Moesziomyces antarcticus*, isolada de sedimento do lago Vanda da Antártica, é considerada um modelo industrial para produção de lipídios manosileritritol e um dos poucos fungos polares que é comercialmente aplicado por sintetizar substâncias tensoativas (KONISHI *et al.*, 2007; PERFUMO *et al.*, 2018).

Apesar de diferentes tipos de surfactantes originados dos fungos já terem sido descritos, e com alguns deles já em uso no mercado, a descoberta de novos e/ou mais efetivos ainda é um campo emergente de bioprospecção. Acredita-se que esses derivados, em alguns aspectos, possam até serem superiores a aqueles produzidos por procariotos, em especial, por não gerarem subprodutos tóxicos e da possibilidade da síntese acontecer por meio de substratos mais acessíveis (JEZIERSKA *et al.*, 2017; LIEPINS *et al.*, 2021). Os fungos da Antártica estão sob investigação como agentes promissores de biossurfactantes, por exemplo Chaves *et al.* (2021) verificaram recentemente que a levedura *Naganishia adellienses* L95, isolada de uma amostra de estrela do mar do ambiente antártico, por meio de palha de cana-de-açúcar como substrato bruto, sintetizou um glicolípídio com altas taxas de emulsificação e que se manteve estável em condições estritas de temperatura baixa (0 - 4 °C), concentração salina (10%) e alcalinidade.

Assim, os fungos circulantes nos sistemas aquáticos da Antártica podem resguardar novos recursos genéticos interessantes para expressar metabólitos quimicamente diferenciados (CHAVES *et al.*, 2021), já que são multifuncionais com extensas capacidades sintéticas e adaptativas e, por isso, é de grande importância realizar a triagem deles para obtenção de surfactantes naturais, pois os estudos específicos voltados para essa perspectiva ainda são iniciais e podem elucidar possíveis papéis ecológicos nos ecossistemas polares e relevar as

possibilidades de aplicação biotecnológica dessas moléculas, como aditivos anticongelantes, produção de hidrato de gás, agentes de limpeza e até em boas práticas de biorremediação (PERFUMO *et al.*, 2018; CHAVES *et al.*, 2021).

2. JUSTIFICATIVA

A Antártica é marcada pelos extremos de temperatura, radiação ultravioleta, oligotrofia e ciclos sazonais congelamento-degelo (RUISI *et al.*, 2007; CONVEY *et al.*, 2014) e abriga uma comunidade biológica característica que inclui micro-organismos altamente resilientes e versáteis. Nesse habitat gelado, os fungos são funcionalmente ativos na ciclagem nutricional, se dispersam com facilidade e crescem sob vários substratos, sendo a maioria relatados em solos, plantas e macroalgas (ROSA *et al.*, 2019a). Contudo, de modo geral, ainda se conhece muito pouco sobre fungos na Antártica (SHIVAJI & PRASAD, 2009) e são relativamente escassas as investigações deles em sedimentos marinhos oceânicos que circunda o continente frio (ROSA *et al.*, 2019b; OGAKI *et al.*, 2020a).

As profundezas marinhas antárticas são ambientes hostis e um dos mais inexplorados da terra, os sedimentos que se formam neles pode abrigar comunidades microbianas interessantes que, por meio de mecanismos adaptativos únicos, lidam com as adversidades extremas desses habitats (RÉDOU *et al.*, 2015). No entanto, a diversidade microbiana ainda é timidamente conhecida nesses habitats marinhos, menos ainda quando se trata dos possíveis fungos existentes. Dos poucos estudos prévios documentados, majoritariamente são baseados em métodos dependentes de cultivo (VAZ *et al.*, 2011; GONÇALVES *et al.*, 2013, 2015; LAICH *et al.*, 2013; DUARTE *et al.*, 2013; WENTZEL *et al.*, 2018; OGAKI *et al.*, 2020a), sendo ainda mais restritos aqueles dedicados a pesquisa dos grupos fúngicos pela abordagem do *metabarcoding* do DNA ambiental (eDNA) por sequenciamento de alto rendimento (OGAKI *et al.*, 2021a). Isso reforça o papel de novos estudos para sedimentos marinhos da Antártica, que alinhado ao uso das técnicas moleculares de cultivo independente, venham a contribuir para a elucidação da diversidade, ecologia e potencial dos fungos existentes, com perspectiva para descrição de novos táxons (ROSA *et al.*, 2019b; VARRELLA *et al.*, 2021).

Além disso, por contornarem as adversidades abióticas dos ambientes marinhos, os fungos exibem uma mescla de vias metabólicas e moléculas inéditas que os auxiliam na sobrevivência e desempenho ecológico, o que concomitantemente também os tornam ótimos alvos para a prospecção de biomoléculas diferenciadas para aplicações mais sustentáveis e eficientes (VARRELLA *et al.*, 2021). Nesse sentido, devido às suas capacidades sintéticas vantajosas e promissoras, somado ao pouco conhecimento dos seus produtos naturais, os fungos marinhos antárticos podem ser triados quanto a produção de metabólitos bioativos, enzimas e biossurfactantes, que podem representar fontes alternativas viáveis em distintos setores industriais (ROSA *et al.*, 2019a; da SILVA *et al.*, 2021).

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Caracterizar a diversidade das comunidades de fungos presentes em sedimentos marinhos do Oceano Austral por meio de técnicas dependente e independente de cultivo e realizar a bioprospecção de enzimas, substâncias surfactantes e metabólitos herbicidas de interesse biotecnológico.

3.2. Específicos

- Identificar os fungos não cultiváveis por meio do *metabarcoding* do eDNA por sequenciamento de alto rendimento a partir de sedimentos do Oceano Austral;
- Isolar e identificar os fungos cultiváveis por meio da abordagem taxonômica polifásica (morfologia, fisiologia e análise de regiões do DNA ribossomal - rDNA);
- Realizar a preservação *ex situ* dos fungos obtidos na coleção temática de fungos extremófilos da Coleção de Micro-organismos e Células da UFMG;
- Caracterizar a diversidade das comunidades de fungos não cultiváveis e cultiváveis detectadas nas amostras de sedimentos marinhos;
- Prospectar a produção de exoenzimas e biosurfactantes pelos fungos obtidos;
- Produzir extratos a partir do cultivo dos fungos obtidos e avaliar a atividade herbicida frente a modelos de plantas monocotiledôneas e dicotiledôneas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Coleta das amostras de sedimentos marinhos

As amostras de sedimentos marinhos (uma por local) foram coletadas ao redor de três ilhas no Arquipélago Shetland do Sul, Antártica marítima (**Figura 1**) durante os verões austrais de 2013 e 2014 (OPERANTAR XXXII e XXXIII). Os sedimentos foram coletados usando o equipamento *Box corer* nos sítios: Walker Bay (Ilha Livingston) a 52 m, Whalers Bay (Ilha Deception) a 151 m e English Strait a 404 m de profundidade. Seções de 10 cm de comprimento (aproximadamente 500 g de sedimento) da base de cada local foram coletadas, colocadas em sacos *Whirl-pack* esterilizados (Nasco, Ft. Atkinson, WI) e mantidas congeladas a - 20 °C até o processamento no Laboratório de Microbiologia Polar e Conexões Tropicais (MICROPOLAR) na Universidade Federal de Minas Gerais.

4.2. Determinação das características físico-químicas dos sedimentos

Um total de 400 g de cada amostra de sedimento foi usado para análises físico-químicas. A composição granulométrica das amostras de sedimento (frações areia, silte e argila) foi avaliada em amostras quimicamente dispersas usando 10 mL de NaOH (1 mol L⁻¹) e agitadas lentamente por 16 h (TEIXEIRA *et al.*, 2017). A fração areia (areia grossa e fina) foi separada por peneiramento e as frações silte e argila por sedimentação diferencial, utilizando o método da pipeta. Os resultados foram plotados em um diagrama ternário de areia-silto-argila para identificar a classe textural.

As análises químicas das amostras de sedimento seguiram os parâmetros estabelecidos por Teixeira *et al.* (2017). O pH foi determinado usando uma proporção de 1:2,5 para sedimento:água deionizada, respectivamente. A acidez potencial (H + Al) foi determinada com 0,5 mol L⁻¹ Ca(OAc)₂ tamponado para o pH 7 e quantificada por titulação com 0,0606 mol L⁻¹ NaOH. Ca²⁺, Mg²⁺ e Al³⁺ foram obtidos com 1 mol L⁻¹ KCl, e K⁺ e P⁺ com Melich. Os teores dos elementos nos sedimentos foram determinados por ICP (Al³⁺), emissão de chama (Na⁺, K⁺) e fotolorimetria pelo método do ácido ascórbico (P). O carbono orgânico total (TOC) foi obtido por oxidação úmida seguindo o método *Walkley-Black*. A capacidade total de troca catiônica (CTC) foi calculada como a soma das bases (Ca²⁺, Mg²⁺, K⁺ e Al³⁺) e acidez potencial (H⁺ + Al³⁺). Todas as análises dos sedimentos foram realizadas em triplicata.

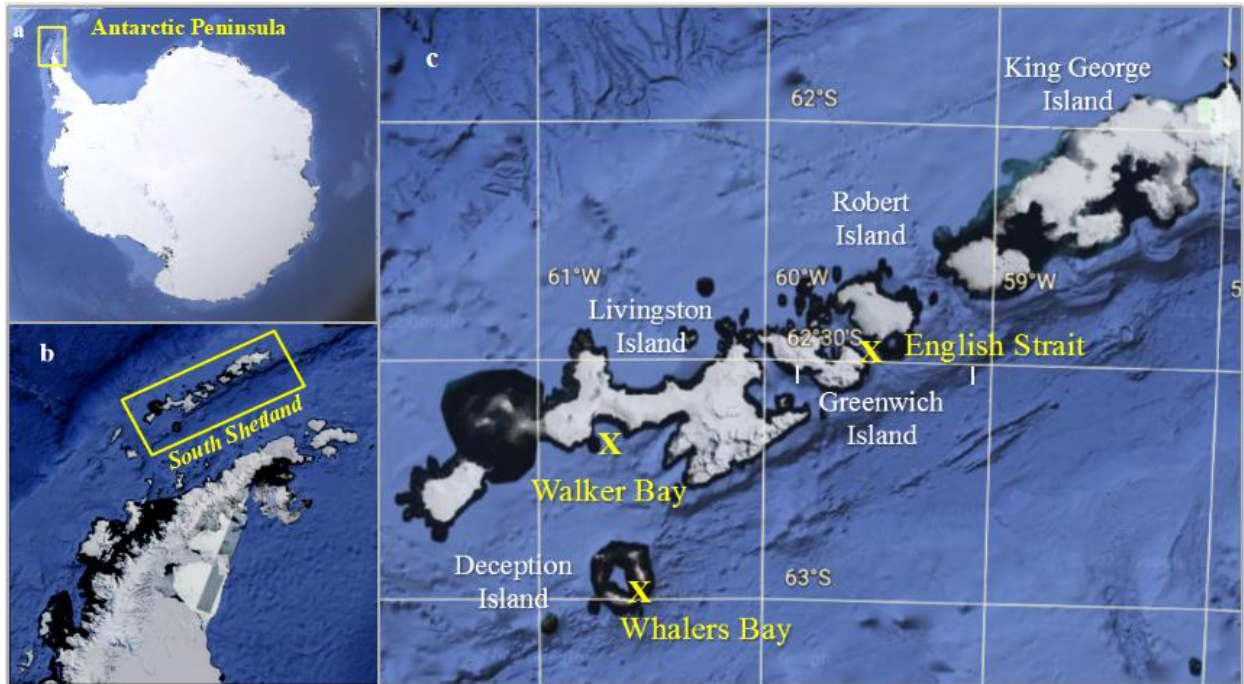


Figura 1. Área de coleta dos sedimentos marinhos no Oceano Austral Antártico. Visão geral do continente Antártico, destacando a Península Antártica (a) e as ilhas do arquipélago Shetland do Sul (b) indicados pelo retângulo amarelo. (c) Locais de amostragem em Walker Bay (Livingston), Whalers Bay (Deception) e English Strait, a 52, 151 e 404 m de profundidade, respectivamente. Imagens de satélite obtidas pelo *Google Earth* (<https://earth.google.com>).

4.3. Fungos não cultiváveis: avaliação taxonômica pelo eDNA por meio da técnica de *metabarcoding*

A avaliação da diversidade de fungos não cultiváveis presentes nos sedimentos marinhos antárticos foi realizada pela abordagem do *metabarcoding* de DNA por meio do sequenciamento de alto rendimento (HTS) que fornece a proporção de sequências de *amplicons* de fungos (ASVs = táxons) nas amostras analisadas.

4.3.1. Extração de DNA, construção da biblioteca Illumina e sequenciamento

As amostras de sedimentos marinhos dos três diferentes locais foram gradualmente descongeladas em condições estéreis a 4 °C por 24 h antes de realizar a extração de DNA. Nove subamostras (5 g) das partes centrais de cada ponto de coleta foram obtidas em condições assépticas e processadas, para aumentar o rendimento do DNA fúngico, as quais foram usadas para extrações de DNA. A partir delas, quadruplicatas (para cada local amostrado) foram separadas e usadas para extração de DNA ambiental (eDNA), que foi realizada pelo uso do kit

comercial *FastDNA*TM para solos (MPBIO, Ohio, USA), seguindo as instruções do fabricante. Amostras de DNA com concentração ≥ 10 ng foram selecionadas para análise posterior. A eficiência e a qualidade das extrações foi analisada por eletroforese em gel de agarose (1% de agarose em $1 \times$ Trisborato-EDTA) e então quantificada usando o ensaio Quanti-iTTM Pico Green dsDNA (Invitrogen).

A construção das bibliotecas e a amplificação do DNA foram realizadas seguindo o protocolo de preparação da biblioteca de sequenciamento metagenômico Illumina 16S (Parte #15.044.223, Rev. B) da Macrogen Inc. (Coréia do Sul). A região transcrita interna do espaçador 2 (ITS2) do DNA ribossômico nuclear foi usada como um código de barras (*barcoding*) de DNA para identificação de espécies moleculares de fungos (RICHARDSON *et al.*, 2015; ROSA *et al.*, 2022) usando os *primers* universais ITS3 (5'-GCATCGATGAAGAACGCAGC-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (WHITE *et al.*, 1990). As reações de PCR tiveram um volume de 25 μ L e foram realizadas usando 2,5 μ L de DNA extraído (5 ng μ L⁻¹), 5 μ L *forward primer* (1 μ M), 5 μ L *reverse primer* (1 μ M) e 12,5 μ L de 2 \times KAPA HiFi HotStart ReadyMix (Roche, Basel, Suíça).

A PCR de amplificação consistiu em uma etapa inicial de desnaturação a 95°C por 3 min; 25 ciclos de amplificação a 95 °C por 30 s, 55 °C por 30 s e 72 °C por 30 s; e uma etapa de extensão final por 5 min a 72 °C. As PCRs de índice foram realizadas usando o Herculase II Fusion DNA Polymerase Nextera XT Index Kit V2. A quantificação das bibliotecas e o agrupamento foram realizados de acordo com as instruções da Illumina. O sequenciamento de alto rendimento HTS (2 \times 300 bp) foi realizado comercialmente em uma plataforma MiSeq v3 (Illumina) pela Macrogen Inc. (Coreia do Sul). Em todas as etapas de extração de DNA, procedemos sob condições de controle estritas dentro de uma capela de fluxo laminar para recuperar o DNA dos fungos e evitar a contaminação. Os controles de qualidade da extração de DNA, PCR e sequenciamento foram realizados pela Macrogen Inc.

4.3.2. Análise de dados e identificação taxonômica dos fungos não cultiváveis

A análise de qualidade dos dados foi realizada usando BBDuk v. 38.87 no software BBmap (sourceforge.net/projects/bbmap/) (BUSHNELL, 2014) com os seguintes parâmetros: remoção de adaptadores Illumina (artefatos Illumina e biblioteca PhiX Control v3); ktrim = 1; k = 23; mink = 11; hdist = 1; minlen = 50; tpe; tbo; qtrim = rl; trimq = 20; ftm = 5; maq = 20. As sequências filtradas foram importadas para QIIME2 versão 2021.4 (<https://qiime2.org/>) para análises bioinformáticas (BOLYEN *et al.*, 2019). O plug-in qiime2-dada2 foi utilizado para

filtrar, desreplicar, transformar arquivos fastq emparelhados em mesclados e remover quimeras (CALLAHAN *et al.*, 2016). As atribuições taxonômicas foram determinadas para variantes de sequência de *amplicons* (ASVs = táxons) em três passos. Primeiro, as ASVs foram classificadas usando o qiime2-feature-classifier (BOKULICH *et al.*, 2018) contra o banco de dados referência para fungos, o UNITE Eukaryotes ITS versão 8.3 (ABARENKOV *et al.*, 2020) com um perfil de 95% de confiança. Em segundo lugar, os ASVs não classificados restantes foram filtrados e alinhados contra o banco de dados filtrado de sequências de nucleotídeos não redundantes (nt) do NCBI usando BLAST_n (CAMACHO *et al.*, 2009) com parâmetros padrão; o banco de dados nt foi filtrado usando as seguintes palavras-chave: “ITS1”, “ITS2”, “*Internal transcribed spacer*” e “*internal transcribed spacer*”. Em terceiro lugar, os arquivos de saída do BLAST_n (CAMACHO *et al.*, 2009) foram importados para o MEGAN (HUSON *et al.*, 2016) e as atribuições taxonômicas foram realizadas usando o arquivo de mapeamento “megan-nucl-Jan2021.db” com parâmetros padrão e treinados com o classificador Naive Bayes e um limite de confiança de 98,5%.

Os perfis taxonômicos foram traçados usando o Krona (ONDOV *et al.*, 2011). O mapa de calor da abundância relativa de ASV e a análise de agrupamento foram realizados usando Heatmapper (BABICKI *et al.*, 2016); a análise de agrupamento foi realizada usando os seguintes parâmetros: Average Linkage, Spearman Rank Correlation e Z-score entre as amostras para cada ASV. Para fins comparativos, usamos o número de leituras como proxy para a abundância relativa. A classificação fúngica também foi embasada em Kirk *et al.* (2008), Tedersoo *et al.* (2018), *Mycobank* (<http://www.mycobank.org>) e o *Index Fungorum* (<http://www.indexfungorum.org>).

4.3.3. Análise da diversidade e ecologia dos fungos não cultiváveis

As abundâncias relativas do número de leituras das ASVs foram usadas para quantificar os táxons fúngicos presentes nos sedimentos amostrados, onde os ASVs fúngicos com abundância relativa > 10% foram considerados dominantes, aqueles entre 1 e 10% como intermediários e aqueles com < 1% como menores (raros) componentes da comunidade fúngica (ROSA *et al.*, 2021).

As abundâncias relativas foram usadas para avaliar a diversidade, riqueza e dominância dos táxons, usando os seguintes índices: (i) Fisher's α , (ii) Margalef's e (iii) Simpson's, respectivamente. O índice de diversidade de Fisher- α é adequado para

frequências em que diferentes espécies ocorrem de forma aleatória, integra o número de espécies e a sua proporção na participação do conjunto da comunidade. Este índice é calculado pela fórmula $S = a \cdot \ln(1+n/a)$: S é o número de táxons presente na amostra, n é o número de indivíduos e a representa o índice de Fisher- α . O Índice de Margalef estima a riqueza de espécies de uma comunidade com base na distribuição numérica dos indivíduos das diferentes espécies em função do número total de indivíduos existentes na amostra analisada. Sua fórmula é dada por $S = (n-1)/\ln(N)$, onde n é o número de táxons encontrados e N representa o número de indivíduos. Quanto mais alto o valor de S maior a riqueza de espécies do local amostrado. O índice de Simpson considera o número de espécies presentes no local, bem como a abundância de cada espécie. Trata-se de um índice de dominância que mede a probabilidade de dois indivíduos, selecionados ao acaso na amostra, pertencer à mesma espécie. O cálculo da Dominância de Simpson é dado pela fórmula $D = \sum(n/N)^2$, onde n é o número total de organismos de uma mesma espécie e N o número total de organismos de todas as espécies. O valor estimado de D pode variar de 0 a 1, quanto mais alto for, maior a probabilidade de os indivíduos serem da mesma espécie, ou seja, maior a dominância e menor a diversidade.

Curvas de rarefação das espécies foram obtidas usando o índice de Mao Tao (baseado em uma matriz de presença-ausência) que interpola valores entre zero e o número de amostras analisadas, e calcula a riqueza esperada e o intervalo de confiança. Todos os resultados foram obtidos com 95% de confiança e os valores de *bootstrap* foram calculados a partir de 1000 réplicas usando o software PAST v1.9 (HAMMER *et al.*, 2001). As atribuições ecológicas das ASVs fúngicas foram avaliadas usando o FunGuild (<http://www.funguild.org/>) (NGUYEN *et al.*, 2016).

4.4. Fungos cultiváveis

4.4.1. Isolamento para obtenção das culturas puras

Os sedimentos dos três diferentes locais amostrados foram descongelados gradualmente sob condições estéreis a 4 °C por 24 h. Após isso, foram separadas três subamostras (1 g por alíquota) de cada profundidade em microtubos esterilizados de 2 mL. Para a recuperação dos fungos, primeiramente utilizou-se o método de enriquecimento que consistiu no uso de três caldos líquidos, o marinho (Difco/USA), sabouraud e extrato de malte (mesmas formulações dos meios sólidos citados mais adiante, sem a adição do ágar),

suplementados com 100 mg mL⁻¹ do antibiótico cloranfenicol (Sigma/EUA) para prevenir o crescimento bacteriano, em que 1 g de cada subamostra dos sedimentos (as triplicatas) foi adicionado em tubos cônicos de 50 mL contendo 5 mL dos meios líquidos esterilizados, os quais foram mantidos sob agitação por 14 dias a 120 rpm e 15 °C, os caldos líquidos sem inoculantes/amostras incubados nas mesmas condições foram usados para aferir o controle de contaminantes. Passado esse período, realizou-se uma diluição seriada a 10⁻⁴ em solução salina esterilizada a 0,9% para padronização de um inóculo de 100 µL de cada suspensão que foi usado para as sementeiras em cinco meios de cultura sólidos distintos:

- (1) **ágar marinho suplementado com 2% glicose (MAG, Difco/USA)**: 0,5% peptona, 0,1% extrato de levedura, 0,01% Citrato Férrico, 1,94% NaCl, 0,88% MgCl₂, 0,32% Na₂SO₄, 0,18% CaCl₂, 0,055% KCl, 0,016% NaHCO₃, 0,008% KBr, 3,4% SrCl₂, 2,2% H₃BO₃, 0,4% Na₂SiO₃, 0,24% NaF, 0,16% NH₄NO₃, 0,8% Na₂HPO₄, 2% ágar;
- (2) **ágar sabouraud (SAB, Himedia/India)**: 1% peptona, 2% glicose, 2% ágar;
- (3) **ágar dicloran glicerol 18 (DG18, Oxoid/USA)**: 0,5% peptona, 1% glicose, 0,1% KH₂PO₄, 0,05% MgSO₄ 7H₂O, 0,0002% dicloran, 2% ágar;
- (4) **ágar dicloran rosa bengala (DRBC, Oxoid/USA)**: 0,5% peptona, 1% glicose, 0,1% KH₂PO₄, 0,05% MgSO₄ 7H₂O, 0,0002% dicloran, 0,0025% rosa bengala, 2% ágar;
- (5) **ágar extrato de malte (MEA)**: 2% glicose, 2% de extrato de malte, 0,1% peptona e 2% de ágar.

A incubação ocorreu em condições normais de pressão atmosférica a 15 °C e o crescimento acompanhado durante 60 dias (utilizou-se placas dos meios sólidos sem inoculantes/amostras incubados nas mesmas condições para aferir o controle de contaminantes). Neste período, foi realizada a contagem das unidades formadoras de colônias (UFC's) na diluição 10⁴, seguida da subcultura das colônias que exibiram morfologia distinta em novas placas contendo meio MEA (0,1% peptona e 2% de ágar, glicose e extrato de malte) na mesma temperatura por uma semana e, logo depois, procedeu-se a preservação dos isolados.

4.4.2. Preservação das culturas puras

Confirmada a pureza das colônias fúngicas individuais, os isolados obtidos foram preservados em duplicata, para tanto os fragmentos do micélio ativo dos filamentosos (3 mm de diâmetro) foram adicionados tanto em frascos contendo água destilada esterilizada a

temperatura ambiente (CASTELLANI, 1939), quanto em criotubos com 1 mL de glicerol 15% estéril e mantidos em ultrafreezer a - 80 °C (criopreservação). Enquanto as leveduras foram cultivadas em meio GYMP (glicose 2%, extrato de malte 1%, extrato de levedura 0,5% e fosfato de sódio 0,2%) durante 48h e, em seguida, uma alíquota de 600 µL deste caldo junto a 400 µL de glicerol 20% estéril foram adicionados em criotubos em duplicata, estes também foram mantidos a - 80 °C. Todos os fungos obtidos foram devidamente depositados na Coleção de Micro-organismos e Células do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, sob o código UFMGCB.

4.4.3. Identificação dos fungos cultiváveis

Para identificação taxonômica dos fungos cultiváveis, analisou-se a morfologia (macro e microscópica) e o material genético dos fungos obtidos. Inicialmente observou-se os aspectos das colônias obtidas a fim de detectar os padrões dos morfotipos, seguido pelo perfil molecular que foi realizado por meio da técnica de PCR microssatélite (PCR-MST), também chamada “DNA *fingerprint*”, usando como iniciador o oligonucleotídeo sintético (GTG)₅. Após isso, os isolados dos morfotipos agrupados pela técnica foram submetidos aos processos de extração de DNA total, amplificação e sequenciamento das regiões ribossomais (ITS e D1/D2) e de outros marcadores complementares como os genes da β-tubulina e RNA polimerase II. Por fim, as sequências geradas foram submetidas a análise computacional para permitir a inferência filogenética dos isolados obtidos.

4.4.3.1. Identificação de fungos filamentosos

4.4.3.1.1. Extração de DNA total

A extração do DNA total seguiu o protocolo de Rosa *et al.* (2009) com modificações. Os filamentosos foram crescidos em caldo YM (0,3% extrato de levedura, 0,3% extrato de malte, 0,5% peptona e 1% glicose) por 7 a 14 dias e, em seguida, fragmentos do micélio foram retirados e colocados em microtubos estéreis de 2 mL acrescidos de 400 µL de tampão de lise (Tris-HCl 0,05 M, EDTA 0,005 M, NaCl 0,1 M e SDS 1%), sendo mantidos a -20 °C por no mínimo 30 min. Adicionou-se de duas a três pérolas de aço inoxidável aos microtubos contendo os fragmentos de micélio, os quais foram submetidos à trituração com auxílio de microdesmembrador sob intensa agitação. Após homogeneização, adicionou-se 162 µL de CTAB (Tris 2M, NaCl 8,2%, EDTA 2M e CTAB 0,2%) e os microtubos foram incubados a 65 °C/40 min. Após isso, foram acrescidos 570 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) aos

microtubos, sendo homogeneizados e mantidos em gelo por 30 min e, posteriormente, centrifugados a 14.800 rpm/10 min. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo com adição de 10% de seu volume de uma solução acetato de sódio 3M. Essa suspensão foi homogeneizada, incubada a 0 °C por 30 min e centrifugada a 14.800 rpm/15 min. Novamente, o sobrenadante resultante foi transferido para um novo microtubo acrescido de 50% de seu volume de isopropanol, seguido da homogeneização e descanso por 1 h em temperatura ambiente. Logo depois, foi feita a centrifugação a 14.800 rpm/20 min, o sobrenadante desprezado e o *pellet* lavado duas vezes com 200 µL de etanol 70% gelado, seguido de centrifugação a 14.800 rpm/10 min e o sobrenadante desprezado por inversão. As amostras ficaram em *overnight* para secar em temperatura ambiente, depois adicionou-se 30 µL de tampão TE/Tris-EDTA (Tris-HCl 0,01 M e EDTA 0,001 M) nas mesmas, com incubação a 65 °C/60 min em banho seco para a hidratação do DNA. E, por fim, armazenadas em freezer a - 20 °C. As amostras foram dosadas em *NanoDrop* ND 1000 (*NanoDrop Thecnologies*) para confirmar a quantidade e a qualidade do DNA extraído, padronizando-o na concentração de 100 a 500 ng µL⁻¹ para ser utilizado nas reações posteriores.

4.4.3.1.2. Amplificações de regiões do rDNA

4.4.3.1.2.1. Amplificação utilizando o iniciador (GTG)₅

O iniciador (GTG)₅ (5'-GTGGTGGTGGTGGTG-3') foi utilizado para amplificar regiões microsatélites por meio da PCR *fingerprinting* (PCR-MST), conforme a metodologia descrita por Lieckfeldt *et al.* (1993). Para tanto, a reação teve um volume final padronizado de 25 µL, contendo: 14,2 µL de água esterilizada; 2,5 µL de tampão de PCR 5X (Fermentas); 2 µL do iniciador (GTG)₅ 10 pmol µL (MWG Biotech); 1,5 µL de MgCl₂ 25 mM; 1,5 µL de betaína; 1 µL de dNTP 10 mM; 1 µL de DMSO; 0,3 µL de Taq DNA polimerase 5U (Fermentas) e 1 µL de DNA da amostra (concentração entre 100 - 500 ng µL⁻¹). As seguintes condições no termociclador foram usadas: (a) desnaturação inicial a 94 °C/2 min, seguida por (b) 40 ciclos de desnaturação (93 °C/45 s), anelamento (50 °C/1 min) e extensão (72 °C/1 min), e (c) uma extensão final a 72 °C/6 min. A observação dos produtos da PCR (*amplicons*) foi realizada por eletroforese em gel de agarose 1,5%, em tampão TBE 0,5X (54 g de tris base, 27,5 g de ácido bórico, 20 mL de EDTA 0,5M, pH 8), submetidos a 80 V por 90 min e corados com uma solução de agente intercalante (GelRed), e os géis visualizados sob luz ultravioleta e fotodocumentados (Vilber Lourmat, França).

4.4.3.1.2.2. Amplificação da região ITS

A amplificação da região transcrita interna (ITS1-5.8S-ITS2) do gene do rDNA foi realizada segundo a metodologia de White *et al.* (1990), com a utilização dos *primers* ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'). Para tanto, a reação teve um volume final padronizado de 50 μL , contendo: 33,8 μL de água esterilizada; 5 μL de tampão de PCR 5X; 3 μL de MgCl_2 25 mM; 2 μL de dNTP 10 mM; 2 μL de betaína; 1 μL de cada *primer* 10 $\mu\text{mol } \mu\text{L}^{-1}$; 1 μL de DMSO; 0,2 μL de Taq DNA polimerase 5U e 1 μL de DNA da amostra (concentração entre 100 - 500 ng μL^{-1}). As seguintes condições no termociclador foram usadas: (a) desnaturação inicial a 94 °C/5 min, seguido por (b) 35 ciclos de desnaturação (94 °C/1 min) - anelamento (55 °C/1 min) - extensão (72 °C/1 min) e (c) uma extensão final (72 °C/5 min). Os *amplicons* foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1%, em tampão TBE 0,5X, sendo submetidos a 120 V por 20 min, corados com solução de agente intercalante (GelRed) e visualizados sob luz ultravioleta e fotodocumentados (Vilber Lourmat, França).

4.4.3.1.2.3. Amplificação do gene da β -tubulina

A amplificação parcial do gene da β -tubulina foi realizada utilizando os *primers* BT2a (5'-GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC-3') e BT2b (5'-ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC-3'), segundo Glass & Donaldson (1995). Para tanto, a reação teve um volume final padronizado de 50 μL , contendo: 33,8 μL de água esterilizada; 5 μL de tampão de PCR 5X; 3 μL de MgCl_2 25 mM; 2 μL de dNTP 10 mM; 2 μL de betaína; 1 μL de cada *primer* 10 $\mu\text{mol } \mu\text{L}^{-1}$; 1 μL de DMSO; 0,2 μL de Taq DNA polimerase 5U e 1 μL de DNA da amostra (concentração entre 100 - 500 ng μL^{-1}). As seguintes condições no termociclador foram usadas: (a) desnaturação inicial a 94 °C por 5 min, seguido por (b) 35 ciclos de desnaturação (94 °C/1 min) - anelamento (59 °C/1 min) - extensão (72 °C/90 s) e (c) uma extensão final a 72 °C por 7 min. Os *amplicons* foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1%, em tampão TBE 0,5X, sendo submetidos a 120 V por 20 min, corados com solução de GelRed e visualizados sob luz ultravioleta e fotodocumentados (Vilber Lourmat, França).

4.4.3.1.2.4. Amplificação do gene da RNA polimerase II

Na amplificação parcial do gene que codifica a RNA polimerase II (RPB2) foram utilizados os *primers* RBP2 5F (5'-GATGACCGTGACCACTTCGG-3') e RPB2 7R

(5'-CCCATGGCTTGTTTGCCCAT-3'), conforme descrito por Malkus *et al.* (2006). Para tanto, a reação teve um volume final padronizado de 50 μL , contendo: 33,8 μL de água esterilizada; 5 μL de tampão de PCR 5X; 3 μL de MgCl_2 25 mM; 2 μL de dNTP 10 mM; 2 μL de betaína; 1 μL de cada *primer* 10 $\mu\text{mol } \mu\text{L}^{-1}$; 1 μL de DMSO; 0,2 μL de Taq DNA polimerase 5U e 1 μL de DNA da amostra (concentração entre 100 - 500 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$). As seguintes condições no termociclador foram usadas: (a) desnaturação inicial a 94 °C por 3 min, seguido por (b) 35 ciclos de desnaturação (94 °C/ 20 s) - anelamento (55 °C/30 s) - extensão (72 °C/1 min) e (c) uma extensão final por 10 min a 72 °C. Os *amplicons* foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1%, em tampão TBE 0,5X, sendo submetidos a 120 V por 20 min, corados com solução de agente intercalante (GelRed) e visualizados sob luz ultravioleta e fotodocumentados (Vilber Lourmat, França).

4.4.3.2. Identificação de leveduras

As leveduras obtidas foram analisadas quanto a morfologia, atentando-se aos formatos celulares e aspectos coloniais referentes a coloração e textura, que permitiu o agrupamento das características, juntamente com o perfil molecular observado por meio da técnica de PCR microsatélite (PCR-MST), similar ao item 4.4.3.1.2.1, com vistas a selecionar os isolados para a identificação via amplificação e sequenciamento do domínio D1/D2 do gene 26S do DNA ribossomal utilizando os iniciadores ITS1/NL4.

4.4.3.2.1. Extração de DNA total

As leveduras foram reativadas em meio de cultura MEA (0,1% peptona e 2% de ágar, glicose e extrato de malte) e uma alçada do cultivo foi suspensa em 100 μL de tampão de lise (0,05 M Tris-HCl, 0,005 M EDTA, 0,1 M NaCl e 1% SDS) em tubos de 0,6 mL, com incubação a 65 °C/30 min. Após isso, adicionou-se 200 μL de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1), os tubos foram homogeneizados, centrifugados a 14.800 rpm/10 min e o sobrenadante transferido para um novo tubo. Nestes, foi feita a adição de isopropanol e o DNA foi precipitado em repouso por 15 min em temperatura ambiente. Esses tubos foram então centrifugados a 14.000 rpm/10 min, o sobrenadante desprezado, no *pellet* resultante foi adicionado 200 μL de etanol 70% gelado e novamente os tubos foram centrifugados (14.000 rpm/10 min). O sobrenadante final foi desprezado e as amostras secas em temperatura ambiente em *overnight*. Passado esse tempo, o DNA das amostras foi hidratado adicionando-se 50 μL de tampão TE/Tris-EDTA, com incubação a 37 °C/60 min. E, por fim, as amostras foram armazenadas em freezer a - 20 °C. As

amostras foram dosadas em NanoDrop ND 1000 (*NanoDrop Thecnologies*) para confirmar a quantidade e a qualidade do DNA extraído, padronizando-o na concentração de 100 a 500 ng μL^{-1} para ser utilizado nas reações posteriores.

4.4.3.2.2. Amplificação do domínio D1/D2

Confirmada a extração do DNA das leveduras selecionadas, por meio da PCR foi feita a amplificação de região D1/D2 da subunidade maior do gene 26S do DNAr utilizando os *primers* ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3'), conforme descrito por Lachance *et al.* (1999). Para tanto, a reação teve um volume final padronizado de 50 μL , contendo: 33,8 μL de água esterilizada; 5 μL de tampão de PCR 5X; 3 μL de MgCl_2 25 mM; 2 μL de dNTP 10 mM; 2 μL de betaína; 1 μL de cada *primer* 10 μmol μL^{-1} ; 1 μL de DMSO; 0,2 μL de Taq DNA polimerase 5U e 1 μL de DNA da amostra (concentração entre 100 - 500 ng μL^{-1}). As seguintes condições no termociclador foram usadas: (a) desnaturação inicial a 94 °C durante 3 min, seguido por (b) com 30 ciclos de desnaturação (94°C/30 s) - anelamento (57 °C/30 s) - extensão (72 °C/90 s) e (c) uma extensão final de 10 min a 72°C. Os *amplicons* foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1%, em tampão TBE 0,5X, submetidos a 120 V por 20 min, corados com solução de agente intercalante (GelRed) e visualizados sob luz ultravioleta e fotodocumentados (Vilber Lourmat, França).

4.4.3.3 . Purificação dos *amplicons*

A purificação dos *amplicons* dos fungos (filamentosos e leveduras) seguiu o protocolo de Menezes (2019a), nos tubos das amostras amplificadas foi adicionado 11,75 μL EDTA (125 mM) e 141 μL de etanol absoluto, que após homogeneização, foram deixados em temperatura ambiente durante 40 min, seguido de centrifugação a 14.000 rpm/25 min e do descarte do sobrenadante. O precipitado foi então lavado com 120 μL de etanol 70% gelado, centrifugado 10 min (mesma rotação anterior), após isso, o sobrenadante foi descartado novamente e o *pellet* resultante secou em *overnight* em temperatura ambiente. O DNA no *pellet* foi ressuspendido em 10 μL de água ultrapura esterilizada, hidratado por 30 min a 37 °C em banho seco e armazenado a - 20 °C. Por fim, as amostras foram dosadas em *NanoDrop* ND 1000 (*NanoDrop Thecnologies*) para confirmar a quantidade e a qualidade do DNA purificado, padronizando-o na concentração de 10 - 20 ng μL^{-1} para ser utilizado nas reações posteriores do sequenciamento genético.

4.4.3.4. Sequenciamento

O sequenciamento foi realizado utilizando-se o Kit BigDye Terminator v3.1 (*Applied Biosystems*, EUA) em combinação com o sistema de sequenciamento automatizado ABI 3730 do Laboratório de Parasitologia Celular e Molecular (LPCM) da FIOCRUZ/Instituto René Rachou. Primeiro foi feita a reação de PCR em uma microplaca de 96 poços, preparada em volume final de 10 μL , contendo: 6 μL de água ultrapura esterilizada; 1 μL do *primer* (5 μmol) da região de interesse amplificada (ITS, β -tubulina, RNA pol II ou D1/D2); 1 μL de tampão (presente no kit de sequenciamento); 1 μL de BigDye e 1 μL de DNA (de 10 - 20 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$). A placa foi selada com um filme adesivo transparente e levada ao termociclador, as seguintes condições foram usadas: (a) uma desnaturação inicial a 96 °C/1 min, seguido por (b) 35 ciclos de desnaturação (96 °C/15 s) - anelamento (50 °C/15 s) - extensão 60 °C/4 min e (c) uma extensão final de 60 °C/15 s.

Após isso, realizou-se a reação de precipitação do sequenciamento, em que 1 μL de EDTA a 125 mM, 1 μL de acetato de sódio 3M e 50 μL de etanol absoluto (Merck) gelado foram adicionados em cada poço da placa de 96 poços com os *amplicons* purificados na reação anterior. A placa foi novamente selada, submetida à agitação em vórtex por 10 s e mantida por 15 min em repouso à temperatura ambiente. Posteriormente, a microplaca foi centrifugada por 45 min a 4.000 rpm a 4 °C, o selante removido e o sobrenadante descartado por inversão (de uma vez). Em seguida, foram acrescentados 100 μL de etanol 70% (Merck) gelado em cada poço, a placa foi novamente centrifugada por 15 min a 4.000 rpm a 4 °C, o selante retirado, o sobrenadante descartado por inversão e a mesma foi invertida sobre um papel absorvente e submetida a um *spin* rápido (pulso até a centrífuga atingir 900 rpm). Após essa etapa, a placa aberta coberta com papel alumínio foi mantida em repouso durante 20 min em temperatura ambiente para evaporação do etanol residual e depois selada novamente. Em seguida, o DNA das amostras precipitado em cada poço foi ressuscitado em 10 μL de Formamida HI DI (*Applied Biosystems*, EUA) e submetido ao sistema automatizado ABI 3730 (*Applied Biosystems*, EUA) para geração das sequências de pares de bases (pb) que foram analisadas para o alcance das propostas de identificação dos fungos cultiváveis obtidos.

4.4.3.5. Análise computacional das sequências

As sequências de DNA obtidas na etapa anterior foram analisadas no portal Embrapa (<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>) para apuração da qualidade, comparadas com sequências de maiores similaridades depositadas no GenBank, incluindo “*type species*”,

pertencentes às coleções de culturas internacionais, utilizando o programa BLAST_n (*Basic Local Alignment Search Tool*) disponível no portal NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>). Fungos com sequências *e-value* = 0, cobertura e identidade $\geq 99\%$ serão considerados da mesma espécie de referência no banco de dados, enquanto aquelas com valor $E \neq 0$, cobertura e identidade $\leq 98\%$ serão identificados em nível de gênero ou níveis hierárquicos mais altos após a análise filogenética. O termo ‘cf.’ (latim “*for confer*” = comparado com) foi utilizado em alguns táxons para indicar a espécie a qual se assemelham, mas que exibem sutis diferenças com a espécie fúngica de referência depositada no GenBank.

4.4.3.6. Análise da diversidade dos fungos cultiváveis

As médias das UFC's dos isolados foram usadas para quantificar as densidades relativas dos táxons fúngicos presentes nos sedimentos amostrados, sendo essas utilizadas para avaliar a diversidade, riqueza e dominância dos táxons, usando os índices: (i) Fisher's α , (ii) Margalef's e (iii) Simpson's, respectivamente (estimados através das mesmas fórmulas do tópico 4.3.3). Todos os resultados foram obtidos com 95% de confiança e os valores de *bootstrap* foram calculados a partir de 1000 réplicas usando o software PAST v1.9 (HAMMER *et al.*, 2001).

4.4.4. Detecção das substâncias produzidas pelos fungos cultiváveis

4.4.4.1. Triagem enzimática

Os fungos obtidos foram triados para 09 enzimas extracelulares. Os isolados foram previamente crescidos em MEA e inoculados em meios de cultura específicos contendo substratos indutores para cada enzima triada. Para os filamentosos, um fragmento do micélio de 5 mm de diâmetro foi inoculado no centro das placas com os meios indutores. Para as leveduras, uma alçada da colônia crescida em MEA foi diluída em 1 mL de solução salina 0,8% para padronizar um inóculo de 10^7 células mL⁻¹, por espectrofotometria (absorbância de 0,8 - 1,0 e comprimento de onda de 660 nm), o qual foi inoculado nos meios indutores (10 μ L da suspensão padronizada). A atividade enzimática dos fungos foi verificada nas placas com os indutores após 7 dias de incubação a 15 °C, em que foram detectados os halos de hidrólise extracelular (zonas características em torno das colônias) como indicativo de atividade positiva ou negativa para cada enzima triada. Para mensurar a produção enzimática entre os isolados, foi calculado o Índice Enzimático (IE) que corresponde à razão entre o diâmetro do halo de hidrólise pelo diâmetro da colônia em mm, medido com paquímetro (TRONCOSO *et al.*, 2016;

SILVA *et al.*, 2022). Todos os ensaios foram realizados em duplicatas.

4.4.4.1.1. Agarases

O ensaio para a observação da produção de agarase foi adaptado de Furbino *et al.* (2018), no qual os isolados foram cultivados em meio YMA (0,3% extrato de levedura, 0,3% extrato de malte, 0,5% peptona, 1% glicose e 2% ágar) suplementado com 1,5% de ágar. As determinações das atividades agarolíticas foram realizadas pela adição de lugol na placa, na qual a presença de um halo amarelo foi usada como um indicador da atividade da enzima.

4.4.4.1.2. Amilases

Os isolados foram cultivados em meio YMA (sem a glicose) juntamente com o amido (10 g L⁻¹). Após o período de incubação, foi adicionado solução de lugol nas placas, revelando um halo amarelo claro em torno da colônia em um fundo roxo indicando a hidrólise do amido (CARRASCO *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2022).

4.4.4.1.3. Carragenases

O ensaio para a observação da produção de carragenase foi adaptado de Furbino *et al.* (2018), no qual os isolados foram cultivados em meio YM suplementado com 1,5% de carragenana (Sigma Aldrich). As determinações das atividades carragenolíticas foram realizadas pela adição de lugol na placa, na qual a presença de um halo amarelo foi usado como um indicador da atividade da enzima.

4.4.4.1.4. Celulases

Os isolados foram cultivados em meio YMA (1:10) com carboximetilcelulose (5 g L⁻¹) substituindo a glicose como fonte de carbono. Após o período de incubação, as placas de Petri foram inundadas com uma solução de vermelho Congo (2,5 g L⁻¹ em tampão Tris HCl 0,1 M, pH 8) durante 15 min. Passado esse tempo, o corante foi descartado e adicionou-se uma solução de NaCl 1M por 15 min nas placas, revelando a atividade de celulase positiva pela observação de um halo claro alaranjado ao redor da colônia em um fundo vermelho (MARTORELL *et al.*, 2017).

4.4.4.1.5. Esterases

Os isolados foram cultivados em um meio composto de CaCl₂H₂O (4 g L⁻¹), NaCl (5 g L⁻¹), peptona (10 g L⁻¹), Tween 80 (10 g L⁻¹) e ágar (20 g L⁻¹). A atividade de esterase foi evidenciada como um precipitado branco ao redor da colônia dos isolados (MARTORELL *et al.*, 2017).

4.4.4.1.6. Invertases

Os isolados foram cultivados em meio YMA com 2% de sacarose e 0,003% de verde de bromocresol. O aparecimento de um halo amarelo foi indicativo de atividade da enzima (TRONCOSO *et al.*, 2016).

4.4.4.1.7. Lipases

Os isolados foram cultivados em meio contendo extrato de levedura (0,5 g L⁻¹), peptona (1 g L⁻¹), ágar (15 g L⁻¹), azeite de oliva (31,25 g L⁻¹) como fonte de carbono e solução de rodamina B 0,01% v/v em etanol absoluto (10 mL L⁻¹). A atividade positiva foi detectada pela presença de um halo fluorescente de cor laranja sob luz UV a 350 nm. O método se baseia na observação da fluorescência causada pela interação da rodamina B com os ácidos graxos liberados pela hidrólise enzimática do azeite (DUARTE *et al.*, 2013).

4.4.4.1.8. Pectinases

Os isolados foram cultivados em meio YMA (1:10), pH 7,0, contendo pectina cítrica (10 g L⁻¹). As placas foram imersas em 10 g L⁻¹ de CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio) como revelador, o qual tem a capacidade de precipitar polissacarídeos em solução. A atividade da enzima foi observada por mais halo claro ao redor da colônia em fundo branco (MARTORELL *et al.*, 2017; POVEDA *et al.*, 2018).

4.4.4.1.9. Proteases

Os isolados foram cultivados em *Sabouraud dextrose ágar* (65 g L⁻¹) com leite desnatado (10 g L⁻¹) (Oxoid). Após o período de incubação, a atividade positiva da enzima foi detectada pela presença de um halo claro (produzido pela degradação da caseína) ao redor da colônia no meio opaco (BRIZZIO *et al.*, 2007; DUARTE *et al.*, 2013).

4.4.4.2. Atividade biossurfactante

4.4.4.2.1. Preparação do inóculo fúngico

A metodologia para produção de biossurfactantes foi adaptada de Sena *et al.* (2018). Os isolados foram pré-cultivados em MEA a 15 °C por 7 dias. Para os filamentosos, 05 fragmentos (5 mm) do micélio foram inoculados em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio de cultivo líquido esterilizado, preparado com 40 g L⁻¹ de óleo de girassol (Soya) e 10 g L⁻¹ de extrato de levedura (Merck). Os frascos foram mantidos sob agitação de 100 rpm a 20 °C por 9 dias. No caso das leveduras, um pré-inóculo foi preparado, no qual uma alçada da colônia

crescida no MEA foi transferida para tubos tipo Falcon com 10 mL de caldo YM (glicose 10 g L⁻¹, peptona 5 g L⁻¹, extrato de levedura 3 g L⁻¹ e extrato de malte 3 g L⁻¹) que foram mantidos sob agitação a 100 rpm, a 20 °C por 48h. Depois, a solução foi padronizada por espectrofotometria (absorbância entre 0.4 - 0.5 e comprimento de onda de 660 nm) e 0,5 mL (5% do pré-inóculo no caldo YM) dessa solução foi transferida para Erlenmeyers contendo 50 mL do mesmo meio líquido com óleo de girassol usado para os filamentosos, nas mesmas condições de incubação. Após os 9 dias do crescimento fúngico, os líquidos foram centrifugados a 7.197 ref por 8 minutos a 20 °C em tubos tipo falcon de 50 mL para separar o sobrenadante do micélio que foi utilizado para o teste de determinação do Índice de Emulsificação (IE₂₄%).

4.4.4.2.2. Determinação da atividade de emulsificação

O teste de determinação do Índice de Emulsificação seguiu a proposta de Cooper & Goldberg (1987). Para o experimento, foi utilizado o sobrenadante obtido da centrifugação do crescimento fúngico. Para tal, tubos de ensaio de vidro de 15 mL com tampa foram preenchidos com uma alíquota de 4 mL de sobrenadante e 6 mL do solvente querosene (Aciflex), depois agitados em vórtex em rotação máxima (3000 rpm) durante 2 minutos e deixados em repouso à temperatura ambiente por 24 horas. Em seguida, analisou-se a capacidade emulsificante dos sobrenadantes dos fungos através do cálculo do Índice de Emulsificação (IE₂₄%) que é estimado através da divisão da medida da altura da camada de emulsão pela altura total da mistura (mm) multiplicado por 100 ($IE_{24} = h_{emulsão}/h_{total} \times 100$). Os ensaios foram realizados em triplicata, com os valores finais definidos a partir da média dos resultados da triplicata, sendo considerados bons produtores de biossurfactante aqueles isolados que exibiram a média do índice $\geq 50\%$. Para esse teste, o surfactante industrial SDS (Dodecil Sulfato de Sódio) (Kasvi) a 1% foi usado como controle positivo, enquanto o meio de cultivo líquido livre de inóculo representou o controle negativo.

4.4.4.3. Atividade herbicida

4.4.4.3.1. Cultivo dos fungos e obtenção dos extratos brutos

O preparo dos extratos fúngicos seguiu o protocolo estabelecido por Rosa *et al.* (2013). Os fungos obtidos foram crescidos separadamente em 05 placas de Petri (90 x 15 mm) a 15 °C contendo 20 mL de meio MEA (0,1% peptona e 2% de ágar, glicose e extrato de malte) durante 15 dias. Logo depois, o conteúdo das placas (meio de cultura com o crescimento micelial) foi fragmentado em pequenos pedaços, transferido para frascos Erlenmeyers de 125 mL que foram

congelados a - 20 °C por 24h e, em seguida, liofilizados por 5 dias a - 50 °C (Liofilizador Liobras - L108). Passado esse período, cerca de 100 mL do solvente diclorometano P.A. (Synth, Brasil) foi adicionado aos frascos que ficaram incubados com o solvente por sete dias em capela química de exaustão à temperatura ambiente, com a finalidade de separar os metabólitos do micélio. Para obtenção dos extratos brutos com os metabólitos extraídos, o sobrenadante dos frascos (fase diclorometânica) foi filtrado, com auxílio de papel filtro (50 x 50 – 80g), e transferido para frascos de cintilação de 10 mL previamente pesados (ROSA *et al.*, 2013), os quais foram deixados semiabertos para a evaporação completa do solvente e obtenção final dos extratos secos. Foi realizada a pesagem dos extratos para averiguar se o rendimento estava acima de 3 mg mL⁻¹, por fim, os frascos foram armazenados a - 4 °C e depositados na extratoteca do Laboratório de Microbiologia Polar e Conexões Tropicais, UFMG para a realização do teste herbicida.

4.4.4.3.2. Ensaio herbicida

O ensaio de determinação da atividade herbicida seguiu a metodologia de Gomes *et al.* (2018). Os extratos fúngicos foram testados frente às sementes de alface (*Lactuca sativa*) (alface delícia americana - Isla) e cebolinha (*Allium schoenoprasum*) (cebolinha todo ano - Isla), modelos de dicotiledônea e monocotiledônea, respectivamente. Antes do ensaio, foi feito um primeiro teste para verificação da viabilidade da germinação das sementes, em que as sementes foram incubadas em papel filtro com 1 mL de água destilada em uma placa de petri (60 × 15 mm) nas mesmas condições propostas para o teste e, confirmada a viabilidade via crescimento visível das sementes, o ensaio herbicida foi iniciado.

Primeiramente, os extratos fúngicos foram diluídos em 10 mg mL⁻¹ de acetona P.A. (Synth) e, em seguida, foi realizada a limpeza das sementes, sendo imersas em álcool 70% por um minuto, depois em hipoclorito de sódio 2,5% por sete minutos e 30 segundos, lavadas em água destilada esterilizada por quatro vezes e secas dentro do fluxo laminar em papel filtro esterilizado. O ensaio foi realizado em duplicata em placas de 24 poços contendo em cada poço um disco de papel filtro esterilizado, cinco sementes de alface crespa ou cinco de cebolinha e 400 µL dos controles ou do extrato do fungo. Aos respectivos poços foram adicionados 400 µL do herbicida comercial glifosato (Sigma) na concentração de 3 mg mL⁻¹ como controle positivo, 400 µL de água destilada esterilizada como controle negativo, 400 µL de acetona diluída em água destilada esterilizada como controle do solvente (360 µL de água e 40 µL de acetona) e 400 µL dos extratos brutos diluídos em acetona a 1 mg mL⁻¹ (360 µL de água e 40 µL do extrato

em acetona). As placas foram seladas e armazenadas em BOD com luz contínua na temperatura de 26 °C. O resultado foi avaliado após 10 dias de incubação para *L. sativa* e 14 dias para *A. schoenoprasum*. A leitura da atividade herbicida foi realizada considerando o número de sementes que germinaram em contato com os extratos dos fungos, em uma escala de 0 (todas as sementes germinaram) a 5 (nenhuma semente germinou). Os extratos que inibir a germinação das sementes em 100% foram submetidos ao ensaio para cálculo da Concentração Inibitória Mínima (MIC), com diluições seriadas dos extratos, de 1000, 500, 250, 125, 62,5 até 31,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$, também em duplicata. Os controles utilizados no MIC foram os mesmos mencionados acima.

5. RESULTADOS

5.1. Fungos não cultiváveis: diversidade e avaliação taxonômica pelo eDNA meio da técnica de *metabarcoding*

Nos sedimentos marinhos analisados, um total de 193.436 leituras de DNA foram detectadas, 48.112 do sedimento de Walker Bay (Ilha Livingston a 52 m), 104.704 de Whalers Bay (Ilha Deception a 151 m) e 40.620 do English Strait a 404 m de profundidade. As leituras de DNA foram atribuídas a 133 ASVs fúngicas; dessas, 88 detectadas no sedimento de Walker Bay, 32 de Whalers Bay e 59 de English Strait (**Tabela 1**). A comunidade fúngica total detectada apresentou altos índices de diversidade (Fisher α), moderada riqueza (Margalef) e uma dominância baixa (Simpson). Os maiores valores de diversidade e riqueza foram obtidos, respectivamente, em Walker Bay, seguido por English Strait e Whalers Bay (**Tabela 1**).

A diversidade taxonômica das AVS's foi dominada, respectivamente, por táxons representantes dos filos *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Mortierellomycota*, *Chytridiomycota*, *Glomeromycota*, *Monoblepharomycota*, *Mucoromycota* e *Rozellomycota* (Fungi), bem como aqueles pertencentes à Straminopila (reino basal próximo a fungos) (**Figura 2 e 3, Tabela Suplementar 2**). Por meio da quantificação da abundância relativa foram detectados 05 ASVs dominantes, 16 intermediárias e 110 considerados raros (minoritários) dentro comunidade fúngica não cultivável presente nos sedimentos marinhos da Antártica (**Figura 2, Tabela Suplementar 2**). Os táxons fúngicos dominantes foram *Thelebolus balaustiformis*, *Ciliophora* sp., *Pseudogymnoascus* sp., Fungi sp. 1 e *Agaricomycetes* sp., respectivamente. Além desses, o táxon *Chaetoceros* sp. 1 (Straminopila) foi o quarto mais dominante nas amostras estudadas. Os padrões de dominância desses táxons foram distintos entre as assembleias fúngicas dos três locais amostrados. No sedimento de 52 m de profundidade (Walker Bay – Ilha Livingston), o ASV dominante foi Fungi sp. 1 (55,486%), enquanto em Whalers Bay a 151 m (Ilha Deception) *T. balaustiformis* dominou (67,3%), seguindo por *Pseudogymnoascus* sp. (17,611%) e, no English Strait, *Ciliophora* sp. (42,458%) e *Chaetoceros* sp. 1 (19,031%) dominaram as assembleias (**Figura 2, Tabela 2 Suplementar**). A maior parte dos táxons das assembleias fúngicas detectadas nas amostras de sedimentos de Whalers Bay e English Strait foi identificada utilizando os bancos de dados UNITE e GenBank em níveis taxonômicos abaixo de reino. Por outro lado, a maioria das sequências presentes no sedimento de Walker Bay não pôde ser atribuída a nenhum dos bancos de dados e 56% das ASVs só puderam ser identificados como Fungi sp., **Figura 2**.

Tabela 1. Locais de amostragem, características, dados físico-químicos dos sedimentos e índices de diversidade das assembleias de fungos detectados nos três sedimentos marinhos analisados das Ilhas no Arquipélago Shetland do Sul, Antártica marítima.

Índices de diversidade fúngica	Localização (profundidade em m)		
	Walker Bay, Livingston(52 m)	Whalers Bay, Deception(151 m)	English Strait(404 m)
Localização	62°39'149"S; 060°38'225" W	62°56'23"S; 060°39'.42"W	62°28'680"S; 59°32'706"W
Número de <i>reads</i> de DNA	48,112	104,704	40,620
Número de táxons (ASV)	88	32	59
Fisher α (diversidade)	389,0	16,3	60,4
Margalef (riqueza)	19,1	6,7	12,6
Simpson (dominância)	0,7	0,5	0,8
Parâmetros do sedimento			
Físicos			
Argila (%)	18	26	15
Silte	43	36	72
Areia grossa	2	1	1
Areia fina	37	43	12
Classe textural	franco	franco	franco siltosa
Químicos			
pH em H ₂ O	8,6	8,4	7,8
Troca P—mg dm ⁻³	131,8	165,5	135,7
Soma de bases trocáveis	6,7	6,3	6,0
Ca + K + Mg (SB) – cmol _c dm ⁻³			
Porcentagem de saturação de base (PSB) - %	100,0	100,0	100,0
H + Al - acidez potencial – cmol _c dm ⁻³	0,0	0,0	0,0
Capacidade de troca catiônica em pH 7 (CTC) - cmol _c dm ⁻³	6,7	6,3	6,0
Carbono orgânico total (TOC) - dag kg ⁻¹	0,7	0,8	0,9
Micronutriente Fe - mg dm ⁻³	478,2	617,2	1029,2
Micronutriente Mn - mg dm ⁻³	14,9	14,8	43,3

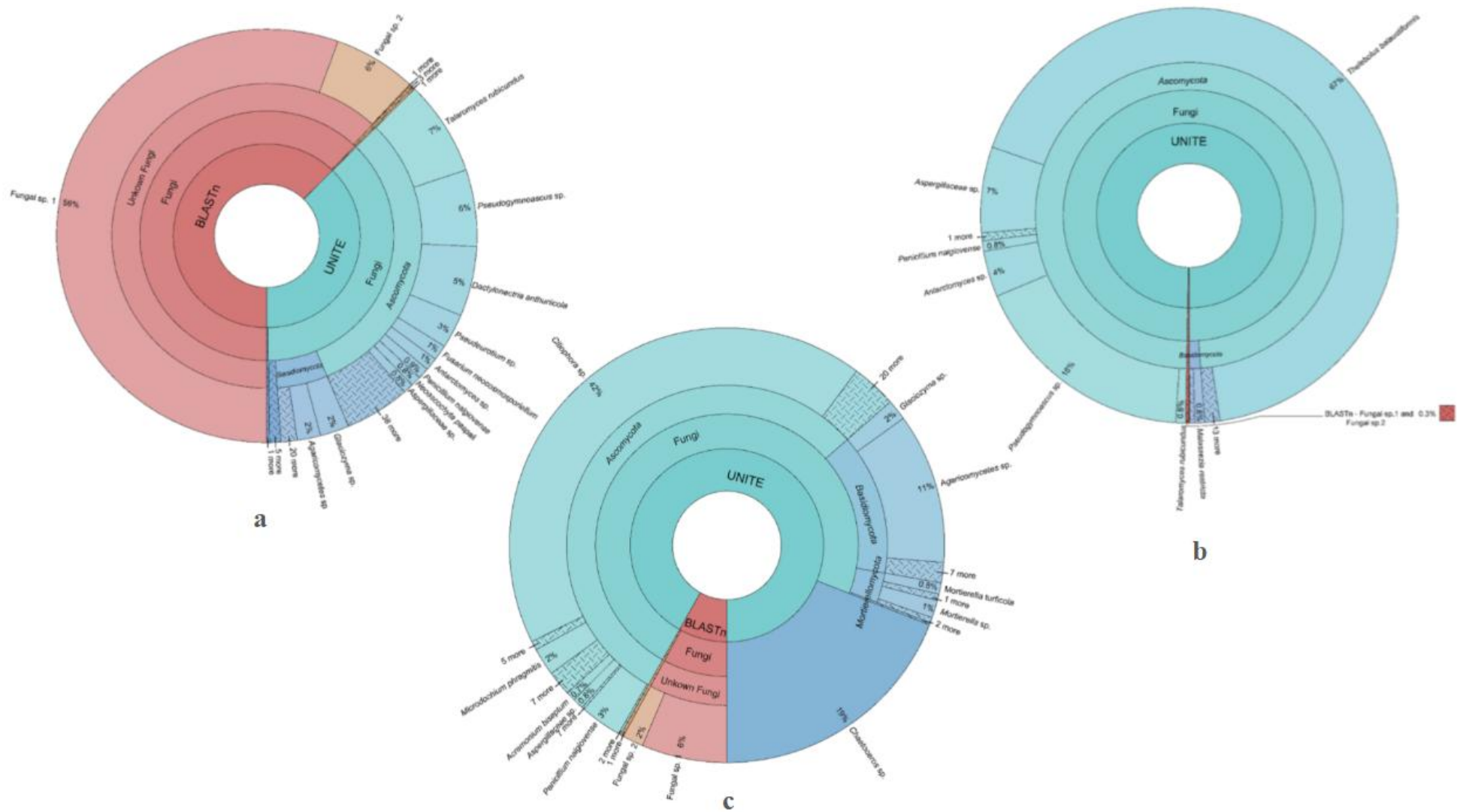


Figura 2. Gráfico Kronas com as abundâncias de diferentes níveis taxonômicos de fungos detectados em sedimentos marinhos coletados no Arquipélago Shetland do Sul, Antártica marítima. **a.** Walker Bay (Livingston) a 52 m, **b.** Whalers Bay (Deception) a 151 m e **c.** English Strait a 404 m de profundidade.

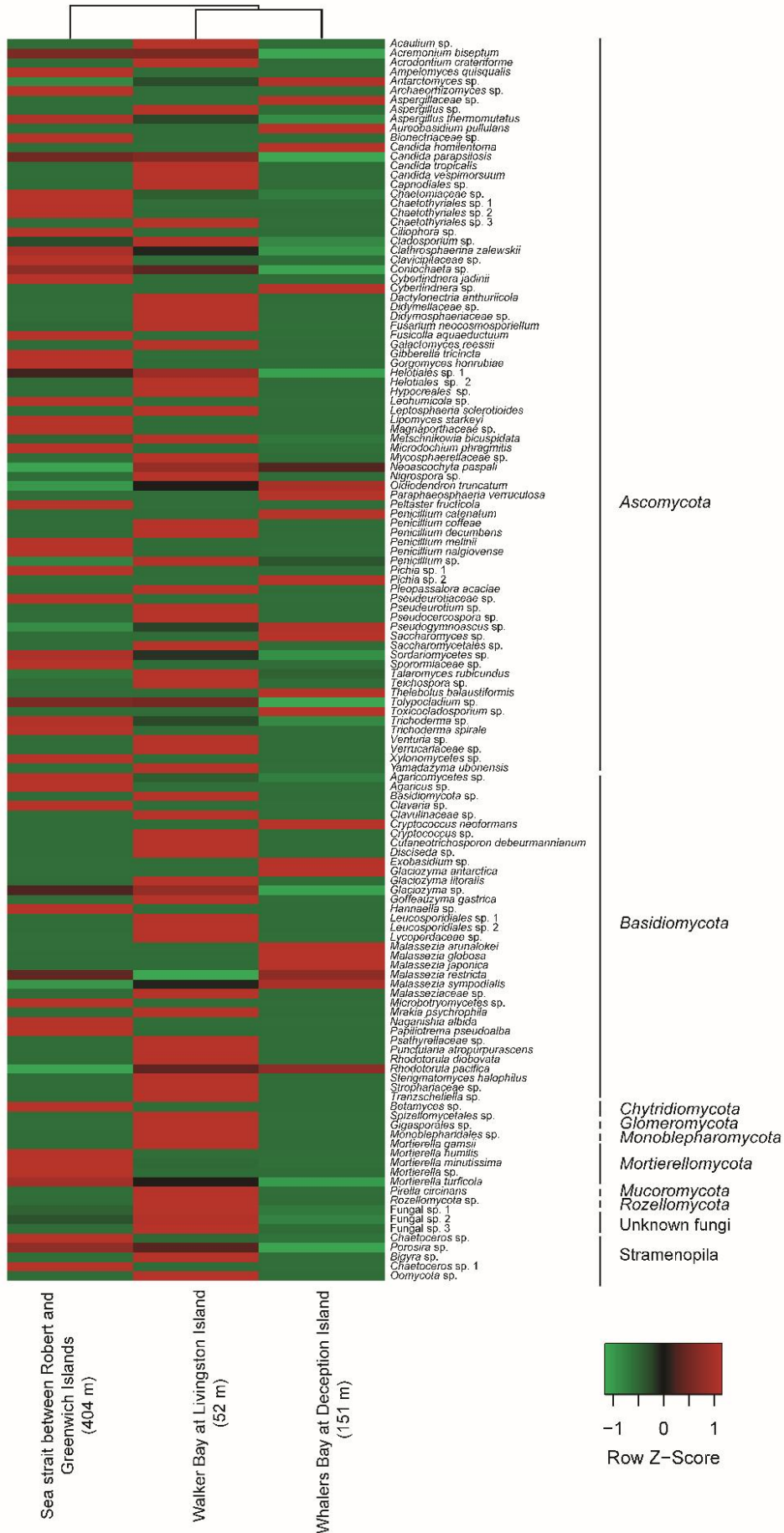


Figura 3. Mapa de calor das abundâncias relativas da biblioteca fúngica. As intensidades das cores variam do vermelho (maior abundância relativa) ao verde (menor abundância relativa). Esses valores representam porcentagens de leituras de DNA fúngico obtidas de amostras de sedimentos de Walker Bay (Livingston), Whalers Bay (Deception) e English Strait. O mapa de calor da abundância de ASV foi criado usando os seguintes parâmetros: Average Linkage, Spearman Rank Correlation e Z-score entre amostras para cada ASV.

Das 133 ASVs fúngicos atribuídos, apenas 12 (9%) foram comuns nos sedimentos das 03 regiões amostradas, incluindo táxons de diferentes gêneros (**Figura 4**). Para cada área estudada, a distribuição fúngica variou com a ocorrência de alguns táxons específicos. O sedimento de Walker Bay hospedou 53 ASVs exclusivos, seguido pelo English Strait com 30 e Whalers Bay com 14. As ASVs comuns variaram entre os táxons abundantes (*Fungi* sp. 1, *Pseudogymnoascus* sp., *Chaetoceros* sp. 1), intermediários (*Fungi* sp. 2, *Penicillium nalgiovense*, *Neoscochyta paspali*, *Aspergillaceae* sp., *Candida parapsilosis*, *Malassezia restricta* e *Microdochium phragmitis*) e raros (*Penicillium* sp. e *Cladosporium* sp.). Dentre os táxons encontrados unicamente em Walker Bay estão *Bigyra* sp., *Glaciozyma litoralis*, *Mrakia psychrophila* e *Teichospora* sp. Já em English Strait *Betamyces* sp., *Fusicolla aquaeductuum*, *Hannaella* sp. e *Papiliotrema pseudoalba*. Por sua vez, *Cyberlindnera* sp., *Glaciozyma antarctica* e *Toxicocladosporium* sp. foram reportados somente no sedimento de Whalers Bay (**Figura 4**).

Os índices de rarefação Mao Tao das assembleias fúngicas detectadas nas amostras de sedimentos dos 03 locais exibiram curvas diferentes (**Figura 5**). Aquelas de Walker Bay (Ilha Livingston) e Whalers Bay (Ilha Deception) chegaram a uma assíntota, o que sugere que as amostragens realizadas forneceram uma boa descrição da diversidade presente. Entretanto, a assembleia fúngica detectada no sedimento do English Strait não atingiu a assíntota, sugerindo que a diversidade nos sedimentos dessa região pode ser maior do que a encontrada (**Figura 5**).

Após comparação das características físico-químicas dos sedimentos em relação a diversidade das assembleias fúngicas detectada, foi observado que os sedimentos de Walker Bay e Whalers Bay apresentaram a mesma classe textural (franca) e frações granulométricas semelhantes (areia, silte e argila), com a fração areia fina se destacando em relação à fração de areia grossa (**Tabela 1**). Em contraste, o sedimento de English Strait apresentou um maior teor de silte (textura siltosa) e com uma proporção menor de areia fina em comparação com as

outras duas amostras. Todos os três sedimentos apresentaram reações alcalinas com valores elevados de pH próximos ou superiores a 8. Também apresentaram características eutróficas com valores de saturação total por bases (100%), apesar de os valores de CTC não terem sido elevados, próximos a $6 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$. Além disso, os teores de carbono orgânico (TOC) presente nos sedimentos foram baixos ($< 1\%$) e o teor de fósforo foi considerado moderado. As maiores concentrações dos micronutrientes Fe e Mn estiveram no sedimento amostrado em English Strait a 404 m de profundidade (**Tabela 1**).

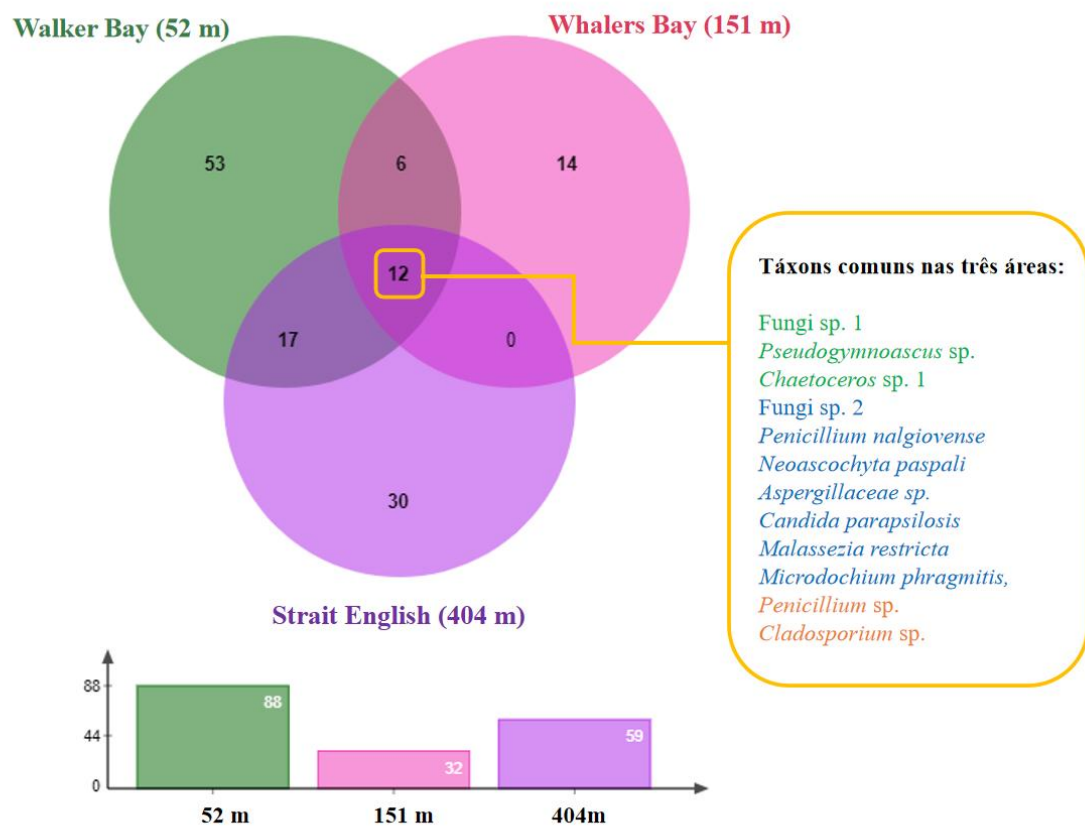


Figura 4. Diagrama de Venn demonstrando a distribuição de variantes de sequência *amplicon* fúngica (ASVs) nas amostras de sedimentos obtidas em Walker Bay, Whalers Bay e English Strait, em Ilhas da Shetland do Sul, Antártica marítima. Na legenda, o código de cores representa táxons dominantes (verde), de abundância intermediária (azul) e membros raros da comunidade fúngica (laranja). Diagrama gerado em <http://jvenn.toulouse.inra.fr/app/example.html> (BARDOU *et al.*, 2014).

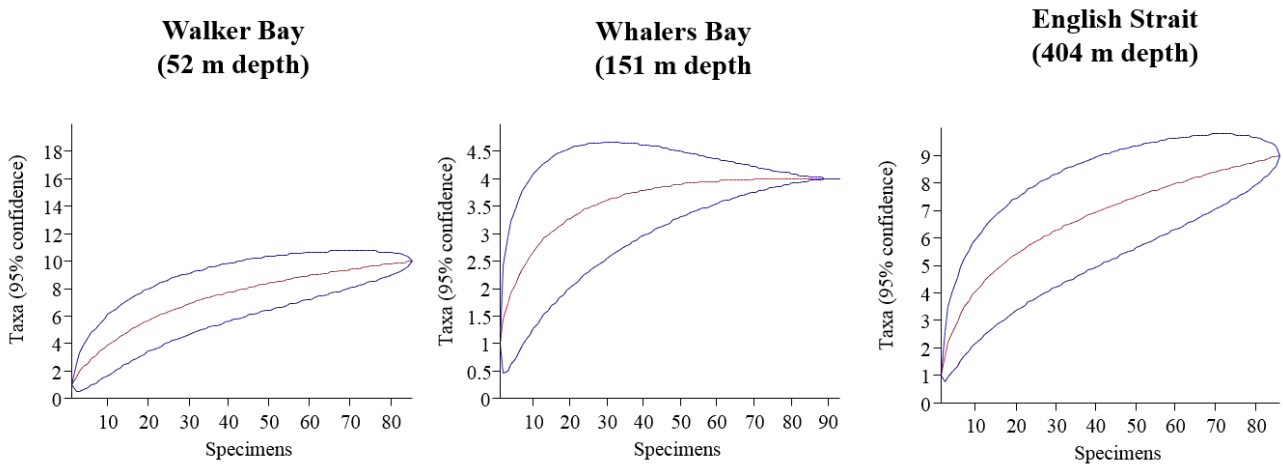


Figura 5. Curvas de rarefação, com limites de confiança de 95%, de variantes de sequência de *amplicon* de fungos (ASVs) obtidas das três amostras de sedimentos marinhos analisadas.

5.1.1. Ecologia dos fungos não cultiváveis

As análises das atribuições de ecologia funcional dos ASVs detectados em nível de gênero indicaram que as assembleias de fungos presentes nos sedimentos marinhos foram dominadas, em ordem, por táxons saprotróficos, simbióticos e patogênicos tanto de plantas quanto de animais (**Tabela Suplementar 3**). *Antarctomyces*, *Lipomyces*, *Paraphaeosphaeria*, *Penicillium* e *Talaromyces* foram reportados por seus papéis como decompositores ambientais. Por sua vez, *Cyberlindnera*, *Ciliophora* e *Hannaella* estiveram entre os simbiotes conhecidos. Interessantemente, muitos táxons que tiveram uma abundância intermediária e os raros são reconhecidos como importantes patógenos em animais, entre os quais se destacam aqueles dos gêneros *Candida*, *Malassezia* e *Cryptococcus*, incluindo *Candida parapsilosis*, *Malassezia restricta* (abundância intermediária), *Aspergillus thermomutatus*, *C. tropicalis*, *Cryptococcus neoformans*, *M. arunalokei*, *M. globosa*, *M. japonica* e *M. sympodialis* (menor) **Tabela Suplementar 3**.

5.2. Fungos cultiváveis: isolamento e identificação

Todos os meios de cultura utilizados se mostraram eficientes para a recuperação dos fungos nos sedimentos marinhos, com as médias das UFC's entre os meios e os locais amostrados variando de 1,3 a > 300 colônias na diluição de 10^{-4} . Os filamentosos tiveram uma faixa contagem de 1 - 50 UFC's e a maioria das leveduras acima de 300 (**Tabela 4, Suplementar Tabela 5**). Reunidos em morfotipos variados (**Figura 6**), 68 isolados foram obtidos dos sedimentos amostrados, agrupados em sete táxons representando seis gêneros distintos, todos do filo *Ascomycota*, sendo a maioria fungos filamentosos (n=44, 65%) pertencentes a *Penicillium*, *Pseudeurotium*, *Thelebolus*, *Antarctomyces* e *Cladosporium*. As leveduras recuperadas dos sedimentos foram identificadas em *Meyerozyma*, o gênero mais abundante encontrado, todos os isolados leveduriformes (n=24, 35%) agruparam em *Meyerozyma guilliermondii*. Os táxons abundantes entre os filamentosos foram os de *Penicillium*, principalmente *Penicillium chrysogenum* e *P. cf. palitans*, seguido pelas espécies de *Pseudeurotium cf. bakeri* e *Thelebolus balaustiformis*. Enquanto *Antarctomyces* e *Cladosporium*, tiveram as menores densidades (**Tabela 4, Suplementar Tabela 5**).

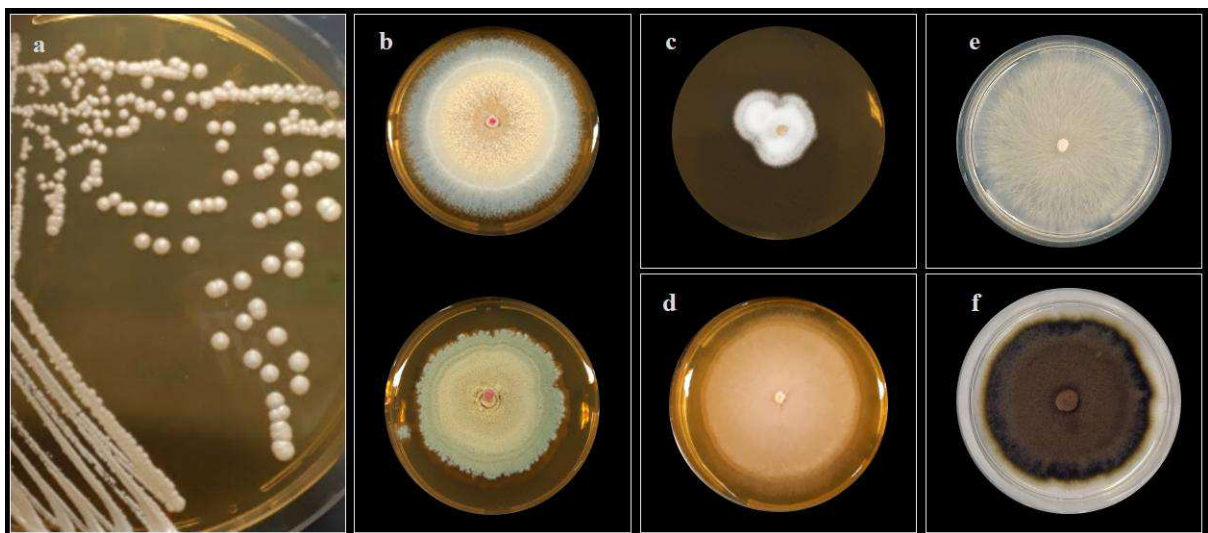


Figura 6. Morfologia das colônias fúngicas recuperadas a 15 °C por cultivo de sedimentos marinhos, no Oceano Austral, Antártica marítima: **a.** *Meyerozyma*, **b.** *Penicillium* sp. **c.** *Pseudeurotium*, **d.** *Thelebolus*, **e.** *Antarctomyces* sp., **f.** *Cladosporium* sp. Fotos: Mayanne Karla da Silva, 2023.

Pelas médias das UFC's, observou-se que o perfil de crescimento dos fungos nos 05 diferentes meios sólidos usados foi relativamente semelhante entre os sedimentos marinhos de Walker Bay (52 m) e o English Strait (404 m), embora a variedade dos grupos encontrados a

52 m tenha sido mais significativa do que aqueles isolados a 404 m que representaram prioritariamente espécies de *Penicillium* (tanto *P. cf. palitans* quanto *P. chrysogenum*) e *Meyerozyma* (Tabela 4, Tabela Suplementar 5). Em MEA, os isolados de *Antarctomyces* sp. obtidos a partir do sedimento amostrado a 52 m não exibiram crescimento. Por outro lado, os dois isolados de *Pseudeurotium cf. bakeri* cresceram apenas em MEA. Já os *T. balaustiformis* foram isolados somente a partir dos meios MEA e ágar marinho (MAG) e o *Cladosporium* sp. do meio DRBC. Nenhuma levedura presente nos sedimentos cresceu em MAG.

Tabela 4. Média das Unidades Formadoras de Colônias (UFC's) a 10^{-4} , densidades e índices de diversidade ecológica de fungos obtidos em diferentes meios de crescimento a 15 °C a partir de sedimentos marinhos de diferentes profundidades em Walker Bay/Livingston (52 m), Whalers Bay/Deception (151 m) e English Strait (404 m) no Oceano Austral, Península Antártica. *As triplicatas dos sedimentos de cada local foi usado para definir a média das UFC's por meio.^a ágar dicloran glicerol 18; ^b ágar dicloran rosa bengala; ^c ágar marinho; ^d ágar extrato de malte; ^e ágar *sabouraud*.

Contagem UFC's (médias)	Localização (profundidade em m)		
	Walker Bay, Livingston (52 m)	Whalers Bay, Deception (151 m)	English Strait (404 m)
Meios*			
DG18 ^a	> 300,0	21,3	> 300,0
DRBC ^b	> 300,0	14,3	> 300,0
MAG ^c	7,6	3,3	1,3
MEA ^d	25,6	17,0	22,6
SAB ^e	> 300,0	30,6	> 300,0
Táxon (densidades)			
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	> 300,0	25,8	> 300,0
<i>Penicillium chrysogenum</i>	19,0	0,0	18,1
<i>Penicillium cf. palitans</i>	16,4	12,0	4,3
<i>Pseudeurotium cf. bakeri</i>	8,0	7,0	0,0
<i>Thelebolus balaustiformis</i>	0,0	4,0	0,0
<i>Antarctomyces</i> sp.	2,7	0,0	0,0
<i>Cladosporium</i> sp.	1,0	0,0	0,0

Índices diversidade			
Número de táxons	6	4	3
Fisher α (diversidade)	0,9	0,6	0,4
Margalef (riqueza)	0,8	0,5	0,3
Simpson (dominância)	0,5	0,4	0,5

Os sedimentos de Walker Bay (52 m) exibiram a maior diversidade e riqueza de táxons fúngicos, com registro para 05 dos seis gêneros recuperados, exceto *Thelebolus*. Por sua vez, a diversidade fúngica foi moderada nos sedimentos de Whalers Bay (151 m) e mais baixa nos de English Strait a 404 m (**Figura 7, Tabela 4, Tabela Suplementar 5**). As duas únicas espécies compartilhadas entre os isolados de todas as diferentes profundidades foram *M. guilliermondii* e *P. cf. palitans*, sendo estas também as mais abundantes em todos os locais amostrados (**Figura 7, Tabela 4**). *P. cf. bakeri* foi comum nos sedimentos de 52 e 151 m, enquanto *P. chrysogenum* foi presente tanto a 52 quanto a 404 m de profundidade, com as densidades bem próximas. Já *Cladosporium* sp. (um singleto) e *Antarctomyces* sp. foram detectados apenas em Walker Bay (52 m) e *Thelebolus balaustiformis* ocorreu unicamente em Whalers Bay (151 m) (**Figura 7, Tabela 4, Tabela Suplementar 5**).

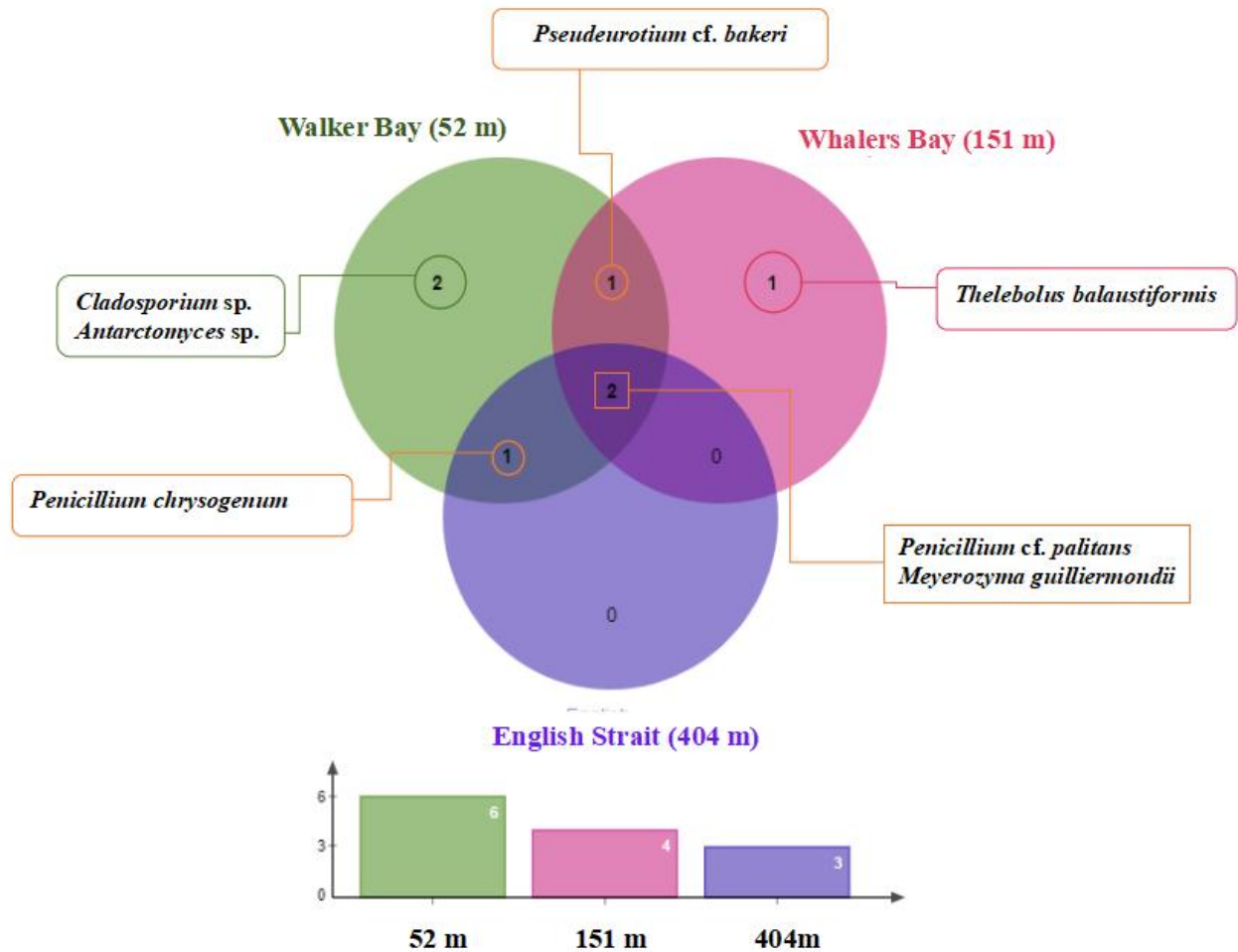


Figura 7. Diagrama de Venn com a comparação taxonômica dos fungos recuperados de sedimentos oceânicos profundos na Antártica marítima, em Walker Bay (52m), Whalers Bay (151 m) e English Strait (404 m). Diagrama gerado em <http://jvenn.toulouse.inra.fr/app/example.html> (BARDOU *et al.*, 2014).

5.3. Detecção das substâncias produzidas pelos fungos cultiváveis

5.3.1. Triagem enzimática

Todos isolados fúngicos obtidos (n=68) foram triados para a produção de 09 exoenzimas, os quais apresentaram atividade para pelo menos uma delas, exceto para amilase. Os isolados fúngicos foram ativos para proteases (n=63, 92%), invertases (n=58, 85%), celulases (n=37, 54%), lipases (n=36, 52%), carragenases (n=35, 51%), agarases (n=32, 47%), pectinases (n=30, 44%) e esterases (n=11, 16%) (**Figura 8**). Dos fungos ativos, 07 se destacaram produzindo as 08 enzimas avaliadas; já outros 22 isolados foram produtores de 07; quatro fungos produziram 06 ao mesmo tempo. Os isolados das duas espécies de *Penicillium* sp. se destacaram na produção de enzimas e foram hábeis em produzir de 06-08 enzimas,

principalmente proteases, invertases, lipases, celulasas, carragenases e agarases (**Tabela 6**). Vinte cinco isolados positivaram para apenas duas enzimas, incluindo todos os isolados de *M. guilliermondii* (n=24) que, particularmente, produziram proteases e invertases. Os isolados de *P. cf. bakeri* produziram agarase, carragenase e celulase. *Cladosporium* sp. UFMGCB 19612 foi o único isolado produtor de 04 enzimas (celulase, esterase, lipase e protease). Por outro lado, seis isolados exibiram atividade extracelular para somente uma enzima, incluindo todos de *Antarctomyces* sp. que foram positivos apenas para proteases e *T. balaustiformis* para lipases (**Tabela 6**).

Os Índices Enzimáticos (IE) entre os fungos avaliados variaram de 0,80 a 3,05; entretanto, os valores não representaram diferença estatística relevante entre os isolados por serem bem próximos, impedindo assim definir os melhores produtores para cada enzima (especialmente entre os fungos filamentosos). Contudo, *M. guilliermondii* UFMGCB 19667 e 19651 tiveram seus índices considerados os melhores para invertase e protease (3,05 e 2,76, respectivamente), **Tabela 6**.

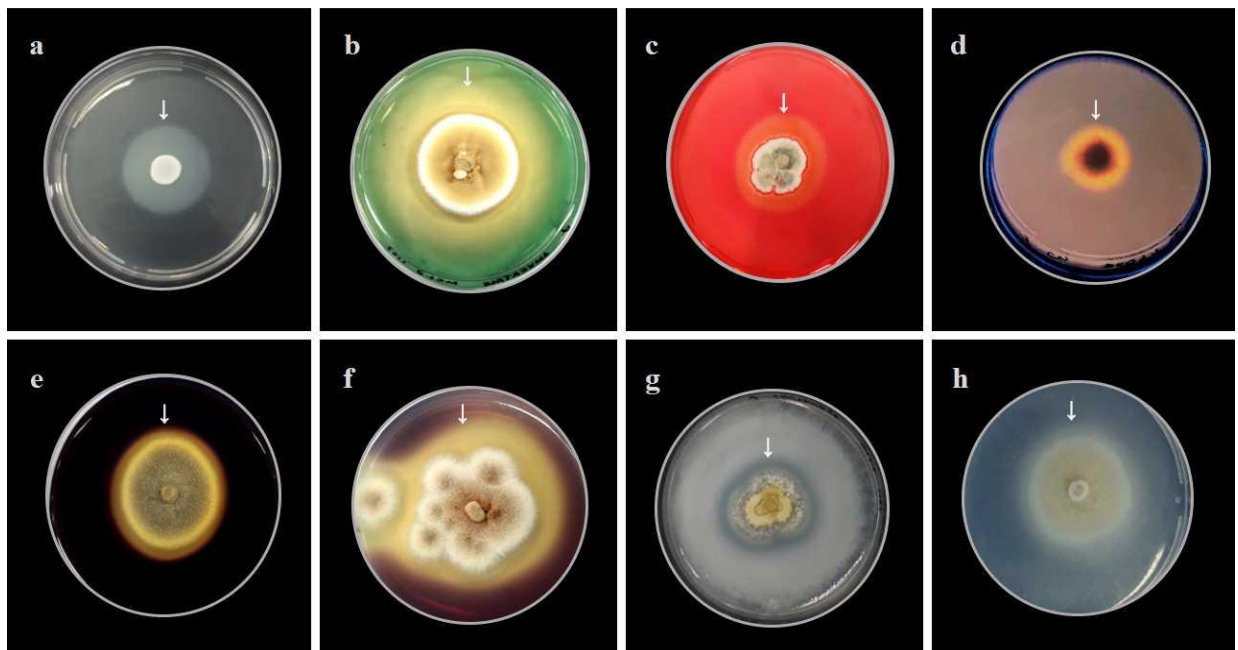


Figura 8. Enzimas extracelulares produzidas a 15 °C durante 7 dias por fungos antárticos isolados de sedimentos marinhos de profundidade do Oceano austral: **a.** protease, **b.** invertase **c.** celulase, **d.** lipase, **e.** carragenase, **f.** agarase, **g.** pectinase e **h.** esterase. As setas indicam os halos de hidrólise. Fotos: Mayanne Karla da Silva, 2023.

Tabela 6. Perfil de produção e Índice Enzimático (IE) das enzimas protease, invertase, celulase, lipase, carragenase, agarase, pectinase e esterase produzidas a 15 °C por fungos isolados de sedimentos marinhos de profundidade na Península Antártica em um período de sete dias. ^aUFMGCB = Código na Coleção de Microrganismos e Células da UFMG; ^b Média das duplicatas utilizadas no teste, calculado pela razão entre o diâmetro do halo de atividade extracelular pelo da colônia em milímetro. (+) Resultado positivo, (-) Resultado negativo. *Valores não mensurados. (O código de cores indica o número de enzimas produzidas: (8) azul, (7) creme, (6) laranja, (5) lilás, (4) amarelo, (3) rosa, (2) verde e (1) cinza).

Fungo (Código UFMGCB ^a)	Índice Enzimático (IE) ^b							
	Agarase	Carragenase	Celulase	Esterase	Invertase	Lipase*	Pectinase	Protease
<i>Penicillium palitans</i> UFMG 19616	1,23	1,12	1,22	1,02	1,39	+	1,38	1,51
<i>Penicillium chrysogenum</i> 19626	1,15	1,37	1,25	1,01	1,02	+	1,03	1,05
<i>P. chrysogenum</i> 19628	1,12	1,24	1,33	1,03	1,03	+	1,03	1,11
<i>P. chrysogenum</i> 19632	1,06	1,14	1,22	1,05	1,08	+	1,03	1,16
<i>P. cf. palitans</i> 19657	1,12	1,16	1,17	0,95	1,40	+	1,33	1,57
<i>P. cf. palitans</i> 19662	1,07	1,10	1,37	1,08	1,31	+	1,09	1,57
<i>P. cf. palitans</i> 19668	1,08	1,12	1,38	1,15	1,39	+	1,17	1,51
<i>P. cf. palitans</i> 19605	1,09	1,10	1,46	-	1,39	+	1,27	1,48
<i>P. cf. palitans</i> 19614	1,16	1,02	1,31	-	1,38	+	1,19	1,56
<i>P. cf. palitans</i> 19619	1,11	1,15	1,44	-	1,77	+	1,26	1,56
<i>P. cf. palitans</i> 19620	1,01	1,02	1,30	-	1,68	+	1,38	1,49
<i>P. cf. palitans</i> 19621	1,22	1,20	1,17	-	1,41	+	1,45	1,61
<i>P. cf. palitans</i> 19622	1,19	1,04	1,51	-	1,26	+	1,20	1,51
<i>P. cf. palitans</i> 19623	1,12	1,17	1,52	-	1,28	+	1,34	1,48

<i>P. chrysogenum</i> 19624	-	1,20	1,36	0,80	1,04	+	1,10	1,09
<i>P. cf. palitans</i> 19625	1,20	1,17	1,30	1,05	1,12	-	1,33	1,47
<i>P. cf. palitans</i> 19629	1,12	1,01	1,27	-	1,34	+	1,36	1,44
<i>P. cf. palitans</i> 19630	1,12	1,00	1,38	-	1,43	+	1,31	1,48
<i>P. chrysogenum</i> 19631	1,07	1,22	1,40	1,06	1,05	+	-	1,08
<i>P. cf. palitans</i> 19634	1,10	1,05	1,15	-	1,57	+	1,49	1,53
<i>P. chrysogenum</i> 19636	1,04	1,22	1,25	-	1,25	+	1,15	1,08
<i>P. chrysogenum</i> 19656	1,02	1,17	1,32	-	1,07	+	1,05	1,09
<i>P. cf. palitans</i> 19659	1,19	1,12	1,43	-	1,37	+	1,10	1,52
<i>P. cf. palitans</i> 19660	1,07	1,11	1,29	-	1,39	+	1,14	1,57
<i>P. cf. palitans</i> 19661	1,21	1,21	1,36	-	1,37	+	1,31	1,43
<i>P. cf. palitans</i> 19669	1,08	1,10	1,35	-	1,31	+	1,09	1,44
<i>P. cf. palitans</i> 19670	1,00	1,11	1,11	-	1,38	+	1,13	1,54
<i>P. cf. palitans</i> 19671	1,18	1,12	1,29	-	1,38	+	1,28	1,48
<i>P. cf. palitans</i> 19672	1,11	1,08	1,16	-	1,22	+	1,10	1,64
<i>P. cf. palitans</i> 19618	-	1,12	1,37	-	1,37	+	1,13	1,56
<i>P. chrysogenum</i> 19627	1,11	1,02	1,78	-	1,07	+	-	1,09
<i>P. chrysogenum</i> 19633	1,06	1,22	1,33	-	1,07	+	-	1,11
<i>P. chrysogenum</i> 19635	1,03	1,14	1,19	-	1,20	+	-	1,11
<i>P. cf. palitans</i> 19610	-	-	1,19	-	1,66	+	1,20	1,56
<i>Cladosporium</i> sp. 19612	-	-	1,54	1,40	-	+	-	1,23
<i>Pseudeurotium</i> cf. <i>bakeri</i> 19658	1,02	1,11	1,16	-	-	-	-	-
<i>P. cf. bakeri</i> 19613	-	1,13	1,33	-	-	-	-	-

<i>Meyerozyma guilliermondii</i> 19637	-	-	-	-	2,29	-	-	2,35
<i>M. guilliermondii</i> 19638	-	-	-	-	2,94	-	-	2,26
<i>M. guilliermondii</i> 19639	-	-	-	-	2,80	-	-	2,52
<i>M. guilliermondii</i> 19640	-	-	-	-	1,78	-	-	2,41
<i>M. guilliermondii</i> 19641	-	-	-	-	1,72	-	-	2,58
<i>M. guilliermondii</i> 19642	-	-	-	-	1,88	-	-	2,38
<i>M. guilliermondii</i> 19643	-	-	-	-	2,40	-	-	2,63
<i>M. guilliermondii</i> 19644	-	-	-	-	2,38	-	-	2,38
<i>M. guilliermondii</i> 19645	-	-	-	-	2,47	-	-	2,67
<i>M. guilliermondii</i> 19646	-	-	-	-	2,23	-	-	2,49
<i>M. guilliermondii</i> 19647	-	-	-	-	2,62	-	-	2,59
<i>M. guilliermondii</i> 19648	-	-	-	-	2,18	-	-	2,45
<i>M. guilliermondii</i> 19649	-	-	-	-	2,22	-	-	2,68
<i>M. guilliermondii</i> 19650	-	-	-	-	2,13	-	-	2,69
<i>M. guilliermondii</i> 19651	-	-	-	-	2,35	-	-	2,76
<i>M. guilliermondii</i> 19652	-	-	-	-	2,53	-	-	2,58
<i>M. guilliermondii</i> 19653	-	-	-	-	2,59	-	-	2,31
<i>M. guilliermondii</i> 19654	-	-	-	-	2,52	-	-	2,48
<i>M. guilliermondii</i> 19655	-	-	-	-	2,48	-	-	2,62
<i>M. guilliermondii</i> 19663	-	-	-	-	2,54	-	-	2,49
<i>M. guilliermondii</i> 19664	-	-	-	-	2,80	-	-	2,44
<i>M. guilliermondii</i> 19665	-	-	-	-	2,59	-	-	2,46
<i>M. guilliermondii</i> 19666	-	-	-	-	2,82	-	-	2,59

<i>M. guilliermondii</i> 19667	-	-	-	-	3,05	-	-	2,34
<i>Thelebolus balaustiformis</i> 19606	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>T. balaustiformis</i> 19607	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>Antarctomyces</i> sp. 19608	-	-	-	-	-	-	-	1,03
<i>Antarctomyces</i> sp. 19611	-	-	-	-	-	-	-	1,02
<i>Antarctomyces</i> sp. 19615	-	-	-	-	-	-	-	1,23
<i>Antarctomyces</i> sp. 19617	-	-	-	-	-	-	-	1,02
TOTAL (n° aislados, %)	32 (47%)	35 (51%)	37 (54%)	11 (16%)	58 (85%)	36 (52%)	30 (44%)	63 (92%)

5.3.2. Atividade biossurfactante

Todos os fungos obtidos (n=68) foram avaliados quando à produção de biossurfactante. Quatro isolados demonstraram atividade significativa ($IE_{24} \geq 50\%$), os quais foram identificados como *T. balaustiformis* UFMGCB 19606 (53,04%), *Antarctomyces* sp. UFMGCB 19608 (63,35%) e UFMGCB 19617 (81,38% - com o melhor desempenho) e *P. cf. palitans* 19671 (63,71%) quando comparados com 84,56% do SDS 1% utilizado como controle positivo (**Tabela 7**).

Tabela 7. Produção de biossurfactantes por fungos recuperados de sedimentos marinhos a distintas profundidades na Península Antártica detectados pela atividade emulsificante em querosene.

^aUFMGCB = Código na Coleção de Microrganismos e Células da UFMG; ^bCN = Controle negativo (meio de cultivo livre de inóculo); ^cSDS 1% = Controle positivo (dodecil sulfato de sódio a 1%).

*Média das triplicatas utilizadas no experimento com o desvio padrão (\pm).

Táxon	UFMGCB ^a	Índice de emulsificação ($IE_{24}\%$) [*]
<i>Antarctomyces</i> sp.	19617	81,38 \pm 2,79
<i>Penicillium</i> cf. <i>palitans</i>	19671	63,71 \pm 0,87
<i>Antarctomyces</i> sp.	19608	63,35 \pm 5,46
<i>Thelebolus balaustiformis</i>	19606	53,04 \pm 13,26
<i>P. cf. palitans</i>	19657	49,79 \pm 8,31
<i>P. cf. palitans</i>	19661	46,32 \pm 16,73
<i>P. cf. palitans</i>	19662	43,00 \pm 17,28
<i>P. cf. palitans</i>	19622	41,45 \pm 19,28
<i>P. cf. palitans</i>	19625	40,52 \pm 11,25
<i>P. cf. palitans</i>	19610	39,65 \pm 18,93
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	19653	37,47 \pm 3,69
<i>P. cf. palitans</i>	19668	36,35 \pm 14,58
<i>P. cf. palitans</i>	19616	35,68 \pm 16,20
<i>P. cf. palitans</i>	19669	29,72 \pm 19,96
<i>P. cf. palitans</i>	19670	28,86 \pm 17,89
<i>M. guilliermondii</i>	19649	27,10 \pm 2,48
<i>Antarctomyces</i> sp.	19615	26,96 \pm 13,44
<i>Penicillium chrysogenum</i>	19626	25,92 \pm 3,56
<i>P. cf. palitans</i>	19623	23,67 \pm 6,36
<i>T. balaustiformis</i>	19607	21,91 \pm 12,89

<i>P. cf. palitans</i>	19634	17,19 ± 19,80
<i>M. guilliermondii</i>	19638	16,70 ± 2,86
<i>P. cf. palitans</i>	19629	15,81 ± 9,29
<i>M. guilliermondii</i>	19644	13,59 ± 10,36
<i>M. guilliermondii</i>	19641	12,05 ± 1,94
<i>M. guilliermondii</i>	19663	11,22 ± 7,82
<i>P. cf. palitans</i>	19630	10,40 ± 1,54
<i>M. guilliermondii</i>	19655	10,26 ± 8,70
<i>M. guilliermondii</i>	19645	10,12 ± 1,39
<i>P. cf. palitans</i>	19672	9,81 ± 6,69
<i>M. guilliermondii</i>	19651	9,33 ± 2,41
<i>M. guilliermondii</i>	19648	8,61 ± 5,77
<i>M. guilliermondii</i>	19664	8,59 ± 1,99
<i>Pseudeurotium cf. bakeri</i>	19658	8,21 ± 0,23
<i>M. guilliermondii</i>	19650	7,01 ± 1,31
<i>P. cf. palitans</i>	19620	6,73 ± 2,94
<i>M. guilliermondii</i>	19640	6,57 ± 2,08
<i>P. cf. palitans</i>	19605	6,54 ± 3,51
<i>M. guilliermondii</i>	19647	6,21 ± 1,14
<i>P. cf. palitans</i>	19659	6,06 ± 2,33
<i>M. guilliermondii</i>	19637	5,45 ± 0,96
<i>P. cf. palitans</i>	19660	5,44 ± 1,05
<i>M. guilliermondii</i>	19652	5,19 ± 0,89
<i>P. cf. bakeri</i>	19613	5,08 ± 1,84
<i>M. guilliermondii</i>	19665	4,91 ± 2,11
<i>Cladosporium sp.</i>	19612	4,64 ± 0,99
<i>P. chrysogenum</i>	19633	4,58 ± 1,51
<i>M. guilliermondii</i>	19654	4,06 ± 0,89
<i>M. guilliermondii</i>	19639	3,87 ± 0,86
<i>Antarctomyces sp.</i>	19611	3,43 ± 0,65
<i>P. cf. palitans</i>	19618	3,38 ± 2,25
<i>M. guilliermondii</i>	19666	3,36 ± 0,89
<i>M. guilliermondii</i>	19642	2,98 ± 0,47
<i>M. guilliermondii</i>	19643	2,90 ± 0,35
<i>P. chrysogenum</i>	19636	2,79 ± 1,36
<i>M. guilliermondii</i>	19646	2,61 ± 0,81

<i>M. guilliermondii</i>	19667	2,61 ± 1,25
<i>P. chrysogenum</i>	19631	2,43 ± 0,64
<i>T. balaustiformis</i>	19609	2,14 ± 0,09
<i>P. cf. palitans</i>	19621	2,09 ± 0,66
<i>P. chrysogenum</i>	19632	1,31 ± 0,26
<i>P. cf. palitans</i>	19619	1,14 ± 0,29
<i>P. chrysogenum</i>	19628	1,13 ± 0,18
<i>P. chrysogenum</i>	19656	1,11 ± 0,15
<i>P. chrysogenum</i>	19627	0,78 ± 0,52
<i>P. chrysogenum</i>	19624	0,67 ± 0,44
<i>P. chrysogenum</i>	19635	0,65 ± 0,04
<i>P. cf. palitans</i>	19614	0,44 ± 0,58
CN^b		0,81 ± 1,08
SDS^c 1%		84,56 ± 1,62

5.3.3. Atividade herbicida

Todos os extratos dos fungos identificados como *P. cf. palitans* (n = 24) demonstraram fitotoxicidade contra os modelos de alface crespa (*L. sativa*) e da cebolinha (*A. schoenoprasum*). Apenas dois isolados, *P. cf. palitans* UFMGCB 19623 e 19625, exibiram efeito contra as sementes de alface crespa, na concentração de 1 mg mL⁻¹. Para o isolado *P. cf. palitans* 19625, a inibição da germinação foi completa para as 05 sementes testadas (**Tabela 8**). Esses mesmos isolados foram também ativos contra as sementes da cebolinha, nas mesmas concentrações anteriores após o reteste. Os demais fungos agrupados em *P. cf. palitans* (n=22) exibiram atividade herbicida seletiva contra cebolinha. Três desses fungos (*P. cf. palitans* UFMGCB 19616, 19621 e o 19662) foram eficientes em inibir a germinação a 0,5 mg mL⁻¹, todos os demais restantes tiveram toxicidade apenas na concentração de 1 mg mL⁻¹.

Tabela 8. Atividade herbicida contra *Lactuca sativa* (alface crespa) e *Allium schoenoprasum* (cebolinha) de extratos obtidos de espécies fúngicas isoladas de sedimentos marinhos do Oceano Austral, na Península Antártica.

Táxon	Profundidade do sedimento (m)	UFMGCB ^a	Atividade herbicida em mg mL ⁻¹ (MIC ^b)	
			<i>L. sativa</i>	<i>A. schoenoprasum</i>
<i>Penicillium cf. palitans</i>	404	19623	4 ± 0,5 (1)	5 ± 0 (1)
<i>P. cf. palitans</i>	404	19625	5 ± 0 (1)	5 ± 0 (1)
<i>P. cf. palitans</i>	151	19605	-	5 ± 0 (1)
<i>P. cf. palitans</i>	52	19610	-	5 ± 0 (1)
<i>P. cf. palitans</i>	52	19614	-	5 ± 0 (1)
<i>P. cf. palitans</i>	52	19616	-	5 ± 0 (0,5)
<i>P. cf. palitans</i>	404	19618	-	5 ± 0 (1)
<i>P. cf. palitans</i>	404	19619	-	5 ± 0 (1)
<i>P. cf. palitans</i>	404	19620	-	5 ± 0 (1)
<i>P. cf. palitans</i>	404	19621	-	5 ± 0 (0,5)
<i>P. cf. palitans</i>	404	19622	-	5 ± 0 (1)
<i>P. cf. palitans</i>	404	19629	-	5 ± 0 (1)
<i>P. cf. palitans</i>	404	19634	-	5 ± 0 (1)
<i>P. cf. palitans</i>	52	19657	-	5 ± 0 (1)
<i>P. cf. palitans</i>	52	19659	-	5 ± 0 (1)
<i>P. cf. palitans</i>	52	19660	-	5 ± 0 (1)
<i>P. cf. palitans</i>	151	19661	-	5 ± 0 (1)
<i>P. cf. palitans</i>	151	19662	-	5 ± 0 (0,5)
<i>P. cf. palitans</i>	151	19668	-	5 ± 0 (1)
<i>P. cf. palitans</i>	151	19669	-	5 ± 0 (1)
<i>P. cf. palitans</i>	52	19670	-	5 ± 0 (1)
<i>P. cf. palitans</i>	52	19671	-	5 ± 0 (1)
<i>P. cf. palitans</i>	52	19672	-	5 ± 0 (1)
Glifosato			5 ± 0	5 ± 0

A estimativa qualitativa da fitotoxicidade foi realizada atribuindo uma escala de 0-5, onde 0 = todas as sementes germinaram/nenhum efeito e 5 = nenhuma semente germinou; ± desvio padrão. Plantas alvo: *Lactuca sativa* = alface crespa, *Allium schoenoprasum* = cebolinha. Em negrito, os valores selecionados no cálculo da concentração inibitória mínima. (-) Resultado negativo. Controles utilizados: positivo (glifosato) e negativos

(meio de crescimento MEA e o solvente acetona). Obs: O controle positivo glifosato foi testado na concentração de 3 mg mL⁻¹. ^aUFMGCB = Coleção de Micro-organismos e Células da Universidade Federal de Minas Gerais.
^bConcentração Inibitória Mínima.

6. DISCUSSÃO

6.1. Fungos não cultiváveis: diversidade e avaliação taxonômica pelo eDNA por meio da técnica de *metabarcoding*

Em contraste com os ambientes antárticos terrestres, até o momento poucos estudos avaliaram a diversidade fúngica em sedimentos marinhos no Oceano Antártico (ROSA *et al.*, 2019b). Entre os trabalhos já publicados, a maioria aplicou abordagens tradicionais de cultivo, relatando a presença de uma diversidade relativamente baixa (VAZ *et al.*, 2011; GONÇALVES *et al.*, 2013, 2015; LAICH *et al.*, 2013; WENTZEL *et al.*, 2018; OGAKI *et al.*, 2020a). Já a aplicação de uma abordagem de *metabarcoding* de eDNA no estudo atual detectou uma diversidade de sequências fúngicas mais rica do que a indicada nesses relatos anteriores.

Um pequeno número de estudos abordou a presença de fungos não cultivados em sedimentos marinhos da Antártica. López-Garcia *et al.* (2001) usaram informações filogenéticas de genes de RNA ribossômico diretamente amplificados de amostras de sedimentos para avaliar a biota residente (metodologia diferente da utilizada nesse trabalho), mas detectaram apenas um táxon fúngico não identificado na zona afótica entre 250 e 3.000 m de profundidade ao sul da Frente Polar Antártica. Recentemente, Ogaki *et al.* (2021a) avaliaram a diversidade fúngica em sedimentos do fundo do mar obtidos de diferentes profundidades no Oceano Antártico usando a região ITS2 do DNA ribossomal nuclear (a mesma metodologia de *metabarcoding* usada nesse trabalho). O presente estudo detectou uma menor diversidade de sequências fúngicas do que a relatada por Ogaki *et al.* (2021a), que detectaram 655.991 *reads* de DNA fúngico e 263 ASVs fúngicos a partir de amostras de sedimentos coletadas em profundidades diferentes (153, 250, 550 e 1.463 m), dominados por *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Mortierellomycota*, *Mucoromycota*, *Chytridiomycota* e *Rozellomycota*. Embora detectado apenas cerca de metade da diversidade de ASVs em comparação com os dados de Ogaki *et al.* (2021a), esses filos também foram reportados nos sedimentos analisados nesse trabalho, juntamente com a alta presença do grupo Straminopila (reino próximo a Fungi). Os táxons fúngicos dominantes encontrados por esses autores foram *Mortierella*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Phaeosphaeria* e *Pseudogymnoascus*, os quais também foram encontrados nos locais amostrados nesse estudo; entretanto, apenas o último gênero, em conjunto com *Thelebolus*, *Ciliophora* (fungos) e *Chaetoceros* (Straminopila) dominaram.

Essas diferentes composições de assembleias fúngicas podem estar relacionadas às

características geológicas e profundidades dos sedimentos amostrados. Apenas sete táxons foram compartilhados entre o estudo atual e o de Ogaki *et al.* (2021a), que incluíram táxons psicrófilos (*Pseudogymnoascus*), decompositores cosmopolitas (*Cladosporium* e *Penicillium*) e animais oportunistas (*Candida* e *Malassezia*). Cabe salientar, que um total de 38 ASVs fúngicos só puderam ser atribuídos a níveis taxonômicos mais altos (filo, classe, ordem, família) e podem representar táxons atualmente desconhecidos, táxons não incluídos nos bancos de dados UNITE ou GenBank ou representar novos táxons e/ou novos registros para a Antártica, assim como tem sido apontado em estudos semelhantes (OGAKI *et al.*, 2021a; BARONE *et al.*, 2022).

Como observado, os táxons *T. balaustiformis*, Fungi sp. 1, *Ciliophora* sp. 1, *Pseudogymnoascus* sp., *Agaricomycetes* sp. (Fungos) e o *Chaetoceros* sp. (Straminopila) dominaram a comunidade fúngica de DNA ambiental em termos de abundância relativa neste estudo. *Thelebolus balaustiformis* é uma espécie nova recentemente descrita isolada de tecidos da esponja *Dysidea fragilis* na costa atlântica da Irlanda (BOVIO *et al.*, 2018). Na Antártica, *T. balaustiformis* foi detectado recentemente em estudos de *metabarcoding* em solo na ilha de James Ross (GONÇALVES *et al.*, 2023) e por cultivo na neve sazonal (de MENEZES *et al.*, 2019b) e gelo glacial (de MENEZES *et al.*, 2020), sem qualquer avaliação do papel ecológico funcional. *Ciliophora* é um gênero de *Ascomycota* relatado como decompositor e recuperado de ambientes tropicais da América Central e com apenas duas espécies conhecidas atualmente, *C. cryptica* e *C. quercus* (<https://www.mycobank.org/>). Na Antártica, sequências atribuídas a *Ciliophora* foram detectadas com abundância relativa baixa e média em estudos de *metabarcoding* de sedimentos de lagos (de SOUZA *et al.*, 2022a; GONÇALVES *et al.*, 2022) e solos (GONÇALVES *et al.*, 2023) da Ilha James Ross, bem como em amostras de madeira de estruturas antropogênicas históricas na Ilha Deception (de SOUZA *et al.*, 2022b). Por sua vez, o gênero *Chaetoceros* (Straminopila) foi descrito por Ehrenberg em 1844 com base em material antártico contendo a espécie tipo *C. dichæta*, possui ocorrência global das zonas marinhas costeiras, oceano aberto até as áreas polares (GOGOREV & SAMSONOV, 2016; de LUCA *et al.*, 2019).

Todos os três sedimentos amostrados apresentaram atributos físico-químicos semelhantes. A geologia geral das áreas amostradas é amplamente semelhante, com predominância de rochas de composição andesítica a básica (SMELLIE *et al.*, 1984), embora de diferentes idades. No entanto, a distribuição e diversidade dos táxons fúngicos atribuídos diferiram consideravelmente entre os três locais amostrados. Walker Bay, em que o ASV Fungi sp. foi dominante na assembleia, está localizada na Ilha Livingston, situada entre John

Beach e Hannah Point (onde estão localizadas várias colônias de pinguins) e recebe água derretida da Geleira Verila. No entanto, nenhum dos parâmetros físico-químicos avaliados parece estar relacionado com a dominância de fungos não identificados na amostra de sedimento desse local.

Deception é uma ilha vulcânica cuja geologia é considerada relativamente jovem e foi sugerido que aspectos de seus ecossistemas ainda estão em um estágio inicial de desenvolvimento (ROSA *et al.*, 2020). No entanto, os dados relatados aqui de sedimentos marinhos obtidos da Ilha Deception contrastam com os relatados por Rosa *et al.* (2020) dos solos terrestres adjacentes em Whalers Bay; usando a mesma abordagem de *metabarcoding*, os autores detectaram alta dominância de fungos cosmopolitas nos solos, enquanto nos sedimentos marinhos a comunidade foi dominada por *T. balaustiformis* e *Pseudogymnoascus* sp. que são fungos adaptados ao frio relatados em muitas localizações antárticas (ROSA *et al.*, 2019a). Logicamente que as condições ambientais diferem consideravelmente entre os dois habitats, uma vez que os terrestres em Whalers Bay são localmente influenciados pelo aquecimento geotérmico, enquanto o ambiente marinho dessa região é fortemente caracterizado por sua condição fria das águas mais profundas, o que pode influenciar a diversidade das assembleias fúngicas residentes. No sedimento obtido em English Strait, *Ciliophora* sp. (Fungo) e *Chaetoceros* sp. 1 (Straminopila) dominaram as assembleias detectadas. Este foi o ponto mais profundo amostrado (404 m) e apresentou as maiores concentrações de silte, Fe e Mn, características que talvez tenham, de algum modo, contribuído com a dominância desses táxons neste sedimento.

6.1.1. Ecologia dos fungos não cultiváveis

Os papéis ecológicos desempenhados pelos fungos marinhos antárticos são geralmente pouco conhecidos. As inferências ecológicas sobre a comunidade fúngica aqui detectada são semelhantes às relatadas por Ogaki *et al.* (2021a) e incluem táxons reconhecidos como saprotróficos, mutualistas, simbioses e/ou parasitas. A maioria dos gêneros atribuídos foram fungos cosmopolitas/decompositores e, se forem metabolicamente ativos neste ambiente, provavelmente estarão envolvidos na degradação da limitada matéria orgânica disponível e, portanto, contribuirão para o ciclo local do carbono (ROSA *et al.*, 2019b). Entre os fungos dominantes, os gêneros psicrófilos *Thelebolus* e *Pseudogymnoascus* e o autotrófico *Chaetoceros* sp. (Straminopila) foram detectados. Em conjunto, com vários patógenos vegetais e animais reconhecidos com diferentes abundâncias, incluindo *Aspergillus*, *Candida*,

Cryptococcus, *Cutaneotrichosporon*, *Fusarium*, *Malassezia* e *Rhodotorula*. O mesmo perfil ecológico funcional detectado para fungos presentes em sedimentos marinhos aqui também foi relatado em estudos de amostragem de fungos no solo (ROSA *et al.*, 2020), ar (ROSA *et al.*, 2021), sedimento lacustre (de SOUZA *et al.*, 2022a) e rochas (de MENEZES *et al.*, 2021a) na Antártica. No entanto, como foi detectado DNA ambiental, mais estudos ecológicos funcionais são necessários para entender melhor o papel e a importância dos fungos nos sedimentos marinhos antárticos.

6.2. Fungos cultiváveis: isolamento e identificação

A diversidade microbiana em ecossistemas marinhos polares é praticamente desconhecida, com uma sub-representação das comunidades micológicas existentes, especialmente nas zonas oceânicas mais profundas da Antártica (ROSA *et al.*, 2019b). Investigações recentes tem reportado fungos como integrantes relevantes em sedimentos oceânicos de profundidade (RÉDOU *et al.*, 2015), contudo poucos estudos foram realizados voltados para essa perspectiva no Oceano Antártico (VARRELLA *et al.*, 2021), os quais por meio dependente cultivo revelaram uma diversidade considerada baixa em comparação com aquela encontrada nos ambientes terrestres antárticos (VAZ *et al.*, 2011; GONÇALVES *et al.*, 2013, 2015; LAICH *et al.*, 2013; WENTZEL *et al.*, 2018; OGAKI *et al.*, 2020a). Aqui neste estudo, apenas sete táxons de *Ascomycota* foram recuperados, reforçando a baixa diversidade cultivável desse grupo microbiano nos sedimentos da Península Antártica. Esse percentual de poucas espécies parece ser justificado pelas características intrínsecas desse substrato que é marcado pela oligotrofia (OGAKI *et al.*, 2020a); ademais, questões metodológicas também devem ser apreciadas devido as complicações relacionadas ao isolamento microbiano, pela dificuldade de simular condições abióticas das profundezas marinhas antárticas como a alta pressão, microaerofilia e anaerbiose (ROSA *et al.*, 2019b; OGAKI *et al.*, 2020a).

Em sedimentos de quatro profundidades distintas (153, 250, 550 e 1463 m) da Antártica, Ogaki *et al.* (2020a) registraram 31 isolados de filamentosos identificados em três gêneros: *Acremonium*, *Penicillium* e *Pseudogymnoascus*. Comparativamente, apesar das profundidades serem diferentes, nos sedimentos amostrados nesse trabalhos, detectou-se fungos com formas filamentosas e leveduriformes, agrupados em seis gêneros de *Ascomycota*: *Antarctomyces*, *Cladosporium*, *Meyerozyma*, *Penicillium*, *Pseudeurotium* e *Thelebolus*; combinação essa que ainda não havia sido registrado em único estudo com sedimentos oceânicos na Antártica. Wentzel *et al.* (2018) também evidenciaram fungos de ambas as

formas (filamentosos e leveduras) a partir desse substrato aquático, contudo isolados de *Ascomycota* e *Basidiomycota* foram encontrados em sedimentos mais superficiais coletados só até 24 m, com uma riqueza maior do que a encontrada aqui, apenas fungos de *Penicillium*, *Cladosporium* e *Meyerozyma* foram comuns com este estudo.

Os táxons fúngicos já relatados em sedimentos marinhos antárticos são principalmente membros de *Ascomycota* e *Basidiomycota* (OGAKI *et al.*, 2020a; VARRELLA *et al.*, 2021). Em geral, representantes de *Ascomycota* respondem pelo maior número de espécies recuperadas de sistemas aquáticos (HAGESTAD *et al.*, 2019; TORRES-GARCIA *et al.*, 2022), incluindo ambientes marinhos extremos (RAGHUKUMAR, 2017). Corroborando essas informações, somente fungos de *Ascomycota* foram detectados nos sedimentos analisados, especialmente os cosmopolitas *Penicillium*, *Cladosporium* e *Meyerozyma*, táxons terrestres que são considerados facultativamente adaptados ao ambiente marinho (JONES *et al.*, 2015).

Por ser um gênero ubíquo de distribuição mundial, espécies de *Penicillium* estão entre os fungos mais comuns encontrados no ecossistema antártico, incluindo habitats aquáticos marinhos como em macroalgas (GODINHO *et al.*, 2013; FURBINO *et al.*, 2014), água do mar (GONÇALVES *et al.*, 2017), invertebrados (HENRÍQUEZ *et al.*, 2014; GODINHO *et al.*, 2019) e sedimentos lacustres (OGAKI *et al.*, 2020c). Dentre os táxons aqui encontrados, *Penicillium* e *Cladosporium* foram identificados em sedimentos marinhos de todos os oceanos, conforme detalhado em outros estudos e revisado por Rosa *et al.* (2019b). Em sedimentos antárticos, espécies de *Penicillium* foram dominantes em fungos cultiváveis, *P. solitum* predominou no estudo de Gonçalves *et al.* (2013), enquanto a assembleia fúngica encontrada por Ogaki *et al.* (2020a) foi quase totalmente composta por espécies de *Penicillium*. Este gênero foi o mais abundante entre os filamentosos detectado nos três locais aqui amostrados, destacando-se *P. chrysogenum* e *P. cf. palitans*; este é o segundo relato da recuperação dessas duas espécies em sedimentos do oceano antártico, o primeiro foi feito por Ogaki *et al.* (2020a).

Penicillium chrysogenum teve densidade maior em dois dos locais amostrados, não sendo detectado no sedimento de Whalers Bay, Deception (151 m). No trabalho de Ogaki *et al.* (2020a), *P. chrysogenum* foi a espécie mais frequente isolada de sedimentos marinhos antárticos. Sabe-se que esse fungo é cosmopolita, ocorre em regiões temperadas e subtropicais (FURBINO *et al.*, 2014) e parece ser bem adaptado as pressões adversas da Antártica, uma vez que sua ocorrência já foi constatada nos seus distintos habitats, terrestres e marinhos (OGAKI *et al.*, 2020a). Elevadas densidades dessa espécie foram reportadas em águas

marinhas profundas ao longo da Península Antártica (GONÇALVES *et al.*, 2017) e *permafrost* (ZUCCONI *et al.*, 2012), com distribuição ampla no gelo glacial (de MENEZES *et al.*, 2020), rochas (ALVES *et al.*, 2019), solos (GODINHO *et al.*, 2015), associada a macroalga antártica *Ascoseira mirabilis* (FURBINO *et al.*, 2018) e como endofítico na angiosperma nativa *Colobanthus quitensis* (OSES-PEDRAZA *et al.*, 2020).

Penicillium palitans é um fungo ubíquo e mesofílico que primeiro foi isolado de alimentos (FRISVAD *et al.*, 2004) e, posteriormente, em habitats terrestres antárticos incluindo musgos e solos (AZMI & SEPPET, 1998; MCRAE *et al.*, 1999; de CARVALHO *et al.*, 2019), bem como no gelo subglacial do Ártico (SONJAK *et al.*, 2006). Neste trabalho, apesar de ter tido densidade relativamente inferior que a de *P. chrysogenum*, *P. cf. palitans* foi mais bem distribuído, sendo encontrado em todas as profundidades aqui amostradas. Embora relatada de poucas fontes marinhas antárticas, essa espécie tem se mostrado resistente as condições polares (de MENEZES *et al.*, 2020; KOZLOVSKY *et al.*, 2020). Recuperada a 550 m de profundidade, esse táxon fúngico foi o quarto mais frequente obtido de sedimentos marinhos por Ogaki *et al.* (2020a), mostrou-se ser dominante em *permafrost* (ZUCCONI *et al.*, 2012) e com alta densidade do gelo de Sikorsky, uma geleira da Península Antártica (de MENEZES *et al.*, 2020). Relatado também em solos e sedimentos de *permafrost* não perturbados datados de 30 mil anos (KOZLOVSKY *et al.*, 2020).

Geralmente, em ambientes extremos as comunidades fúngica parecem ser dominadas por filamentosos ascomicéticos (de MENEZES *et al.*, 2019b). Entretanto, em diferentes investigações, isolados de leveduras são apontadas como integrantes importantes dessas comunidades (VAZ *et al.*, 2011; RÉDOU *et al.*, 2015), sendo até sugeridas como as formas fúngicas marinhas mais dominantes (BASS *et al.*, 2007). Nos sedimentos antárticos aqui amostrados, o táxon fúngico mais abundante foi o da levedura ascomicética *Meyerozyma guilliermondii* (em termos anteriores *Candida/Pichia guilliermondii*), com alta densidade em todas as profundidades. Caracterizado como um fungo cosmopolita mesofílico-psicrotolerante (FURBINO *et al.*, 2014) capaz de ocupar diferentes substratos marinhos extremos como fontes hidrotermais e vulcões de profundidade. Sua ocorrência também foi verificada por outros autores em sedimentos marinhos; por exemplo, na coleção de culturas obtidas por RÉDOU *et al.* (2015) de sedimentos profundos na Bacia de Canterbury (Nova Zelândia), essa espécie foi a única levedura de *Ascomycota* obtida. Isolados desse fungo também foram encontrados em amostras antárticas de sedimentos do mar, porém em baixas densidades (VAZ *et al.*, 2011; DUARTE *et al.*, 2013; WENTZEL *et al.*, 2018).

Juntamente com *Pseudorotium cf. bakeri*, os isolados de *Antarctomyces* e *Thelebolus*

foram os menos abundantes achados entre os locais amostrados, aparentemente essa é a primeira menção desses táxons em sedimentos marinhos antárticos via cultivo. *Antarctomyces* é um gênero endêmico da Antártica com somente duas espécies, *A. psychrotrophicus* e *A. pellizariae* registradas em solo e neve, respectivamente (STCHIGEL *et al.*, 2001; de MENEZES *et al.*, 2017). Até o momento as espécies desse gênero não são conhecidas fora da Antártica, com recorrência em vários substratos nesse ambiente polar, tanto por cultivo associada com líquens (SANTIAGO *et al.*, 2015), *Deschampsia antarctica* (ROSA *et al.*, 2009; COELHO *et al.*, 2021), animais e macroalgas marinhas (LOQUE *et al.*, 2010; FURBINO *et al.*, 2014, 2018; GODINHO *et al.*, 2019), água, biofilmes e sedimentos de lagos (GONÇALVES *et al.*, 2012; de SOUZA *et al.*, 2022c; OGAKI *et al.*, 2020b,c), quanto por métodos moleculares de cultivo independente (GONÇALVES *et al.*, 2023).

Em habitats similares aos fungos anteriores, espécies de *Thelebolus* também foram relatadas na Antártica (de HOOG *et al.*, 2005), algumas delas são consideradas específicas para ambientes frios, abrangendo *Thelebolus balaustiformis* (ROSA *et al.*, 2019a), aqui isolada apenas no sedimento a 151 m em Whalers Bay (Deception). Corresponde a uma nova espécie que foi recentemente reconhecida e descrita por Bovio *et al.* (2018) associado a esponja *Dysidea fragilis* no oceano Atlântico. Na Antártica, apesar do papel ecológico ser desconhecido, observou-se o isolamento por cultivo dessa espécie a partir do molusco *Nacella concinna* (GODINHO *et al.*, 2019), fragmentos de gelo (de MENEZES *et al.*, 2020) e na rizosfera de *Colobanthus quitensis* (COELHO *et al.*, 2021).

Globalmente distribuídos, representantes de *Pseudeurotium* são encontrados como fungos pertencentes a diferentes comunidades na Antártica (GONÇALVES *et al.*, 2012; da SILVA *et al.*, 2020; OGAKI *et al.*, 2020b,c; SANTOS *et al.*, 2020), incluindo madeira e sedimento marinho (DUARTE *et al.*, 2018b). Contudo, a espécie *Pseudeurotium* cf. *bakeri* compartilhada entre os sedimentos de 52 m e 151 m, teve uma ocorrência mais limitada, mencionada principalmente de solos antárticos em estudos anteriores (ARENZ & BLANCHETTE, 2009, 2011; FERRARI *et al.*, 2011; KOCHKINA *et al.*, 2014). Mesmo com um papel ecológico indefinido na Antártica (da SILVA *et al.*, 2020), essa espécie tem sido relatada como endofítica (ADHIKARI *et al.*, 2016; QUIJADA *et al.*, 2022) e detectada em outras regiões, como na geleira Passu, na Cordilheira Karakoram no Paquistão (RAFIQ *et al.*, 2021), em macroalgas marinhas (FLEWELLING *et al.*, 2013; COOPER & WALKER, 2022) e sedimentos intertidais e de águas profundas (NAGANO *et al.*, 2017; HEO *et al.*, 2019).

Em ambientes extremos, *Cladosporium* é um táxon onipresente, por ser altamente tolerante às variadas pressões climáticas e geográficas impostas (MOHAMED & IBRAHIM,

2021), apresentando comportamento similar nos habitats terrestres e marinhos antárticos (GONÇALVES *et al.*, 2017). Nas condições aqui adotadas, *Cladosporium* sp. ocorreu como um singleto no sedimento de Walker Bay (51 m). Como dito anteriormente, representantes desse fungo foram encontrados em sedimentos oceânicos de todo o planeta (ZHANG *et al.*, 2014; RÉDOU *et al.*, 2015; MARCHESE *et al.*, 2021), incluindo no antártico (WENTZEL *et al.*, 2018; ROSA *et al.*, 2019b). Assim, a recuperação desse fungo contribui com os poucos estudos com sedimento marinho na Antártica, mesmo com a sua baixa densidade no isolamento.

Como foi observado, os táxons de *Meyerozyma guilliermondii*, *Penicillium chrysogenum* e *P. cf. palitans* foram os mais frequentes, o que pode indicar suas aptidões em sobreviver frente as condições hostis nos fundos oceânicos antárticos, com possível preferência em colonizar sedimentos profundos, conforme tem sido apontado na literatura para táxons recorrentes (MARCHESE *et al.*, 2021). Uma possível contribuição das correntes marinhas no transporte de estruturas fúngicas, pode justificar a alta prevalência dessas espécies nos sedimentos de todas as áreas amostradas (RÉDOU *et al.*, 2015; OGAKI *et al.*, 2020a). Neste estudo, foi constatado o primeiro relato por cultivo, em sedimentos marinhos da Antártica, de isolados fúngicos dos gêneros *Antarctomyces*, *Thelebolus* e *Pseudeurotium*, todos taxonomicamente inclusos na ordem *Thelebolales* (*Leotiomyces*). Desse modo, considerando a recente atenção dada para sedimentos como substratos para microrganismos, parece autêntico focar na compreensão da prevalência, tendência e importância dos fungos dessa ordem nas áreas mais profundas do oceano Antártico, uma vez que engloba importantes representantes endêmicos e adaptados aos estressores ambientais antárticos.

Analisando o conjunto dos táxons encontrados, observou-se que o sedimento amostrado na menor profundidade amostrada (52 m em Waker Bay, Ilha Livingston) foi o mais rico e diverso entre os locais analisados, registrando seis dos táxons cultiváveis obtidos; sendo o de 151 m intermediário e de 404 m o sedimento menos rico. Embora os sedimentos sejam de pontos distintos e a análise físico-química não tenha variado bruscamente, esse gradiente de diversidade decrescente nos sedimentos de 404, 151 até 52 m poderia apontar uma possível influência da profundidade na recuperação dos fungos, com um grupo mais diverso nos sedimentos menos profundos, fenômeno semelhante foi observado por Rédou *et al.* (2015), os quais sugeriram a disponibilidade da matéria orgânica como um importante fator influenciador desse processo, que ao diminuir com a profundidade parece exercer controle na diversidade fúngica presente. Contudo, isso precisa ser investigado com mais detalhes.

Fungos pertencentes a *Antarctomyces*, *Cladosporium*, *Pseudeurotium*, *Penicillium* e *Thelebolus* foram detectados em ambos os métodos aqui utilizados, isto é, por *metabarcoding* e cultivo. Por meio do primeiro viés, a espécie de *T. balaustiformis* foi o táxon mais abundante encontrado, principalmente no sedimento amostrado a 151 m em Whalers Bay (Ilha Deception), além de ter ocorrido no de 52 m (Ilha Livingston); entretanto, por cultivo, seu isolamento ocorreu apenas a 151 m com baixa abundância. Enquanto *Antarctomyces* e *Pseudeurotium* foram táxons intermediários em termos de abundância, sendo o primeiro registrado a 52 e 151 m e o segundo apenas a 52 m. Em cultivo, no entanto, a ocorrência foi inversa, *Antarctomyces* a 52 m e *Pseudeurotium* nas outras duas profundidades (o qual foi representado por *P. cf. bakeri*), ambos também com uma densidade baixa. Além desses, ASVs atribuídas a *Penicillium* spp. e *Cladosporium* sp. foram vistos como táxons de abundância menor em todos os locais amostrados. Todavia, as espécies cultiváveis de *Penicillium* aqui isoladas tiveram as maiores densidades entre os filamentosos também nos sedimentos dos três pontos. Já *Cladosporium* foi singleto unicamente a 52 m. Por meio do *metabarcoding*, ASVs reconhecidas em *Pseudogymnoascus* sp. dominaram entre os sedimentos, mas não foi recuperado por cultivo neste estudo, mesmo sendo um táxon bem difundido em abordagens dessa natureza na Antártica (ROSA *et al.*, 2019a).

Aqui, os táxons mais predominantes em cultura foram os de *M. guilliermondii* e os dois *Penicillium* (*P. chrysogenum* e *P. cf. palitans*) que particularmente não foram observados nas assinaturas moleculares do *metabarcoding*; neste método, outras espécies de *Penicillium* spp. foram atribuídas com abundâncias relativas menores dentro da comunidade encontrada. Esses resultados foram equivalentes ao reportado por Ogaki *et al.* (2020a, 2021a), em que um heterogêneo grupo de fungos foi relatado entre cultivo e *metabarcoding* das mesmas amostras de sedimentos marinhos submetidas simultaneamente a ambos os métodos. Por exemplo, ASVs atribuídas a *M. guilliermondii* foi encontrada no DNA ambiental com baixa frequência (Ogaki *et al.*, 2021a), porém os autores não reportaram esse táxon em cultura (Ogaki *et al.*, 2020a). Nesse contexto, a estimativa taxonômica de fungos em sedimentos por meio de ambas as técnicas (dependente e independente de cultivo) fornecem uma perspectiva diferente para a interpretação da recorrência dos táxons e podem ser usadas como fontes complementares de informação ponderando os dados que cada uma fornece, como sugerido por Singh *et al.* (2012) e Rédou *et al.* (2015).

Rédou *et al.* (2015) explicam que os resultados da leitura de técnicas moleculares dependem sobretudo dos iniciadores moleculares utilizados na análise que garantirão a precisão da identificação, juntamente com a amplitude do sequenciamento, do esforço

amostral e do processo adequado de extração do material genético, o que implicaria na não representação de alguns fungos cujos DNAs presentes na amostra não foram acessados. Além disso, a metodologia empregada no cultivo fúngico pode corresponder a um forte determinante que favorece mais alguns táxons do que outros (GAUTAM *et al.*, 2022). Aqui, a prevalência usando enriquecimento dos táxons citados pode indicar a contribuição desse método no resultado encontrado. Cabe salientar que a diversidade real dos táxons fúngicos pode estar sendo subestimada, considerando que uma fração pequena dos sedimentos é utilizada para análises na cultura ou *metabarcoding* (GAUTAM *et al.*, 2022).

Notavelmente, os sedimentos marinhos aqui explorados abrigaram táxons cultiváveis majoritariamente cosmopolitas-psicrotolerantes e um percentual menor de endêmicos, cabe pontuar que os fungos encontrados são categorizados como espécies marinhas facultativas, designadas como aquelas que tem origem terrestre reconhecida capazes de crescer e/ou esporular em habitats aquáticos (JONES *et al.*, 2015; ROSA *et al.*, 2019b). Grande parte das espécies documentadas de fontes marinhas apresenta homologia com espécies descritas de ambientes terrestres (RAGHUKUMAR, 2017), não sendo diferente no ecossistema Antártico (GONÇALVES *et al.*, 2013; OGAKI *et al.*, 2020a), cuja presença desses eucariotos nos sedimentos profundos do oceano austral pode indicar sua chegada pelo escoamento terrestre, influência das correntes aquáticas, aerotransporte por ventos e animais (RAGHUKUMAR, 2017; OGAKI *et al.*, 2020a).

Os sedimentos marinhos se formam por um conjunto de partículas inorgânicas e orgânicas se acumulam constantemente no fundo oceânico (KUMAR *et al.*, 2021). Os propágulos fúngicos podem se especializar para colonizar essa zona marinha e utilizar os nutrientes dispersos, sendo funcionalmente ativos como sapróbios, mas também estabelecendo papéis como parasitas, patógenos e simbioses (BALABANOVA *et al.*, 2018; NICOLETTI & ANDOLFI, 2018). Fenômeno similar pode ser proposto para as comunidades fúngicas nos gradientes mais profundos marinhos na Antártica, os táxons reportados neste estudo podem ter atribuições semelhantes caso sejam metabolicamente ativos (ROSA *et al.*, 2019b).

6.3. Detecção das substâncias produzidas pelos fungos cultiváveis

6.3.1. Triagem enzimática

Para facilitar a dispersão em habitats polares marinhos, os micro-organismos desenvolvem diferentes estratégias, e dentre elas um sistema enzimático eficiente é uma das

principais adaptações (ZUCCONI *et al.*, 2020). Na Antártica, os fungos lidam principalmente com a constante baixa temperatura, a qual tem forte interferência na atividade catalítica celular. Devido a isso, enzimas adaptadas são produzidas para manter o funcionamento celular e a adequada atividade metabólica nesse ambiente extremo (RAFIQ *et al.*, 2019). Um perfil bem variado de enzimas já foi reportado de linhagens fúngicas recuperadas na Antártica, incluindo seus substratos marinhos, a maioria do grupo das hidrolases, mas algumas oxirredutases também foram observadas (DUARTE *et al.*, 2018a). Por suas propriedades diferenciadas, em termos de estrutura e ação química, a busca dessas moléculas é atrativa em fungos com perfil de extremófilos (BRUNO *et al.*, 2019).

No presente trabalho, todas as exoenzimas detectadas já foram observadas em outros estudos de prospecção com fungos antárticos (TURKIEWICZ *et al.*, 2005; KRISHNAN *et al.*, 2011; DUARTE *et al.*, 2013; FURBINO *et al.*, 2018; WENTZEL *et al.*, 2018; MARTORELL *et al.*, 2019; OSES-PEDRAZA *et al.*, 2020). Os resultados aqui obtidos mostraram o alto desempenho na produção enzimática pelas espécies de *Penicillium*, assimilando polímeros de natureza proteica, polissacarídica e lipídica. A bioatividade para enzimas extracelulares foi reportada por membros desse gênero em variados substratos antárticos como em estrela do mar (DUARTE *et al.*, 2018b), macroalgas (FURBINO *et al.*, 2018), solos (MARTORELL *et al.*, 2019), plantas (OSES-PEDRAZA *et al.*, 2020) e também em sedimentos marinhos (GONÇALVES *et al.*, 2013). Fungos do gênero *Penicillium* desempenham um papel ecológico decisivo na biodegradação da matéria orgânica ambiental, justamente pela alta capacidade de produzir um amplo arsenal de exoenzimas (YADAV *et al.*, 2018). Desse modo, se viáveis, é provável que *P. chrysogenum* e *P. cf. palitans* exerçam função similar nos sedimentos oceânicos, atuando na catálise de compostos proteicos e açúcares, incluindo os de origem vegetal (sacarose, celulose e pectina) e algal (carragenina e ágar).

A secreção de proteases foi mais frequente entre os fungos isolados das amostras de sedimentos (92%). A alta produção dessa enzima foi constatada em muitos fungos recorrentes na Antártica, em gêneros como *Pseudogymnoascus*, *Thelebolus*, *Cadophora*, *Acremonium* e *Trichoderma* (KRISHNAN *et al.*, 2011; MARTORELL *et al.*, 2019; DUARTE *et al.*, 2018a) e em muitas leveduras como *Glaciozyma antarctica*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Leucosporidium creatinivorum*, *Metschnikowia australis* e *Vishniacozyma victoriae* (TURKIEWICZ *et al.*, 2003; LARIO *et al.*, 2015; MARTORELL *et al.*, 2017; de SOUZA *et al.*, 2022c; SILVA *et al.*, 2022). Aqui, os táxons de *Penicillium*, *Cladosporium*, *Antarctomyces* e *Meyerozyma* são acrescentados como produtores de protease a partir de sedimentos marinhos.

Invertase foi a segunda enzima mais comum entre os isolados desse estudo (85%). Até o momento, observou-se poucos relatos da produção dessa enzima entre fungos da Antártica, principalmente entre formas leveduriformes (DUARTE *et al.*, 2018a; BRUNO *et al.*, 2019). Uma das primeiras descrições de linhagens ativas para essa enzima foi feita a partir de *G. antarctica* isolada de águas subglaciais profundas antárticas (TURKIEWICZ *et al.*, 2005). Ademais, a maioria das leveduras reportadas de solos antárticos por Troncoso *et al.* (2016) apresentou atividade para invertase. Por outro lado, de Souza *et al.* (2022c) destacaram o melhor índice para essa enzima por *Holtermanniella wattica*, isolada em biofilme amostrado de um lago antártico. Singularmente, todas as *M. guilliermondii* obtidas dos sedimentos marinhos foram produtoras de invertases, incluindo isolados com os índices de atividade mais altos na triagem. Esse resultado sugere que essa levedura pode ser uma boa fonte para invertase extracelular.

Foi observada a habilidade de fungos antárticos em sintetizar enzimas atuantes sobre substratos poliméricos marinhos, a exemplo do ágar e carrageninas. No trabalho de Souza *et al.* (2022c), *Pseudogymnoascus verrucosus* exibiu o melhor desempenho na produção de agarase e carragenase, específicas para as moléculas citadas. Em macroalgas, Furbino *et al.* (2018) reportaram vários táxons fúngicos com atividade para essas mesmas enzimas, abrangendo *Beauveria*, *Cladosporium*, *Doratomyces* e principalmente *Penicillium*, incluindo *P. chrysogenum*. De forma equivalente, os isolados dos sedimentos marinhos também exibiram atividade carragenolíticas (51%) e agarolíticas (47%), predominantemente entre *Penicillium cf. palitans* e *P. chrysogenum*, juntamente com um isolado de *Pseudeurotium cf. bakeri*, essas mesmas três espécies também demonstraram alta habilidade em hidrolisar a carboximetilcelulose através de celulasas (54%).

Em outras iniciativas de triagem, a partir do isolamento de substratos variados, fungos antárticos também mostraram disposição em exibir atividade celulolítica (KRISHNAN *et al.*, 2011; LOPERENA *et al.*, 2012; VACA *et al.*, 2012; HERRERA *et al.*, 2016; de SOUZA *et al.*, 2022c; SILVA *et al.*, 2022), incluindo representantes compatíveis com os gêneros isolados neste estudo, nomeadamente *Cladosporium*, *Pseudeurotium* e *Penicillium* (DUARTE *et al.*, 2018a). Adicionalmente, as espécies de *Penicillium* aqui recuperadas foram significativas para pectinases extracelulares a 15 °C. De macroalgas antárticas, Poveda *et al.* (2018) verificaram a espécie *Penicillium polonicum* como produtora de pectinases na mesma temperatura que as espécies dos sedimentos aqui testados; no entanto, o destaque para a enzima foi para isolados de *Pseudogymnoascus* sp. A habilidade de hidrólise da pectina foi observada nos filamentosos *Arthrotrichum*, *Aureobasidium*, *Cladosporium* e *Trametes*

(DUARTE *et al.*, 2018a; BERTINI *et al.*, 2022), mas principalmente a partir de leveduras como *Leucosporidium scottii*, *Meyerozyma caribbica* e *Mrakia* sp. (VAZ *et al.*; 2011; MARTORELL *et al.*, 2017; de SOUZA *et al.*, 2022c).

Linhagens do gênero *Antarctomyces* foram evidenciados como produtoras enzimáticas em alguns habitats antártico. Em solo na Ilha Rei George, representantes do gênero positivaram para celulase (KRISHNAN *et al.*, 2011). Por sua vez, recuperada em amostra de biofilme do Lago Kroner, *Antarctomyces psychrotrophicus* foi a espécie com mais isolados capazes de produzir diferentes enzimas, incluindo protease, esterase, celulase e lipase (de SOUZA *et al.*, 2022c). Contrariamente, neste estudo, todos os isolados de *Antarctomyces* sp. expressaram apenas proteases. No caso de *Thelebolus* sp., Krishnan *et al.*, (2011) constataram um representante deste fungo com atividade proteolítica. Entretanto, os *T. balaustiformis* isolados dos sedimentos aqui analisados apenas foram ativos para lipase.

Os sedimentos marinhos antárticos se mostraram como fonte promissoras de fungos com atividade lipídica extracelular a partir da produção de lipases e esterases (DUARTE *et al.*, 2013; GONÇALVES *et al.*, 2013). Obtido desse substrato, *Leucosporidium scottii* L117 produziu lipase extracelular (DUARTE *et al.*, 2015). No estudo de Duarte *et al.* (2013), um isolado de *M. guilliermondii* foi ativo para essa enzima. Diferentemente, as leveduras dessa espécie aqui detectadas não exibiram a mesma atividade, apenas fungos dos gêneros *Penicillium* e *Cladosporium*. Sendo os isolados desses dois gêneros também ativos para esterases. Atividade para essa enzima foi observada em *P. solitum* (GONÇALVES *et al.*, 2013). Cabe ressaltar, que em triagens anteriores, amilases foram constatadas em cepas fúngicas na Antártica (GONÇALVES *et al.*, 2013; MARTORELL *et al.*, 2017, 2019; OSES-PEDRAZA *et al.*, 2020). Entretanto, nenhum dos isolados obtidos dos sedimentos marinhos manifestaram capacidade degradativa do amido nas condições adotadas.

Nas áreas marinhas polares, os fungos parecem corresponder a uma porção importante da microbiota presente. A biodisponibilidade de macromoléculas orgânicas nesse ambiente pode representar ativação da atividade metabólica e expressão das enzimas degradativas que liberam os nutrientes para a cadeia alimentar residente (VARRELLA *et al.*, 2021). No geral, há poucos estudos trazendo o perfil enzimático de fungos cultivados de sedimentos marinhos antárticos, a triagem aqui realizada aponta para uma possível contribuição dos táxons isolados na degradação de proteínas, lipídios e diferentes carboidratos (sacarose, celulose, pectina, ágar e carragenina) nesta camada profunda do Oceano Antártico. É interessante pontuar que o processo nutricional dos fungos depende da produção dessas moléculas catalíticas em seus substratos de crescimento, por serem heterotróficos por

absorção (EL-GENDI *et al.*, 2022). Aqueles dispersos em ambientes extremos como a Antártica produzem enzimas adaptadas a diferentes fatores de temperatura, pH e salinidade que lhes conferem características intrínsecas diferenciadas, tornando-as vantajosas para estudos de bioprospecção (DUARTE *et al.*, 2018a; VARRELLA *et al.*, 2021). Por decorrência disso, devido a compatibilidade e eficiência, enzimas hidrolíticas de extremófilos como proteases, invertases, celulasas, carragenases, agarases, pectinases e esterases, encontradas nos táxons aqui triados, são consideradas potencialmente relevantes, em reações que ocorrem em temperaturas mais baixas ou moderadas, para aplicações nas indústrias alimentícia, têxtil, cosmética, médica, agrícola e ambiental, já que podem agregar na qualidade, rendimento e maior economia energética e monetária nas reações as quais possam ser utilizadas (DUARTE *et al.*, 2018a; SILVA *et al.*, 2022).

Essas enzimas fúngicas podem ter efeitos simultâneos (BAEZA *et al.*, 2017; MARTORELL *et al.*, 2017; DUARTE *et al.*, 2018a; RAFIQ *et al.*, 2019) na indústria de (1) detergentes/sabões como aditivos para remoção de sujeiras (proteases, lipases, esterases e celulasas); (2) bebidas, para extração e clarificação de sucos de frutas e vinificação incrementando no aroma e sabor (pectinases e celulasas); (3) tecidos, para melhorar o acabamento e o processamento do algodão (pectinases e celulasas) e como (4) agentes gelificantes (agarases e carragenases), (5) fabricação de compostos lábeis (celulasas, esterases e lipases), além de aplicações na (6) biorremediação, para o tratamento de efluentes (lipases, esterases e pectinases) e na produção de (7) bioetanol a partir de óleos e resíduos vegetais (lipases e celulasas) (BAEZA *et al.*, 2017; MARTORELL *et al.*, 2017; DUARTE *et al.*, 2018a; RAFIQ *et al.*, 2019). Enquanto aplicações mais específicas podem ser feitas na produção de xaropes, mel e açúcar invertido através das invertases (MANOOCHEHRI *et al.*, 2020), maturação de queijos por proteases, aditivo de celulasas em rações para a favorecer a nutrição animal (DUARTE *et al.*, 2018a) e extração de oligossacarídeos diversos para uso nutricional através das agarases e carragenases (CHEONG *et al.*, 2018). Nesse contexto, é interessante avaliar em detalhes as enzimas produzidas pelos táxons fúngicos obtidos no presente estudo.

6.3.2. Atividade biossurfactante

Os ecossistemas polares têm sido explorados na busca por novas fontes microbianas produtoras de biossurfactantes, devido à grande versatilidade genética e metabólica que exibem para colonizar nesses ambientes (PERFUMO *et al.*, 2018). Perante tal intuito, a maior atenção foi dada principalmente aos procariotos, mas pesquisas direcionadas para fungos

ganharam um importante destaque nas últimas décadas (LUFT *et al.*, 2020). Na Antártica, as leveduras dominam as investigações para a produção de surfactantes, sendo os principais relatos de linhagens de *Candida*, juntamente com *Pseudozyma*, *Yarrowia* e *Rhodotorula* como produtoras eficientes de diversos tipos de glicolipídios (AMARAL *et al.*, 2010; JEZIERSKA *et al.*, 2017; PERFUMO *et al.*, 2018). Originalmente isolado de um lago antártico, a levedura *Moesziomyces antarcticus* (anteriormente conhecido como *Pseudozyma/Candida antarctica*) é considerada um micro-organismo modelo industrialmente aplicado para a produção do biosurfactante manosileritritol lipídico (MELs) (KITAMOTO *et al.*, 1993; KONISHI *et al.*, 2007; PERFUMO *et al.*, 2018).

Estudos mais recentes foram conduzidos averiguando o potencial de outros fungos para produzir substâncias surfactantes na Antártica. Recuperada em amostra de solo e utilizando o glicerol como fonte de carbono suplementado com extrato de levedura, Bueno *et al.* (2019) identificaram a levedura *Candida glabrosa* como boa produtora de biosurfactante. Por sua vez, um glicolípido foi produzido por *Naganishia adellienses* a partir de hidrolisado hemicelulósico de palha de cana-de-açúcar como substrato alternativo (CHAVES *et al.*, 2021). Outras leveduras também estão sendo investigadas, incluindo espécies de *M. guilliermondii* já apontadas como boas produtoras (SHARMA *et al.*, 2019). Por exemplo, advindas de fontes marinhas e terrestres da Antártica, CORREA *et al.*, (2020) observaram alto desempenho das espécies de *M. guilliermondii* L21, *C. glabrosa* L75, *Cryptococcus victoriae* L92 e *Leucosporidium scotti* L120 na produção dessas moléculas.

Entretanto, a partir dos sedimentos marinhos aqui amostrados, foi observado que nenhum isolado de *M. guilliermondii* (24) teve um desempenho emulsificante satisfatório. Como há poucas linhagens dessa levedura triadas nas mesmas condições empregadas, alguns pontos podem ser discutidos como justificativa para esse resultado encontrado, conforme apontado por outros autores para a triagem de biosurfactantes (CORREA *et al.*, 2020; SANCHES *et al.*, 2021). Para o bioensaio de produção dessas moléculas, vários critérios devem ser cuidadosamente considerados para uma leitura eficiente da atividade microbiana, sobretudo os parâmetros físico-químicos do cultivo. Sabe-se que a linhagem microbiana escolhida/avaliada, em conjunto com a fonte de carbono e nitrogênio utilizadas, o método de detecção e o hidrocarboneto emulsificante, são determinantes decisivos para verificar se há atividade para surfactante e o tipo que será produzido (CORREA *et al.*, 2020; da SILVA *et al.*, 2021; SANCHES *et al.*, 2021). Foi utilizado o óleo de girassol (fonte de C) mais o extrato de levedura (fonte de N) para o cultivo dos isolados de *M. guilliermondii*, os quais não se mostraram favoráveis para um bom efeito de emulsificação em querosene a 20 °C, pode ser

interessante avaliar essas leveduras em outras condições experimentais, levando em conta a sua abundância nos sedimentos marinhos avaliados.

A aplicação de fungos filamentosos como produtores de biossurfactantes é mais restrita quando comparada à de espécies leveduriformes e bacterianas (LUFT *et al.*, 2020). Apesar disso, ascomicetos como *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* e o basidiomiceto *Ustilago* são relatados como os gêneros mais estudados quanto a capacidade de expressar diferentes tipos de biossurfactantes (LUFT *et al.*, 2020; SANCHES *et al.*, 2021). Contudo, ainda há pouco foco em fungos extremófilos para a bioprospecção de surfactantes (da SILVA *et al.*, 2021). Até o momento não foram encontrados dados na literatura sobre a produção de biossurfactantes por linhagens de *Antarctomyces* spp., *Thelebolus* spp. e *Penicillium palitans* na Antártica, já que não há uma caracterização ecofisiológica e bioquímica detalhada dessas cepas recuperadas nesse ambiente (KRISHNAN *et al.*, 2011). Nas condições aqui utilizadas, sugere-se que os quatro isolados que exibiram IE₂₄ superior a 50%, a citar: 19606, 19608, 19617 e 19671 dos gêneros citados, podem representar bons agentes de emulsificação, cabendo investigar seus desempenhos em outras perspectivas de triagem e processos de otimização, bem como as possíveis razões de produzirem moléculas surfactantes nos substratos marinhos antárticos e o espectro de aplicação biotecnológica que podem ter, especialmente focalizado no isolado *Antarctomyces* sp. UFMG 19617 que apresentou a melhor atividade comparado ao surfactante comercial SDS usado como controle.

6.3.3. Atividade herbicida

Ambientes extremos, como os habitats marinhos de áreas polares, são marcados por flutuações na temperatura, pressão e osmotofia que interferem diretamente na sobrevivência microbiana (ROSA *et al.*, 2019b). Esses habitats resguardam uma singular diversidade de fungos capazes de exibir alta plasticidade genética e bioquímica para lidar com as adversidades impostas. E, por isso, são micro-organismos considerados fontes interessantes para gerar novas biomoléculas e produtos para fins biotecnológicos (SANTIAGO *et al.*, 2012; TIAN *et al.*, 2017), sendo o gênero *Penicillium* um dos mais representativos no campo das bioprospecções (DING *et al.*, 2016).

Geralmente bem adaptados a maioria dos ecossistemas, os *Penicillium* spp. constituem uma das principais fontes de metabólitos bioativos conhecidas (YADAV *et al.*, 2018). Na Antártica, espécies do gênero são geralmente mais bioativas do que outros grupos (DING *et al.*, 2016), uma vez que demonstraram serem hábeis em produzir muitos metabólitos funcionalmente relevantes, como rugulosina, skirina e penilactonas (BRUNATI *et*

al., 2009; WU *et al.*, 2012). Por meio da abordagem baseada no uso de extratos brutos obtidos em cultura por fermentação em estado sólido, representantes desse grupo fúngico foram reportados como produtores de moléculas com efeito citotóxico, antitumoral, antioxidante, antiprotozoário e antimicrobiano (contra bactérias, fungos patógenos e alguns vírus), registradas de substratos variados, a incluir plantas, macroalgas, esponjas, solos, gelo glacial, lagos (SANTIAGO *et al.*, 2012; GODINHO *et al.*, 2013, 2015; HENRÍQUEZ *et al.*, 2014; GOMES *et al.*, 2018; de MENEZES *et al.*, 2020; OGAKI *et al.*, 2020b,c) e também em sedimentos marinhos (PURÍĆ *et al.*, 2018; OGAKI *et al.*, 2020a).

Adicionalmente, pela abordagem citada mais acima, o potencial herbicida também foi enfatizado em fungos antárticos, abrangendo isolados de *Aspergillus*, *Cystobasidium*, *Cladosporium*, *Mrakia*, *Mortierella*, *Phenoliferia*, *Pseudogymnoascus* e *Pseudeurotium*, bem como várias espécies de *Penicillium* spp. (*P. allii-sativi*, *P. brevicompactum*, *P. chrysogenum*, *P. glabrum*, *P. solitum* e *P. tardochrysogenum*) (GODINHO *et al.*, 2015; GOMES *et al.*, 2018; de MENEZES *et al.*, 2020; OGAKI *et al.*, 2020b,c). Aqui, os fungos obtidos dos sedimentos marinhos foram avaliados quanto a atividade herbicida dos seus extratos. Nas condições propostas, todos os isolados da espécie taxonomicamente sugerida como *Penicillium* cf. *palitans* se sobressaíram no controle da germinação das sementes de *L. sativa* e *A. schoenoprasum*, maioria apresentou ação seletiva contra o segundo modelo, sugerindo um possível efeito herbicida. Com a mesma metodologia, incluindo as plantas-alvo, esse resultado foi consistente com o estudo de Ogaki *et al.* (2020a) e de Menezes *et al.* (2020), no qual essa espécie mostrou ter efeito herbicida significativo. Além disso, os autores apontaram esse fungo exibindo forte atividade tripanomicida e antiplasmodial.

É bem disseminada a aplicação de herbicidas químicos na agricultura, esses produtos são apontados como preocupantes à saúde humana e ambiental, muitos tem perdido sua eficácia de ação devido a resistência adquirida dos seus alvos vegetais; perante isso, a busca por alternativas mais seguras e compatíveis ecologicamente tem se mostrado necessária (de SOUZA BARROS *et al.*, 2021). Uma das vertentes são as moléculas naturais produzidas por fungos que podem ser usadas como bioherbicidas e, por consequência, reduzir o uso de químicos (TRIOLET *et al.*, 2020). Muito tem se apontado na literatura que fungos do gênero *Penicillium* isolados de habitats pouco estudados, como áreas polares marinhas, são capazes de sintetizar metabólitos conhecidos com estruturas variadas, bem como outros inéditos ativos fisiologicamente (KOZLOVSKII *et al.*, 2013). Sabe-se que esse grupo inclui muitas espécies com propriedades relevantes no campo agrícola, com especialistas na solubilização de fosfato, produção de fitohormônios, sideróforos e vários moduladores vegetais (RABHA & JHA,

2018; YADAV *et al.*, 2018).

Linhagens *Penicillium palitans* isoladas nos substratos antárticos não foram investigadas quimicamente em detalhes. Essa espécie parece ter função importante na biodeterioração de alimentos como carnes e queijos, sendo conhecido por sua habilidade de produzir metabólitos secundários como o ácido ciclopiazônico, ciclopenina, festuclavina, fumigaclavina, palitantina e viridicatina, utilizados para a quimiotaxonomia, alguns sendo considerados micotóxicos (FRISVAD & SAMSON, 2004; FRISVAD *et al.*, 2004; SANTINI *et al.*, 2014; KOZLOVSKY *et al.*, 2020; NAEIMI *et al.*, 2021). Assim, levando em conta que os extratos de *P. cf. palitans* obtidos dos sedimentos marinhos exibiram desempenho herbicida relevante, inclusive reforçando relatos anteriores dessa atividade para esse fungo (OGAKI *et al.*, 2020a; de MENEZES *et al.*, 2020), em conjunto com o conhecimento limitado da espécie na Antártica e dos seus metabólitos, é pertinente apoiar a caracterização química dos seus extratos, com vistas a entender como se dá o efeito fitotóxico na germinação de *L. sativa* e *A. schoenoprasum*, bem como de outros modelos vegetais e observar as possíveis aplicações agroquímicas das moléculas geradas por esse fungo.

7. CONCLUSÃO

Os resultados aqui obtidos revelaram a ocorrência de fungos em sedimentos marinhos de ilhas antárticas no Arquipélago Shetland do Sul, afiliados a um significativo grupo taxonômico detectados por meio das duas abordagens empregadas, *metabarcoding* do eDNA e o cultivo dependente. No primeiro caso, diferentes filos fúngicos foram acessados por meio das *reads* (ASVs) do DNA ambiental indicando os táxons presentes, os quais apresentaram índices variados de diversidade entre os locais amostrados, com perfis ecológicos de saprotroficos, patogênicos e simbióticos. Empregando o método de cultivo, uma baixa diversidade de táxons foi encontrada, apenas fungos ascomicéticos foram isolados, preservados e identificados, os quais representaram gêneros cosmopolitas adaptados ao clima polar e alguns endêmicos. Esses fungos cultiváveis recuperados demonstraram desempenho biossintético satisfatório na produção de oito exoenzimas hidrolíticas, moléculas biosurfactantes e de extratos com efeito herbicida, cujas atividades podem ter aproveitamento em muitas aplicações industriais e agrícolas. Assim, este estudo reforça a relevância taxonômica, ecológica e biotecnológica de fungos presentes em sedimentos profundos do ecossistema antártico. Além de evidenciar a necessidade de estudos futuros que visem caracterizar os fungos recorrentes nos substratos marinhos da Antártica para uma melhor compreensão dos seus aspectos biossintéticos, ecológicos e espectro de aplicação.

REFERÊNCIAS

- ABARENKOV, K.; *et al.* UNITE QIIME release for eukaryotes. Version 04.02.2020. **UNITE Community**, 2020. <https://doi.org/10.15156/BIO/786386>
- ABRAHAM, E. P.; *et al.* Cephalosporin N: a new type of penicillin. **Nature**, v. 171, n. 4347, 1953. <https://doi.org/10.1038/171343a0>
- ADHIKARI, M.; *et al.* A new record of *Pseudeurotium bakeri* from crop field soil in Korea. **Kor. J. Mycol.**, v. 44, n. 3, p. 145-149, 2016. <http://dx.doi.org/10.4489/KJM.2016.44.3.145>
- ALBERDI, M.; *et al.* Ecophysiology of Antarctic vascular plants. **Physiol. Plant.**, v. 115, p. 479-486, 2002. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2002.1150401.x>
- ALI, S. S.; *et al.* Screening and characterizing of xylanolytic and xylose-fermenting yeasts isolated from the wood-feeding termite, *Reticulitermes chinensis*. **PLoS One**, v. 12, ID e0181141, 2017. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181141>
- ALVES, I. M. S.; *et al.* The diversity, distribution, and pathogenic potential of cultivable fungi present in rocks from the South Shetlands archipelago, Maritime Antarctica. **Extremophiles**, v. 23, p. 327-336, 2019. <https://doi.org/10.1007/s00792-019-01086-8>
- AMARAL, P. F. F.; *et al.* Biosurfactants from yeasts: characteristics, production and application. In: SEN, R. (eds). **Biosurfactants. Advances in Experimental Medicine and Biology**. New York: Springer, 2010, v. 672, p. 236-249. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-5979-9_18
- ARENZ, B. E.; BLANCHETTE, R. A. Investigations of fungal diversity in wooden structures and soils at historic sites on the Antarctic Peninsula. **Can. J. Microbiol.**, v. 55, p. 46-56, 2009. <https://doi.org/10.1139/W08-120>
- ARENZ, B. E.; BLANCHETTE, R. A. Distribution and abundance of soil fungi in Antarctica at sites on the Peninsula, Ross Sea Region and McMurdo Dry Valleys. **Soil Biol. Biochem.**, v. 43, n. 2, p. 308-315, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.10.016>
- AZMI, O. R.; SEPPELT, R. D. The broad-scale distribution of microfungi in the Windmill Islands region, continental Antarctica. **Polar Biol.**, v. 19, p. 92-100, 1998. <https://doi.org/10.1007/s003000050219>
- BABICKI, S.; *et al.* Heatmapper: Web-enabled heat mapping for all. **Nucl. Acids Res.**, v. 44, p. 147-153, 2016. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw419>
- BAEZA, M.; *et al.* Cold-active enzymes from cold-adapted yeasts. In: SIBIRNY, A. (eds) **Biotechnology of Yeasts and Filamentous Fungi**. Cham: Springer, 2017, p. 297-324. https://doi.org/10.1007/978-3-319-58829-2_10
- BALABANOVA, L.; *et al.* Biotechnology Potential of Marine Fungi Degrading Plant and Algae Polymeric Substrates. **Front. Microbiol.**, v. 9, 2018. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01527>
- BAO, J.; *et al.* First description of milky disease in the Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* caused by the yeast *Metschnikowia bicuspidata*. **Aquaculture**, v. 532, ID 735984, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735984>
- BARDOU, P.; *et al.* jvenn: an interactive Venn diagram viewer. **BMC Bioinform.**, v. 15, 2014. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-15-293>

- BARONE, G.; *et al.* Local Environmental Conditions Promote High Turnover Diversity of Benthic Deep-Sea Fungi in the Ross Sea (Antarctica). **J. Fungi**, v. 8, 2022. <https://doi.org/10.3390/jof8010065>
- BASS, D.; *et al.* Yeast forms dominate fungal diversity in the deep oceans. **Proc. R. S. B. Biol. Sci.**, v. 274, n. 1629, p. 3069-3077, 2007. <https://doi.org/10.1098/rspb.2007.1067>
- BEILHARZ, V. C.; *et al.* *Passalora perplexa*, an important pleoanamorphic leaf blight pathogen of *Acacia crassicarpa* in Australia and Indonesia. **Stud. Mycol.**, v. 50, p. 471-479, 2004.
- BERTINI, L.; *et al.* Biodiversity and bioprospecting of fungal endophytes from the antarctic plant *Colobanthus quitensis*. **J. Fungi**, v. 8, n. 9, 2022. <https://doi.org/10.3390/jof8090979>
- BIEDERMANN, P. H.; *et al.* Abundance and dynamics of filamentous fungi in the complex ambrosia gardens of the primitively eusocial beetle *Xyleborinus saxesenii* Ratzeburg (Coleoptera: Curculionidae, Scolytinae). **FEMS Microbiol. Ecol.**, v. 83, n. 3, p. 711-723, 2013. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12026>
- BOCKHEIM, J. G. Soil-forming factors in Antarctica. *In*: BOCKHEIM, J. G. (eds). **The Soils of Antarctica**. Cham: Springer, 2015. p. 5-20. https://doi.org/10.1007/978-3-319-05497-1_2
- BOLYEN, E.; *et al.* Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. **Nat. Biotechnol.**, v. 37, p. 852-857, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0209-9>
- BONUGLI-SANTOS, R. C.; *et al.* Marine-derived fungi: diversity of enzymes and biotechnological applications. **Front. Microbiol.**, v. 6, 2015. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00269>
- BOKULICH, N. A.; *et al.* Optimizing taxonomic classification of marker-gene amplicon sequences with QIIME 2's q2-feature-classifier plugin. **Microbiome**, v. 6, n. 90, 2018. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0470-z>
- BOVIO, E.; *et al.* The culturable mycobiota associated with three Atlantic sponges, including two new species: *Thelebolus balaustiformis* and *T. spongiae*. **Fung. Syst. Evol.**, p. 141-167, 2018. <https://doi.org/10.3114/fuse.2018.01.07>
- BUSHNELL, B. BBMap: a fast, accurate, splice-aware aligner. **Lawrence Berkeley National Lab.** (LBNL), Berkeley, CA (United States), 2014. <https://sourceforge.net/projects/bbmap>
- BRASIL, M. E. Coleção explorando o ensino - Antártica. 2006.
- BRIDGE, P. D.; SPOONER, B. M. Non-lichenized Antarctic fungi: Transient visitors or members of a cryptic ecosystem?. **Fungal Ecol.**, v. 5, n. 4, p. 381-394, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2012.01.007>
- BRIZZIO, S.; *et al.* Extracellular enzymatic activities of basidiomycetous yeasts isolated from glacial and subglacial waters of northwest Patagonia (Argentina). **Can. J. Microbiol.**, v. 53, p. 519-525, 2007. <https://doi.org/10.1139/W07-010>
- BRUNATI, M.; *et al.* Diversity and pharmaceutical screening of fungi from benthic mats of Antarctic lakes. **Mar. Genomics**, v. 2, p. 43-50, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.margen.2009.04.002>
- BRUNO, S.; *et al.* Enzymes from marine polar regions and their biotechnological

- applications. **Mar. Drugs**, v. 17, n. 10, 2019. <https://doi.org/10.3390/md17100544>
- BUENO, J. L.; *et al.* Biosurfactant production by yeasts from different types of soil of the South Shetland Islands (Maritime Antarctica). **J. Appl. Microbiol.**, v. 126, n. 5, p. 1402-1413, 2019. <https://doi.org/10.1111/jam.14206>
- BUZZINI, P.; MARGESIN, R. Cold-adapted yeasts: A lesson from the cold and a challenge for the XXI century. *In*: BUZZINI, P.; MARGESIN, R. (eds). **Cold-adapted yeasts: biodiversity, adaptation strategies and biotechnological significance**. Berlin: Springer, 2014, p. 3-22. https://doi.org/10.1007/978-3-642-39681-6_1
- CALLAHAN, B. J.; *et al.* DADA2: high-resolution sample inference from Illumina amplicon data. **Nat. Methods**, v. 13, p. 581–583, 2016. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>
- CAMACHO, C.; *et al.* BLAST+: Architecture and applications. **BMC Bioinform.**, v. 10, p. 1–9, 2009. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-421>
- CARRASCO, M.; *et al.* Diversity and extracellular enzymatic activities of yeasts isolated from King George Island, the sub-Antarctic region. **BMC Microbiol.**, v. 12, ID 251, 2012. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-12-251>
- CASTELLANI, A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. **J. Trop. Med. Hyg.**, v. 42, p. 225-226, 1939.
- CERESA, C.; *et al.* Recent Advances in Biomedical, Therapeutic and Pharmaceutical Applications of Microbial Surfactants. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 4, 2021. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13040466>
- CHAVES, F. D. S.; *et al.* Biosurfactant production by Antarctic-derived yeasts in sugarcane straw hemicellulosic hydrolysate. **Biomass Conv. Bioref.**, p. 1-11, 2021. <https://doi.org/10.1007/s13399-021-01578-8>
- CHEONG, K. L.; *et al.* Oligosaccharides derived from red seaweed: Production, properties, and potential health and cosmetic applications. **Molecules**, v. 23, n. 10, ID 2451, 2018. <https://doi.org/10.3390/molecules23102451>
- CHAKRABORTY, A.; *et al.* Core mycobiome and their ecological relevance in the gut of five Ips bark beetles (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). **Front. Microbiol.**, v. 11, ID 568853, 2020. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.568853>
- COELHO, L. C.; *et al.* Diversity, distribution, and xerophilic tolerance of cultivable fungi associated with the Antarctic angiosperms. **Polar Biol.**, v. 44, p. 379-388, 2021. <https://doi.org/10.1007/s00300-021-02799-3>
- CONVEY, P. Antarctic terrestrial biodiversity in a changing world. **Polar Biol.**, v. 34, 2011. <https://doi.org/10.1007/s00300-011-1068-0>
- CONVEY, P.; *et al.* The spatial structure of Antarctic biodiversity. **Ecol. Monogr.**, v. 84, n. 2, p. 203-244, 2014. <https://doi.org/10.1890/12-2216.1>
- COOPER, D. G.; GOLDENBERG, B. G. Surface-active agents from two *Bacillus* species. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 53, p. 224–229, 1987. <https://doi.org/10.1128/aem.53.2.224-229.1987>
- COOPER, C.; WALKER, A. K. Endophytic Fungi from Marine Macroalgae in Nova Scotia. **Northeast. Nat.**, v. 29, n. 2, p. 295-310, 2022. <https://doi.org/10.1656/045.029.0212>
- CORINALDESI, C.; *et al.* Marine Microbial-Derived Molecules and Their Potential Use in

- Cosmeceutical and Cosmetic Products. **Mar. Drugs**, v. 15, n. 4, 2017. <https://doi.org/10.3390/md15040118>
- CORREA, H. T.; *et al.* L-asparaginase and biosurfactants produced by extremophile yeasts from Antarctic environments. **Ind. Biotechnol.**, v. 16, n. 2, p. 107-116, 2020. <https://doi.org/10.1089/ind.2019.0037>
- CUI, X.; *et al.* Diversity and function of the Antarctic krill microorganisms from *Euphausia superba*. **Sci. Rep.**, v. 6, 2016. <https://doi.org/10.1038/srep36496>
- de CARVALHO, C. R.; *et al.* Fungi associated with plants and lichens of Antarctica. In: ROSA, L. H. (eds). **Fungi of Antarctica: diversity, ecology and biotechnological applications**. Cham: Springer, 2019, p. 165-199. https://doi.org/10.1007/978-3-030-18367-7_8
- de HOOG, G. S.; *et al.* Evolution, taxonomy and ecology of the genus *Thelebolus* in Antarctica. **Stud. Mycol.**, v. 51, p. 33, 2005. <https://hdl.handle.net/11245/1.240832>
- de LUCA, D.; *et al.* Global distribution and diversity of *Chaetoceros* (Bacillariophyta, Mediophyceae): integration of classical and novel strategies. **PeerJ**, v. 7, p. e7410, 2019. <https://doi.org/10.7717/peerj.7410>
- de MENEZES, G. C. A.; *et al.* *Antarctomyces pellizariae* sp. nov., a new, endemic, blue, snow resident psychrophilic ascomycete fungus from Antarctica. **Extremophiles**, v. 21, 259–269, 2017. <https://doi.org/10.1007/s00792-016-0895-x>
- de MENEZES, G. C. A. **Taxonomia, diversidade, ecologia, caracterização de resistência a antifúngicos e bioprospecção de fungos presentes na neve e gelo glacial da Antártica**. 2019a. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Departamento de Microbiologia - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2019a. p. 42. Disponível: <https://repositorio.ufmg.br/handle/1843/30751>. Acesso em: 28 mar 2023.
- de MENEZES, G. C. A.; *et al.* Diversity, distribution, and ecology of fungi in the seasonal snow of Antarctica. **Microorganisms**, v. 7, 2019b. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7100445>
- de MENEZES, G. C. A.; *et al.* Fungi in glacial ice of Antarctica: diversity, distribution and bioprospecting of bioactive compounds. **Extremophiles**, v. 24, p. 367–376, 2020. <https://doi.org/10.1007/s00792-020-01161-5>
- de MENEZES, G. C. A.; *et al.* Fungal diversity present on rocks from a polar desert in continental Antarctica assessed using DNA metabarcoding. **Extremophiles**, v. 25, p. 193–202, 2021a. <https://doi.org/10.1007/s00792-021-01221-4>
- de MENEZES, G. C. A.; *et al.* Fungi in the Antarctic Cryosphere: Using DNA Metabarcoding to Reveal Fungal Diversity in Glacial Ice from the Antarctic Peninsula Region. **Microb. Ecol.**, 2021b. <https://doi.org/10.1007/s00248-021-01792-x>
- de PASCALE, D.; *et al.* The microbial diversity of Polar environments is a fertile ground for bioprospecting. **Mar. Genomics**, v. 8, p. 15–22, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.margen.2012.04.004>
- da SILVA, A. F.; *et al.* Fungal biosurfactants, from nature to biotechnological product: bioprospection, production and potential applications. **Bioprocess Biosyst. Eng.**, v. 44, n. 10, p. 2003-2034, 2021. <https://doi.org/10.1007/s00449-021-02597-5>
- da SILVA, T. H.; *et al.* Diversity, distribution, and ecology of viable fungi in permafrost and

- active layer of Maritime Antarctica. **Extremophiles**, v. 24, p. 565–576, 2020. <https://doi.org/10.1007/s00792-020-01176-y>
- de SOUZA BARROS, V. M.; *et al.* Herbicides of biological origin: A review. **J. Hort. Sci. Biotechnol.**, v. 96, n. 3, p. 288-296, 2021. <https://doi.org/10.1080/14620316.2020.1846465>
- de SOUZA, L. M. D.; *et al.* Assessment of fungal diversity present in lakes of Maritime Antarctica using DNA metabarcoding: a temporal microcosm experiment. **Extremophiles**, v. 25, p. 77–84, 2021. <https://doi.org/10.1007/s00792-020-01212-x>
- de SOUZA, L. M. D.; *et al.* Diversity, distribution and ecology of fungal communities present in Antarctic lake sediments uncovered by DNA metabarcoding. **Sci. Rep.**, v. 12, 2022a. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-12290-6>
- de SOUZA, L. M. D.; *et al.* Cryptic environmental DNA fungal diversity revealed by DNA metabarcoding in historic wooden structures at Whalers Bay, Deception Island, maritime Antarctic. **Brazil. J. Microbiol.**, 2022b. <https://doi.org/10.1007/s42770-022-00869-0>
- de SOUZA, L. M. D.; *et al.* Communities of culturable freshwater fungi present in Antarctic lakes and detection of their low-temperature-active enzymes. **Brazil. J. Microbiol.**, p. 1-11, 2022c. <https://doi.org/10.1007/s42770-022-00834-x>
- DIMITROVA, S.; *et al.* Production of metabolites with antioxidant and emulsifying properties by Antarctic strain *Sporobolomyces salmonicolor* AL 1. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 169, p. 301-311, 2013. <https://doi.org/10.1007/s12010-012-9983-2>
- DING, Z.; *et al.* Richness and bioactivity of culturable soil fungi from the Fildes Peninsula, Antarctica. **Extremophiles**, v. 20, n. 4, p. 425–435, 2016. <https://doi.org/10.1007/s00792-016-0833-y>
- DUARTE, A. W. F.; *et al.* Taxonomic assessment and enzymes production by yeasts isolated from marine and terrestrial Antarctic samples. **Extremophiles**, v. 17, n. 6, p. 1023-1035, 2013. <https://doi.org/10.1007/s00792-013-0584-y>
- DUARTE, A. W. F.; *et al.* Liquid–liquid extraction of lipase produced by psychrotrophic yeast *Leucosporidium scottii* L117 using aqueous two-phase systems. **Sep. Purif. Technol.**, v. 156, p. 215-225, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2015.10.001>
- DUARTE, A. W. F.; *et al.* Yeasts from macroalgae and lichens that inhabit the South Shetland Islands, Antarctica. **Environ. Microbiol. Rep.**, v. 8, n. 5, p. 874-885, 2016. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12452>
- DUARTE, A. W. F.; *et al.* Cold-adapted enzymes produced by fungi from terrestrial and marine Antarctic environments. **Cri. Rev. Biotechnol.**, v. 38, n. 4, p. 600-619, 2018a. <https://doi.org/10.1080/07388551.2017.1379468>
- DUARTE, A. W. F.; *et al.* Production of cold-adapted enzymes by filamentous fungi from King George Island, Antarctica. **Polar Biol.**, v. 41, p. 2511-2521, 2018b. <https://doi.org/10.1007/s00300-018-2387-1>
- EL-GENDI, H.; *et al.* A Comprehensive Insight into Fungal Enzymes: Structure, Classification, and Their Role in Mankind’s Challenges. **J. Fungi**, v. 8, 2022. <https://doi.org/10.3390/jof8010023>
- FERRARI, B. C.; *et al.* Recovering greater fungal diversity from pristine and diesel fuel contaminated sub-Antarctic soil through cultivation using both a high and a low nutrient

- media approach. **Front. Microbiol.**, v. 2, 2011. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00217>
- FLEWELLING, A. J.; *et al.* Isolation and bioassay screening of fungal endophytes from North Atlantic marine macroalgae. **Bot. Mar.**, v. 56, n. 3, p. 287-297, 2013. <https://doi.org/10.1515/bot-2012-0224>
- FRISVAD, J. C.; *et al.* Mycotoxins, drugs and other extrolites produced by species in *Penicillium* subgenus *Penicillium*. **Stud. Mycol.**, v. 49, p. 201-241, n. 201, 2004.
- FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A. Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*. A guide to identification of food and air-borne terverticillate *Penicillia* and their mycotoxins. **Stud. Mycol.**, v. 49, p. 1-174, 2004.
- FURBINO, L. E.; *et al.* Diversity patterns, ecology and biological activities of fungal communities associated with the endemic macroalgae across the Antarctic Peninsula. **Microb. Ecol.**, v. 67, p. 775-787, 2014. <https://doi.org/10.1007/s00248-014-0374-9>
- FURBINO, L. E.; *et al.* Isolation of fungi associated with macroalgae from maritime Antarctica and their production of agarolytic and carrageenolytic activities. **Polar Biol.**, v. 41, p. 527–535, 2018. <https://doi.org/10.1007/s00300-017-2213-1>
- GAO, W. L.; *et al.* New species of *Yamadazyma* from rotting wood in China. **MycoKeys**, v. 83, p. 69-84, 2021. <https://doi.org/10.3897/mycokeys.83.71156>
- GAUTAM, A. K.; *et al.* Current insight into traditional and modern methods in fungal diversity estimates. **J. Fungi**, v. 8, n. 3, 2022. <https://doi.org/10.3390/jof8030226>
- GLASS, N. L.; DONALDSON, G. C. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 61, n. 4, p. 1323–1330, 1995. <https://doi.org/10.1128/aem.61.4.1323-1330.1995>
- GODINHO, V. M.; *et al.* Diversity and bioprospecting of fungal communities associated with endemic and cold-adapted macroalgae in Antarctica. **ISME J.**, v. 7, n. 7, p. 1434-1451, 2013. <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.77>
- GODINHO, V. M.; *et al.* Diversity and bioprospection of fungal community present in oligotrophic soil of continental Antarctica. **Extremophiles**, v. 19, p. 585–596, 2015. <https://doi.org/10.1007/s00792-015-0741-6>
- GODINHO, V. M.; *et al.* Diversity and distribution of hidden cultivable fungi associated with marine animals of Antarctica. **Fungal Biol.**, v. 123, n. 7, p. 507-516, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2019.05.001>
- GOGOREV, R. M.; SAMSONOV, N. I. The genus *Chaetoceros* (*Bacillariophyta*) in Arctic and Antarctic. **Novosti Sist. Nizsh. Rast.**, v. 50, p. 56–111, 2016. <https://doi.org/10.31111/nsnr/2016.50.56>
- GOLZAR, H.; *et al.* *Neoscochyta* species cause leaf scorch on wheat in Australia. **Austral. Plant Dis. Notes**, v. 14, p. 1-5, 2019. <https://doi.org/10.1007/s13314-018-0332-3>
- GOMES, E. C. Q.; *et al.* Cultivable fungi present in Antarctic soils: taxonomy, phylogeny, diversity, and bioprospecting of antiparasitic and herbicidal metabolites. **Extremophiles**, v. 22, n. 3, p. 381-393, 2018. <https://doi.org/10.1007/s00792-018-1003-1>
- GONÇALVES, V. N.; *et al.* Diversity and distribution of fungal communities in lakes of Antarctica. **FEMS Microbiol. Ecol.**, v. 82, n. 2, p. 459-471, 2012.

<https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2012.01424.x>

- GONÇALVES, V. N.; *et al.* *Penicillium solitum*: a mesophilic psychrotolerant fungus present in marine sediments from Antarctica. **Polar Biol.**, v. 36, p. 1823-1831, 2013. <https://doi.org/10.1007/s00300-013-1403-8>
- GONÇALVES, V. N.; *et al.* Antibacterial, antifungal and antiprotozoal activities of fungal communities present in different substrates from Antarctica. **Polar Biol.**, v. 38, n. 8, p. 1143-1152, 2015. <https://doi.org/10.1007/s00300-015-1672-5>
- GONÇALVES V. N.; *et al.* Taxonomy, phylogeny and ecology of cultivable fungi present in seawater gradients across the Northern Antarctica Peninsula. **Extremophiles**, v. 21, n. 6, p. 1005-1015, 2017. <https://doi.org/10.1007/s00792-017-0959-6>
- GONÇALVES, V. N.; *et al.* Diversity and ecology of fungal assemblages present in lake sediments at Clearwater Mesa, James Ross Island, Antarctica, assessed using metabarcoding of environmental DNA. **Fungal Biol.**, v. 126, p. 640–647, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2022.08.002>
- GONÇALVES, V. N.; *et al.* Soil Fungal Diversity and Ecology Assessed Using DNA Metabarcoding along a Deglaciated Chronosequence at Clearwater Mesa, James Ross Island, Antarctic Peninsula. **Biology**, v. 12, n. 2, p. 275, 2023. <https://doi.org/10.3390/biology12020275>
- GONZAGA, L. L.; *et al.* Endophytic fungi from the genus *Colletotrichum* are abundant in the *Phaseolus vulgaris* and have high genetic diversity. **J. Appl. Microbiol.**, v. 118, p. 485-496, 2015. <https://doi.org/10.1111/jam.12696>
- GONZÁLEZ-DOMÍNGUEZ, E.; *et al.* Biology and epidemiology of *Venturia* species affecting fruit crops: a review. **Front. Plant Sci.**, v. 8, ID 1496, 2017. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01496>
- GRAMAJE, D.; *et al.* Comparative genomic analysis of *Dactylonectria torresensis* strains from grapevine, soil and weed highlights potential mechanisms in pathogenicity and endophytic lifestyle. **J. Fungi**, v. 6, n. 4, 2020. <https://doi.org/10.3390/jof6040255>
- HAGESTAD, C. O.; *et al.* Cultivable marine fungi from the Arctic Archipelago of Svalbard and their antibacterial activity. **Mycology**, v. 11, n. 3, p. 230-242, 2019. <https://doi.org/10.1080/21501203.2019.1708492>
- HAMMER, Ø.; *et al.* PAST-palaeontological statistics. **Palaeontol. Electron.**, v. 4, p. 1-9, 2001.
- HASSAN, N.; *et al.* Psychrophilic and psychrotrophic fungi: a comprehensive review. **Rev. Environ. Sci. Biotechnol.**, v. 15, n. 2, p. 147-172, 2016. <https://doi.org/10.1007/s11157-016-9395-9>
- HENRÍQUEZ, M.; *et al.* Diversity of cultivable fungi associated with Antarctic marine sponges and screening for their antimicrobial, antitumoral and antioxidant potential. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 30, p. 65-76, 2014. <https://doi.org/10.1007/s11274-013-1418-x>
- HEO, Y. M.; *et al.* Fungal diversity in intertidal mudflats and abandoned solar salterns as a source for biological resources. **Mar. Drugs**, v. 17, n. 11, 2019. <https://doi.org/10.3390/md17110601>
- HERRERA, L. M.; *et al.* Hydrolytic enzyme-producing microbes in the Antarctic oligochaete *Grania* sp. (Annelida). **Polar Biol.**, v. 40, p. 947-953, 2016.

<https://doi.org/10.1007/s00300-016-2012-0>

- HUISKES, A. H. L.; *et al.* Trends in Antarctic terrestrial and limnetic ecosystems: Antarctica as a global indicator. *In*: BERGSTROM, D. M.; CONVEY, P.; HUISKES, A. H. L. (eds.). **Trends in Antarctic terrestrial and limnetic ecosystems: Antarctica as a global indicator**. Dordrecht: Springer, 2006, p. 1-13. https://doi.org/10.1007/1-4020-5277-4_1
- HUSON, D. H.; *et al.* MEGAN community edition-interactive exploration and analysis of large-scale microbiome sequencing data. **PLoS Comput. Biol.**, v. 12, n. 6, p. e1004957, 2016. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1004957>
- JEZIERSKA, S.; *et al.* Yeast glycolipid biosurfactants. **FEBS Lett.**, v. 592, n. 8, p. 1312-1329, 2017. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12888>
- JONES, E. B. G.; *et al.* Classification of marine Ascomycota, Basidiomycota, Blastocladiomycota and Chytridiomycota. **Fungal Divers.**, v. 73, p. 1–72, 2015. <https://doi.org/10.1007/s13225-015-0339-4>
- JONES, E. B. G.; *et al.* An online resource for marine fungi. **Fungal Divers.**, v. 96, p. 347–433, 2019. <https://doi.org/10.1007/s13225-019-00426-5>
- KIRK, P. M.; *et al.* **Dictionary of the Fungi**. Wallingford: CABI, 10 ed., 640 p., 2008.
- KITAMOTO, D.; *et al.* Surface active properties and antimicrobial activities of mannosylerythritol lipids as biosurfactants produced by *Candida antarctica*. **J. Biotechnol.**, v. 29, p. 91-96, 1993. [https://doi.org/10.1016/0168-1656\(93\)90042-L](https://doi.org/10.1016/0168-1656(93)90042-L)
- KOCHKINA, G. A.; *et al.* Fungal diversity in the Antarctic active layer. **Microbiology**, v. 83, p. 94-101, 2014. <https://doi.org/10.1134/S002626171402012X>
- KONISHI, M.; *et al.* Production of different types of mannosylerythritol lipids as biosurfactants by the newly isolated yeast strains belonging to the genus *Pseudozyma*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 75, n. 3, p. 521–531, 2007. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-0853-8>
- KOZLOVSKII, A. G.; *et al.* Fungi of the genus *Penicillium* as producers of physiologically active compounds. **Appl. Biochem. Microbiol.**, v. 49, p. 1-10, 2013. <https://doi.org/10.1134/S0003683813010092>
- KOZLOVSKY, A. G.; *et al.* Secondary metabolites of the genus *Penicillium* from undisturbed and anthropogenically altered Antarctic habitats. **Folia Microbiol.**, v. 65, p. 95-102, 2020. <https://doi.org/10.1007/s12223-019-00708-0>
- KRISHNAN, A.; *et al.* Extracellular hydrolase enzyme production by soil fungi from King George Island, Antarctica. **Polar Biol.**, v. 34, p. 1535-1542, 2011. <https://doi.org/10.1007/s00300-011-1012-3>
- KUMAR, V.; *et al.* Ecology and Evolution of Marine Fungi With Their Adaptation to Climate Change. **Front. Microbiol.**, v. 12, 2021. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.719000>
- LACHANCE, M. A.; *et al.* *Kodamaea kakaduensis* and *Candida tolerans* two new ascomycetous yeasts species from Australian Hibiscus flowers. **Can. J. Microbiol.**, v. 45, p. 172-177, 1999. <https://doi.org/10.1139/w98-225>
- LACHANCE, M. A. *Metschnikowia*: half tetrads, a regicide and the fountain of youth. **Yeast**, v. 33, p.563-574, 2016. <https://doi.org/10.1002/yea.3208>

- LAICH, F.; *et al.* *Rhodotorula portillonensis* sp. nov., a basidiomycetous yeast isolated from Antarctic shallow-water marine sediment. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 63, p. 3884–3891, 2013. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.052753-0>
- LARIO, L. D.; *et al.* Production, purification, and characterization of an extracellular acid protease from the marine Antarctic yeast *Rhodotorula mucilaginosa* L7. **Fungal Biol.**, v. 119, n. 11, p. 1129-1136, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2015.08.012>
- LAY, C. Y.; *et al.* Canola root-associated microbiomes in the Canadian prairies. **Front. Microbiol.**, v. 9, 1188, 2018. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01188>
- LI, A. H.; *et al.* Diversity and phylogeny of basidiomycetous yeasts from plant leaves and soil: Proposal of two new orders, three new families, eight new genera and one hundred and seven new species. **Stud. Mycol.**, v. 96, p. 17-140, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2020.01.002>
- LIECKFELDT, E.; *et al.* Rapid identification and differentiation of yeasts by DNA and PCR fingerprinting. **J. Basic Microbiol.**, v. 33, n. 6, p. 413-425, 1993. <https://doi.org/10.1002/jobm.3620330609>
- LIEPINS, J.; *et al.* Glycolipid Biosurfactant Production from Waste Cooking Oil by Yeast: Review of Substrates, Producers and Products. **Fermentation**, v. 7, n. 3, 2021. <https://doi.org/10.3390/fermentation7030136>
- LIU, X. Z.; *et al.* Towards an integrated phylogenetic classification of the *Tremellomycete*. **Stud. Mycol.**, v. 81, p. 85-147, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2015.12.001>
- LOPERENA, L.; *et al.* Extracellular enzymes produced by microorganisms isolated from maritime Antarctica. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 28, p. 2249-2256, 2012. <https://doi.org/10.1007/s11274-012-1032-3>
- LÓPEZ-GARCIA, P.; *et al.* Unexpected diversity of small eukaryotes in deep-sea Antarctic plankton. **Nature**, v. 409, p. 603-607, 2001. <https://doi.org/10.1038/35054537>
- LOQUE, C. P.; *et al.* Fungal community associated with marine macroalgae from Antarctica. **Polar Biol.**, v. 33, p. 641-648, 2010. <https://doi.org/10.1007/s00300-009-0740-0>
- LUFT, L.; *et al.* An overview of fungal biopolymers: bioemulsifiers and biosurfactants compounds production. **Cri. Rev. Biotechnol.**, v. 40, n. 8, p. 1059-1080, 2020. <https://doi.org/10.1080/07388551.2020.1805405>
- MALKUS, A.; *et al.* RNA polymerase II gene (RPB2) encoding the second largest protein subunit in *Phaeosphaeria nodorum* and *P. avenaria*. **Mycol. Res.**, v. 110, n. 10, p. 1152-1164, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2006.07.015>
- MANOOCHEHRI, H.; *et al.* A review on invertase: Its potentials and applications. **Biocatal. Agric. Biotechnol.**, v. 25, ID 101599, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101599>
- MARCHESE, P.; *et al.* Fungi populate deep-sea coral gardens as well as marine sediments in the Irish Atlantic Ocean. **Environ. Microbiol.**, v. 23, n. 8, p. 4168-4184, 2021. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15560>
- MARTORELL, M. M.; *et al.* Bioprospection of cold-adapted yeasts with biotechnological potential from Antarctica. **J. B. Microbiol.**, v. 57, n. 6, p. 504-516, 2017. <https://doi.org/10.1002/jobm.201700021>
- MARTORELL, M. M.; *et al.* Biodiversity and enzymes bioprospection of Antarctic filamentous fungi. **Antarct. Sci.**, v. 31, p. 3-12, 2019.

<https://doi.org/10.1017/S0954102018000421>

- MASENYA, K.; *et al.* Pathogen infection influences a distinct microbial community composition in sorghum RILs. **Plant Soil**, v. 463, p. 555–572, 2021. <https://doi.org/10.1007/s11104-021-04875-3>
- MAYER, A. M.; *et al.* Marine pharmacology in 2009-2011: marine compounds with antibacterial antidiabetic antifungal anti-inflammatory antiprotozoal antituberculosis and antiviral activities affecting the immune and nervous systems and other miscellaneous mechanisms of action. **Mar. Drugs**, v. 11, n. 7, p. 2510-2573, 2013. <https://doi.org/10.3390/md11072510>
- MCRAE, C. F.; *et al.* *Penicillium* species from terrestrial habitats in the Windmill Islands, East Antarctica, including a new species, *Penicillium antarcticum*. **Polar Biol.**, v. 21, p. 97–111, 1999. <https://doi.org/10.1007/s003000050340>
- MCGORUM, B. C.; *et al.* Equine grass sickness (a multiple systems neuropathy) is associated with alterations in the gastrointestinal mycobiome. **Anim. Microbiome**, v. 3, 70, 2021. <https://doi.org/10.1186/s42523-021-00131-2>
- MENKIS, A.; *et al.* *Archaeorhizomyces borealis* sp. nov. and a sequence-based classification of related soil fungal species. **Fungal Biol.**, v. 118, p. 943-955, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2014.08.005>
- MOHAMED, G. A.; IBRAHIM, S. R. M. Untapped potential of marine-associated *Cladosporium* species: An overview on secondary metabolites, biotechnological relevance, and biological activities. **Mar. Drugs**, v. 19, n. 11, 2021. <https://doi.org/10.3390/md19110645>
- MOHAMMADI, S.; *et al.* The Cold-Active Endo- β -1,3(4)-Glucanase from a marine psychrophilic yeast, *Glaciozyma antarctica* P112: heterologous expression, biochemical characterisation, and molecular modeling. **Int. J. Appl. Biol. Pharm. Technol.**, v. 12, p. 279–300, 2021.
- NAEIMI, B.; *et al.* Phenotypic features and molecular study of airborne *Penicillium* species isolated in the northern part of the Persian Gulf, Bushehr, Iran. **Curr. Med. Mycol.**, v. 7, n. 2, p. 22-28, 2021. <https://doi.org/10.18502/cmm.7.2.7035>
- NAGANO, Y.; *et al.* Fungal diversity in deep-sea sediments – the presence of novel fungal groups. **Fungal Ecol.**, v. 3, p. 316-325, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2010.01.002>
- NAGANO, Y.; *et al.* Fungal diversity in deep-sea sediments associated with asphalt seeps at the Sao Paulo Plateau. **Deep-Sea. Res. II: Top. Stud. Oceanogr.**, v. 146, p. 59–67, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.dsr2.2017.05.012>
- NANDANWAR, S. K.; *et al.* Taking Advantage of Promiscuity of Cold-Active Enzymes. **Appl. Sci.**, v. 10, n. 22, 2020. <https://doi.org/10.3390/app10228128>
- NARANJO-ORTIZ, M. A.; GABALDÓN, T. Fungal evolution: diversity, taxonomy and phylogeny of the Fungi. **Biol. Rev.**, v. 94, p. 2101-2137, 2019. <https://doi.org/10.1111/brv.12550>
- NASA. NASA-USGS Landsat 8 Satellite Pinpoints Coldest Spots on Earth. p. 13-364, 2013. Disponível em: <https://www.nasa.gov/content/goddard/nasa-usgs-landsat-8-satellite-pinpoints-coldest-spots-on-earth>. Acesso em: 28 mar. 2023.

- NGUYEN, N. H.; *et al.* FUNGuild: An open annotation tool for parsing fungal community datasets by ecological guild. **Fungal Ecol.**, v. 20, p. 241–248, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2015.06.006>
- NICOLETTI, R.; ANDOLFI, A. The Marine-Derived Filamentous Fungi in Biotechnology. *In*: RAMPELOTTO, P.; TRINCONE, A. (eds). **Grand Challenges in Marine Biotechnology. Grand Challenges in Biology and Biotechnology**. Cham: Springer, 2018, p. 157-189. https://doi.org/10.1007/978-3-319-69075-9_4
- NOT, F.; *et al.* Diversity and ecology of eukaryotic marine phytoplankton. *In*: PIGANEAU, G. (eds). **Advances in Botanical Research**. 2012, v. 64, p. 1-53. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-391499-6.00001-3>
- NÚÑEZ-PONS, L.; *et al.* Marine Terpenoids from Polar Latitudes and Their Potential Applications in Biotechnology. **Mar. Drugs**, v. 18, n. 8, 2020. <https://doi.org/10.3390/md18080401>
- OGAKI, M. B.; *et al.* Cultivable fungi present in deep-sea sediments of Antarctica: taxonomy, diversity, and bioprospecting of bioactive compounds. **Extremophiles**, v. 24, p. 227–238, 2020a. <https://doi.org/10.1007/s00792-019-01148-x>
- OGAKI, M. B.; *et al.* Diversity and bioprospecting of cultivable fungal assemblages in sediments of lakes in the Antarctic Peninsula. **Fungal Biol.**, v. 124, n. 6, p. 601-611, 2020b. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2020.02.015>
- OGAKI, M. B.; *et al.* Diversity, ecology, and bioprospecting of culturable fungi in lakes impacted by anthropogenic activities in Maritime Antarctica. **Extremophiles**, v. 24, p. 637–655, 2020c. <https://doi.org/10.1007/s00792-020-01183-z>
- OGAKI, M. B.; *et al.* Fungi Present in Antarctic Deep-Sea Sediments Assessed Using DNA Metabarcoding. **Microb. Ecol.**, v. 82, p. 157–164, 2021a. <https://doi.org/10.1007/s00248-020-01658-8>
- OGAKI, M. B.; *et al.* Diversity of fungal DNA in lake sediments on Vega Island, north-east Antarctic Peninsula assessed using DNA metabarcoding. **Extremophiles**, v. 25, p. 257–265, 2021b. <https://doi.org/10.1007/s00792-021-01226-z>
- OKUTANI, K. Gliotoxin produced by a strain of *Aspergillus* isolated from marine mud. **Nippon Suisan Gakkaishi**, v. 43, p. 995–1000, 1977. <https://doi.org/10.2331/suisan.43.995>
- ONDOV, B. D.; *et al.* Interactive metagenomic visualization in a web browser. **BMC Bioinform.**, v. 12, p. 385, 2011. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-12-385>
- OSSES-PEDRAZA, R.; *et al.* Root endophytic *Penicillium* promotes growth of Antarctic vascular plants by enhancing nitrogen mineralization. **Extremophiles**, v. 24, p. 721-732, 2020. <https://doi.org/10.1007/s00792-020-01189-7>
- PARVIZPOUR, S.; *et al.* Psychrophilic enzymes: structural adaptation, pharmaceutical and industrial applications. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 105, p. 899–907, 2021. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-11074-0>
- PERFUMO, A.; *et al.* Going Green and Cold: Biosurfactants from Low-Temperature Environments to Biotechnology Applications. **Trends Biotechnol.**, v. 36, n. 3, p. 277–289, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2017.10.016>
- PETERSEN, L. E.; *et al.* Secondary Metabolites of Marine Microbes: From Natural Products Chemistry to Chemical Ecology. *In*: JUNGBLUT, S.; *et al.* (eds) **YOUMARES 9 - The**

- Oceans: Our Research, Our Future.** Cham: Springer, 2020, p. 159-180.
https://doi.org/10.1007/978-3-030-20389-4_8
- POVEDA, G.; *et al.* Cold-active pectinolytic activity produced by filamentous fungi associated with Antarctic marine sponges. **Biol. Res.**, v. 51, 2018.
<https://doi.org/10.1186/s40659-018-0177-4>
- PURIĆ, J.; *et al.* Activity of Antarctic fungi extracts against phytopathogenic bacteria. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 66, n. 6, p. 530-536, 2018. <https://doi.org/10.1111/lam.12875>
- QUIJADA, L.; *et al.* Apothecial Ancestry, Evolution, and Re-Evolution in *Thelebolales* (*Leotiomyces*, Fungi). **Biology**, v. 11, n. 4, 2022.
<https://doi.org/10.3390/biology11040583>
- RABHA, J.; JHA, D. K. Metabolic diversity of *Penicillium*. In: GUPTA, V. K.; RODRIGUEZ-COUTO, S. **New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering.** Elsevier, 2018, p. 217-234.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63501-3.00012-0>
- RAFIQ, M.; *et al.* Adaptation mechanisms and applications of psychrophilic fungi. In: TIQUIA-ARASHIRO, S.M.; GRUBE, M. (eds). **Fungi in extreme environments: ecological role and biotechnological significance.** Switzerland: Springer, 2019, p. 157-174. https://doi.org/10.1007/978-3-030-19030-9_9
- RAFIQ, M.; *et al.* Geochemistry and insights into the distribution of biotechnological important fungi from the third pole of the world, Karakoram Mountains Range. **Geomicrobiol. J.**, v. 38, n. 5, p. 395-403, 2021.
<https://doi.org/10.1080/01490451.2020.1863526>
- RAGHUKUMAR, C.; *et al.* A review on deep-sea fungi occurrence, diversity and adaptations. **Bota. Mar.**, v. 53, p. 479-492, 2010. <https://doi.org/10.1515/bot.2010.076>
- RAGHUKUMAR, S. Extreme Marine Environments. In: RAGHUKUMAR, S. (eds). **Fungi in Coastal and Oceanic Marine Ecosystems.** Cham: Springer, 2017, p. 219-263.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-54304-8_12
- RÉDOU, V.; *et al.* Species richness and adaptation of marine fungi from deep-subseafloor sediments. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 81, n. 10, p. 3571-3583, 2015.
<https://doi.org/10.1128/AEM.04064-14>
- RICHARDSON, R. T.; *et al.* Application of ITS2 metabarcoding to determine the provenance of pollen collected by honey bees in an agroecosystem. **Appl. Plant Sci.**, v. 3, 2015.
<https://doi.org/10.3732/apps.1400066>
- RIZZO, C.; LO GIUDICE, A. The Variety and Inscrutability of Polar Environments as a Resource of Biotechnologically Relevant Molecules. **Microorganisms**, v. 8, n. 9, 2020.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms8091422>
- ROSA, L. H.; *et al.* Endophytic fungi associated with the Antarctic grass *Deschampsia antarctica* Desv. (Poaceae). **Polar Biol.**, v. 32, p. 161-167, 2009.
<https://doi.org/10.1007/s00300-008-0515-z>
- ROSA, L. H.; *et al.* *Coniochaeta ligniaria*: antifungal activity of the cryptic endophytic fungus associated with autotrophic tissue cultures of the medicinal plant *Smallanthus sonchifolius* (Asteraceae). **Symbiosis**, v. 60, p. 133-142, 2013.
<https://doi.org/10.1007/s13199-013-0249-8>
- ROSA L. H.; *et al.* Fungi in Antarctica: Diversity, Ecology, Effects of Climate Change, and

- Bioprospection for Bioactive Compounds. *In*: ROSA, L. H. (eds) **Fungi of Antarctica: Diversity, Ecology and Biotechnological Applications**. Cham: Springer, 2019a, p. 1-17. https://doi.org/10.1007/978-3-030-18367-7_1
- ROSA, L. H.; *et al.* Sub Antarctic and Antarctic marine ecosystems: an unexplored ecosystem of fungal diversity. *In*: ROSA, L. H. (eds). **Fungi of Antarctica: Diversity, Ecology and Biotechnological Applications**. Cham: Springer, 2019b, p. 221-242. https://doi.org/10.1007/978-3-030-18367-7_10
- ROSA, L. H.; *et al.* DNA metabarcoding uncovers fungal diversity in soils of protected and non-protected areas on Deception Island, Antarctica. **Sci. Rep.**, v. 10, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-78934-7>
- ROSA, L. H.; *et al.* DNA metabarcoding to assess the diversity of airborne fungi present in air over Keller Peninsula, King George Island Antarctica. **Microb. Ecol.**, v. 82, p. 165–172, 2021. <https://doi.org/10.1007/s00248-020-01627-1>
- ROSA, L. H.; *et al.* Fungal diversity in a sediment core from climate change impacted Boeckella Lake, Hope Bay, north-eastern Antarctic Peninsula assessed using metabarcoding. **Extremophiles**, v. 26, p. 1–10, 2022. <https://doi.org/10.1007/s00792-022-01264-1>
- ROTH, F. J.; *et al.* Occurrence and distribution of fungi in a subtropical marine environment. **Canad. J. Bot.**, v. 42, p. 375-383, 1964. <https://doi.org/10.1139/b64-037>
- RUISE, S.; *et al.* Fungi in Antarctica. **Rev. Env. Sci. Biotechnol.**, v. 6, p. 127-141, 2007. <https://doi.org/10.1007/s11157-006-9107-y>
- SANCHES, M. A.; *et al.* Production of Biosurfactants by Ascomycetes. **Int. J. Microbiol.**, v. 2021, 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/6669263>
- SANTIAGO, I. F.; *et al.* Leishmanicidal and antitumoral activities of endophytic fungi associated with the Antarctic angiosperms *Deschampsia antarctica* Desv. and *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. **Extremophiles**, v. 16, p. 95–103, 2012. <https://doi.org/10.1007/s00792-011-0409-9>
- SANTIAGO, I. F.; *et al.* Lichensphere: a protected natural microhabitat of the non-lichenised fungal communities living in extreme environments of Antarctica. **Extremophiles**, v. 19, p. 1087-1097, 2015. <https://doi.org/10.1007/s00792-015-0781-y>
- SANTIAGO, M.; *et al.* Discovery, molecular mechanisms, and industrial applications of cold active enzymes. **Front. Microbiol.**, v. 7, p. 01-32, 2016. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01408>
- SANTINI, A.; *et al.* *Penicillium* strains isolated from Slovak grape berries taxonomy assessment by secondary metabolite profile. **Mycotoxin Res.**, v. 30, p. 213-220, 2014. <https://doi.org/10.1007/s12550-014-0205-3>
- SANTOS, J. A.; *et al.* Fungal community in antarctic soil along the retreating collins glacier (Fildes peninsula, King George Island). **Microorganisms**, v. 8, n. 8, p. 1145, 2020. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8081145>
- SENA, H. H.; *et al.* Production of Biosurfactants by Soil Fungi Isolated from the Amazon Forest. **Int. J. Microbiol.**, v. 2018, p. 1–8, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/5684261>
- SCHMIDT, S. K.; *et al.* A *Naganishia* in high places: functioning populations or dormant cells from the atmosphere?. **Mycology**, v. 8, p. 153-163, 2017. <https://doi.org/10.1080/21501203.2017.1344154>

- SHARMA, P.; *et al.* Process parameters for biosurfactant production using yeast *Meyerozyma guilliermondii* YK32. **Environ. Monit. Assess.**, v. 191, p. 1-13, 2019. <https://doi.org/10.1007/s10661-019-7665-z>
- SHIVAJI, S.; PRASAD, G. S. Antarctic yeasts: biodiversity and potential applications. *In*: KUNZE, G.; SATYANARAYANA, T. (eds). **Yeast biotechnology: diversity and applications**. [S.l.]: Springer, 2009, p. 3-18. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8292-4_1
- SILVA, T. R.; *et al.* Bacteria from Antarctic environments: diversity and detection of antimicrobial, antiproliferative, and antiparasitic activities. **Polar Biol.**, v. 41, p. 1505-1519, 2018. <https://doi.org/10.1007/s00300-018-2300-y>
- SILVA, M. K.; *et al.* Extracellular hydrolytic enzymes produced by yeasts from Antarctic lichens. **An. Acad. Bras. Ciênc.**, v. 94, 2022. <https://doi.org/10.1590/0001-376520220210540>
- SIMÕES, J. C. O ambiente Antártico: domínio de extremos. *In*: GOLDEMBERG, J. (org.). **Antártica e as mudanças globais: um desafio para a humanidade**. São Paulo: Blucher, v. 9, 2011, p. 15-27. ISBN: 9788521206354
- SINGH, P.; *et al.* Fungal diversity in deep-sea sediments revealed by culture-dependent and culture-independent approaches. **Fungal Ecol.**, v. 5, n. 5, p. 543-553, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2012.01.001>
- SMELLIE, J. L.; *et al.* The geology of the South Shetland Islands: VI. Stratigraphy, geochemistry and evolution. **Brit. Antarc. Sur.**, v. 87, p. 1–85, 1984. <https://nora.nerc.ac.uk/id/eprint/509198>
- SONJAK, S; *et al.* *Penicillium* mycobiota in Arctic subglacial ice. **Microb. Ecol.**, v. 52, p. 207-216, 2006. <https://doi.org/10.1007/s00248-006-9086-0>
- SOTO-ROBLES, L. V.; *et al.* An overview of genes from *Cyberlindnera americana*, a symbiont yeast isolated from the gut of the bark beetle *Dendroctonus rhizophagus* (*Curculionidae: Scolytinae*), involved in the detoxification process using genome and transcriptome data. **Front. Microbiol.**, v. 10, 2019. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02180>
- STCHIGEL, A. M.; *et al.* *Antarctomyces psychrotrophicus* gen. et sp. nov., a new ascomycete from Antarctica. **Mycol. Res.**, v. 105, p. 377–382, 2001. <https://doi.org/10.1017/S0953756201003379>
- SUN, X.; *et al.* Endophytic fungi VI. *Ciliophora quercus* sp. nov. from China. **Nova Hedwig.**, v. 85, n. 3, p. 403-406, 2007. <https://doi.org/10.1127/0029-5035/2007/0085-0403>
- TEDERSOO, L.; *et al.* High-level classification of the Fungi and a tool for evolutionary ecological analyses. **Fungal Divers.**, v. 90, p. 135–159, 2018. <https://doi.org/10.1007/s13225-018-0401-0>
- TEIXEIRA, P. C.; *et al.* **Manual de métodos de análise de solo**. 3. ed. rev. e ampl. – Brasília, DF : Embrapa, 2017, 574 p. ISBN 978-85-7035-771-7
- TIAN, Y.; *et al.* Secondary Metabolites from Polar Organisms. **Mar. Drugs**, v. 15, n. 3, 2017. <https://doi.org/10.3390/md15030028>
- TONELLI, M.; *et al.* O Oceano Austral e o clima. *In*: HARARI, Joseph (org.). **Noções de Oceanografia**. São Paulo: Instituto Oceanográfico, 2021. E-book. Cap. 14: p. 299-308.

- TORRES-GARCIA, D.; *et al.* New and interesting species of *Penicillium* (Eurotiomycetes, Aspergillaceae) in freshwater sediments from Spain. **MycoKeys**, v. 86, 2022. <https://doi.org/10.3897/mycokeys.86.73861>
- TRIOLET, M.; *et al.* Fungal-based bioherbicides for weed control: a myth or a reality?. **Weed Res.**, v. 60, p. 60-77, 2020. <https://doi.org/10.1111/wre.12389>
- TRIPATHI, L.; *et al.* Marine derived biosurfactants: a vast potential future resource. **Biotechnol. Lett.**, v. 40, p. 1441–1457, 2018a. <https://doi.org/10.1007/s10529-018-2602-8>
- TRIPATHI, V. C., *et al.* Natural products from polar organisms: Structural diversity, bioactivities and potential pharmaceutical applications. **Polar Sci.**, v. 18, p. 147-166, 2018b. <https://doi.org/10.1016/j.polar.2018.04.006>
- TRONCOSO, E.; *et al.* Identification and characterization of yeasts isolated from the South Shetland Islands and the Antarctic Peninsula. **Polar Biol.**, v. 40, n. 3, p. 649-658, 2016. <https://doi.org/10.1007/s00300-016-1988-9>
- TURKIEWICZ, M.; *et al.* A cold-adapted extracellular serine proteinase of the yeast *Leucosporidium antarcticum*. **Extremophiles**, v. 7, p. 435-442, 2003. <https://doi.org/10.1007/s00792-003-0340-9>
- TURKIEWICZ, M.; *et al.* Invertase and α -glucosidase production by the endemic Antarctic marine yeast *Leucosporidium antarcticum*. **Pol. Polar Res.**, v. 26, n. 2, p. 125-136, 2005.
- VACA, I.; *et al.* Cultivable psychrotolerant yeasts associated with Antarctic marine sponges. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 29, p. 183-189, 2012. <https://doi.org/10.1007/s11274-012-1159-2>
- VALDERRAMA, B.; *et al.* Cultivable yeast microbiota from the marine fish species *Genypterus chilensis* and *Serirolella violacea*. **J. Fungi**, v. 7, n. 7, ID 515, 2021. <https://doi.org/10.3390/jof7070515>
- VARRELLA, S.; *et al.* Diversity, Ecological Role and Biotechnological Potential of Antarctic Marine Fungi. **J. Fungi**, v. 7, 2021. <https://doi.org/10.3390/jof7050391>
- VAZ, A. B. M.; *et al.* The diversity extracellular enzymatic activities and photoprotective compounds of yeasts isolated in Antarctica. **Braz. J. Microbiol.**, v. 42, p. 937-947, 2011. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822011000300012>
- VIEIRA, G.; *et al.* Terrestrial and marine Antarctic fungi extracts active against *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 67, p. 64–71, 2018. <https://doi.org/10.1111/lam.12890>
- WANG, Y. N.; *et al.* Progress in Research on Bioactive Secondary Metabolites from Deep-Sea Derived Microorganisms. **Mar. Drugs**, v. 18, n. 12, 2020. <https://doi.org/10.3390/md18120614>
- WENTZEL, L. C. P.; *et al.* Fungi from Admiralty Bay (King George Island, Antarctica) soils and marine sediments. **Microb. Ecol.**, v. 77, p. 12–24, 2018. <https://doi.org/10.1007/s00248-018-1217-x>
- WHITE, T. J.; *et al.* Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M. A.; *et al.* (eds). **PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications**. New York: Academic Press, 1990, p. 315–322.
- WU, G.; *et al.* Penilactones A and B, two novel polyketides from Antarctic deep-sea derived

- fungus *Penicillium crustosum* PRB-2. **Tetrahedron**, v. 68, n. 47, p. 9745-9749, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2012.09.038>
- YAO, H.; *et al.* Phyllosphere epiphytic and endophytic fungal community and network structures differ in a tropical mangrove ecosystem. **Microbiome**, v. 7, 57, 2019. <https://doi.org/10.1186/s40168-019-0671-0>
- YARZÁBAL, L. A. Antarctic psychrophilic microorganisms and biotechnology: history, current trends, applications, and challenges. *In*: CASTRO-SOWINSKIS, S. (eds). **Microbial Models: from environmental to industrial sustainability**. Singapore: Springer, 2016, p. 83-118. https://doi.org/10.1007/978-981-10-2555-6_5
- YADAV, A. N.; *et al.* Biodiversity of the genus *Penicillium* in different habitats. *In*: **New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering**. Elsevier, 2018, p. 3-18. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63501-3.00001-6>
- YURKOV, A. M. Yeasts of the soil—obscure but precious. **Yeast**, v. 35, n. 5, p. 369-378, 2018. <https://doi.org/10.1002/yea.3310>
- ZHANG, C.; KIM, S. K. Research and Application of Marine Microbial Enzymes: Status and Prospects. **Mar. Drugs**, v. 8, p. 1920-1934, 2010. <https://doi.org/10.3390/md8061920>
- ZHANG, X. Y.; *et al.* Insights into deep-Sea sediment fungal communities from the East Indian Ocean using targeted environmental sequencing combined with traditional cultivation. **PLoS One**, v. 9, ID e109118, 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109118>
- ZHANG, T.; *et al.* Diversity and distribution of fungal communities in the marine sediments of Kongsfjorden, Svalbard (High Arctic). **Sci. Rep.**, v. 5, 2015. <https://doi.org/10.1038/srep14524>
- ZHANG, X.; *et al.* Novel Natural Products from Extremophilic Fungi. **Mar. Drugs**, v. 16, n. 6, 2018. <https://doi.org/10.3390/md16060194>
- ZHOU, Y.; *et al.* *Naganishia floricola* sp. nov., a novel basidiomycetous yeast species isolated from flowers of *Sorbaria sorbifolia*. **Inter. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 70, p. 4496-4501, 2020. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004304>
- ZUCCONI, L.; *et al.* Searching for eukaryotic life preserved in Antarctic permafrost. **Polar Biol.**, v. 35, p. 749-757, 2012. <https://doi.org/10.1007/s00300-011-1119-6>
- ZUCCONI, L.; *et al.* Extracellular enzymes and bioactive compounds from Antarctic terrestrial fungi for bioprospecting. **Int. J. Environ. Res. Public Health**, v. 17, n. 18, 2020. <https://doi.org/10.3390/ijerph17186459>

APÊNDICES

Tabela Suplementar 2. Abundâncias relativas das variantes de sequência *amplicon* fúngica (ASVs) detectadas nos três sedimentos marinhos amostrados nas Ilhas Shetland do Sul, Antártica marítima. Verde indica abundância relativa dominante (> 10%); azul intermediária (1 - 10 %) e laranja rara (< 1%).

Base de dados	Reino	Filo	<i>Amplicon sequence variant (ASV)</i>	Abundância Relativa (%)/local (profundidade)		
				Walker Bay, Livingston Island (52 m)	Whalers Bay, Deception Island (151 m)	English Strait (404 m)
UNITE	Fungo	<i>Ascomycota</i>	<i>Thelebolus balaustiformis</i>	0.602	67.301	0.000
			<i>Ciliophora</i> sp.	0.000	0.000	42.458
			<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	5.992	17.611	0.102
			<i>Aspergillaceae</i> sp.	0.783	6.671	0.795
			<i>Talaromyces rubicundus</i>	7.433	0.772	0.000
			<i>Dactylonectria anthuriicola</i>	5.460	0.000	0.000
			<i>Penicillium nalgiovense</i>	0.879	0.819	3.114
			<i>Antarctomyces</i> sp.	1.001	3.575	0.000
			<i>Pseudeurotium</i> sp.	2.683	0.000	0.000
			<i>Microdochium phragmitis</i>	0.110	0.007	2.067
			<i>Neosascochyta paspali</i>	0.784	0.621	0.191
			<i>Acremonium biseptum</i>	0.672	0.000	0.683
			<i>Candida parapsilosis</i>	0.554	0.205	0.535
			<i>Fusarium neocosmosporiellum</i>	1.191	0.000	0.055
			<i>Penicillium</i> sp.	0.485	0.265	0.201
			<i>Cladosporium</i> sp.	0.440	0.090	0.186
			<i>Trichoderma</i> sp.	0.149	0.000	0.499
<i>Tolypladium</i> sp.	0.264	0.000	0.277			

<i>Helotiales</i> sp. 1	0.247	0.000	0.161
<i>Trichoderma spirale</i>	0.000	0.000	0.399
<i>Chaetomiaceae</i> sp.	0.047	0.000	0.321
<i>Paraphaeosphaeria verruculosa</i>	0.000	0.278	0.000
<i>Fusicolla aquaeductuum</i>	0.000	0.000	0.272
<i>Chaetothyriales</i> sp. 1	0.000	0.000	0.265
<i>Gibberella tricincta</i>	0.000	0.000	0.249
<i>Chaetothyriales</i> sp. 2	0.000	0.000	0.233
<i>Metschnikowia bicuspidata</i>	0.208	0.000	0.017
<i>Ampelomyces quisqualis</i>	0.000	0.000	0.220
<i>Sordariomycetes</i> sp.	0.053	0.000	0.140
<i>Leohumicola</i> sp.	0.000	0.000	0.193
<i>Didymosphaeriaceae</i> sp.	0.192	0.000	0.000
<i>Xylonomycetes</i> sp.	0.000	0.000	0.180
<i>Lipomyces starkeyi</i>	0.000	0.000	0.177
<i>Clathrosphaerina zalewskii</i>	0.051	0.000	0.116
<i>Clavicipitaceae</i> sp.	0.000	0.000	0.145
<i>Sporormiaceae</i> sp.	0.000	0.000	0.144
<i>Gorgomyces honrubiae</i>	0.000	0.000	0.143
<i>Cyberlindnera</i> sp.	0.000	0.138	0.000
<i>Hypocreales</i> sp.	0.134	0.000	0.000
<i>Pseudeurotiaceae</i> sp.	0.000	0.000	0.123
<i>Magnaporthaceae</i> sp.	0.000	0.000	0.119
<i>Archaeorhizomyces</i> sp.	0.000	0.000	0.110
<i>Cyberlindnera jadinii</i>	0.000	0.000	0.106
<i>Peltaster fructicola</i>	0.000	0.000	0.096

<i>Teichospora</i> sp.	0.095	0.000	0.000
<i>Bionectriaceae</i> sp.	0.000	0.000	0.082
<i>Aspergillus thermomutatus</i>	0.019	0.000	0.062
<i>Didymellaceae</i> sp.	0.077	0.000	0.000
<i>Helotiales</i> sp. 2	0.067	0.000	0.000
<i>Pichia</i> sp. 1	0.000	0.000	0.064
<i>Coniochaeta</i> sp.	0.024	0.000	0.031
<i>Leptosphaeria sclerotioides</i>	0.050	0.000	0.000
<i>Venturia</i> sp.	0.050	0.000	0.000
<i>Saccharomyces</i> sp.	0.000	0.050	0.000
<i>Pleopassalora acaciae</i>	0.046	0.000	0.000
<i>Candida tropicalis</i>	0.043	0.000	0.000
<i>Acrodontium crateriforme</i>	0.041	0.000	0.000
<i>Penicillium melinii</i>	0.000	0.000	0.039
<i>Candida vespimorsuum</i>	0.037	0.000	0.000
<i>Yamadazyma ubonensis</i>	0.035	0.000	0.000
<i>Oidiodendron truncatum</i>	0.011	0.023	0.000
<i>Aspergillus</i> sp.	0.034	0.000	0.000
<i>Mycosphaerellaceae</i> sp.	0.033	0.000	0.000
<i>Candida homilentoma</i>	0.000	0.033	0.000
<i>Penicillium catenatum</i>	0.000	0.032	0.000
<i>Penicillium coffeae</i>	0.031	0.000	0.000
<i>Saccharomycetales</i> sp.	0.029	0.000	0.000
<i>Aureobasidium pullulans</i>	0.000	0.028	0.000
<i>Acaulium</i> sp.	0.023	0.000	0.000
<i>Penicillium decumbens</i>	0.018	0.000	0.000

	<i>Pseudocercospora</i> sp.	0.017	0.000	0.000
	<i>Nigrospora</i> sp.	0.016	0.000	0.000
	<i>Pichia</i> sp. 2	0.000	0.014	0.000
	<i>Chaetothyriales</i> sp. 3	0.010	0.000	0.000
	<i>Galactomyces reessii</i>	0.008	0.000	0.000
	<i>Toxicocladosporium</i> sp.	0.000	0.008	0.000
<i>Basidiomycota</i>	<i>Agaricomycetes</i> sp.	1.798	0.000	11.200
	<i>Glaciozyma</i> sp.	2.236	0.000	1.541
	<i>Malassezia restricta</i>	0.216	0.756	0.647
	<i>Clavaria</i> sp.	0.000	0.000	0.220
	<i>Papiliotrema pseudoalba</i>	0.000	0.000	0.206
	<i>Naganishia albida</i>	0.000	0.000	0.197
	<i>Microbotryomycetes</i> sp.	0.000	0.000	0.156
	<i>Agaricus</i> sp.	0.000	0.000	0.046
	<i>Hannaella</i> sp.	0.000	0.000	0.041
	<i>Clavulinaceae</i> sp.	0.023	0.000	0.000
	<i>Cryptococcus</i> sp.	0.023	0.000	0.000
	<i>Cryptococcus neoformans</i>	0.000	0.015	0.000
	<i>Cutaneotrichosporon debeurmannianum</i>	0.016	0.000	0.000
	<i>Disciseda</i> sp.	0.075	0.000	0.000
	<i>Exobasidium</i> sp.	0.000	0.007	0.000
	<i>Glaciozyma antarctica</i>	0.000	0.007	0.000
	<i>Glaciozyma litoralis</i>	0.263	0.000	0.000
	<i>Goffeauzyma gastrica</i>	0.040	0.000	0.000
	<i>Leucosporidiales</i> sp. 1	0.115	0.000	0.000
	<i>Leucosporidiales</i> sp. 2	0.016	0.000	0.000

		<i>Lycoperdaceae</i> sp.	0.044	0.000	0.000	
		<i>Malassezia arunalokei</i>	0.000	0.048	0.000	
		<i>Malassezia globosa</i>	0.000	0.193	0.000	
		<i>Malassezia japonica</i>	0.000	0.004	0.000	
		<i>Malassezia sympodialis</i>	0.034	0.075	0.000	
		<i>Malasseziaceae</i> sp.	0.053	0.000	0.000	
		<i>Mrakia psychrophila</i>	0.009	0.000	0.000	
		<i>Psathyrellaceae</i> sp.	0.053	0.000	0.000	
		<i>Punctularia atropurpurascens</i>	0.007	0.000	0.000	
		<i>Rhodotorula diobovata</i>	0.097	0.000	0.000	
		<i>Rhodotorula pacifica</i>	0.056	0.071	0.000	
		<i>Sterigmatomyces halophilus</i>	0.039	0.000	0.000	
		<i>Strophariaceae</i> sp.	0.029	0.000	0.000	
		<i>Tranzscheliella</i> sp.	0.033	0.000	0.000	
	<i>Mortierellomycota</i>	<i>Mortierella</i> sp.	0.000	0.000	1.310	
		<i>Mortierella turficola</i>	0.451	0.000	0.833	
		<i>Mortierella minutissima</i>	0.021	0.000	0.495	
		<i>Mortierella humilis</i>	0.000	0.000	0.393	
		<i>Mortierella gamsii</i>	0.073	0.000	0.000	
	<i>Chytridiomycota</i>	<i>Betamyces</i> sp.	0.000	0.000	0.171	
	<i>Glomeromycota</i>	<i>Gigasporales</i> sp.	0.163	0.000	0.000	
	<i>Monoblepharomycota</i>	<i>Monoblepharidales</i> sp.	0.090	0.000	0.000	
	<i>Mucoromycota</i>	<i>Pirella circinans</i>	0.014	0.000	0.000	
	<i>Rozellomycota</i>	<i>Rozellomycota</i> sp.	0.067	0.000	0.000	
	Stramenopila	<i>Ochrophyta</i>	<i>Chaetoceros</i> sp. 1	0.206	0.012	19.031
GENBANK	Fungi	<i>Ascomycota</i>	<i>Capnodiales</i> sp.	0.051	0.000	0.000

		<i>Verrucariaceae</i> sp.	0.041	0.000	0.000
	<i>Basidiomycota</i>	<i>Basidiomycota</i> sp.	0.135	0.000	0.000
	<i>Chytridiomycota</i>	<i>Spizellomyces</i> sp.	0.014	0.000	0.000
	Unidentified	Fungi sp. 1	55.489	0.164	6.339
		Fungi sp. 2	6.406	0.106	1.555
		Fungi sp. 3	0.069	0.000	0.000
Stramenopila	<i>Oomycota</i>	<i>Oomycota</i> sp.	0.034	0.000	0.000
	<i>Bacillariophyta</i>	<i>Porosira</i> sp.	0.143	0.000	0.193
		<i>Chaetoceros</i> sp. 2	0.003	0.000	0.057
	<i>Bigyra</i>	<i>Bigyra</i> sp.	0.004	0.000	0.000

Tabela Suplementar 3. Perfis ecológicos obtidos do banco de dados FUNGuild e citações específicas em nível de gênero dos fungos detectados em amostras de sedimentos marinhos obtidas de Walker Bay (a 52 m de profundidade), Whalers Bay (151 m de profundidade) e English Strait entre Robert e Greenwich (404 m de profundidade).

Gênero	Walker Bay (52 m)	Whaler Bay (151 m)	English Strait (404 m)	Modo Trófico	FUNGuild*
<i>Acaulium</i>	0.023	0.000	0.000	Saprotrófico	Saprotrófico*
<i>Acremonium</i>	0.672	0.000	0.683	Patotrófico-Saprotrófico-Simbiotrófico	Patógeno animal/vegetal-Saprotrófico(madeira)-Endofítico
<i>Acrodonium</i>	0.041	0.000	0.000	Patotrófico	Patógeno vegetal*
<i>Agaricus</i>	0.000	0.000	0.046	Saprotrófico	Saprotrófico (KIRK <i>et al.</i> , 2008)
<i>Ampelomyces</i>	0.000	0.000	0.220	Saprotrófico-Simbiótico	Saprotrófico indefinido-Endofítico*
<i>Antarctomyces</i>	1.001	3.575	0.000	Saprotrófico	Saprotrófico indefinido*
<i>Archaeorhizomyces</i>	0.000	0.000	0.110	Saprotrófico	Saprotrófico (solo) (MENKIS <i>et al.</i> , 2014)
<i>Aspergillus</i>	0.026	0.000	0.031	Patotrófico-Saprotrófico	Patógeno animal-Saprotrófico indefinido*
<i>Aureobasidium</i>	0.000	0.028	0.000	Patotrófico-Saprotrófico-Simbiotrófico	Patógeno animal/vegetal-Saprotrófico-Endofítico/Epifítico*
<i>Betamyces</i>	0.000	0.000	0.171	Patotrófico-Saprotrófico	Patógeno vegetal*
<i>Candida</i>	0.158	0.059	0.133	Patotrófico-Saprotrófico-Simbiotrófico	Patógeno animal-Saprotrófico (solo)-Endosimbionte/Epifítico*
<i>Chaetoceros</i>	0.206	0.012	19.031	Autotrófico	Fotosintético-Fitoplâncton (NOT <i>et al.</i> , 2012)
<i>Ciliophora</i>	0.000	0.000	42.458	Simbiotrófico	Endofítico (SUN & GUO, 2007)
<i>Cladosporium</i>	0.440	0.090	0.186	Simbiotrófico	Endofítico*
<i>Clathrophaerina</i>	0.051	0.000	0.116	Saprotrófico	Saprotrófico indefinido*
<i>Clavaria</i>	0.000	0.000	0.220	Saprotrófico	Saprotrófico indefinido*
<i>Coniochaeta</i>	0.024	0.000	0.031	Patotrófico-Saprotrófico-Simbiotrófico	Patógeno animal/vegetal-Saprotrófico indefinido-Epifítico*
<i>Cryptococcus</i>	0.011	0.007	0.000	Patotrófico-Saprotrófico-Simbiotrófico	Patógeno animal-Saprotrófico-Endofítico/Epifítico*
<i>Cutaneotrichosporon</i>	0.016	0.000	0.000	Patotrófico-Saprotrófico	Patógeno animal* - Saprotrófico indefinido (LI <i>et al.</i> , 2020)
<i>Cyberlindnera</i>	0.000	0.069	0.053	Simbiotrófico	Simbionte (insetos) (SOTO-ROBES <i>et al.</i> , 2019)
<i>Dactylonectria</i>	5.460	0.000	0.000	Patotrófico-Saprotrófico	Patógeno vegetal-Saprotrófico (solo) (GRAMAJE <i>et al.</i> , 2020)
<i>Disciseda</i>	0.075	0.000	0.000	Saprotrófico	Saprotrófico (solo)*

<i>Exobasidium</i>	0.000	0.007	0.000	Patotrófico	Patógeno vegetal*
<i>Fusarium</i>	1.191	0.000	0.055	Patotrófico-Saprotrófico-Simbiotrófico	Patógeno animal/vegetal-Saprotrófico (solo,madeira)-Endofítico*
<i>Fusicolla</i>	0.000	0.000	0.272	Patotrófico-Simbiotrófico	Patógeno vegetal-Simbionte (insetos) (BIEDERMANN <i>et al.</i> , 2013; LAY <i>et al.</i> , 2018)
<i>Galactomyces</i>	0.008	0.000	0.000	Patotrófico	Patógeno vegetal*
<i>Gibberella</i>	0.000	0.000	0.249	Patotrófico	Patógeno vegetal*
<i>Glaciozyma</i>	0.833	0.002	0.513	Saprotrófico	Saprotrófico indefinido (MOHAMMADI <i>et al.</i> , 2021)
<i>Goffeauzyma</i>	0.040	0.000	0.000	Saprotrófico	Solo-rochas-água ácida (LIU <i>et al.</i> , 2015)
<i>Gorgomyces</i>	0.000	0.000	0.143	Patotrófico	Nematófago (KIRK <i>et al.</i> , 2008)
<i>Hannaella</i>	0.000	0.000	0.041	Simbiotrófico	Epífita-Endofítica (GONZAGA <i>et al.</i> , 2015; MASENYA <i>et al.</i> , 2021)
<i>Leohumicola</i>	0.000	0.000	0.193	Saprotrófico	Saprotrófico indefinido*
<i>Leptosphaeria</i>	0.050	0.000	0.000	Patotrófico	Patógeno vegetal*
<i>Lipomyces</i>	0.000	0.000	0.177	Saprotrófico	Saprotrófico (solo, excremento de inseto) (YURKOV, 2018); NARANJO-ORTIZ & GABALDÓN, 2019)
<i>Malassezia</i>	0.050	0.215	0.129	Patotrófico-Saprotrófico	Patógeno animal-Saprotrófico indefinido*
<i>Metschnikowia</i>	0.208	0.000	0.017	Patotrófico-Simbiotrófico	Patógeno animal/vegetal-Endosimbionte (LACHANCE, 2016; BAO <i>et al.</i> , 2021)
<i>Microdochium</i>	0.110	0.007	2.067	Patotrófico-Simbiotrófico	Patógeno vegetal-Endofítico*
<i>Mortierella</i>	0.109	0.000	0.606	Saprotrófico-Simbiotrófico	Saprotrófico indefinido-Endofítico*
<i>Mrakia</i>	0.009	0.000	0.000	Saprotrófico	Saprotrófico indefinido (solo)*
<i>Naganishia</i>	0.000	0.000	0.197	Saprotrófico	Saprotrófico (solo-flores) (SCHMIDT <i>et al.</i> , 2017; ZHOU <i>et al.</i> , 2020)
<i>Neoscochyta</i>	0.784	0.621	0.191	Patotrófico-Saprotrófico	Patógeno animal/vegetal (GOLZAR <i>et al.</i> , 2019; MCGORUM <i>et al.</i> , 2021)
<i>Nigrospora</i>	0.016	0.000	0.000	Saprotrófico	Saprotrófico indefinido*
<i>Oidiodendron</i>	0.011	0.023	0.000	Patotrófico-Saprotrófico	Micorriza ericóide*
<i>Papiliotrema</i>	0.000	0.000	0.206	Patotrófico	Patógeno vegetal (MASENYA <i>et al.</i> , 2021)
<i>Paraphaeosphaeria</i>	0.000	0.278	0.000	Saprotrófico	Saprotrófico indefinido*
<i>Peltaster</i>	0.000	0.000	0.096	Patotrófico	Patógeno vegetal*
<i>Penicillium</i>	0.235	0.186	0.559	Saprotrófico	Saprotrófico (madeira)*
<i>Pichia</i>	0.000	0.007	0.032	Patotrófico-Saprotrófico-Simbiotrófico	Patógeno animal/vegetal-Saprotrófico-Endosimbionte animal*
<i>Pirella</i>	0.014	0.000	0.000	Saprotrófico	Saprotrófico indefinido*

<i>Pleopassalora</i>	0.046	0.000	0.000	Patotrófico	Patógeno vegetal (BEILHARZ <i>et al.</i> , 2004)
<i>Porosira</i>	0.143	0.000	0.193	Autotrófico	Fotosintético-Fitoplâncton (NOT <i>et al.</i> , 2012)
<i>Pseudocercospora</i>	0.017	0.000	0.000	Patotrófico	Patógeno vegetal*
<i>Pseudeurotium</i>	2.683	0.000	0.000	Saprotrófico	Saprotrófico indefinido*
<i>Pseudogymnoascus</i>	5.992	17.611	0.102	Patotrófico-Saprotrófico-Simbiotrófico	Patógeno animal-Saprotrófico (solo)*
<i>Punctularia</i>	0.007	0.000	0.000	Saprotrófico	Saprotrófico indefinido*
<i>Rhodotorula</i>	0.076	0.035	0.000	Patotrófico-Saprotrófico	Patógeno animal/vegetal-Saprotrófico indefinido-Endofítico*
<i>Saccharomyces</i>	0.000	0.050	0.000	Saprotrófico	Saprotrófico indefinido*
<i>Sterigmatomyces</i>	0.039	0.000	0.000	Patotrófico-Simbiotrófico	Patógeno/parasita (animais marinhos)-Simbionte (inseto) (ZHANG <i>et al.</i> , 2014; ALI <i>et al.</i> , 2017)
<i>Talaromyces</i>	7.433	0.772	0.000	Saprotrófico	Saprotrófico indefinido*
<i>Teichospora</i>	0.095	0.000	0.000	Saprotrófico	Saprotrófico indefinido*
<i>Thelebolus</i>	0.602	67.301	0.000	Saprotrófico-Simbiótico	Saprotrófico-Endofítico*
<i>Tolypocladium</i>	0.264	0.000	0.277	Patotrófico-Saprotrófico	Patógeno animal/parasita de fungo-Endófito Clavicipitaceous*
<i>Toxicocladosporium</i>	0.000	0.008	0.000	Patotrófico-Simbiotrófico	Patógeno vegetal-Endofítico*
<i>Tranzscheliella</i>	0.033	0.000	0.000	Patotrófico	Patógeno vegetal*
<i>Trichoderma</i>	0.074	0.000	0.449	Patotrófico-Saprotrófico-Simbiotrófico	Patógeno animal/vegetal/parasita de fungo-Saprotrófico-Endofítico/Epifítico*
<i>Venturia</i>	0.050	0.000	0.000	Patotrófico	Patógeno vegetal (GONZÁLEZ-DOMÍNGUEZ <i>et al.</i> , 2017)
<i>Yamadazyma</i>	0.035	0.000	0.000	Saprotrófico-Simbiotrófico	Saprotrófico-Endofítico/simbionte animal (YAO <i>et al.</i> , 2019; CHAKRABORTY <i>et al.</i> , 2020; GAO <i>et al.</i> , 2021; VALDERRAMA <i>et al.</i> , 2021)

Tabela Suplementar 5. Fungos isolados de sedimentos marinhos da Península Antártica identificados a partir de regiões do DNAr pela similaridade com sequências depositadas no banco de dados NCBI GenBank utilizando o BLAST_n. *Unidade formadora de colônia. ^aUFMGCB = Código na Coleção de Microrganismos e Células da UFMG. Táxons depositados no GenBank indicados como similares pela análise BLAST_n com base nas sequências das regiões do DNAr: ^bITS, ^cPolimerase II, ^dβ-tubulina e ^eD1/D2. ^fTaxonomia proposta para os isolados pelas sequências de ^gITS, ^hPolimerase II e ⁱβ-tubulina.

Local: profundidade (m)	Contagem UFC* a 10 ⁴	UFMGCB ^a	Principais resultados no BLAST _n (número de acesso no GenBank)	Pares de base (pb) analisadas	Cobertura (%)	Identidade (%)	Táxon proposto ^f
Walker Bay - Livingston: 52 m	1	19612	<i>Cladosporium tenuissimum</i> (MH864840) ^b	521	100	100	<i>Cladosporium</i> sp. ^g
	8	19658	<i>Pseudeurotium bakeri</i> (MH860393) ^b	437	97	99	<i>Pseudeurotium</i> cf. <i>bakeri</i> ^g
	4	19608	<i>Antarctomyces psychrotrophicus</i> (NR164292) ^b	434	100	100	<i>Antarctomyces</i> sp. ^g
	1	19611	<i>Antarctomyces psychrotrophicus</i> (NR164292) ^b	494	100	100	<i>Antarctomyces</i> sp. ^g
	3	19615	<i>Antarctomyces psychrotrophicus</i> (NR164292) ^b	481	100	100	<i>Antarctomyces</i> sp. ^g
	3	19617	<i>Antarctomyces psychrotrophicus</i> (NR164292)	493	100	100	<i>Antarctomyces</i> sp. ^g
	19	19656	<i>Penicillium goetzii</i> (MT558933) ^b <i>Penicillium chrysogenum</i> (JX996668) ^c	497 540	100 100	100 99	<i>Penicillium chrysogenum</i> ^h
	13	19610	<i>Penicillium fuscoglaucum</i> (MT558936) ^b <i>Penicillium palitans</i> (KU904360) ^c	464 613	100 100	100 100	<i>Penicillium</i> cf. <i>palitans</i> ^h
	23	19614	<i>Penicillium fuscoglaucum</i> (MT558936) ^b <i>Penicillium palitans</i> (KU904360) ^c	508 613	100 100	100 100	<i>Penicillium</i> cf. <i>palitans</i> ^h
	30	19616	<i>Penicillium fuscoglaucum</i> (MT558936) ^b <i>Penicillium palitans</i> (KU904360) ^c	468 613	100 100	100 100	<i>Penicillium</i> cf. <i>palitans</i> ^h
	50	19657	<i>Penicillium fuscoglaucum</i> (MT558936) ^b <i>Penicillium palitans</i> (KU904360) ^c	511 613	100 100	100 100	<i>Penicillium</i> cf. <i>palitans</i> ^h
	12	19659	<i>Penicillium fuscoglaucum</i> (MT558936) ^b <i>Penicillium palitans</i> (KU904360) ^c	467 613	100 100	100 100	<i>Penicillium</i> cf. <i>palitans</i> ^h
	9	19660	<i>Penicillium fuscoglaucum</i> (MT558936) ^b <i>Penicillium palitans</i> (KU904360) ^c	465 613	100 100	100 100	<i>Penicillium</i> cf. <i>palitans</i> ^h

Whalers Bay - Deception: 151 m	2	19670	<i>Penicillium fuscoglaucum</i> (MT558936) ^b <i>Penicillium palitans</i> (KU904360) ^c	468 570	100 100	100 100	<i>Penicillium cf. palitans</i> ^h
	2	19671	<i>Penicillium fuscoglaucum</i> (MT558936) ^b <i>Penicillium palitans</i> (KU904360) ^c	511 613	100 100	100 100	<i>Penicillium cf. palitans</i> ^h
	7	19672	<i>Penicillium fuscoglaucum</i> (MT558936) ^b <i>Penicillium palitans</i> (KU904360) ^c	511 613	100 100	100 100	<i>Penicillium cf. palitans</i> ^h
	> 300	19637	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> (MH545918) ^c <i>Meyerozyma guilliermondii</i> (MH545918) ^b	488 557	100 100	100 99	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> ^g
	25	19644	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> (MH545918) ^c <i>Meyerozyma guilliermondii</i> (MH545918) ^b	491 557	100 100	100 99	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> ^g
	> 300	19645	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> (MH545918) ^c <i>Meyerozyma guilliermondii</i> (MH545918) ^b	492 557	100 100	100 99	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> ^g
	> 300	19649	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> (MH545918) ^c <i>Meyerozyma guilliermondii</i> (MH545918) ^b	490 557	100 100	100 99	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> ^g
	25	19655	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> (MH545918) ^c <i>Meyerozyma guilliermondii</i> (MH545918) ^b	496 557	100 100	100 99	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> ^g
	2	19663	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> (MH545918) ^c <i>Meyerozyma guilliermondii</i> (MH545918) ^b	472 557	100 100	100 99	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> ^g
	7	19613	<i>Pseudeurotium bakeri</i> (MH860393) ^b	478	97	99	<i>Pseudeurotium cf. bakeri</i> ^g
	4	19606	<i>Thelebolus balaustiformis</i> (NR159056) ^b <i>Thelebolus balaustiformis</i> (MG832202) ^d	435 356	100 96	100 96	<i>Thelebolus balaustiformis</i> ⁱ
	6	19607	<i>Thelebolus balaustiformis</i> (NR159056) ^b <i>Thelebolus balaustiformis</i> (MG832202) ^d	435 318	100 96	100 96	<i>Thelebolus balaustiformis</i> ⁱ
	2	19609	<i>Thelebolus globosus</i> (MH862951) ^b <i>Thelebolus balaustiformis</i> (MG832202) ^d	449 356	100 96	100 96	<i>Thelebolus balaustiformis</i> ⁱ
	1	19605	<i>Penicillium fuscoglaucum</i> (MT558936) ^b <i>Penicillium palitans</i> (KU904360) ^c	508 613	100 100	100 100	<i>Penicillium cf. palitans</i> ^h
	19	19661	<i>Penicillium fuscoglaucum</i> (MT558936) ^b <i>Penicillium palitans</i> (KU904360) ^c	466 613	100 100	100 100	<i>Penicillium cf. palitans</i> ^h
	18	19662	<i>Penicillium fuscoglaucum</i> (MT558936) ^b <i>Penicillium palitans</i> (KU904360) ^c	465 613	100 100	100 100	<i>Penicillium cf. palitans</i> ^h
	2	19668	<i>Penicillium fuscoglaucum</i> (MT558936) ^b	468 613	100 100	100 100	<i>Penicillium cf. palitans</i> ^h

		<i>Penicillium palitans</i> (KU904360) ^c					
20	19669	<i>Penicillium fuscoglaucum</i> (MT558936) ^b	511	100	100	<i>Penicillium cf. palitans</i> ^h	
		<i>Penicillium palitans</i> (KU904360) ^c	613	100	100		
35	19638	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> (MH545918) ^c	492	100	100	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> ^g	
		<i>Meyerozyma guilliermondii</i> (MH545918) ^b	557	100	99		
42	19646	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> (MH545918) ^c	497	100	100	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> ^g	
		<i>Meyerozyma guilliermondii</i> (MH545918) ^b	557	100	99		
10	19648	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> (MH545918) ^c	492	100	100	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> ^g	
		<i>Meyerozyma guilliermondii</i> (MH545918) ^b	557	100	99		
29	19650	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> (MH545918) ^c	495	100	100	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> ^g	
		<i>Meyerozyma guilliermondii</i> (MH545918) ^b	557	100	99		
40	19664	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> (MH545918) ^c	494	100	100	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> ^g	
		<i>Meyerozyma guilliermondii</i> (MH545918) ^b	557	100	99		
20	19665	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> (MH545918) ^c	497	100	100	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> ^g	
		<i>Meyerozyma guilliermondii</i> (MH545918) ^b	557	100	99		
5	19666	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> (MH545918) ^c	488	100	100	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> ^g	
		<i>Meyerozyma guilliermondii</i> (MH545918) ^b	557	100	99		
English Strait: 404 m	3	19618	<i>Penicillium fuscoglaucum</i> (MT558936) ^b	468	100	100	<i>Penicillium cf. palitans</i> ^h
			<i>Penicillium palitans</i> (KU904360) ^c	613	100	100	
	3	19619	<i>Penicillium fuscoglaucum</i> (MT558936) ^b	511	100	100	<i>Penicillium cf. palitans</i> ^h
			<i>Penicillium palitans</i> (KU904360) ^c	613	100	100	
	3	19620	<i>Penicillium fuscoglaucum</i> (MT558936) ^b	468	100	100	<i>Penicillium cf. palitans</i> ^h
			<i>Penicillium palitans</i> (KU904360) ^c	613	100	100	
	7	19621	<i>Penicillium fuscoglaucum</i> (MT558936) ^b	508	100	100	<i>Penicillium cf. palitans</i> ^h
			<i>Penicillium palitans</i> (KU904360) ^c	613	100	100	
	2	19622	<i>Penicillium fuscoglaucum</i> (MT558936) ^b	508	100	100	<i>Penicillium cf. palitans</i> ^h
			<i>Penicillium palitans</i> (KU904360) ^c	613	100	100	
	7	19623	<i>Penicillium fuscoglaucum</i> (MT558936) ^b	464	100	100	<i>Penicillium cf. palitans</i> ^h
			<i>Penicillium palitans</i> (KU904360) ^c	613	100	100	
	7	19625	<i>Penicillium fuscoglaucum</i> (MT558936) ^b	467	100	100	<i>Penicillium cf. palitans</i> ^h
			<i>Penicillium palitans</i> (KU904360) ^c	613	100	100	
	5	19629	<i>Penicillium fuscoglaucum</i> (MT558936) ^b	467	100	100	<i>Penicillium cf. palitans</i> ^h
				613	100	100	

		<i>Penicillium palitans</i> (KU904360) ^c				
5	19630	<i>Penicillium fuscoglaucum</i> (MT558936) ^b	507	100	100	<i>Penicillium</i> cf. <i>palitans</i> ^h
		<i>Penicillium palitans</i> (KU904360) ^c	613	100	100	
1	19634	<i>Penicillium fuscoglaucum</i> (MT558936) ^b	467	100	100	<i>Penicillium</i> cf. <i>palitans</i> ^h
		<i>Penicillium palitans</i> (KU904360) ^c	613	100	100	
35	19624	<i>Penicillium goetzii</i> (MT558933) ^b	465	100	100	<i>Penicillium chrysogenum</i> ^h
		<i>Penicillium chrysogenum</i> (JX996668) ^c	540	100	99	
17	19626	<i>Penicillium goetzii</i> (MT558933) ^b	465	100	100	<i>Penicillium chrysogenum</i> ^h
		<i>Penicillium chrysogenum</i> (JX996668) ^c	540	100	99	
15	19627	<i>Penicillium goetzii</i> (MT558933) ^b	466	100	100	<i>Penicillium chrysogenum</i> ^h
		<i>Penicillium chrysogenum</i> (JX996668) ^c	540	100	99	
16	19628	<i>Penicillium goetzii</i> (MT558933) ^b	467	100	100	<i>Penicillium chrysogenum</i> ^h
		<i>Penicillium chrysogenum</i> (JX996668) ^c	540	100	99	
31	19631	<i>Penicillium goetzii</i> (MT558933) ^b	510	100	100	<i>Penicillium chrysogenum</i> ^h
		<i>Penicillium chrysogenum</i> (JX996668) ^c	540	100	99	
25	19632	<i>Penicillium goetzii</i> (MT558933) ^b	464	100	100	<i>Penicillium chrysogenum</i> ^h
		<i>Penicillium chrysogenum</i> (JX996668) ^c	540	100	99	
20	19633	<i>Penicillium goetzii</i> (MT558933) ^b	467	100	100	<i>Penicillium chrysogenum</i> ^h
		<i>Penicillium chrysogenum</i> (JX996668) ^c	540	100	99	
2	19635	<i>Penicillium goetzii</i> (MT558933) ^b	507	100	100	<i>Penicillium chrysogenum</i> ^h
		<i>Penicillium chrysogenum</i> (JX996668) ^c	540	100	99	
2	19636	<i>Penicillium goetzii</i> (MT558933) ^b	469	100	100	<i>Penicillium chrysogenum</i> ^h
		<i>Penicillium chrysogenum</i> (JX996668) ^c	540	100	99	
38	19639	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> (MH545918) ^c	490	100	100	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> ^g
		<i>Meyerozyma guilliermondii</i> (MH545918) ^b	557	100	99	
> 300	19640	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> (MH545918) ^c	492	100	100	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> ^g
		<i>Meyerozyma guilliermondii</i> (MH545918) ^b	557	100	99	
24	19641	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> (MH545918) ^c	494	100	100	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> ^g
		<i>Meyerozyma guilliermondii</i> (MH545918) ^b	557	100	99	
42	19642	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> (MH545918) ^c	491	100	99	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> ^g
		<i>Meyerozyma guilliermondii</i> (MH545918) ^b	557	100	99	
15	19643	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> (MH545918) ^c	492	100	100	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> ^g

		<i>Meyerozyma guilliermondii</i> (MH545918) ^b	557	100	99	
10	19647	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> (MH545918) ^c	492	100	100	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> ^g
		<i>Meyerozyma guilliermondii</i> (MH545918) ^b	557	100	99	
15	19651	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> (MH545918) ^c	488	100	100	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> ^g
		<i>Meyerozyma guilliermondii</i> (MH545918) ^b	557	100	99	
36	19652	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> (MH545918) ^c	491	100	100	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> ^g
		<i>Meyerozyma guilliermondii</i> (MH545918) ^b	557	100	99	
> 300	19653	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> (MH545918) ^c	581	100	100	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> ^g
		<i>Meyerozyma guilliermondii</i> (MH545918) ^b	557	100	99	
> 300	19654	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> (MH545918) ^c	498	100	100	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> ^g
		<i>Meyerozyma guilliermondii</i> (MH545918) ^b	557	100	99	
2	19667	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> (MH545918) ^c	501	100	100	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> ^g
		<i>Meyerozyma guilliermondii</i> (MH545918) ^b	557	100	99	
