

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

HEBERT MORAIS FIGUEREDO

**Taxonomia, diversidade e termotolerância de fungos presentes em
solos congelados e termais da Antártica**

BELO HORIZONTE
MINAS GERAIS - BRASIL

2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

HEBERT MORAIS FIGUEREDO

**Taxonomia, diversidade e caracterização fisiológica de fungos
presentes em solos congelados e termais da Antártica**

Dissertação de apresentadas ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, para obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Henrique Rosa

Co-orientadora: Profa. Dra. Vívian Nicolau Gonçalves

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, e acima de tudo, agradeço a minha família por todo o apoio e o incentivo que me deram ao longo desta jornada, sempre sendo um porto seguro para mim durante a tempestade que foi conciliar a vida de mestrando com a vida de pai. Obrigado por tudo!

Agradeço especialmente à Helena, mãe do meu filho e minha companheira de muitas batalhas do dia a dia. Sem você me apoiando todos os dias e dizendo que tudo vai dar certo, que vai ficar tudo bem, teria sido impossível chegar até aqui. E ao meu filho César, por ser a luz que iluminou nosso caminho e a surpresa mais bem vinda em nossas vidas. Seu sorriso pela manhã e as brincadeiras que fizemos juntos me ajudaram a manter o foco e relaxar! Sem vocês essa jornada teria sido ainda mais sofrida e difícil!

Aos meus amigos de infância, Bruno Reis, Matheus Filipe, Willian Taitson e Willian Souza, por serem pessoas com as quais eu sempre pude contar, nos mais diversos e divertidos momentos da minha vida. E em especial à minha madrinha e eterna professora, Ana Déa Reis Neto, por sempre ter me apoiado, incentivado despertado em mim a minha eterna paixão pela ciência.

Tenho que agradecer ainda a todos as pessoas do ICB que me aconselharam, guiaram e apoiaram nesta empreitada:

A todas as pessoas do Laboratório de Microbiologia Polar e Conexões Tropicais da UFMG, em especial às doutorandas Graciele de Menezes, Mayara Ogaki, Soraya Sander e Thamar Holanda, por todos os conselhos e dicas que me deram e toda a ajuda que prestaram para enriquecer este trabalho, bem como à Lívia Costa, Eldon Queres e todos aqueles com quem compartilhei de bons momentos e algumas boas risadas nestes dois anos que passaram tão rápido.

Às pós-doutorandas Camila Carvalho, Iara Santiago e Mariana Costa, bem como a Prof. Dra. Valeria Godinho, por toda a paciência e carinho que vocês tiveram comigo ao compartilhar do conhecimento acumulado e me orientar frente às dificuldades da rotina do laboratório. Vocês sempre terão meu carinho!

Ao professor Dr. Luiz Henrique Rosa, por ter confiado a mim um projeto tão inovador e desafiador. Obrigado por ter me recebido em seu Laboratório, por ter me orientado nessa

empreitada e me ajudado a me encontrar profissionalmente, me ensinando a sempre pensar grande e manter a mente aberta para as possibilidades. Você sempre terá minha gratidão por isso!

À professora Dra. Vívian Nicolau Gonçalves, pela co-orientação, pela dedicação e todos os conselhos, correções, puxões de orelha e toda a ajuda que me prestou nesses dois anos. Você me ajudou a crescer muito e a enfrentar essa jornada! Você sempre será minha referência como profissional e minha professora!

Ao Centro de Pesquisas René Rachou, por manter as portas abertas, possibilitando que este trabalho fosse realizado.

Aos professores Dr. Carlos Rosa e Dra. Susana Johann, por todas as dicas e conselhos que me deram ao longo destes dois anos, sempre enriquecendo meu trabalho e minha formação profissional.

Aos colegas do Laboratório de Taxonomia, Biodiversidade e Biotecnologia de Fungos, por todo o apoio e momentos compartilhados.

Ao Departamento de Microbiologia, à Universidade Federal de Minas Gerais, às agências financiadoras (CAPES, CNPq e FAPEMIG), ao Programa Antártico Brasileiro (PROANTAR) e à Marinha de Brasil por todo o apoio logístico e financeiro oferecido, possibilitando a realização desse projeto.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	v
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ÍNDICE DE TABELAS	x
RESUMO.....	xi
ABSTRACT	xiii
1. RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1. Ambientes extremos	17
2.2. Ecossistemas antárticos.....	19
2.3. Ilha Deception: formação e história.....	20
2.4. Diversidade de fungos na Antártica e sua importância	23
3. OBJETIVO GERAL	25
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
5. MATERIAIS E MÉTODOS	26
5.1. Coleta das amostras	26
5.2. Isolamento e cultivo de fungos.....	26
5.2.1. Processamento das amostras sem tratamento térmico	27
5.2.2. Processamento das amostras com tratamento térmico.....	28
5.3. Identificação dos Fungos	28
5.3.1. Caracterização morfológica	28
5.3.2. Extração do DNA total	29
5.3.2.1. Extração por meio de maceração utilizando Blender	29
5.3.2.2. Extração por meio de maceração utilizando N ₂ líquido	30
5.3.3. Reações de PCR	30
5.3.3.1. PCR fingerprinting.....	30
5.3.3.2. Amplificação utilizando os iniciadores ITS1 e ITS4.....	31
5.3.3.3. Amplificação parcial do gene da β -tubulina	31

5.3.4.	Purificação dos Amplicons	32
5.3.5.	Reação de sequenciamento	32
5.3.6.	Análise computacional das sequências	33
5.3.7.	Diversidade e ecologia comunidade fúngica	34
5.4.	Testes fisiológicos.....	35
5.4.1.	Avaliação do perfil de crescimento em diferentes temperaturas.....	35
5.4.2.	Determinação da capacidade de sobrevivência ao congelamento	35
5.4.3.	Avaliação do crescimento em altas temperaturas	36
6.	RESULTADOS	38
6.1.	Isolamento e cultivo dos fungos sem tratamento térmico.....	38
6.2.	Isolamento e cultivo dos fungos com tratamento térmico das amostras	39
6.3.	Identificação dos fungos.....	40
6.4.	Diversidade e ecologia da comunidade fúngica	47
6.5.	Avaliação do perfil de crescimento em diferentes temperaturas.....	50
6.5.1.	Ensaio de gradiente de temperatura	50
6.5.2.	Determinação da capacidade de sobrevivência ao congelamento	53
6.5.3.	Avaliação do crescimento em altas temperaturas	53
7.	DISCUSSÃO	55
7.1.	Isolamento e cultivo dos fungos	55
7.2.	Identificação dos fungos.....	56
7.3.	Diversidade e ecologia da comunidade fúngica	58
7.4.	Avaliação do perfil de crescimento em diferentes temperaturas.....	60
7.4.1.	Determinação da capacidade de sobrevivência ao congelamento	60
7.4.2.	Avaliação do crescimento em altas temperaturas	61
8.	CONCLUSÕES	63
9.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C: Graus Celsius

%: Por cento

≠: diferente

≥: Maior ou igual a alguma coisa

ABI: Applied Biosystems

β: Beta

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool

BLASTn: Nucleotide Basic Locus Alignment Search Tool

BT2a/BT2b: Iniciadores para amplificação parcial do gene da β-tubulina

C/: Com

cf.: Confer (do latim: confrontar com)

CTAB: Brometo de Cetil Trimetilamônio

DG18: Ágar Dicloran-Glicerol

DNA: Ácido Desoxirribonucléico

dNTP: Desoxirribonucleotídeos trifosfato

DRBC: Agar Dicloran Rosa Bengala Cloranfenicol Base

DSMZ-188: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen

EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético

et al.: Et Alia (do latim, “E outros”)

EUA: Estados Unidos da América

Fe₂(SO₄)₃: Sulfato de Ferro (III)

FIOCRUZ: Centro de Pesquisa René Rachou/Fundação Oswaldo Cruz

g: Grama

GenBank: Banco de dados de sequências genéticas do NCBI

H₂O: Água

h: Horas

IAATO: *International Association of Antarctica Tour Operators*

ICB: Instituto de Ciências Biológicas

Inc: Incorporation

ITS1/ITS4: Região Transcrita Interna do Gene do rRNA

K₂HPO₄: Fosfato Dipotássico

KCl: Cloreto de Potássio

KH₂PO₄: Fosfato Monopotássico

km²: Quilômetro Quadrado

km: Quilômetro

L: Litro

LMPCT: Laboratório de Microbiologia Polar e Conexões Tropicais

LPCM: Laboratório de Parasitologia Celular e Molecular

m: Metro

m²: Metro quadrado

Mg²⁺: Íon de Magnésio

MgSO₄: Sulfato de Magnésio

mL: Mililitro

mm: Milímetros

mM: Milimolar

MSP-PCR: PCR microssatélite

NaCl: Cloreto de Sódio

NaNO₃: Nitrato de Sódio

ng: Nanograma

nm: Nanômetro

μL: Microlitros

μg/mL: Micrograma/mililitro

μg: Micrograma

μmol: Micromol

MEGA: Molecular Evolutionary Genetics Analysis

Milli-Q: água deionizada que foi purificada em um sistema Milli-Q

min: Minutos

MgCl₂: Cloreto de Magnésio

NCBI: *National Center for Biotechnology Information*

NaCl: Cloreto de sódio

OG: Out-group (grupo externo)

PCR: Reação em cadeia da polimerase

pH: Potencial Hidrogeniônico

pmol: Picomol

PO₄: Fosfato

PROANTAR: Programa Antártico Brasileiro

QS: Coeficiente de Sorensen

q.s.p: Quantidade suficiente para

r.p.m.: Rotações por minuto

rDNA: Ácido desoxirribonucleico ribossomal

RNA: Ácido Ribonucléico

RPB2 5F/ RPB2 7R: Iniciadores para amplificação parcial do gene da RNA polimerase II

rRNA: RNA ribossomal

s: Segundo

S: Latitude Sul

S/: Sem

SDS: Dodecil sulfato de sódio

SO₄: Sulfato

TBE: Tris borato

TE: Tampão Tris-EDTA

TRIS: 2-amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol

U: Unidade

UFC: Unidade formadora de colônia

UFC/g: Unidade formadora de colônia por grama

UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais

UV: Ultra-violeta

V: Volts

V: Volume

W: Longitude Oeste

YM: Ágar extrato de malte e levedura

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Península Antártica, Localização da Ilha <i>Deception</i>	21
Figura 2. Mapa Ilha <i>Deception</i> e suas formações geológicas e topográficas	22
Figura 3. Pontos de coleta de amostras de solos vulcânicos, na região de Fumarola Bay, Ilha <i>Deception</i>	26
Figura 4. Esquema do processamento das amostras de solos vulcânicos obtidos na Ilha <i>Deception</i> , Antártica	27
Figura 5. Análise filogenética das sequências de fungos (em negrito) obtidos a partir de amostras de solo da Ilha <i>Deception</i> em comparação com as sequências tipo das espécies mais próximas após a análise no BLASTn, depositadas na base de dados GenBank. As árvores (a – f) foram construídas com base nas sequências da região ITS por meio do parâmetro composto máximo de <i>Likelihood</i> . As sequências de <i>Mucor circinelloides</i> (NR126116) e <i>Aspergillus glaucus</i> (AY373887) foram utilizadas como grupo externo (OG)	45
Figura 6. Análise filogenética das sequências de fungos (em negrito) obtidos a partir de amostras de solo da Ilha <i>Deception</i> em comparação com as sequências tipo das espécies mais próximas após análise BLASTn, depositadas no banco de dados GenBank. As árvores (a – b) foram construídas com base nos fragmentos gênicos do gene da β -tubulina por meio do parâmetro composto máximo de <i>Likelihood</i> . As sequências de <i>Mucor circinelloides</i> (KT207682) e <i>Rhizopus stolonifer</i> (L47267) foram usadas como grupo externo (OG)	46
Figura 7. Dendrograma do perfil de similaridade de Sorensen entre as assembleias fúngicas dos três solos amostrados (0, 50 e 100 °C). Os resultados foram obtidos com um intervalo de confiança de 95% e os valores de bootstrap foram calculados a partir de 1.000 repetições	48
Figura 8. Análise filogenética das sequências de fungos cosmopolitas (em negrito) a partir de amostras de solo da Ilha <i>Deception</i> em comparação com as sequências gerais das espécies mais próximas após análise BLASTn, depositadas no banco de dados GenBank. As árvores (a – c) foram construídas com base nos fragmentos gênicos do gene da região ITS por meio do parâmetro composto máximo de <i>Likelihood</i> . A sequência de <i>Mucor circinelloides</i> (NR126116) foi utilizada como grupo externo (OG)	50

ÍNDICE_DE_TABELAS

Tabela 1. Número de isolados fúngicos obtidos a partir dos quatro meios de culturas empregados no processamento com e sem tratamento térmico dos solos da Ilha <i>Deception</i>	38
Tabela 2. Densidade em UFC/g dos fungos obtidos nos solos com temperaturas de 0, 50 e 100 °C e incubadas sem tratamento térmico prévio	39
Tabela 3. Contagem de UFC/g, por gênero de fungo nas temperaturas de coleta e 0, 50 e 100 °C, em amostras de solo processadas e incubadas após sofrerem tratamento térmico prévio	39
Tabela 4. Identificação dos fungos presentes nos solos com temperaturas de 0, 50 e 100 °C presentes em <i>Fumarole bay</i> , Ilha <i>Deception</i> , Antártica	41
Tabela 5. Índices de diversidade, riqueza e dominância das assembleias presentes nos três solos amostrados em <i>Fumarole bay</i> , Ilha <i>Deception</i>	47
Tabela 6. Perfil de crescimento dos fungos em diferentes temperaturas de incubação	51
Tabela 7. Avaliação da velocidade de crescimento dos fungos submetidos ao crescimento a 50 °C	54

RESUMO

O Continente Antártico e suas ilhas contabilizam cerca de 14 milhões de km² e abrigam diferentes ecossistemas com extremos em temperatura, baixa disponibilidade de nutrientes, de água, radiações solares intensas, fortes ventos, entre outros. Nestes ecossistemas, diferentes grupos microbianos se adaptaram e são capazes de sobreviver; entre eles, os fungos têm se destacado por serem capazes de colonizar variados habitats e substratos. Apesar de a Antártica ser conhecida por sua baixa média anual de temperatura, em algumas regiões da Península Antártica são encontrados locais com elevadas temperaturas devido a atividade vulcânica, como por exemplo na Ilha *Deception*. Devido ao vulcanismo frequente, a Ilha *Deception* apresenta habitats diversos e únicos quando comparados com outras regiões da Antártica. Nesta ilha são encontradas fumarolas onde as águas e os solos podem apresentar temperaturas entre 0 e 100 °C. Com base nestes dados, esta dissertação teve como objetivo caracterizar a comunidade de fungos presentes em amostras de solos da Ilha *Deception* em um gradiente de 0, 50 e 100 °C. De cada amostra foram realizados dois procedimentos para isolamento dos fungos. No primeiro procedimento todas as amostras de solo foram processadas sem a realização de um tratamento térmico. Já no segundo processo, as amostras sofreram tratamentos térmicos distintos, onde os solos obtidos a 0 °C foram congelados a -70 °C por 24 horas; os solos obtidos a 50 e 100 °C foram aquecidos a 50 e 100 °C por 15 min, respectivamente. A partir dos procedimentos de isolamento, um total de 75 isolados fúngicos foi obtido, dos quais 32 após o solo sofrer tratamento térmico e 43 a partir de solo sem tratamento térmico. Os isolados foram agrupados morfológicamente e seus DNAs genômicos obtidos para confirmação por meio da PCR microsatélite utilizando o iniciador (GTG)₅. Após confirmação, um representante de cada grupo molecular obtido foi submetido ao sequenciamento de diferentes regiões do rDNA e as sequências obtidas foram comparadas com sequências de espécies tipo ou de referência depositados no GenBank. Ao todo, foram obtidos 16 táxons distintos, distribuídos entre os gêneros *Aspergillus*, *Leohumicola*, *Mortierella*, *Penicillium*, *Pseudogymnoascus* e *Purpureocillium*. *Aspergillus* foi o gênero com maior número de isolamentos, sendo obtido de todas as amostras de solos nas diferentes temperaturas, com ou sem tratamento térmico prévio, seguido por *Pseudogymnoascus*, o qual foi obtido exclusivamente da amostra de solo a 0 °C. As amostras de solo da Ilha *Deception* apresentaram baixas diversidade e riqueza de espécie, e houve dominância de alguns táxons. Nas amostras de solo a 0 °C, com e sem tratamento, *Aspergillus* sp. 2 apresentou a maior contagem, assim como *Penicillium* sp. 1 na amostra de solo a 50 °C e *Aspergillus* cf. *ruber* na amostra de solo a 100 °C. Todos os isolados foram submetidos a testes de crescimento em diferentes temperaturas, entre 5 e 50 °C, para caracterização dos fungos

mesófilos, psicrófilos/psicrotolerantes e termotolerantes. Sete isolados do gênero *Aspergillus* apresentaram comportamento termotolerante a 50 °C. Dezesete isolados da espécie *Pseudogymnoascus* cf. *destructans*, dois isolados da espécie *Mortierella parvispora* e três isolados do gênero *Leohumicola* foram capazes de crescer em temperatura média de 5 °C, os quais foram
5 selecionados e submetidos a um ensaio de sobrevivência ao congelamento. Todos os 23 fungos testados apresentaram crescimento normal após exposição a -70 °C por 30 dias na ausência de crioprotetores. A partir dos resultados obtidos fortalecemos outros resultados que demonstram que a comunidade fúngica da Ilha *Deception* é composta principalmente por organismos cosmopolitas, tendo *Aspergillus* como principal táxon presente. Há ainda alguns táxons endêmicos da Antártica,
10 representados pelos gêneros *Mortierella* e *Pseudogymnoascus*, organismos psicrófilos e/ou psicrotolerantes. Entre os táxons cosmopolitas, chama a atenção à presença de fungos potencialmente patogênicos, pertencentes ao gênero *Aspergillus*, que podem representar um risco aos seres humanos e outros animais da região. Por fim, a existência de fungos capazes de suportar o congelamento sem a presença de crioprotetores é um fator relevante, pois sugere que estes são
15 capazes de produzir crioprotetores a partir de sua própria maquinaria celular e podem ser fontes de metabólitos de interesse no futuro.

Palavras – chave: Fungos, Diversidade, Solos, Atividade Vulcânica, Ilha *Deception*

ABSTRACT

The Antarctic Continent and its islands account for about 14 million km² and harbor different ecosystems with extremes in temperature, low availability of nutrients, water, intense solar radiation, strong winds, among others. In these ecosystems, different microbial groups have adapted and are able to survive; among them, fungi have been outstanding for being able to colonize varied habitats and substrates. Although Antarctica is known for its low annual average temperature, in some regions of the Antarctic Peninsula are found places with high temperatures due to volcanic activity, as in *Deception* Island. Due to frequent volcanism, *Deception* Island presents diverse and unique habitats when compared to other regions of Antarctica. In this island fumaroles are found where the waters and the soils can have temperatures between 0 and 100 °C. Based on these data, this dissertation aimed to characterize the community of fungi present in soil samples from *Deception* Island in a gradient of 0, 50 and 100 °C. From each sample two procedures were performed to isolate the fungi. In the first procedure all soil samples were processed without a heat treatment. In the second process, the samples underwent different thermal treatments, where the soils obtained at 0 °C were frozen at -70 °C for 24 hours; the soils obtained at 50 and 100 °C were heated at 50 and 100 °C for 15 min, respectively. From the isolation procedures, a total of 75 fungal isolates were obtained, of which 32 from the soil that undergoes heat treatment and 43 from the soil that don't undergoes heat treatment. Isolates were morphologically grouped and their genomic DNAs obtained for confirmation by microsatellite PCR using the primer (GTG)₅. After confirmation, one representative of each obtained molecular group was submitted to the sequencing of different regions of the rDNA and the sequences obtained were compared with sequences of type or reference species deposited in GenBank. In all, 16 distinct taxa were obtained, distributed among the genera *Aspergillus*, *Leohumicola*, *Mortierella*, *Penicillium*, *Pseudogymnoascus* and *Purpureocillium*. *Aspergillus* was the genus with the highest number of isolates, being obtained from all soil samples at different temperatures, with or without previous heat treatment, followed by *Pseudogymnoascus*, which was obtained exclusively from the soil sample at 0 °C. The soil samples of *Deception* Island presented low diversity and species richness, and there were dominance of some taxa. In soil samples at 0 °C, with and without treatment, *Aspergillus* sp. 2 showed the highest count, as did *Penicillium* sp. 1 in the soil sample at 50 °C and *Aspergillus* cf. *ruber* in the soil sample at 100 °C. All isolates were submitted to growth tests at temperatures between 5 and 50 °C for the characterization of mesophilic, psychrophilic/psychotolerant and thermotolerant fungi. Seven isolates of the genus *Aspergillus* showed thermotolerant behavior at 50 °C. Seventeen isolates of the species

Pseudogymnoascus cf. *destructans*, two of the species *Mortierella parvispora* and three of the genus *Leohumicola* were able to grow at a mean temperature of 5 °C, which were selected and subjected to a freezing survival test. All these 23 fungi presented normal growth after exposure to -70 °C for 30 days in the absence of cryoprotectants. From the results obtained we strengthen other results that demonstrate that the fungal community of *Deception* Island is composed mainly by cosmopolitan organisms, with *Aspergillus* as the main taxon present. There are also some endemic taxa of Antarctica, represented by the genera *Mortierella* and *Pseudogymnoascus*, psychrophilous and psychrotolerant organisms. Among the cosmopolitan taxa, attention is drawn to the presence of potentially pathogenic organisms belonging to the genus *Aspergillus*, which may pose a risk to humans in the region. Finally, the existence of organisms able of withstanding freezing without the presence of cryoprotectants is a relevant factor, since it suggests that they are capable of producing cryoprotectants from their own cellular machinery and may be sources of metabolites of interest in the future.

15 **Key words:** Fungi, Diversity, Soils, Volcanic Activity, *Deception* Island.

1. RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

Existem diversos fatores abióticos que tornam um ambiente hostil e extremo para a vida. Entre eles se destacam as variações de temperatura, pH, salinidade, pressão, disponibilidade de nutrientes, escassez de água e alta incidência de radiação. Estes ambientes conhecidos como extremos são descritos como habitats naturais de organismos extremófilos. Diferentes estudos são realizados visando caracterizar a diversidade de organismos presentes nos ambientes extremos do planeta, entre os quais, os micro-organismos são os mais frequentes, pois parecem exercer papel importante nos ciclos biogeoquímicos e manutenção da biodiversidade.

A Antártica é caracterizada pela pequena concentração de áreas livres de gelo, baixas temperaturas, ciclos frequentes de degelo, baixa disponibilidade de nutrientes, fortes ventos e alta incidência de radiação ultravioleta. Apesar dessas características, a Antártica é conhecida por abrigar micro-organismos extremófilos em seus diferentes habitats, tais como solos, rochas, lagos, associados à fauna (aves e mamíferos) e a plantas. Embora nos últimos anos tenham aumentado a quantidade de estudos sobre os ecossistemas antárticos, a diversidade microbiana nos solos vulcânicos antárticos ainda é pouco conhecida. As temperaturas dos solos vulcânicos das ilhas antárticas variam consideravelmente, atingindo desde temperaturas negativas até os 100 °C. Este gradiente de temperatura pode favorecer a colonização de diferentes grupos microbianos, incluindo os psicrófilos, psicrotolerantes, mesófilos, termotolerantes e termófilos. Contudo, pela constante variação de temperatura nesta região, os micro-organismos capazes de sobreviver neste ambiente estão submetidos a variações diárias, mensais e anuais de temperatura, o que favorece a seleção daqueles capazes de sobreviver a esse tipo de estresse. Entre os micro-organismos que ocorrem na Antártica, os fungos parecem apresentar uma elevada diversidade, levando-se em conta as condições extremas da região. Na Antártica fungos *Ascomycota* ocorrem com maior frequência, sendo também reportados táxons dos filos *Chytridiomycota*, *Zygomycota*, *Glomeromycota* e *Basidiomycota*.

O estudo das comunidades de fungos da Antártica tem apresentado enfoque nos fungos com perfis psicrófilos e mesófilos. Entretanto, como em algumas ilhas da Península Antártica a atividade vulcânica ocorre de forma moderada a intensa, existe a presença de solos termais, que apresentam potencial para abrigar uma rara comunidade de fungos

termófilos ou termotolerantes, apesar do intenso frio da Antártica. Desta forma, ressalta-se a importância de estudos com o objetivo de identificar e determinar a diversidade de fungos presentes em solos frios e termais da Ilha *Deception* na Antártica, bem como caracterizar o perfil fisiológico dos isolados obtidos em relação a um gradiente de temperatura, visando futuras aplicações biotecnológicas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. *Ambientes extremos*

Para um ambiente ser considerado extremo ele deve apresentar características físico-químicas diferentes daquelas presentes nos ambientes onde a maior parte dos organismos é capaz de viver, ou seja, temperaturas que variam entre 4 e 40 °C, valores de pH entre 5 e 8,5 e valores de salinidade entre a da água continental e marinha (KRISTJÁNSSON & HREGGVIDSSON 1995). Nestes ambientes extremos, as comunidades biológicas são compostas, majoritariamente, por micro-organismos (GUNDE-CIMERMAN *et al.*, 2003) denominados de extremófilos, por serem capazes de sobreviver a condições ambientais adversas, podendo ser encontrados em diversos tipos de substratos, tais como águas termais, ácidas, cristais de sal, gelo, resíduos tóxicos e até mesmo em água de reatores nucleares (PEARCE, 2009). Estudos conduzidos visando caracterizar estes tipos de ambientes são importantes, pois permitem uma melhor compreensão sobre as relações evolutivas entre grupos de organismos, suas relações ecológicas e descoberta de novas espécies (OARGA *et al.*, 2009). De acordo com ROTHSCCHILD & MANCINELLI (2001) e MAGAN (2007), os organismos extremófilos podem ser divididos em grupos e classificados de acordo com o tipo de ambiente no qual se desenvolvem, sendo divididos:

- Psicrófilos (capacidade de crescer em baixas temperaturas);
- Termófilos (temperaturas altas);
- Acidófilos (baixo pH);
- Alcalófilos (alto pH);
- Barófilos (condições extremas de pressão);
- Halófilos (capacidade de resistir à alta salinidade);
- Xerófilos (capacidade de resistir à dissecação).

De acordo com PRIEUR (2007), a temperatura é, provavelmente, o parâmetro físico mais importante para o desenvolvimento da vida. A temperatura é capaz de afetar os organismos vivos das mais variadas maneiras, podendo destruir as células pela formação de cristais de gelo em seu interior, quando em temperaturas negativas, até desnaturação das moléculas bioativas, quando em temperaturas superiores àquelas em que estas moléculas

são capazes de tolerar (ROTHSCHILD & MANCINELLI, 2001; OARGA, 2009). Desta maneira, levando em consideração as temperaturas nas quais os organismos se desenvolvem, podemos caracterizá-los como termófilos aqueles organismos que são capazes de crescer em temperaturas superiores a 80 °C (VISHNIAC, 2006), ao passo que os organismos considerados termotolerantes são aqueles capazes de crescer em temperaturas que variam desde inferiores a 20 °C, até temperaturas próximas aos 55 °C (MAHESHWARI *et al.*, 2000), sendo os fungos *Thermomyces lanuginosus*, *Thermoascus aurantiacus* e *Torula thermophilai* (MAHESHWARI *et al.*, 2000) exemplos de fungos termotolerantes conhecidos.

Por outro lado, aqueles organismos capazes de colonizar ambientes extremamente frios são denominados psicrófilos (VISHNIAC, 2006). Entre os micro-organismos, diferentes espécies de fungos psicrófilos e psicrotolerantes possuem a capacidade de colonizar ambientes polares, uma vez que, são capazes de crescer entre 0 a 20 °C (D'AMICO *et al.*, 2002), como os organismos *Cladosporium oxysporum* e *Penicillium italicum* (KOSTADINOVA *et al.*, 2009), por exemplo. Os mecanismos fisiológicos que conferem a tolerância a baixas temperaturas são complexos (ROBINSON, 2001). Os fungos adaptados a essas condições utilizam fontes de carbono complexas como fonte de energia, são capazes de sintetizar proteínas e enzimas extracelulares ativas a baixas temperaturas, acumulam trealose dentro das células e possuem maior quantidade de ácidos graxos insaturados na membrana lipídica (ROBINSON, 2001; ADAMS *et al.*, 2006; BRIZZIO *et al.*, 2007; DE GARCÍA *et al.*, 2007; VAZ *et al.*, 2011). Poucas espécies de fungos filamentosos são capazes de sobreviver em temperaturas iguais ou superiores aos 60 °C (MAHESHWARI *et al.*, 2000), pois a maioria dos eucariotos possuem como limite de tolerância temperaturas próximas aos 60 °C, limite este que se mantém para os diversos grupos dos eucariotos, como alguns protozoários, algas e fungos (MANGAN, 2007). Em temperaturas elevadas, os lipídeos celulares, presentes principalmente nas membranas das células fúngicas, podem se solubilizar, levando as células a perderem sua integridade (MANGAN, 2007). O motivo por trás deste limite de temperatura imposto aos eucariotos, quando comparados aos procariotos, frente ao limite de crescimento em altas temperaturas ainda não é bem compreendido e requer mais estudos (MAHESHWARI *et al.*, 2000; SINGH *et al.*, 2003).

2.2. *Ecossistemas antárticos*

As regiões polares representam habitats extremos devido às características comuns, tais como baixas temperaturas, baixa disponibilidade de água e nutrientes e alta radiação UV (MORGAN-KISS *et al.*, 2006). Entre os ecossistemas polares, a Antártica compreende um dos ambientes mais extremos da Terra (CONNELL *et al.*, 2006), possuindo uma área de aproximadamente 14 milhões de Km², onde apenas 2% desta área é livre de gelo (AZMI & SEPPELT, 1997). Este continente é caracterizado por isolamento geográfico e também climático, onde a maior parte do continente ainda possui pouca influência antrópica (BRUNATI *et al.*, 2009).

Apesar das condições extremas presentes na Antártica, diferentes formas de vida são encontradas, como bactérias, fungos, vegetais, invertebrados e algumas espécies de aves e mamíferos (SHIVAJI & PRASAD, 2009). Nos últimos anos, diferentes estudos sobre bactérias, arqueias, microalgas, vírus e fungos foram conduzidos (DEL FRATE & CARETTA, 1990; VAN TRAPPEN *et al.*, 2005; BECQUEVORT *et al.*, 2009; ROSA *et al.*, 2009, 2010; LOQUE *et al.*, 2010; TEIXEIRA *et al.*, 2010; GONÇALVES *et al.*, 2015; SANTIAGO *et al.*, 2016, BATISTA *et al.*, 2017, FURBINO *et al.*, 2017, GONÇALVES *et al.*, 2017, SILVA *et al.*, 2017), sugerindo que os micro-organismos compreendem a maior parcela da biodiversidade da região.

Dentre os diferentes substratos, diversos trabalhos têm focado nos solos da Antártica, visando compreender as comunidades de micro-organismos presentes e sua importância na dinâmica da vida local. Fungos associados a diferentes tipos de solos têm sido estudados como fonte de produtos biotecnológicos, como por exemplo, bioprospecção de metabólitos antimicrobianos (GODINHO *et al.*, 2013; MELO *et al.*, 2013; GONÇALVES *et al.*, 2015; GOMES *et al.*, 2018), potencial patológico de fungos endêmicos associados a solos ornitogênicos (rico em excremento de aves, tais como pinguins) (SOUSA *et al.*, 2017), diversidade e bioprospecção de fungos associados a solos ultra oligotróficos (com baixa disponibilidade de nutrientes), (GODINHO *et al.*, 2015), dentre outros. Esses estudos visam demonstrar a diversidade de fungos presentes na Antártica, bem como a importância destes organismos na composição dos ambientes terrestres antárticos e na manutenção da vida nesse continente, desempenhando um papel

chave na biodegradação de matéria orgânica e ciclagem de nutrientes neste ambiente (SHIVAJI & PRASAD, 2009).

2.3. *Ilha Deception: formação e história*

5 A Ilha *Deception* é composta por um vulcão ativo situado na Península Antártica e composto por solos com temperaturas que vão de, aproximadamente, 0 a 100 °C. Na literatura, solos de origem vulcânica são descritos como aqueles com propriedades físicas únicas, tais como baixa densidade aparente (BROQUEN *et al.*, 2005), alta permeabilidade e estrutura estável (HOYOS & COMERFORD, 2005), além de uma alta capacidade de
10 retenção de água e um alto teor de matéria orgânica (YUAN *et al.*, 2000). Estas características facilitam a colonização destes solos por plantas (BROQUEN *et al.*, 2005), mas também oferecem um bom substrato para micro-organismos. Solos derivados de material vulcânico são caracterizados por uma pequena variedade de minerais assimilados, constituídos principalmente por alofano, imogolita e ferridrita (VAN RANST, 2008), tendo
15 estes solos uma alta capacidade de retenção de fosfato devido ao seu alto teor de elementos como Fe e Al ativos (VAN RANST *et al.*, 1993). Estas características tornam solos vulcânicos ricos e, desta forma, favorecem a sucessão ecológica nestes ambientes.

A Ilha *Deception* é o vulcão mais ativo da região da Península Antártica, localizado abaixo das Ilhas *Snow* e *Livingston* (**Figura 1**), datado do período Quaternário
20 (SMELLIE, 2001). É um vulcão de escudo basáltico e andesítico, com caldeira ativa de 10 km de extensão (*Port Foster*) e um histórico de erupções ocorrendo antes e após a formação da caldeira (**Figura 2**). O vulcão que deu origem à Ilha *Deception* situa-se em uma crosta continental alargada entre a Península Antártica do Norte e as Ilhas *Shetland do Sul* (SMELLIE, 1990). O vulcão é um escudo, com um diâmetro basal submerso de cerca
25 de 30 km e um cume no seu ponto mais alto, o *Mount Pond* (540 m), que se eleva a 1,5 km do fundo do mar (SMELLIE, 1990). Ao longo da história, a ilha passou por numerosos processos de erupções vulcânicas piroclásticas, ou seja, com a liberação de fragmentos de rochas sólidas (HAWKES 1961, ORHEIM 1972a, 1972b, BAKER *et al.*, 1975). Uma erupção de grande volume precedeu o colapso do cume e a formação da caldeira inundada,
30 de 8 a 10 km de diâmetro, formando assim *Port Foster*. (SMELLIE, 2001).

A Ilha *Deception* possui a forma de ferradura, com uma estreita entrada rasa com cerca de 500 m de largura (*Neptunes Bellows*) no lado sudeste, que leva a *Port Foster*. Um anel quase completo de colinas que se eleva a 500 metros no *Mount Pond* circunda o interior afundado de *Port Foster*, e muitas das principais escarpas e linhas de crateras da ilha possuem orientação no sentido nordeste ou noroeste, sugerindo um forte controle estrutural, ou seja, uma forte orientação na direção das erupções e na qual os materiais foram expelidos (SMELLIE 1989, MARTI *et al.*, 1996, GONZÁLEZ-CASADO *et al.*, 1999). Glaciares permanentes de até 100 m de espessura cobrem aproximadamente 57% da ilha (SMELLIE *et al.*, 1997). Eles estão presentes principalmente na crista do *Mount Pond* e no *Mount Kirkwood*, mas incluem grande parte da região nordeste de *Kendall Terrace* (SMELLIE, 2001) (**Figura 2**).



15 **Figura 1.** Península Antártica, Localização da Ilha *Deception* (Wikipédia Commons, 2018).

J.L. SMELLIE

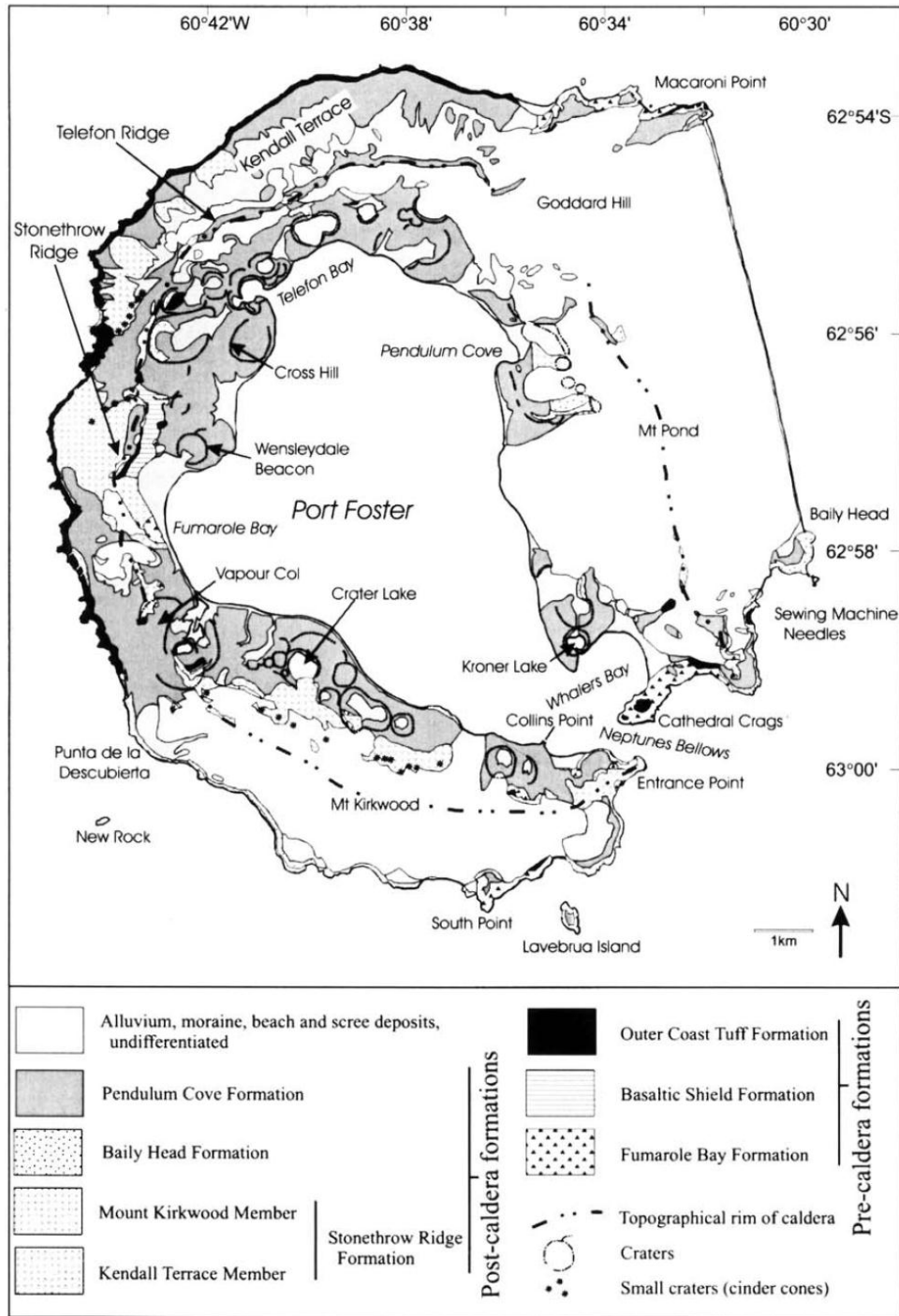


Figura 2. Mapa detalhado da Ilha *Deception* e suas principais formações geológicas e topográficas (SMELLIE, 2001).

2.4. *Diversidade de fungos na Antártica e sua importância*

Embora a Antártica possua uma grande variedade de condições extremas e seja conhecida como um dos ambientes mais inóspitos da Terra (KOSTADINOVA *et al.*, 2009), a presença dos micro-organismos em diferentes ambientes é fundamental para o funcionamento dos ecossistemas da região (WYNN-WILLIAMS, 1996). Os ecossistemas antárticos têm sido investigados quanto à presença, diversidade e ecologia de diferentes comunidades microbianas, incluindo bactérias, arqueias, microalgas e fungos (RUISI *et al.*, 2007). Até o momento, mais de 1.000 espécies de fungos já foram descritas na Antártica, e embora esse número aparente possa ser bastante reduzido quando comparado a outras regiões do mundo, estas espécies, geralmente, parecem bem distribuídas em toda a região (BRIDGE & SPOONER, 2012).

A diversidade de fungos em ambientes antárticos é menor quando comparadas com regiões tropicais e temperadas. Esse fato deve-se, principalmente, as condições extremas da região. A microbiota da Antártica inclui tipicamente leveduras e fungos filamentosos constituídos por espécies dos filos *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Chytridiomycota*, *Glomeromycota* e *Zygomycota*, (RUISI *et al.*, 2007). Os fungos são encontrados em diferentes substratos terrestres, como o solo (GODINHO *et al.*, 2015, SOUSA *et al.*, 2017), rochas (GONÇALVES *et al.*, 2017) as plantas (ROSA *et al.*, 2009; SANTIAGO *et al.*, 2016), água de lagos (GONÇALVES *et al.*, 2012), macroalgas (GODINHO *et al.*, 2013; DUARTE *et al.*, 2016; FURBINO *et al.*, 2014, 2017) e sedimentos marinhos (GONÇALVES *et al.*, 2017). A partir desses substratos, novas espécies de fungos têm sido descritas, as quais são consideradas endêmicas para este ecossistema tais como *Antarctomyces psychrotrophicus* (STCHIGEL *et al.*, 2001), *Taphrina antarctica* (SELBMANN *et al.*, 2014), *Antarctomyces pellizariae* (DE MENEZES *et al.*, 2016), dentre outros.

Devido ao isolamento geográfico e às condições inóspitas os fungos encontrados na Antártica podem ser fontes de moléculas bioativas com potencial aplicação biotecnológica (SANTIAGO *et al.*, 2012). A capacidade de diferentes fungos obtidos da Antártica em produzir substâncias que podem ser usados em processos biotecnológicos (KOGEL *et al.*, 2006; DE GARCÍA *et al.*, 2007) vem sendo descritas e, desta forma, a busca de fungos extremófilos na Antártica pode representar uma estratégia útil para encontrar novas vias

metabólicas eucariotas e, conseqüentemente, novos compostos bioativos (SANTIAGO *et al.*, 2012).

E embora diversos trabalhos referentes aos fungos presentes em solos da Antártica tenham sido realizados nas últimas décadas (ROBINSON, 2001; TOSI *et al.*, 2005; 5 HUGHES *et al.*, 2006; GODINHO *et al.*, 2015, SOUSA *et al.*, 2017), a caracterização de fungos termofílicos presentes em regiões vulcânicas da Antártica é praticamente inexistente. Estas regiões geotermiais, consideradas como oásis de altas temperaturas em ambiente predominantemente frio, podem abrigar comunidades fúngicas únicas e com potencial para aplicações biotecnológicas ainda inexplorados.

10

3. OBJETIVO GERAL

Caracterizar a comunidade de fungos cultiváveis presente em solos da Ilha *Deception*, Antártica, bem como avaliar o perfil fisiológico quanto ao crescimento em diferentes temperaturas.

5

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Coletar e isolar fungos de amostras de solos com temperaturas de 0, 50 e 100 °C;
- Depositar os isolados na Coleção de Culturas e Células da UFMG e contribuir para preservação e montagem de uma coleção temática de fungos de ambientes extremos;
- 10 • Identificar os fungos obtidos por meio de taxonomia polifásica utilizando técnicas morfológicas e de biologia molecular;
- Determinar a diversidade, riqueza, dominância e similaridade das comunidades dos fungos encontrados em relação aos diferentes dos solos amostrados;
- Submeter os fungos obtidos a testes fisiológicos de crescimento em diferentes faixas de
- 15 temperatura.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Coleta das amostras

As amostras de solo foram obtidas durante a Operação Antártica XXXIV no verão antártico em dezembro de 2015. Os solos foram obtidos na região de *Fumarola Bay*, da Ilha *Deception*. A coleta foi realizada seguindo um gradiente de temperatura do solo de 0, 50 e 100 °C, sendo 100 °C a amostra coletada mais próxima da fumarola (62° 96' 738" S; 60° 71' 017"O) e 0 °C sendo mais próxima das geleiras (62° 58' 026" S 60° 43' 020" W) (**Figura 3**). As amostras foram coletadas em duplicata, em sacos plásticos esterilizados e armazenadas a -20 °C até o momento de processamento.

10

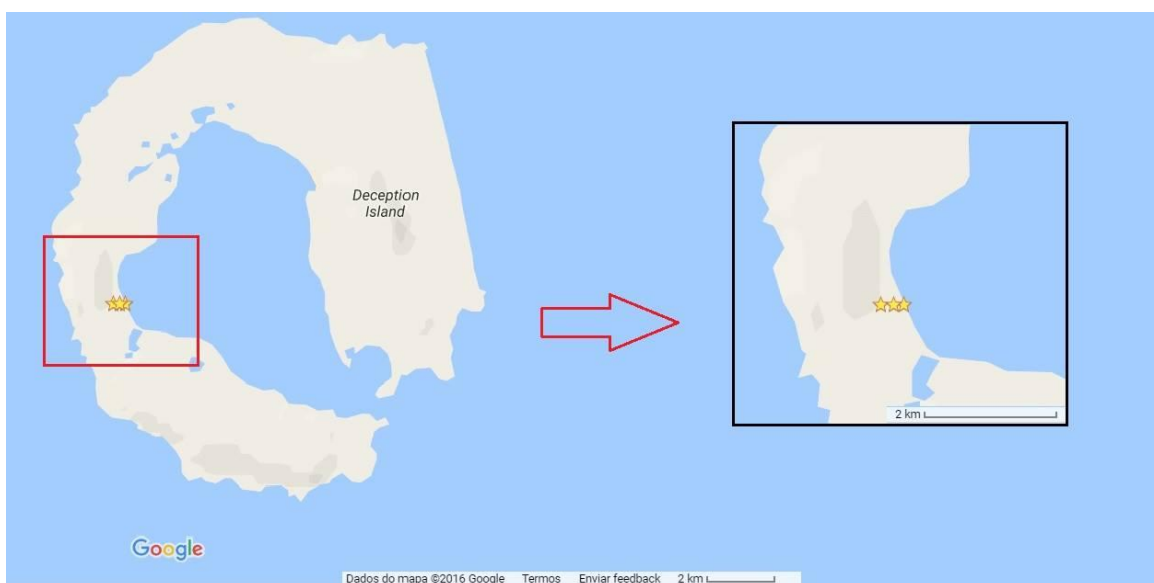


Figura 3. Pontos de coleta de amostras de solos vulcânicos, na região de Fumarola Bay, Ilha Deception (Google Maps, 2018, com modificações).

15

5.2. Isolamento e cultivo de fungos

Os fungos foram isolados em quatro meios de cultura distintos: (1) YM (0,3% de extrato de levedura, 0,3% de extrato de malte, 0,5% de peptona, 2% de glicose, 2% de ágar), (2) DG18 (0,5% de peptona, 1% de glicose, 0,1% di-hidrogeniofosfato de potássio, 0,05% sulfato de magnésio, 0,0002% de dicloran, 2% de ágar e 18% de glicerol) (Oxoid, EUA) e DRBC (0,5% de peptona; 1% de glicose; 0,1% di-hidrogeniofosfato de potássio; 0,05% sulfato

20

de magnésio; 0,0002% de dicloran; 0,0025% de rosa de bengala e 2% de ágar) (Oxoid, EUA) e (4) DSMZ-188 (DSMZ Meio 188: 0,2% de NaNO₃, 0,05% de MgSO₄ x 7H₂O, 0,05% de KCl, 0,001% de Fe₂(SO₄)₃ x H₂O, 0,014% de KH₂PO₄, 0,12% de K₂HPO₄, 0,002 % de extrato de levedura, 1,5% de ágar) (DSMZ GmbH, Alemanha), acrescidos de 100 µg mL de cloranfenicol (Sigma). As amostras foram processadas e então plaqueadas em duplicata seguindo os procedimentos apresentados na **Figura 4**.

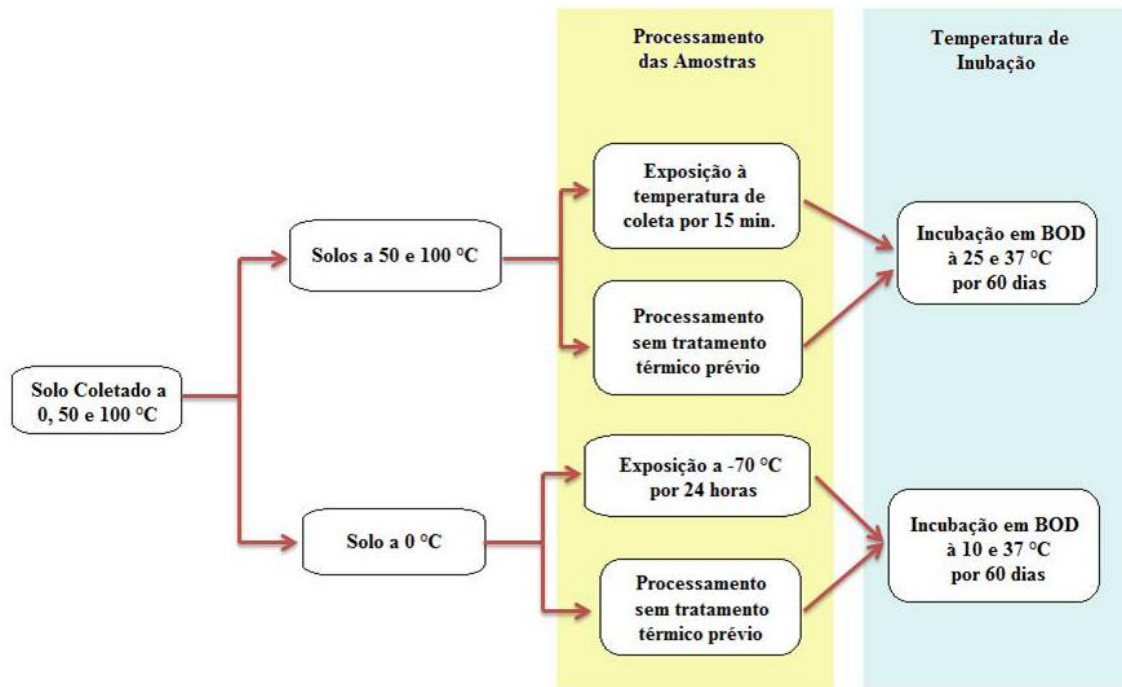


Figura 4. Esquema do processamento das amostras de solos vulcânicos obtidos na Ilha *Deception*, Antártica.

5.2.1. *Processamento das amostras sem tratamento térmico*

Para as amostras de solo de 50 e 100 °C, 1 g foi solubilizado em salina 0,85% de NaCl na concentração de 10⁻². Alíquotas de 100 µL das soluções à 10⁻² foram plaqueadas nos meios de cultura selecionados e as placas incubadas a 25 e 37 °C. Para o solo coletado a 0 °C, uma amostra de 1 g foi solubilizado em salina 0,85% de NaCl na concentração de 10⁻¹, e desta alíquota, foi realizada uma diluição até a concentração de 10⁻². Alíquotas de 100 µL da solução 10⁻² foram plaqueadas nos meios de cultura selecionados e as placas incubadas a 10 e 37 °C. Todas as placas de Petri foram incubadas por até 60 dias.

Transcorrido o período de incubação, as densidades das colônias obtidas foram feitas pela contagem de unidades formadoras de colônia por grama de solo coletado (UFC/g). Um morfotipo de cada placa foi purificado em meio YM. Os fungos filamentosos foram armazenados em duplicata em água esterilizada (CASTELLANI, 1967) e em glicerol 15% a -80 °C. Todos os fungos obtidos foram depositados na coleção de micro-organismos e Células da UFMG.

5.2.2. *Processamento das amostras com tratamento térmico*

Para a amostra de solo de 100 °C, 1 g solo foi submetido a temperatura de 100 °C por 15 min. Após o tratamento, a amostra foi solubilizada em salina 0,85% de NaCl na concentração de 10^{-1} . Alíquotas de 100 µL foram plaqueadas nos meios de cultura selecionados e as placas incubadas nas temperaturas de 25 e 37 °C. Para a amostra de solo de 50 °C, 1 g de solo foi submetido à temperatura de 50 °C por 15 min. Após o tratamento esta amostra foi solubilizada em salina 0,85% de NaCl na concentração de 10^{-1} . Alíquotas de 100 µL foram plaqueadas nos meios de cultura selecionados e as placas foram incubadas as temperaturas de 25 e 37 °C. Para a amostra de solo de 0 °C, 1 g foi previamente congelada à -70 °C por 24 horas e após este período a amostra foi solubilizada em salina 0,85% de NaCl para a concentração de 10^{-1} . Alíquotas de 100 µL desta solução à 10^{-1} foram plaqueadas nos meios de cultura selecionados, e as placas incubadas a temperaturas de 10 e 37 °C;

5.3. *Identificação dos Fungos*

5.3.1. *Caracterização morfológica*

As culturas dos isolados de fungos filamentosos obtidas foram fotografadas (frente e verso) e agrupadas de acordo com as seguintes características macromorfológicas: cor da colônia (frente e verso), textura da superfície (frente e verso) e aspecto da borda. Posteriormente os grupos formados por meio das características citadas acima foram submetidos à análise de perfis moleculares pela técnica de PCR microsatélite (MSP-PCR), utilizando o oligonucleotídeo sintético (GTG)₅ para confirmação do agrupamento morfológico. Os isolados com perfil de banda idênticos foram confirmados como pertencentes ao mesmo grupo.

5.3.2. *Extração do DNA total*

5.3.2.1. *Extração por meio de maceração utilizando Blender*

A extração do DNA total foi realizada de acordo com metodologia descrita por Rosa *et al.* (2009), com modificações. Os fungos filamentosos foram crescidos por no máximo
5 20 dias em meio de cultura caldo YM, à temperatura na qual o isolado foi purificado. Fragmentos do micélio foram retirados e colocados em tubos de 2,0 mL e acrescidos de 400 μ L de tampão de lise (Tris-HCl – trishidroximetilaminometano 0,05 M, EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético 0,005 M, NaCl 0,1 M e SDS –dodecil sulfato de sódio 1%) e deixado a – 20 °C por no mínimo 10 min. Em cada tubo foram adicionadas três esferas
10 estéreis de aço inox (3,175 mm de diâmetro) e posteriormente submetidos à trituração no equipamento Bullet Blender TM 24 (Uniscience). Em seguida, foram adicionados 162 μ L de CTAB (Tris 2M, NaCl 8,2%, EDTA 2M e CTAB 0,2%), seguido de homogeneização em vórtex e incubação por 40 min a 65 °C. Posteriormente, foram acrescentados 570 μ L da mistura clorofórmio/álcool isoamílico (24:1). Após homogeneização, o tubo foi incubado
15 por 30 min em freezer. Em seguida, o conteúdo foi centrifugado a 14.800 r.p.m por 10 min e o líquido sobrenadante foi transferido para um novo tubo de 1,5 mL e acrescentado 10% do volume de uma solução de acetato de sódio 3M. Após homogeneização por inversão, os tubos foram incubados por 30 min em freezer e centrifugados a 14.800 r.p.m por 10 min. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e, em seguida, adicionado 50% do volume
20 de isopropanol (Merck), sendo a suspensão gentilmente homogeneizada e incubada a temperatura ambiente por 30-40 min. Em seguida, foram adicionados 200 μ L de etanol 70% (Merck) gelado, sendo os tubos homogeneizados e submetidos à centrifugação a 14.800 r.p.m por 5 min. O sobrenadante foi descartado novamente por inversão. Foi realizada mais uma lavagem com 200 μ L de etanol 70% (Merck) gelado e, por último, mais
25 uma centrifugação 14.800 r.p.m por 5 min, seguido de descarte do sobrenadante. A amostra foi então seca, por aproximadamente 60 min a 37 °C ou deixada overnight em temperatura ambiente e então ressuspensa em 50 μ L de tampão Tris-EDTA (Tris-HCl 0,01 M e EDTA 0,001 M) e incubada a 65 °C por 60 min para hidratação do DNA e armazenadas a – 20 °C até sua utilização. Todos os produtos obtidos foram quantificados em
30 espectrofotômetro a 260/280 nm (NanoDrop ND 1000 Thecnologies).

5.3.2.2. *Extração por meio de maceração utilizando N₂ líquido*

Para aqueles isolados de fungos em que a extração do DNA total descrita acima não foi eficiente, outra metodologia foi utilizada. Os fungos filamentosos foram crescidos por até sete dias em caldo YM. Os micélios foram transferidos para tubos de 1,5 mL e deixados a -20 °C até o processamento. Durante o processamento, cada micélio foi congelado utilizando N₂ líquido e então triturado com o auxílio de um pistilo. Em seguida, acrescentou-se 400 µL de Tampão de Lise e a extração foi realizada a partir dessa etapa da mesma forma como descrito no item 1.4.2.1. O DNA obtido foi armazenado a -20 °C até sua utilização e os produtos quantificados em espectrofotômetro a 260/280 nm (NanoDrop ND 1000 Thecnologies).

5.3.3. *Reações de PCR*

5.3.3.1. *PCR fingerprinting*

Para a PCR fingerprinting foi utilizado o iniciador (GTG)₅ (LIECKFELDT *et al.*,1995). Para a reação, foi utilizado 2,5 µL de tampão 10X (Mg²⁺ Free) (Sinapse inc.), 1µL de dNTP 0,05 mM (Invitrogen, EUA), 1,5 µL de Mg²⁺ 1,5 mM (Sinapse inc.), 2 µL do iniciador (GTG)₅ 10 µmol⁻¹ (Invitrogen, EUA), 0,2 µL de taq DNA polimerase 1,25 U (Sinapse inc.) e 1 a 2 µL de DNA (de maneira que a reação final contenha entre 50 a 500 ng de DNA). O volume final da reação foi completado com água de injeção, para 25 µL. A PCR foi realizada em um termociclador PCR Express (ThermoHybaid) nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94 °C por 2 min, 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 45 segundos, anelamento a 50 °C por 1 min e extensão a 72 °C por 1 min, seguidos de extensão final a 72 °C por 6 min.

Os produtos de amplificação foram resolvidos em gel de agarose (Pronadisa, Espanha) a 1,5% em tampão TBE 0,5% (54 g de Tris Base, 27,5 g de ácido bórico, 20 mL de EDTA 0,5 M, pH 8,0) a 80 V para a obtenção do perfil de bandas. Os géis foram corados com uma solução de agente intercalante GelredTM (Biotium, EUA) a 0,2%, visualizados sob luz ultravioleta e fotografados pelo sistema de foto-documentação de gel (VilberLourmat, França).

5.3.3.2. *Amplificação utilizando os iniciadores ITS1 e ITS4*

Os iniciadores ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) e ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) foram utilizados para amplificação da região ITS do gene do rRNA, conforme descrito por White *et al.* (1990). A reação de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) foi realizada em um volume final de 50 μ L contendo 5 μ L de tampão de PCR 10X (Mg^{2+} Free) (Sinapse inc.), 3 μ L de Mg^{2+} 25mM (Sinapse inc.), 2 μ L de dNTP 10 mM, 1 μ L de cada iniciador ITS1 e ITS4 a 10 pmol^{-1} (MWG Biotech), 0,2 μ L de Taq DNA polimerase 5U (Sinapse inc.), 1 a 5 μ L do DNA (de modo que a reação contenha entre 50 a 500 ng) e 50 μ L q.s.p. de água de injeção autoclavada. As reações de PCR foram realizadas utilizando o termociclador PCR Express (ThermoHybaid). O programa de ciclagem consistirá de uma desnaturação inicial a 95 °C por 5 min, seguido por 35 ciclos de 1 min de desnaturação a 94 °C, 1 min de anelamento a 55 °C, 1 min de extensão a 72 °C, e uma extensão final por 5 min a 72 °C. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1%, em tampão TBE 0,5 X, resolvidos por aproximadamente 30 min a 120 V. Os géis foram corados com uma solução de agente intercalante Gelred™ (Biotium, EUA) a 0,2%, visualizados sob luz ultravioleta e fotografados pelo sistema de foto-documentação de gel (VilberLourmat, França).

5.3.3.3. *Amplificação parcial do gene da β -tubulina*

Os iniciadores BT2a (GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC) e BT2b (ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC) foram utilizados para amplificação parcial do gene da β -tubulina, conforme descrito por GLASS & DONALDSON (1995). A PCR foi realizada em um volume final de 50 μ L contendo de 1,0 μ L de DNA (de acordo com a concentração do DNA, a qual deve estar entre 50 - 400 ng/ μ L), 1,0 μ L de cada iniciador BT2a e BT2b $10 \text{ } \mu\text{mol}^{-1}$ (MWG Biotech), 5,0 μ L de tampão de PCR 10X (Sinapse inc.), 3,0 μ L de Mg^{2+} 25 mM (Sinapse inc.), 2,0 μ L de dNTP 10 mM, 0,2 μ L de Taq DNA polimerase 5U (Sinapse inc.) e o volume final completado com água de injeção esterilizada. As reações de PCR foram realizadas utilizando o termociclador Mastercycler (Eppendorf). O programa consistiu de uma desnaturação inicial a 94 °C por 5 min, seguido por 35 ciclos de 1 min de desnaturação a 94 °C, 1 min de anelamento a 59 °C e 90 s de extensão a 72 °C e uma extensão final por 5 min a 72 °C. Os produtos de PCR foram analisados por

eletroforese em gel de agarose 1%, em tampão TBE 0,5 X (54 g de tris base, 27,5 g de ácido bórico, 20 mL 20 de EDTA 0,5 M, pH 8,0), resolvidos por aproximadamente 30 min a 110 V. As bandas foram coradas com solução de GelRed (Biotium) e os géis visualizados sob luz ultravioleta e fotografados pelo sistema de foto-documentação de gel (Vilber
5 Lourmat, França).

5.3.4. Purificação dos Amplicons

Os amplicons gerados pelas reações de PCR foram purificados utilizando etanol absoluto e EDTA. Ao produto de PCR (47 μ L) foram adicionados 11,75 μ L de EDTA 125
10 mM e 141 μ L de etanol absoluto (Merck), os tubos foram homogeneizados por inversão e deixados a temperatura ambiente por 15 min. Após, os tubos foram centrifugados 14.800 r.p.m durante 25 min. O sobrenadante foi descartado, e o precipitado foi lavado com a adição de 120 μ L de etanol 70% gelado, sendo posteriormente homogeneizado por inversão. Após centrifugação a 14.000 r.p.m por 10 min, o sobrenadante foi descartado
15 novamente e os tubos foram deixados abertos à temperatura ambiente para evaporação de todo o excesso de etanol. Após, foi adicionado, em cada tubo, 10 μ L de água de injeção esterilizada e os tubos incubado em banho-maria a 37 °C por 30 min. O produto obtido foi dosado em NanoDrop ND 1000 (NanoDrop Technologies, EUA) e armazenado a -20 °C até o momento da reação de sequenciamento.

20

5.3.5. Reação de sequenciamento

As reações de sequenciamento dos produtos obtidos após a purificação dos amplicons foram realizadas no Laboratório de Microbiologia Polar e Conexões Tropicais (LMPCT), do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, e a leitura das placas de
25 sequenciamento realizada no Laboratório de Parasitologia Celular e Molecular (LPCM) da FIOCRUZ/Instituto René Rachou, utilizando o kit Big Dye versão 3.1 (Applied Biosystems, EUA) em combinação com a plataforma de sequenciamento automatizado ABI 3730. A reação de sequenciamento foi realizada em microplacas de 96 poços (Applied Biosystems, EUA) preparada para um volume final de 10 μ L, em que foram adicionados: 1
30 μ L do iniciador (5 μ mol⁻¹), 1 μ L de tampão (presente no kit de sequenciamento), 1 μ L de Big Dye, 1 μ L de DNA (concentração do DNA deve estar entre 15 e 20 ng) e o restante de

água de injeção esterilizada para completar o volume. O programa de ciclagem utilizado consistiu de uma desnaturação inicial a 36 °C por 1 min, 36 ciclos de anelamento a 96 °C por 15 s, seguido por 15 s de extensão a 50 °C e 4 min de extensão final a 60 °C. Para precipitação das reações de sequenciamento, 1,0 µL de EDTA 125 mM, 1,0 µL de acetato de sódio 3M e 50 µL de etanol absoluto (Merck) gelado, foram adicionados em cada poço da placa de 96 poços. A placa foi submetida à agitação em vórtex e incubada por 15 min à temperatura ambiente. Após período de incubação, a placa foi centrifugada por 45 min a 4.000 r.p.m a 4 °C. O sobrenadante foi descartado por inversão e em seguida, foram adicionados 100 µL de etanol 70% (Merck) gelado. Então, a placa foi novamente centrifugada por 15 min a 4.000 r.p.m a 4 °C e o sobrenadante descartado por inversão. Para remoção do excesso de etanol, a placa foi invertida sobre um papel absorvente e submetida a um spin (pulso até a centrífuga atingir 900 r.p.m). Após esta etapa, a placa foi mantida em repouso, durante 20 min em temperatura ambiente para evaporação do etanol residual. Na sequência, o DNA das amostras precipitado em cada poço foi então ressuspensionado em 10 µL de Formamida HI DI (Applied Biosystems, EUA). A placa foi armazenada a 4 °C, protegida da luz, até injeção das amostras no sistema automatizado ABI 3730 (Applied Biosystems, EUA).

5.3.6. *Análise computacional das sequências*

As sequências de DNA obtidas dos fungos filamentosos foram comparadas com as sequências de espécies tipo ou referência de fungos depositadas no GenBank e pertencentes a coleções de culturas internacionais, utilizando o programa BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool – versão 2.215 do BLAST 2.0), disponível no portal NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>), desenvolvido pelo National Center For Biothecnology. Os fungos que apresentaram sequências com valor de $E = 0$, cobertura e identidade $\geq 99\%$, bem como proximidade quando analisadas filogeneticamente utilizando o programa MEGA 6 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) (TAMURA *et al.*, 2013), foram considerados como pertencentes à mesma espécie. Para fungos com sequências com valor de $E \neq 0$ e cobertura e identidade $\leq 98\%$, foram identificados em nível de gênero ou níveis hierárquicos mais altos após a análise filogenética. Além disso, para alguns táxons o termo ‘cf.’ (latim for confer = comparado com) foi utilizado para indicar a espécie a qual se

assemelha, mas apresenta pequenas diferenças com a espécie referência. Para identificação molecular foram utilizadas as sequências ≥ 350 pares de bases. As árvores filogenéticas foram construídas utilizando o algoritmo de Neighbor-joining. O modelo Maximum composite likelihood foi usado para estimar a distância evolucionária. Uma análise de bootstrap foi feita com 1.000 repetições, utilizando os programas incluídos no MEGA 6. 5 Informações sobre os níveis hierárquicos utilizados na taxonomia dos fungos foram obtidos no MycoBank (<http://www.mycobank.org/>) e Index Fungorum (<http://www.Índexfungorum.org/>).

10 5.3.7. *Diversidade e ecologia comunidade fúngica*

As contagens de unidades formadoras de colônia (UFC) foram usadas para cálculo das densidades (UFC/g) em cada local amostrado. Estes dados foram utilizados para determinar a prevalência de cada táxon em comparação com o total de táxons presente nas comunidades fúngicas associadas aos solos vulcânicos de cada local coletado.

15 Para avaliar a diversidade de espécies foram utilizados os seguintes índices: (a) Fisher- α (diversidade), (b) Margalef (riqueza) e (c) Simpson (dominância). O índice de diversidade de Fisher- α é adequado para frequências em que diferentes espécies ocorrem de forma aleatória onde, comumente algumas espécies são tão raras que sua chance de inclusão é pequena (FISHER *et al.*, 1943). Este índice é calculado pela fórmula $S = a \cdot \ln(1 + n/a)$ onde, 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 é uma medida utilizada em ecologia para estimar 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 20 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 é muitas vezes utilizado para quantificar a biodiversidade de um ecossistema. Ele leva em conta 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 25 na amostra, pertencer à mesma espécie. O cálculo da Dominância de Simpson (1-D) é dado pela fórmula $D = \sum(n / N)^2$, onde n é o número total de organismos de uma mesma espécie 30

e **N** o número total de organismos de todas as espécies. O valor estimado de $1 - D$ pode variar de 0 a 1, sendo que 0 representa o mínimo de diversidade e 1 o máximo de diversidade, com as espécies distribuídas igualmente. Sendo assim, uma comunidade de espécies com maior diversidade terá uma menor dominância.

5 Para avaliar a similaridade entre as comunidades fúngicas dos locais amostrados, utilizou-se o coeficiente de Sorensen (QS), que é representado pela fórmula: $QS = 2C/(A+B)$, onde A e B representam o número de espécies nas amostras A e B , respectivamente, e C o número de espécies compartilhadas pelas duas amostras. Todos os resultados foram obtidos com 95% de confiança, e os valores de *bootstrap* foram
10 calculados a partir de 1000 repetições. Todos os índices foram calculados utilizando o programa computacional PAST 3.18 (HAMMER *et al.*, 2001).

5.4. Testes fisiológicos

5.4.1. Avaliação do perfil de crescimento em diferentes temperaturas

15 Todos os isolados obtidos foram cultivados em meio YM, em duplicata, em placas de 48 poços, nas temperaturas de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 37 e 50 °C, por um período de até 14 dias. A avaliação do crescimento ocorreu ao 7° e 14° dia de experimento, a fim de estabelecer as temperaturas mínima e máxima de crescimento de cada isolado. Este ensaio teve ainda como objetivo servir de “pré-triagem” para definir quais isolados foram capazes
20 de crescer a 5 e 50 °C, sendo estes isolados, então, selecionados para testes fisiológicos posteriores.

5.4.2. Determinação da capacidade de sobrevivência ao congelamento

25 Os isolados que apresentaram crescimento a 5 °C no ensaio de gradiente de temperatura foram submetidos ao ensaio para detecção da atividade de anticongelamento. Para isso, a partir da cultura fúngica crescida por 20 dias a 10 °C em ágar YM, foram retirados três discos de 3 mm de diâmetro contendo micélio, sendo transferidos para quatro tubos de 2 mL esterilizados (três discos por tubo) contendo 1 mL de caldo YM, sendo incubados por 7 dias a 10 °C. Como controle negativo foi utilizado o fungo mesófilo
30 tropical *Cladosporium sphaerospermum* CCT 1740, com crescimento ótimo entre 10 e 35°C. Todo este procedimento foi realizado em duplicatas.

Transcorridos o período de incubação, todos os tubos foram centrifugados por 5 min a 14.800 r.p.m e o sobrenadante descartado. À biomassa restante, precipitada no fundo dos tubos, foi adicionada, por duas vezes, 300 µL de salina 0,85% esterilizada. Os tubos foram centrifugados por 7 min a 14.800 r.p.m e o sobrenadante descartado. Após este processo, a biomassa de cada fungo foi submetida a quatro procedimentos diferentes para avaliação da atividade de anticongelamento:

1. Biomassa fúngica + 1 mL de água Milli-Q;
2. Biomassa fúngica + 1 mL de salina 0,85% esterilizada;
- 10 3. Biomassa fúngica + 1 mL de glicerol 15%;
4. Biomassa fúngica + 1 mL de sacarose 30%.

As substâncias utilizadas nas etapas 3 e 4 são conhecidas como crioprotetores (ANCHORDOGUY *et al.*, 1987; SANTARIUS, 1992; VOLK *et al.*, 2006) e, portanto, foram utilizadas como controle positivo. Os fungos foram submetidos a um congelamento lento, passando por diferentes faixas de temperaturas, iniciando-se o procedimento à temperatura de 4 °C por 24 horas, seguido de 24 horas a -20 °C e então armazenados em ultrafreezer a -74 °C pelo período de 30 dias. Decorrido os 30 dias, os tubos com a biomassa fúngica foram submetidos a um descongelamento lento, iniciando-se a -20 °C por 24 horas, e passando a 4 °C pelo mesmo tempo onde, por fim, a biomassa dos fungos filamentosos foi plaqueada em placas de Petri contendo meio de cultura ágar YM e incubadas a 10 °C. Foram considerados capazes de resistir ao congelamento aqueles isolados que apresentaram crescimento, a partir dos procedimentos (1) e (2), até o período de 20 dias após o momento em que a biomassa fúngica novamente incubada a 10 °C.

25

5.4.3. Avaliação do crescimento em altas temperaturas

Todos os isolados que apresentaram crescimento a 50 °C no ensaio de gradiente de temperatura foram re-cultivados em triplicata, em placas de Petri 60 x 15 contendo meio de cultura ágar YM a partir de inóculos de 3 mm de diâmetro. As placas foram seladas, visando conservar a umidade interna das placas, e incubadas em estufa a 50 °C, por um período de 7 dias. O crescimento micelial foi determinado, utilizando como ferramenta um

30

paquímetro digital *Mitutoyo Absolute* (Mitutoyo Sul Americana Ltda) e a colônia foi fotografada após 1, 3 e 7 dias. Transcorrido cada um destes tempos, um novo repique do micélio crescido a 50 °C foi realizado e as placas foram incubadas a 37 °C por 7 dias, visando avaliar a viabilidade do fungo após exposição a temperatura de 50 °C. Como

5 controle negativo foi utilizado o fungo tropical *Cladosporium sphaerospermum* CCT 1740, que tem como característica ser um fungo mesófilo, com crescimento na faixa dos 10 aos 35°C.

6. RESULTADOS

6.1. Isolamento e cultivo dos fungos sem tratamento térmico

A partir das três amostras de solo coletadas foram obtidos um total de 75 isolados fúngicos nos quatro meios de culturas utilizados, sendo 23 isolados obtidos a 10 °C, 10 isolados a 25 °C e 42 isolados a 37 °C. Todos os meios de culturas empregados propiciaram o crescimento de fungos de forma equivalente (**Tabela 1**). Durante o isolamento sem a utilização de tratamento térmico prévio foram obtidos 43 isolados, a partir das temperaturas de incubação de 10, 25 e 37 °C, pertencentes a oito classes distintas, representadas pelos gêneros *Aspergillus*, *Leohumicola*, *Penicillium*, *Purpureocillium*, *Pseudogymnoascus* e *Mortierella* (**Tabela 2**). Da amostra de solo coletada a 100 °C e incubada nas temperaturas de 25 e 37 °C foram obtidos três táxons de dois gêneros, dos quais *Aspergillus* apresentou a maior densidade, seguido por *Purpureocillium*. Para a amostra de solo coletada a 50 °C foram obtidos três táxons, dos quais *Penicillium* foi o gênero mais abundante, seguido por *Aspergillus*. Por fim, o solo coletado a 0 °C foram obtidos seis táxons e *Aspergillus* e *Penicillium* apresentaram as maiores densidades, seguidos por *Pseudogymnoascus* e *Mortierella*. Com base nos resultados obtidos foi possível verificar que o solo a 100 °C apresentou menor número de táxons e menores densidades. Ao contrário, as maiores densidades foram obtidas do solo coletado a 0 °C.

Tabela 1. Número de isolados fúngicos obtidos a partir dos quatro meios de culturas empregados no processamento com e sem tratamento térmico dos solos da Ilha *Deception*.

	Meios de cultura				TOTAL
	DG18 ^a	DRBC ^b	DSMZ-188 ^c	YM ^d	
Com tratamento	8	7	10	7	32
Sem tratamento	10	14	9	10	43
TOTAL	18	21	19	17	75

^a DG18 = Ágar DG18 Dicloran Glicerol; ^b DRBC = Ágar Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol Base; ^c DSMZ-188 = Meio de cultura nº 188, Coleção Alemã de Micro-organismos e Culturas Celulares; ^d YM = Ágar Extrato de Malte-Extrato de Levedura.

Tabela 2. Densidade em UFC/g dos fungos obtidos nos solos com temperaturas de 0, 50 e 100 °C e incubadas sem tratamento térmico prévio.

Temperatura de coleta (°C)	Gênero	N° de táxons	Densidade (UFC/g)
0	<i>Aspergillus</i>	2	>300
	<i>Leohumicola</i>	1	100
	<i>Mortierella</i>	1	150
	<i>Penicillium</i>	1	>300
	<i>Pseudogymnoascus</i>	1	150
50	<i>Aspergillus</i>	2	>300
	<i>Penicillium</i>	1	>300
100	<i>Aspergillus</i>	2	> 300
	<i>Purporeocillium</i>	1	100

6.2. Isolamento e cultivo dos fungos com tratamento térmico das amostras

5 A partir do isolamento dos fungos após tratamento térmico foram obtidos 32 isolados (**Tabela 1**) distribuídos em nove táxons representados pelos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Pseudogymnoascus* (**Tabela 3**). Do solo com temperatura de 100 °C, após tratamento térmico de 100 °C por 15 min, foram obtidos três táxons, representados pelos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*. Da amostra de solo coletada a 50 °C, após tratamento de 10 50 °C por 15 min, foram isolados três táxons do gênero *Aspergillus*. Finalmente, para a amostra de solo obtida a 0 °C, após tratamento térmico a -70 °C por 24 horas, foram obtidos cinco táxons distribuídos entre os gêneros *Aspergillus* e *Pseudogymnoascus*.

15 **Tabela 3.** Contagem de UFC/g, por gênero de fungo nas temperaturas de coleta e 0, 50 e 100 °C, em amostras de solo processadas e incubadas após sofrerem tratamento térmico prévio.

Temperatura de coleta (° C)	Gênero	N° de táxons	Contagem (UFC/g)
0	<i>Aspergillus</i>	4	>300
	<i>Pseudogymnoascus</i>	1	17
50	<i>Aspergillus</i>	3	10
100	<i>Aspergillus</i>	2	10
	<i>Penicillium</i>	1	10

6.3. Identificação dos fungos

Setenta e cinco fungos foram obtidos no total e submetidos à identificação polifásica, os quais fazem parte dos filos *Ascomycota* (*Eurotiomycetes*, *Leotiomycetes* e *Sordariomycetes*) e *Zygomycota* (*Mortierellomycetes*) (Tabela 4, Figuras 5 e 6). Os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* apresentaram as maiores densidades. Os táxons *Aspergillus* sp. 2, *Aspergillus* sp. 3 e *Penicillium* sp. 2 foram os mais abundantes na amostra de solo a 0 °C. Os táxons *Aspergillus* cf. *ochraceus*, *A. sydowii*, *Aspergillus* sp. 3, *Leohumicola* sp., *Pseudogymnoascus* cf. *destructans* e *Mortierella parvispora* foram identificados exclusivamente no solo a 0 °C. Para a amostra de solo a 50 °C *Penicillium* sp. foi o que apresentou maior densidade, acompanhado por *Aspergillus calidoustus*. Para a amostra de solo a 100 °C, o gênero *Aspergillus* foi o mais abundante e o principal representante foi *Aspergillus* cf. *ruber*, além das espécies *A. calidoustus* e *A. lacticoffeatus*. *Purporeocillium sodanum* foi obtido exclusivamente nesta amostra de solo a 100 °C, mas em baixa densidade.

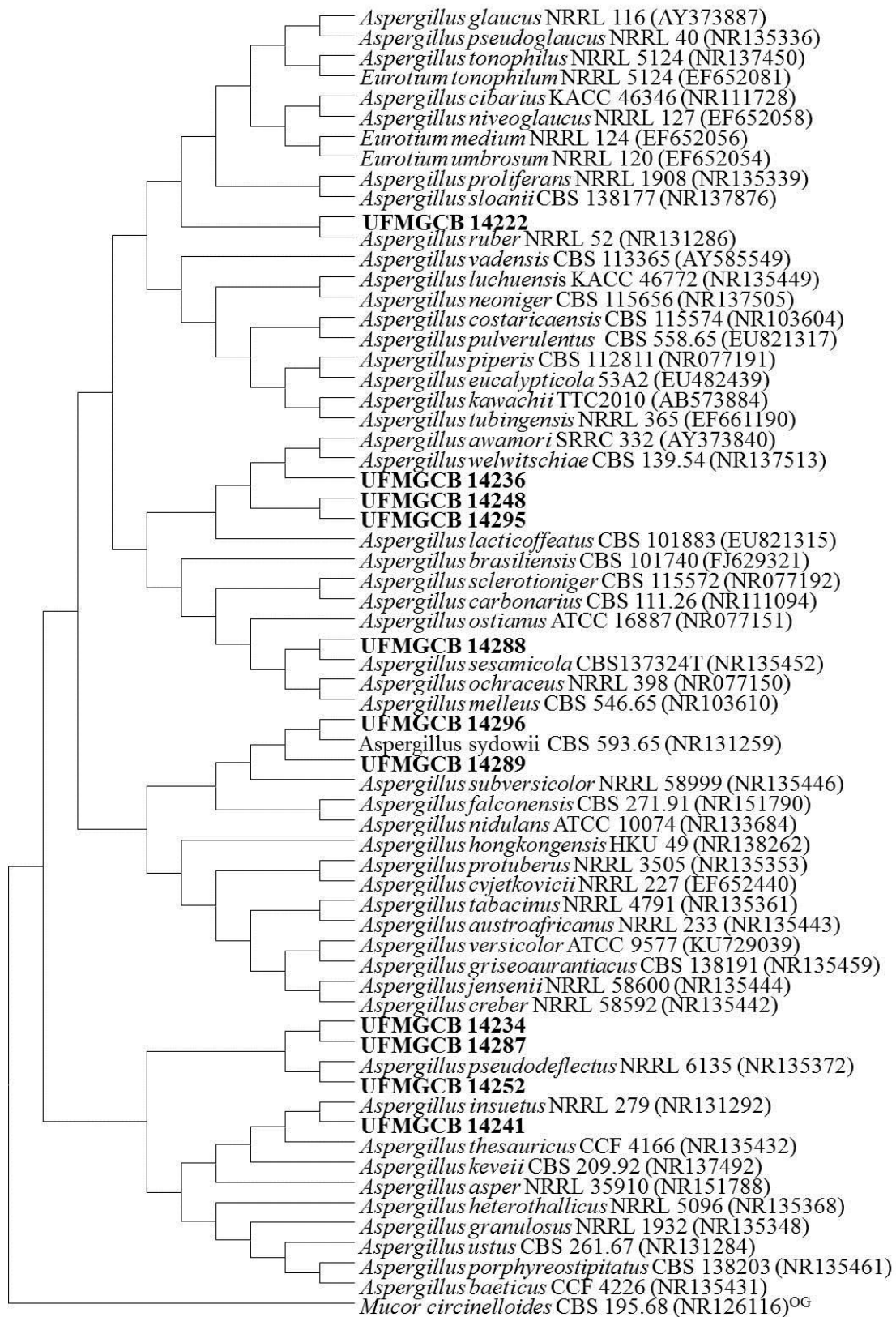
15

Tabela 4. Identificação dos fungos presentes nos solos com temperaturas de 0, 50 e 100 °C presentes em *Fumarole bay*, Ilha *Deception*, Antártica.

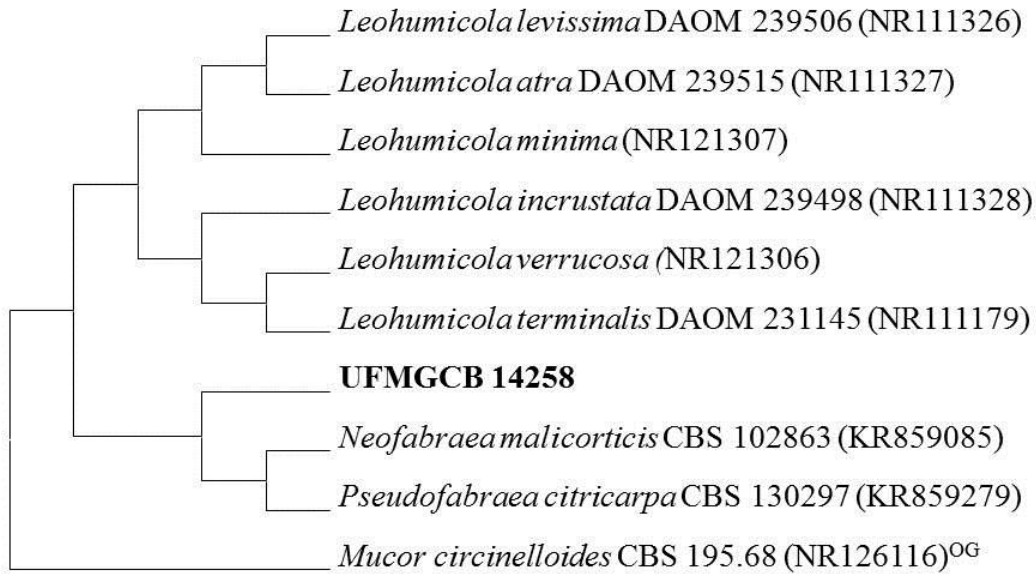
Temperatura do solo (°C)	UFMGCB ^a	Densidade (UFC/g)	Resultado Top BLAST [n° de acesso do GenBank]	Cobertura (%)	Identidade (%)	N° de pb sequenciados e analisados	Espécie ou grupo taxonômico proposto ^d
100	14234	>300	<i>Aspergillus pseudodeflectus</i> (NR135372) ^b	98	99	450	<i>Aspergillus calidoustus</i>
			<i>Aspergillus calidoustus</i> (FJ624456) ^c	100	100	414	
	14222	>300	<i>Aspergillus ruber</i> (NR131286) ^b	98	100	395	<i>Aspergillus</i> cf. <i>ruber</i>
	14236	10	<i>Aspergillus welwitschiae</i> (NR137513) ^b	100	100	504	<i>Aspergillus lacticoffeatus</i>
			<i>Aspergillus lacticoffeatus</i> (AY819998) ^c	100	99	397	
	14238	10	<i>Penicillium citrinum</i> (NR121224) ^b	98	100	432	<i>Penicillium citrinum</i>
			<i>Penicillium citrinum</i> (GU944545) ^c	99	99	425	
	14228	100	<i>Purpureocillium sodanum</i> (KX668542)	100	100	436	<i>Purpureocillium sodanum</i>
50	14241	10	<i>Aspergillus insuetus</i> (NR131292) ^b	99	99	450	<i>Aspergillus insuetus</i>
			<i>Aspergillus insuetus</i> (EF652281) ^c	97	99	406	
	14252	>300	<i>Aspergillus pseudodeflectus</i> (NR135372) ^b	99	99	440	<i>Aspergillus calidoustus</i>
			<i>Aspergillus calidoustus</i> (FJ624456) ^c	100	100	426	
	14249	>300	<i>Penicillium citrinum</i> (NR121224) ^b	98	100	400	<i>Penicillium</i> sp. 1
	14248	55	<i>Aspergillus welwitschiae</i> (NR137513) ^b	100	100	511	<i>Aspergillus</i> sp. 1
<i>Aspergillus lacticoffeatus</i> (AY819998) ^c			100	99	398		
0	14288	20	<i>Aspergillus/s ochraceus</i> (NR077150) ^b	99	100	439	<i>Aspergillus</i> cf. <i>ochraceus</i>
			<i>Aspergillus ochraceus</i> (EF661322) ^c	100	100	371	
	14287	>300	<i>Aspergillus pseudodeflectus</i> (NR135372) ^b	95	99	418	<i>Aspergillus</i> sp. 2
			<i>Aspergillus sydowii</i> (EF428373) ^c	93	100	379	
	14296	73	<i>Aspergillus sydowii</i> (NR131259) ^b	98	100	447	<i>Aspergillus sydowii</i>

		<i>Aspergillus sydowii</i> (EF428373) ^c	92	100	383	
14289	>300	<i>Aspergillus versicolor</i> (KU729039) ^b	100	99	416	<i>Aspergillus</i> sp. 3
		<i>Aspergillus sydowii</i> (EF428373) ^c	92	100	384	
14281	>300	<i>Penicillium citrinum</i> (NR121224) ^b	100	100	386	<i>Penicillium</i> sp. 2
14295	180	<i>Aspergillus welwitschiae</i> (NR137513) ^b	100	100	440	<i>Aspergillus</i> sp. 1
14265	106	<i>Geomyces destructans</i> (EU884921) ^b	100	99	443	<i>Pseudogymnoascus</i> cf. <i>destructans</i>
14258	100	<i>Leohumicola minima</i> (NR121307) ^b	99	89	462	<i>Leohumicola</i> sp.
14264	150	<i>Mortierella parvispora</i> (JX976076) ^b	100	97	498	<i>Mortierella parvispora</i>

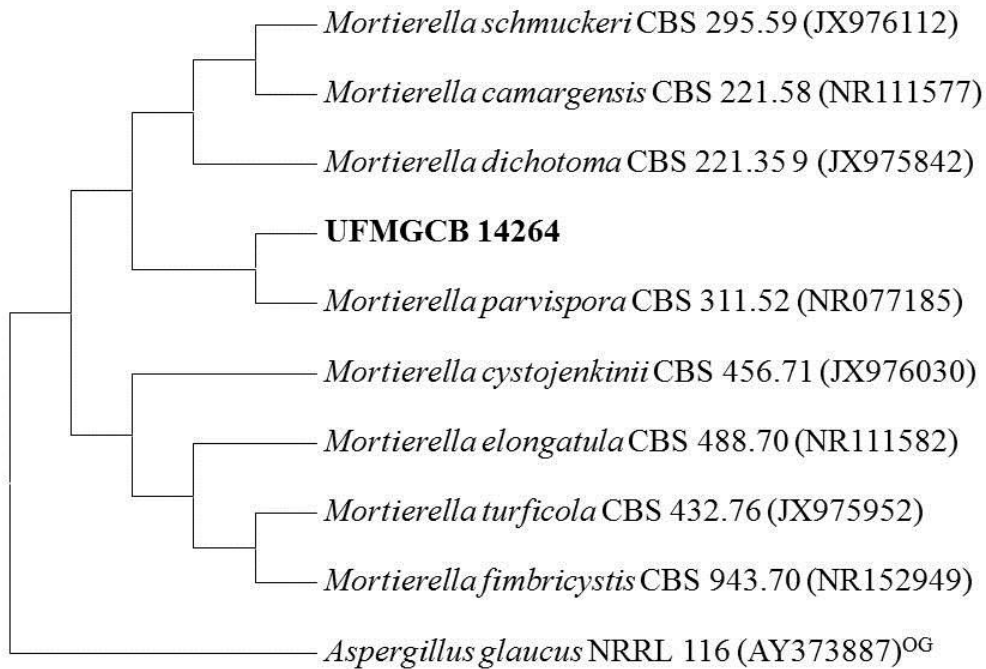
Identificação conduzida utilizando sequências utilizando BLASTn para as regiões dos domínios ITS e β -Tubulina. ^a UFMGCB, Cultura de Micro-organismos e Células da Universidade Federal de Minas Gerais. Táxons sujeitos a análise filogenética baseada nas regiões ^bITS1-5.8S-ITS2 e em ^c β -tubulina, para elucidação da posição taxonômica. ^dPosição taxonômica sugerida pelas análises filogenéticas.



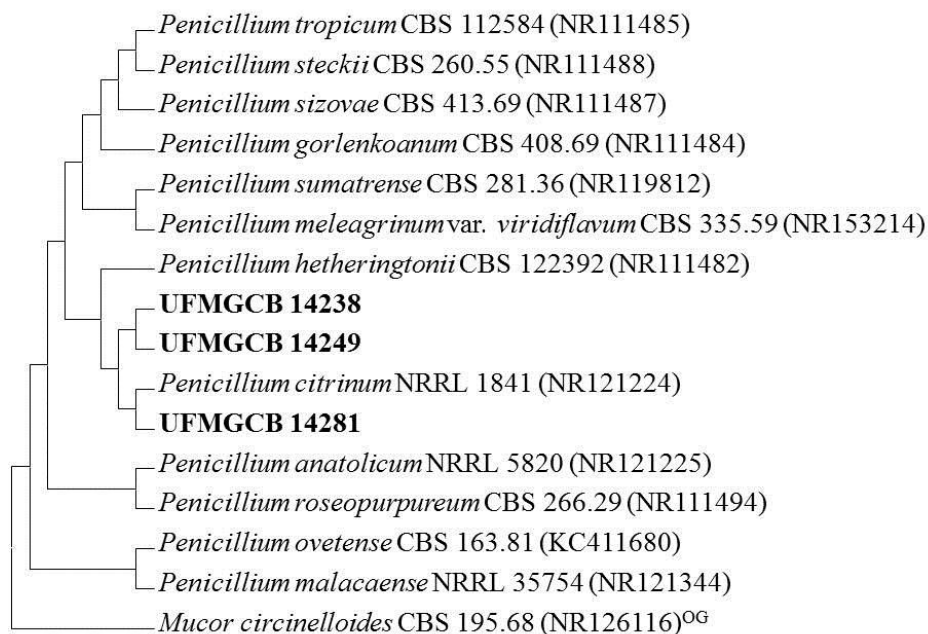
(a)



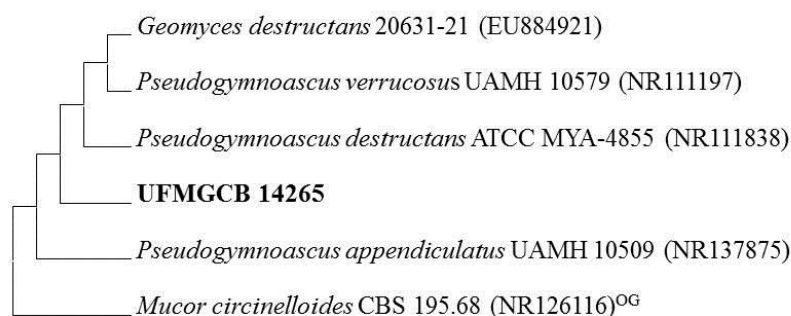
(b)



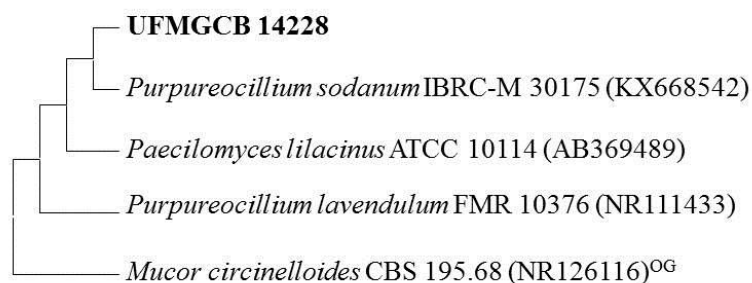
(c)



(d)

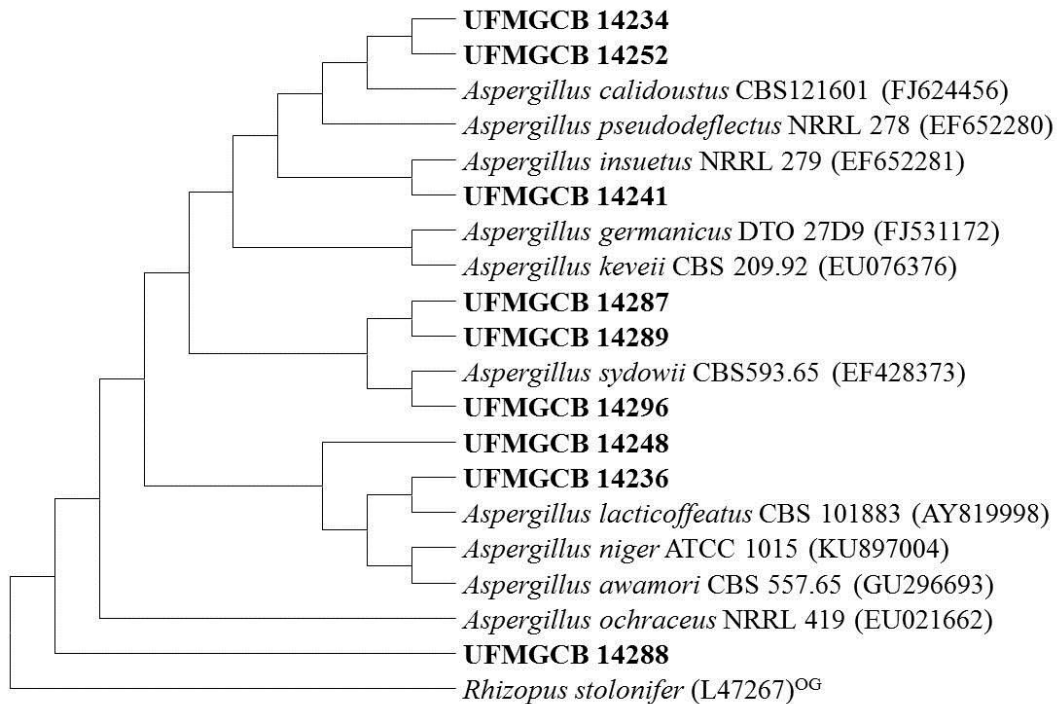


(e)

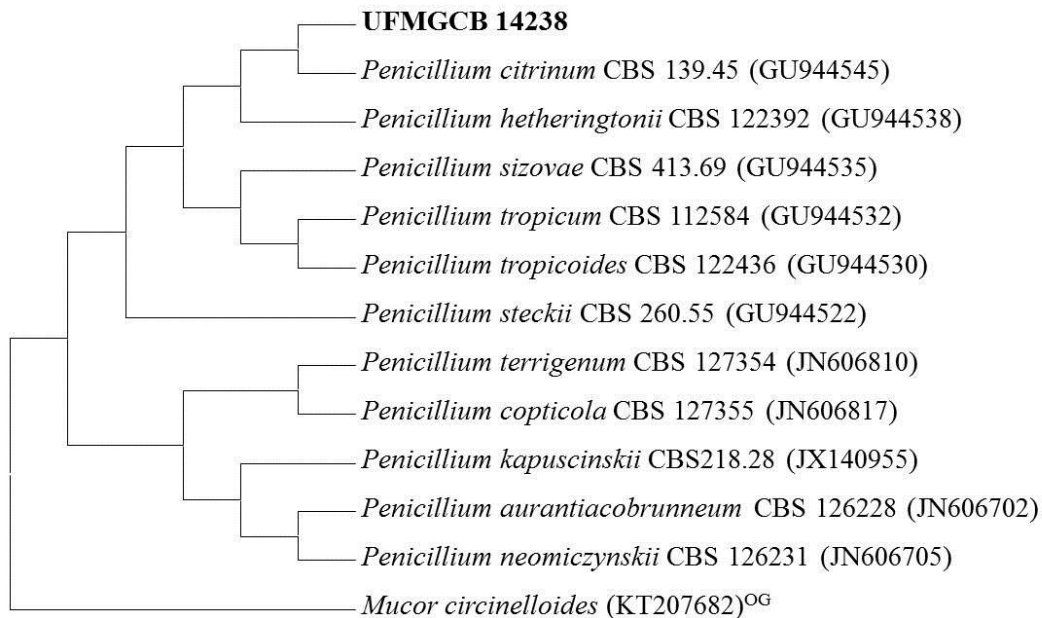


(f)

5 **Figura 5.** Análise filogenética das sequências de fungos (em negrito) obtidos a partir de amostras de solo da Ilha *Deception* em comparação com as sequências tipo das espécies mais próximas após a análise no BLASTn, depositadas na base de dados GenBank. As árvores (a – f) foram construídas com base nas sequências da região ITS por meio do parâmetro composto máximo de *Likelihood*. As sequências de *Mucor circinelloides* (NR126116) e *Aspergillus glaucus* (AY373887) foram utilizadas como grupo externo (OG).



(a)



(b)

5 **Figura 6.** Análise filogenética das sequências de fungos (em negrito) obtidos a partir de amostras de solo da Ilha *Deception* em comparação com as sequências tipo das espécies mais próximas após análise BLASTn, depositadas no banco de dados GenBank. As árvores (a – b) foram construídas com base nos fragmentos gênicos do gene da β -tubulina por meio do parâmetro composto máximo de *Likelihood*. As sequências de *Mucor circinelloides* (KT207682) e *Rhizopus stolonifer* (L47267) foram usadas como grupo externo (OG).

6.4. *Diversidade e ecologia da comunidade fúngica*

Os índices de diversidade (Fisher's α), riqueza (Margalef's) e dominância (Simpson's) para a comunidade total presentes nos solos amostrados sugerem baixa diversidade, riqueza e dominância (**Tabela 5**). Entretanto, ao comparar os índices de diversidade das diferentes assembleias entre três solos diferentes, pode-se notar uma variação na diversidade. No geral, as três diferentes amostras apresentaram baixas diversidades de espécie e uma dominância que variou de moderada (solo coletado a 100 °C) a elevada (solo coletado a 50°C). Em relação aos perfis de similaridade de Sorensen entre as assembleias dos três solos amostrados, aquela presente na amostra de solo a 50 °C foi mais similar à da do solo a 100 °C, enquanto ambas foram menos similares à comunidade de fungos da amostra de 0 °C (**Figura 7**).

Tabela 5. Índices de diversidade, riqueza e dominância das assembleias presentes nos três solos amostrados em *Fumarole bay*, Ilha *Deception*.

	Solo (° C)			
	0	50	100	Valor geral
Fisher's α	0,84	0,37	0,57	1,49
Margalef's	0,76	0,29	0,49	1,34
Simpson's	0.33	0.03	0.26	0.63

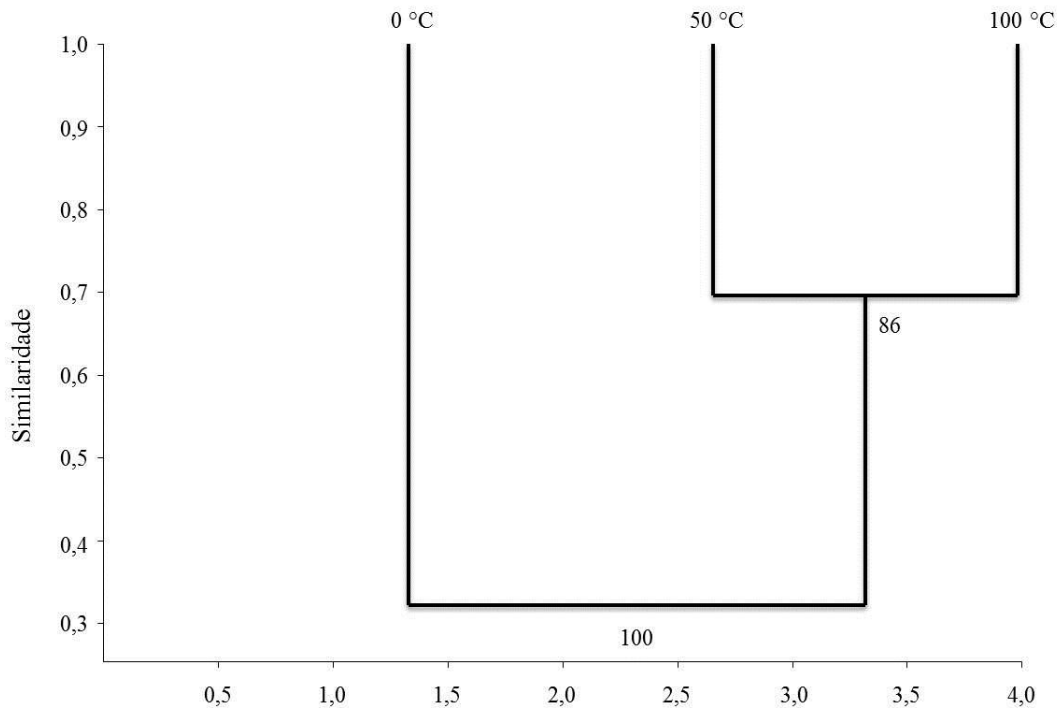


Figura 7. Dendrograma do perfil de similaridade de Sorensen entre as assembleias fúngicas dos três solos amostrados (0, 50 e 100 °C). Os resultados foram obtidos com um intervalo de confiança de 95% e os valores de bootstrap foram calculados a partir de 1.000 repetições.

5

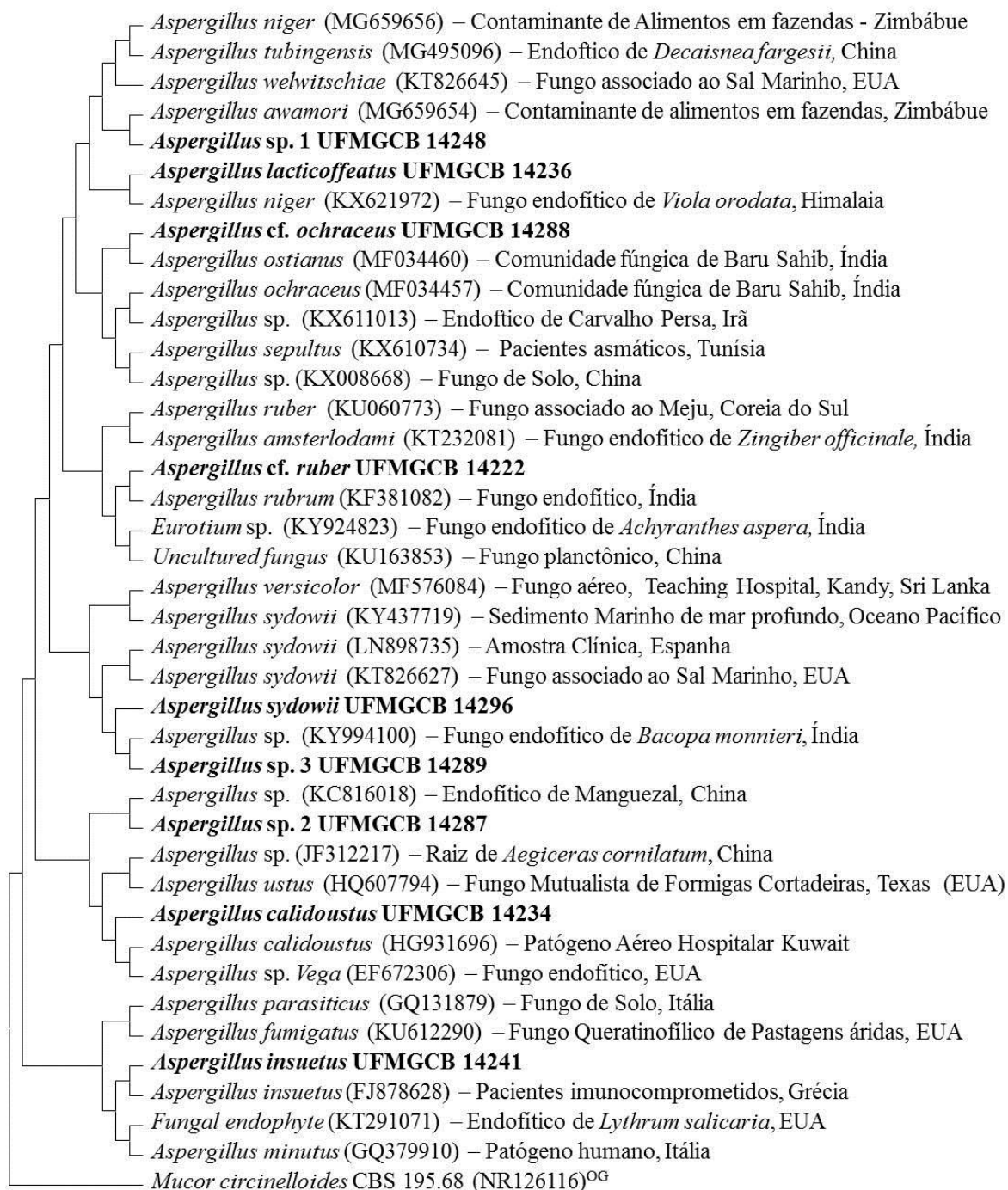
Em relação à ecologia da comunidade fúngica de *Fumarole Bay*, foi observado que a partir de comparações filogenéticas a comunidade é composta por táxons endêmicos e cosmopolitas. As sequências dos fungos obtidos dos três solos antárticos foram comparadas com sequências gerais das espécies mais próximas depositadas no programa Genbank

10 **(Figura 8)**. Com base nesta análise foi possível verificar que a maior parte dos isolados de *Aspergillus* forma um clado com amostras ambientais, especialmente relacionadas a fungos endofíticos. Contudo, dois isolados (UFMGCB 14234 e 14241) chamaram a atenção, uma vez que suas sequências se agruparam com sequências de fungos potencialmente patogênicos obtidos em ambiente hospitalar. *Aspergillus calidoustus* UFMGCB 14234 está

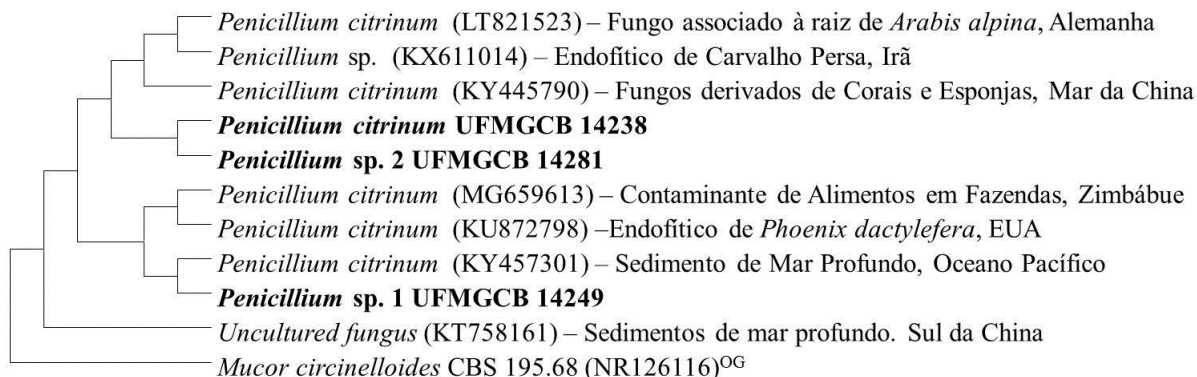
15 relacionado com *A. calidoustus* (HG931696) isolado como patógeno aéreo hospitalar no Kuwait. Já *Aspergillus insuetus* UFMGCB 14241 agrupou com *Aspergillus insuetus* (FJ878628) obtido a partir de um paciente imunocomprometido na Grécia. As espécies do gênero *Penicillium* apresentaram maior similaridade com sequências obtidas de amostras

ambientais e foram isolados como fungos marinhos e endofíticos. Por fim, *Purpureocillium sodanum* UFMGCB 14228 formou um grupo externo, quando comparado com as sequências gerais das espécies mais próximas depositadas no programa Genbank, o que pode sugerir que este isolado não está intimamente relacionado às espécies ambientais até então descritas.

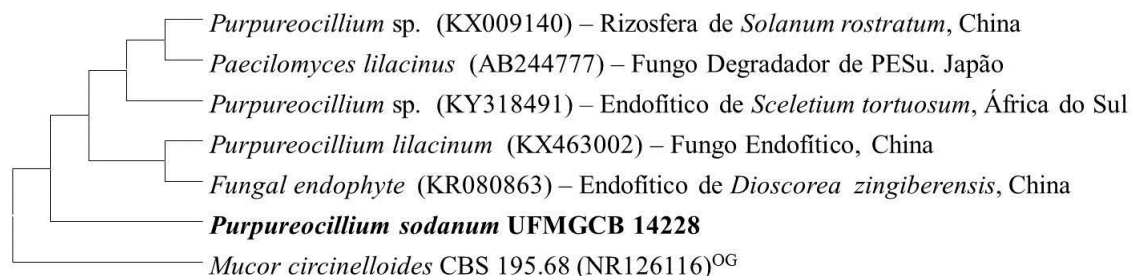
5



(a)



(b)



(c)

Figura 8. Análise filogenética das sequências de fungos cosmopolitas (em negrito) a partir de amostras de solo da Ilha *Deception* em comparação com as sequências gerais das espécies mais próximas após análise BLASTn, depositadas no banco de dados GenBank. As árvores (a – c) foram construídas com base nos fragmentos gênicos do gene da região ITS por meio do parâmetro composto máximo de *Likelihood*. A sequência de *Mucor circinelloides* (NR126116) foi utilizada como grupo externo (OG).

10 6.5. Avaliação do perfil de crescimento em diferentes temperaturas

6.5.1. Ensaio de gradiente de temperatura

Todos os isolados obtidos foram submetidos ao ensaio de gradiente de temperatura, que variou de 5 a 50 °C com o objetivo de determinar as temperaturas máxima e mínima nas quais os isolados são capazes de crescer (**Tabela 6**). Este ensaio permitiu classificar os fungos em organismos mesófilos (crescimento mínimo a 10 °C e máximo a 37 °C), daqueles psicrófilos (crescimento entre 5 e 25 °C), psicrotolerantes (crescimento até os 30 °C) e termotolerantes (capacidade de crescer a 50 °C). Além disso, este ensaio proporcionou a seleção dos fungos para ensaios fisiológicos subsequentes de resistência ao congelamento e altas temperaturas.

Os 23 isolados obtidos a partir da incubação a 10 °C foram capazes de crescer vigorosamente a 5 °C. Nove destes fungos apresentaram comportamento psicrófilo, com crescimento até 25 °C; Os demais apresentaram comportamento psicrotolerante, com crescimento até 30 °C. Dez isolados obtidos a partir da incubação a 25 °C apresentaram comportamento exclusivamente mesófilo, com crescimento entre 10 e 37 °C. A 10 °C o crescimento destes isolados se iniciou após o 7º dia de experimento, enquanto a 37 °C foi possível observar crescimento mais lento do que a 25 °C. Os 42 isolados obtidos a partir da incubação a 37 °C apresentaram comportamento majoritariamente mesófilo, com crescimento entre os 10 e 37 °C, exceto sete isolados de *Aspergillus*, que apresentaram comportamento termotolerante. Destes isolados, apenas um não foi capaz de crescer a 10 °C enquanto os demais apresentaram crescimento limitado.

Tabela 6. Perfil de crescimento dos fungos em diferentes temperaturas de incubação.

Isolados obtidos a partir de amostras de solo sem tratamento térmico			Temperaturas (°C)							
Táxon	Código (UFMGCB ^a)	Perfil de crescimento	5	10	15	20	25	30	37	50
<i>Leohumicola</i> sp.	14275 ^b	Psicrófilo	+	+	+	+				
<i>Leohumicola</i> sp.	14279 ^b		+	+	+	+				
<i>Leohumicola</i> sp.	14258 ^b		+	+	+	+	+			
<i>Mortierella parvispora</i>	14264 ^b		+	+	+	+				
<i>Mortierella parvispora</i>	14268 ^b		+	+	+	+	+			
<i>Pseudogymnoascus</i> cf. <i>destructans</i>	14278 ^b		+	+	+	+				
<i>P. destructans</i>	14261 ^b		+	+	+	+	+			
<i>P. destructans</i>	14274 ^b		+	+	+	+	+			
<i>P. destructans</i>	14276 ^b		+	+	+	+	+			
<i>P. destructans</i>	14260 ^b	Psicrotolerante	+	+	+	+	+	+		
<i>P. destructans</i>	14265 ^b		+	+	+	+	+	+		
<i>P. destructans</i>	14266 ^b		+	+	+	+	+	+		
<i>P. destructans</i>	14269 ^b		+	+	+	+	+	+		
<i>P. destructans</i>	14270 ^b		+	+	+	+	+	+		
<i>P. destructans</i>	14272 ^b		+	+	+	+	+	+		
<i>P. destructans</i>	14273 ^b		+	+	+	+	+	+		
<i>P. destructans</i>	14277 ^b		+	+	+	+	+	+		
<i>Aspergillus</i> cf. <i>ruber</i>	14222 ^c	Mesófilo		+	+	+	+	+	+	
<i>Aspergillus calidoustus</i>	14227 ^d				+	+	+	+	+	
<i>A. calidoustus</i>	14229 ^d			+	+	+	+	+	+	

<i>A. calidoustus</i>	14230 ^d		+	+	+	+	+	+
<i>A. calidoustus</i>	14231 ^d		+	+	+	+	+	+
<i>A. calidoustus</i>	14244 ^d		+	+	+	+	+	+
<i>A. calidoustus</i>	14245 ^d		+	+	+	+	+	+
<i>A. calidoustus</i>	14246 ^d		+	+	+	+	+	+
<i>A. calidoustus</i>	14247 ^d		+	+	+	+	+	+
<i>A. calidoustus</i>	14250 ^d		+	+	+	+	+	+
<i>A. calidoustus</i>	14252 ^d		+	+	+	+	+	+
<i>A. calidoustus</i>	14253 ^d		+	+	+	+	+	+
<i>A. calidoutus</i>	14224 ^c		+	+	+	+	+	+
<i>Aspergillus</i> sp. 2	14280 ^d		+	+	+	+	+	+
<i>Aspergillus</i> sp. 2	14283 ^d		+	+	+	+	+	+
<i>Aspergillus</i> sp. 2	14284 ^d		+	+	+	+	+	+
<i>Aspergillus sydowii</i>	14282 ^d			+	+	+	+	+
<i>Incertae sedis</i>	14223 ^c		+	+	+	+	+	+
<i>Incertae sedis</i>	14251 ^d			+	+	+	+	+
<i>Penicillium</i> sp. 1	14239 ^c		+	+	+	+	+	+
<i>Penicillium</i> sp. 1	14240 ^c		+	+	+	+	+	+
<i>Penicillium</i> sp. 1	14249 ^d		+	+	+	+	+	+
<i>Penicillium</i> sp. 2	14281 ^d		+	+	+	+	+	+
<i>Purpureocillium sodanum</i>	14228 ^d		+	+	+	+	+	+
<i>Aspergillus</i> sp. 1	14248 ^d	Termotolerante	+	+	+	+	+	+
<i>Aspergillus</i> sp. 1	14285 ^d			+	+	+	+	+
Isolados obtidos a partir de amostras de solo com tratamento térmico								
<i>P. destructans</i>	14257 ^b	Psicrotolerante	+	+	+	+	+	+
<i>P. destructans</i>	14259 ^b		+	+	+	+	+	+
<i>P. destructans</i>	14262 ^b		+	+	+	+	+	+
<i>P. destructans</i>	14263 ^b		+	+	+	+	+	+
<i>P. destructans</i>	14267 ^b		+	+	+	+	+	+
<i>P. destructans</i>	14271 ^b		+	+	+	+	+	+
<i>A. calidoustus</i>	14232 ^d	Mesófilos	+	+	+	+	+	+
<i>A. calidoustus</i>	14233 ^d		+	+	+	+	+	+
<i>A. calidoustus</i>	14234 ^d		+	+	+	+	+	+
<i>A. calidoustus</i>	14256 ^d		+	+	+	+	+	+
<i>A. calidoutus</i>	14226 ^c		+	+	+	+	+	+
<i>A. calidoutus</i>	14242 ^c		+	+	+	+	+	+
<i>A. calidoutus</i>	14243 ^c		+	+	+	+	+	+
<i>A. insuetus</i>	14241 ^c		+	+	+	+	+	+
<i>Aspergillus</i> cf. <i>ochraceus</i>	14288 ^d			+	+	+	+	+
<i>Aspergillus sidowii</i>	14292 ^d			+	+	+	+	+
<i>Aspergillus sidowii</i>	14296 ^d			+	+	+	+	+
<i>Aspergillus</i> sp. 2	14287 ^d			+	+	+	+	+
<i>Aspergillus</i> sp. 2	14290 ^d			+	+	+	+	+

<i>Aspergillus</i> sp. 2	14286 ^d		+	+	+	+	+	+
<i>Aspergillus</i> sp. 2	14291 ^d		+	+	+	+	+	+
<i>Aspergillus</i> sp. 2	14293 ^d		+	+	+	+	+	+
<i>Aspergillus</i> sp. 3	14289 ^d			+	+	+	+	+
<i>Incertae sedis</i>	14254 ^d		+	+	+	+	+	+
<i>Penicillium citrinun</i>	14225 ^c		+	+	+	+	+	+
<i>Penicillium citrinun</i>	14237 ^d			+	+	+	+	+
<i>Penicillium citrinun</i>	14238 ^d			+	+	+	+	+
<i>Aspergillus lacticoffeatus</i>	14235 ^d	Termotolerante	+	+	+	+	+	+
<i>Aspergillus lacticoffeatus</i>	14236 ^d		+	+	+	+	+	+
<i>Aspergillus</i> sp. 1	14255 ^d		+	+	+	+	+	+
<i>Aspergillus</i> sp. 1	14294 ^d		+	+	+	+	+	+
<i>Aspergillus</i> sp. 1	14295 ^d		+	+	+	+	+	+

^aUFMGCB, Cultura de Micro-organismos e Células da Universidade Federal de Minas Gerais.

^bIsolados Obtidos em temperatura de incubação de 10 °C. ^cIsolados Obtidos em temperatura de incubação de 25 °C. ^dIsolados Obtidos em temperatura de incubação de 37 °C.

5 6.5.2. Determinação da capacidade de sobrevivência ao congelamento

Todos os isolados que apresentaram perfil psicrotolerante (crescimento até 30 °C) ou psicrófilo (crescimento até 25°C) foram submetidos ao ensaio de detecção da capacidade de sobrevivência ao congelamento a -70 °C. Vinte três isolados foram avaliados, dos quais 18 identificados como *Pseudogymnoascus* cf. *destructans*, dois como *Mortierella parvispora* e três do gênero *Leohumicola*. Ao fim do experimento, todos os isolados testados, incluindo o controle negativo, se mostraram capazes de crescer em todas as condições, mesmo naquelas onde foram expostos ao congelamento prolongado sem a presença de crioprotetores, pois retomaram o crescimento ao serem submetidos à condição normal de crescimento a 10 °C até 7 dias.

15

6.5.3. Avaliação do crescimento em altas temperaturas

Sete isolados capazes de crescer a 50 °C, dois *Aspergillus lacticoffeatus* e cinco *Aspergillus* sp., foram avaliados quanto ao crescimento a 50 °C por até sete dias (**Tabela 7**). Os sete isolados estudados apresentaram crescimento lento a 50 °C, porém os isolados *Aspergillus* sp. UFMGCB 14248 e 14285 demonstraram uma melhor tolerância a altas temperaturas, registrando micélios com, respectivamente, 8,60 e 7,06 mm de diâmetro após 7 dias.

20

Tabela 7. Avaliação da velocidade de crescimento dos fungos submetidos ao crescimento a 50 °C.

Táxons	Código UFMGCB^a	Tempo (dias)	Diâmetro do Micélio (mm)
<i>A. lacticoffeatus</i>	14235	3	5,77 (0,88)
		7	6,92 (0,38)
<i>A. lacticoffeatus</i>	14236	3	5,30 (0,31)
		7	6,17 (0,32)
<i>Aspergillus</i> sp. 1	14248	3	4,24 (0,34)
		7	8,60 (2,57)
<i>Aspergillus</i> sp. 1	14255	3	5,96 (0,39)
		7	Sem alt. ^c
<i>Aspergillus</i> sp. 1	14285	3	4,87 (0,31)
		7	7,06 (0,95)
<i>Aspergillus</i> sp. 1	14294	3	4,31 (0,15)
		7	5,63 (0,14)
<i>Aspergillus</i> sp. 1	14295	3	5,90 (0,96)
		7	Sem alt. ^c
<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	Controle Negativo ^d	3	3,00 (0,00)
		7	Sem alt. ^c

5 ^a UFMGCB, Coleção de micro-organismos e células da Universidade Federal de Minas Gerais; ^b Desvio Padrão; ^c Sem alteração; ^d Controle Negativo: *Cladosporium sphaerospermum* CCT 1740.

7. DISCUSSÃO

7.1. Isolamento e cultivo dos fungos

Todos os meios de cultura utilizados para isolar os fungos apresentaram resultados semelhantes, tanto para as amostras de solo que sofreram tratamento térmico durante o processamento, quanto as que não passaram por um tratamento anterior ao isolamento. O meio DRBC foi o mais eficiente para isolamento dos fungos sem tratamento térmico. Por outro lado, o meio mínimo DSMZ-188 foi mais eficiente para o isolamento a partir de amostras com tratamento térmico, o que está de acordo com MAHESHWARI *et al.* (2000), que propuseram que o DSMZ-188 possui composição que atende as exigências nutricionais de fungos termotolerantes. Considerando os diferentes nutrientes oferecidos por cada meio de cultura utilizado, é possível que a comunidade fúngica isolada em *Fumarole Bay* não apresente exigências nutricionais elevadas, sendo capaz de utilizar de diferentes substratos para atender suas exigências metabólicas de crescimento.

A partir do isolamento dos fungos sem tratamento térmico foi obtida uma comunidade variada, composta por diferentes táxons psicrófilos, psicrotolerantes, mesófilos e termotolerantes. O gênero *Aspergillus* apresentou a maior densidade nas amostras de solo a 0, 50 e 100 °C. *Penicillium* apresentou densidade elevada nos solos a 0 e 50 °C, o que indica que as espécies obtidas não sejam tão resistentes quando comparadas aquelas obtidas de *Aspergillus*. *Purpureocillium* foi isolado exclusivamente na amostra de solo obtida a 100 °C, mas com baixa densidade.

Aspergillus compreende cerca de 260 espécies (GEISER *et al.*, 2007, SAMSON & VARGA, 2009). As espécies de *Aspergillus* estão entre as mais abundantes ao redor do mundo e não são seletivas em relação às condições abióticas de crescimento. Como exemplo, possuem a capacidade de crescer em um amplo espectro de temperaturas (6–55 °C), além de serem capazes de suportar baixos valores de umidade relativa (KRIJGSHELD *et al.*, 2012).

Penicillium é considerado cosmopolita e encontrado em diferentes substratos (McRAE *et al.*, 1999). A presença de dois táxons de *Penicillium* nas amostras de solo que não sofreram tratamento térmico durante o processamento, assim como suas contagens elevadas, podem estar relacionadas à sua capacidade de produção de esporos, com grande capacidade de dispersão (LACEY, 1996).

O gênero *Purpureocillium* foi obtido a partir da amostra de solo a 100 °C, na ausência de tratamento térmico e em temperatura de incubação de 37 °C, sendo representado pelo táxon *P. sodanum*. Apesar disso, seu comportamento mesofílico, com crescimento entre 10 e 37 °C, foi condizente com o que é proposto para organismos deste gênero (LUANGSA-ARD *et al.*, 2011).

A presença dos táxons *Aspergillus* e *Penicillium* em todas as amostras de solo, com densidades maiores nas amostras que não sofreram tratamento térmico, bem como a presença de espécies mesófilas em solos a 50 e 100 °C sugere que os isolados obtidos neste trabalho encontravam-se em formas de semi resistência de esporos. Esporos fúngicos já foram descritos como resistentes a temperaturas elevadas (PEAY *et al.*, 2009), tolerando a pasteurização de alimentos (PITT & HOCKING, 2009), e segundo PITT & CHRISTIAN (1970) ascósporos de fungos filamentosos são mais resistentes ao calor do que conidiósporos.

7.2. Identificação dos fungos

Apesar das condições extremas, os solos vulcânicos da Ilha *Deception* demonstram abrigar diferentes táxons de fungos com capacidades de crescimento em temperaturas variadas. Dentre os grupos apresentados, *Aspergillus* foi o gênero com o maior número de táxons neste trabalho, contabilizando 8 diferentes táxons, seguido por *Penicillium* com 3 taxons distintos. Os demais gêneros foram representados por um único táxon cada.

Espécies de *Aspergillus* já foram observadas em diferentes solos da Antártica (ARENZ *et al.*, 2014; GODINHO *et al.*, 2015; GERGINOVA *et al.*, 2016; DING *et al.*, 2016) e são capazes de utilizar uma grande variedade de substratos para se desenvolver, incluindo fezes de animais e tecidos humanos, no entanto eles são predominantemente encontrados em substratos vegetais (BENNETT, 2010).

Na Antártica, espécies de *Penicillium* já foram descritas em substratos, tais como *permafrost* (ZUCCONI *et al.*, 2012), solos continentais oligotróficos (GODINHO *et al.*, 2015), solos e rizosfera de *Deschampsia antarctica* (GONÇALVES *et al.*, 2015), solos ornitogênicos (SOUSA *et al.*, 2017), associados a macroalgas (FURBINO *et al.*, 2017), dentre outros. Gonçalves *et al.* (2015) identificaram quatro diferentes espécies de *Penicillium* a partir de rochas do Continente Antártico (*Penicillium* cf. *coffae*, *P.*

chrysogenum, *P. tardochrysogenum* e *P. citrinum*), sendo o gênero com a maior densidade presentes neste substrato.

O gênero *Purpureocillium* foi descrito em 2011 (LUANGSA-ARD *et al.*, 2011), a partir da renomeação da espécie *Paecilomyces lilacinus*, um fungo cosmopolita, sapróbio, comumente isolado do solo, vegetação em decomposição, insetos, nematódeos, além de causador de infecção cutânea em pacientes imunosuprimidos e outros vertebrados (LUANGSA-ARD *et al.*, 2011). Fenotipicamente, *Paecilomyces* sensu stricto (s. Str.) (*P. variotii*) pode ser diferenciado do *Purpureocillium* pelo seu rápido crescimento em meios com ágar (LUANGSA-ARD *et al.*, 2011). Espécies pertencentes à *Paecilomyces* "stricto sensu" possuem elevadas temperaturas de crescimento ótima e máxima (30-45 °C) em comparação com *Purpureocillium* (25-33 °C). Na Antártica, representantes do gênero já foram descritas em solos (GONÇALVES *et al.*, 2015) e oceanos (GONÇALVES *et al.*, 2017), representados pelo táxon *P. lilacinus*. Até o presente momento, *P. sodanum* foi descrito em apenas um trabalho, a partir de uma amostra de solo do Irã, não havendo mais informações sobre a espécie (HYDE *et al.*, 2016).

Leohumicola sp., *Mortierella parvispora* e *Pseudogymnoascus* cf. *destructans* são considerados psicrófilos, segundo definição dada por Ruisi *et al.* (2007). *Leohumicola* descrito por Hambleton *et al.* (2005), e compreende as espécies *L. verrucosa*, *L. minima*, *L. terminalis* e *L. lenta*, onde *L. verrucosa* a espécie tipo. Em 2008, Nguyen & Seifert adicionaram três novas espécies ao gênero (*L. levissima*, *L. atra* e *L. incrustata*), originárias da África do Sul e Estados Unidos. As espécies de *Leohumicola* produzem conídios de duas células, com uma célula terminal redonda, elipsoidal, marrom escura e lisa, e uma célula basal em formato de copo ou cilíndrica, com uma coloração entre hialina e marrom pálida (CHEN *et al.*, 2009). Várias espécies conhecidas de *Leohumicola* estão associadas a ecossistemas queimados, especialmente no cultivo comercial de mirtilo, e foram isoladas a partir do tratamento térmico de suspensões de solo ou de raízes esterilizadas superficialmente, de plantas do grupo das ericáceas (NGUYEN & SEIFERT 2008). A espécie *L. minima* já foi obtida de amostras de cinzas vulcânicas no Chile (HAMBLETON *et al.*, 2005). Espécies do gênero *Leohumicola* não foram identificadas na Antártica até o momento, o que reforça a suspeita de que o isolado UFMGCB 14258, identificado como *Leohumicola* sp., represente uma espécie nova.

Mortierella é um gênero que possui cerca de 85 espécies descritas, ocorrendo em diferentes tipos de substratos (KIRK *et al.*, 2008). Na Antártica, espécies de *Mortierella* já foram obtidas a partir de substratos diversos, tais como solos (BRIDGE e NEWSHAM, 2009), lagos (GOLÇALVES *et al.*, 2012), associado a macroalgas (GODINHO *et al.*, 2013), musgos (MELO *et al.*, 2014), líquens (SANTIAGO *et al.*, 2015) e plantas endêmicas (GONÇALVES *et al.*, 2015). Entre as espécies de *Mortierella* já identificadas na Antártica, *Mortierella antarctica* possui a capacidade de crescer e esporular a 0 °C, uma vez que produz ácidos graxos insaturados (ácido linoleico e araquidônico) que permitem manter o metabolismo ativo em baixas temperaturas (ONOFRI *et al.*, 2004).

O gênero *Pseudogymnoascus* já foi isolado a partir de diferentes substratos na Antártica, tais como solos (GODINHO *et al.*, 2015; GONÇALVES *et al.*, 2015), associados a macroalgas (LOQUE *et al.*, 2010; FURBINO *et al.*, 2014), sedimentos de lagos (GONÇALVES *et al.*, 2015) na liquenosfera (SANTIAGO *et al.*, 2016), como endofíticos (GONÇALVES *et al.*, 2015), e diversos outros substratos. Espécies de *Pseudogymnoascus* parecem ter a capacidade de colonizar e utilizar diferentes fontes de carbono e são abundantes em ecossistemas frios (ARENZ, 2011). Embora sejam abundantes em ambientes de temperaturas mais baixas e tenham, em grande parte, um comportamento psicrófilo ou psicrotoletrante, a espécie *P. destructans* já foi descrita como patogênica para populações de morcegos em regiões temperadas da América do Norte e Europa, causando a síndrome do nariz branco (LORCH *et al.*, 2011). Isso ocorre durante o período de hibernação, quando o sistema imunológico dos morcegos diminui, reduzindo sua temperatura corporal e tornando-os vulneráveis à infecção por *P. destructans* (LANGWIG *et al.*, 2015). Apesar disso, até o momento não há nenhuma informação sobre o potencial de virulência dos isolados de *P. destructans* frente aos animais da Antártica.

25

7.3. Diversidade e ecologia da comunidade fúngica

O continente antártico é conhecido por ser distante e inóspito, com o clima mais frio e seco do planeta (RUISI *et al.*, 2007). Por outro lado, a Ilha *Deception* é o vulcão da Península Antártica com temperaturas dos solos que podem chegar a 100 °C (SMELLIE, 2001). A baixa diversidade e riqueza de fungos no solo analisado neste trabalho

30

provavelmente são reflexos do ambiente extremo ao qual os fungos estão expostos e as mudanças abruptas de temperaturas em curtos períodos de tempo.

Quando comparamos os índices de diversidade obtidos neste estudo com outros trabalhos realizados na região, é possível verificar que estes índices são semelhantes aos apresentados nos solos oligotróficos do continente antártico (GODINHO *et al.*, 2015) e ao solo das ilhas Rei George, Nelson e Robert (GOMES *et al.*, 2018), sugerindo que as populações de fungos em solos na península e no continente é baixa quando comparados a outros substratos, tais como macroalgas (GODINHO *et al.*, 2013) e à líquenosfera de líquens terrestres presentes nas ilhas *Deception*, Elefante e Rei George (SANTIAGO *et al.*, 2015).

Segundo ZUCCONI *et al.* (1996), a maioria dos fungos antárticos consiste em ecotipos de espécies cosmopolitas que mostram um comportamento mesófilo-psicrotolerante como adaptação ao clima frio antártico. Já a presença de espécies indígenas é evidenciada pela observação de um grande número de isolados, ao longo do tempo, comumente registrados na Antártica, a partir de diferentes locais e substratos (ONOFRI *et al.*, 2007). Desta maneira, durante este trabalho, foi identificada uma abundância maior de espécies cosmopolitas, representadas majoritariamente pelo gênero *Aspergillus*, enquanto as espécies *M. parvispora* e *P. cf. destructans* representam táxons indígenas da Antártica, apresentando um menor número de isolados.

A atividade humana na Península Antártica, em especial na ilha *Deception*, associada à sua posição geográfica e potencial influência do aquecimento global (COOK & VAUGHAN, 2010) são fatores que tem gerado impactos ambientais consideráveis no que se refere à biodiversidade local (CAMPOS *et al.*, 2013). Nos últimos anos, diferentes trabalhos têm focado no efeito e impacto de espécies invasoras na Península Antártica (FRENOT *et al.*, 2005; KERRY & RIDDLE, 2009; TIN *et al.*, 2009; COWAN *et al.*, 2011; HUGHES & CONVEY, 2012; CHOWN *et al.*, 2012; HUGHES *et al.*, 2015). Independente da origem das espécies invasoras, ou a maneira como elas estão sendo carregadas às ilhas Antárticas, as consequências para as espécies nativas podem incluir o aumento ou diminuição de suas populações, mudanças nos padrões de distribuição na região, mudanças nos índices de diversidade e risco de extinção (CAMPOS *et al.*, 2013).

Dentre os táxons identificados nos solos de *Fumarole Bay*, Ilha *Deception*, dois chamam a atenção por terem sido descritos como isolados potencialmente patogênicos.

Aspegillus calidoutus UFMGCB 14234 e 14252 foram obtidos com densidades elevadas nas amostras a 100 e 50 °C, respectivamente. *Aspegillus calidoutus* foi caracterizado a partir de uma série de casos clínicos em diversas partes do mundo, tendo como holótipo o isolado CBS 121601T (677), obtido a partir de lavado de fluido brônquio-alveolar, provocando aspergilose pulmonar invasiva em um paciente de Nijmegen, Países Baixos (VARGA *et al.*, 2008). O outro táxon que chama a atenção é *Aspegillus insuetus* UFMGCB 14241, fungo pertencente ao grupo *Aspegillus* seção *usti*. Este fungo é considerado um fungo ambiental e foi originalmente descrito por Thom & Chuch (1926), embora já tenha sido relatado como espécie oportunista (HOUBRAKEN *et al.*, 2008; ALANIO *et al.*, 2011). Embora não seja a primeira vez que fungos oportunistas, capazes de crescer em temperaturas de 37 °C, tenham sido reportados na Antártica (GONÇALVES *et al.*, 2017; SOUSA *et al.*, 2017), a presença dos táxons como *A. calidoustus* e *A. insuetus* nos solos da Ilha *Deception* pode significar um risco em potencial de infecções aos turistas da ilha e deve ser levado em consideração.

15

7.4. Avaliação do perfil de crescimento em diferentes temperaturas

7.4.1. Determinação da capacidade de sobrevivência ao congelamento

Após a avaliação do perfil de crescimento em diferentes temperaturas, os táxons *Leohumicola* sp. (2 isolados), *M. parvispora* (3 isolados) e *P. cf. destructans* (18 isolados) permaneceram viáveis após 30 dias congelados a -70 °C, na ausência de crioprotetores conhecidos. Para sobreviver ao congelamento, organismos presentes no solo devem apresentar características fisiológicas, que possibilitem a preservação das membranas celulares, inibindo a formação de cristais de gelo, tais como açúcares crioprotetores e polióis (ANCHORDOGUY *et al.*, 1987; SANTARIUS, 1992; VOLK *et al.*, 2006), ácidos graxos, proteínas anticongelantes ou enzimas frio-ativas (ROBINSON, 2001). Desta forma, os organismos acima mencionados demonstraram ser capazes de produzir pelo menos uma destas substâncias em seu metabolismo, o que os torna bons candidatos para a busca de novas substâncias anticongelantes. Tendo em vista que os organismos estudados neste trabalho não são filogeneticamente próximos, este resultado nos permite supor que a capacidade dos diferentes indivíduos em contornar o estresse criogênico sejam fruto de uma convergência adaptativa (CASTOE *et al.*, 2010) cujos diferentes organismos utilizam-se de

vias metabólicas e estratégias distintas para atingir um mesmo resultado (MAAYER *et al.*, 2014).

5 E importante salientar que o fungo *Cladosporium sphaerospermum* CCT 1740, utilizado como controle negativo, se mostrou capaz de sobreviver ao congelamento, não sendo, portanto, um isolado ideal para o fim proposto. A identificação e padronização de espécies fúngicas que não suportem o congelamento se fazem necessárias, visando validar os resultados deste experimento, bem como modificações no protocolo que permitam a quantificação das UFCs que permaneceram viáveis em cada situação testada.

10 Táxons pertencentes à *Mortierella* e *Pseudogymnoascus* já foram recuperados de solos antárticos e da península antártica em outros trabalhos (BRIDGE e NEWSHAM, 2009; GODINHO *et al.*, 2015; GONÇALVES *et al.*, 2015) bem como outros substratos (GODINHO *et al.*, 2013; MELO *et al.*, 2013; SANTIAGO *et al.*, 2015), e apresentam características que os permitem classificá-los como endêmicos da Antártica, sendo capazes de crescer em baixas temperaturas (RUISI *et al.*, 2007). Embora o mesmo não se aplique para as espécies descritas até o momento do gênero *Leohumicola*, os isolados obtidos na Ilha *Deception* também apresentaram um comportamento psicrófilo.

15 Os resultados demonstram a importância de estudos sobre espécies endêmicas da Antártica e que podem ser utilizadas na busca de metabólitos anticongelantes (MAAYER *et al.*, 2014). Pesquisas futuras poderão elucidar as vias metabólicas que estes organismos utilizam para contornar o estresse criogênico (KANDROR *et al.*, 2002; WILSON *et al.*, 2012; WU *et al.*, 2012; CELIK *et al.*, 2013).

7.4.2. Avaliação do crescimento em altas temperaturas

25 Dois isolados do táxon *A. lacticoffeatus* e cinco isolados do táxon *Aspergillus* sp. foram selecionados para a realização deste ensaio, uma vez que haviam demonstrado previamente a capacidade de crescer a 50 °C, sugerindo um comportamento termotolerante para estes organismos (MAHESHWARI *et al.*, 2000). A avaliação do crescimento em altas temperaturas permitiu confirmar os resultados obtidos previamente, possibilitando verificar a viabilidade dos isolados testados quando expostos em temperaturas consideradas elevadas para os organismos eucariotos (MAHESHWARI *et al.*, 2000), bem como comprovando a existência de organismos termotolerantes nos solos vulcânicos da Ilha *Deception*.

A presença de organismos termotolerantes na Ilha *Deception* é contrastante com o que é normalmente encontrado na península e no continente Antártico, uma comunidade geralmente composta por organismos psicotolerantes (RUISI *et al.*, 2007). A presença de termotolerantes nos três pontos de coletas sugere que a dinâmica populacional dos micro-organismos da ilha *Deception* é complexa, existindo a possibilidade destes organismos participarem ativamente dos ciclos bioquímicos da ilha, utilizando-se de diferentes substratos presentes nos solos vulcânicos e auxiliando na ciclagem da matéria orgânica, possibilitando a sucessão ecológica, quando as condições se mostram favoráveis (GARRET, 1951; NARA *et al.*, 2003, 2004). Além disso, a grande quantidade de esporos que estes isolados produzem pode ser uma forma de permitir que eles continuem colonizando a ilha, mesmo durante o inverno, uma vez que os esporos destes isolados parecem ser capazes de sobreviver ao congelamento e retomar o crescimento, quando as temperaturas do solo voltam a subir.

8. CONCLUSÕES

- Os solos analisados da Ilha *Deception* abrigam uma comunidade de fungos adaptados a diferentes temperaturas com predominância de táxons cosmopolitas;
- 5 • O gênero *Aspergillus* foi aquele com o maior número de táxons, o qual parece estar bem adaptado aos solos vulcânicos da Ilha *Deception* e suas constantes variações de temperatura;
- Entre a comunidade de micro-organismos cosmopolitas presentes neste trabalho, a presença de organismos potencialmente patogênicos, como algumas espécies de
10 *Aspergillus*, por exemplo, chama a atenção. Tendo em vista as condições adversas da Antártica e um aumento da exploração humana na Ilha *Deception*, a existência destes organismos pode significar um risco biológico àqueles que acessam a região, sendo algo a ser considerado por cientistas, turistas e exploradores no futuro;
- Além da comunidade cosmopolita, os solos da Ilha *Deception* parecem abrigar
15 também uma comunidade de fungos endêmicos, adaptados ao frio antártico. Estes organismos se mostraram altamente capazes de crescer em baixas temperaturas e suportar o congelamento por longos períodos, ocupando um nicho ecológico específico na ilha;
- Entre os organismos endêmicos identificados neste trabalho, a presença de três
20 isolados de uma nova espécie do gênero *Leohumicola*, obtidos a partir de um dos três pontos de coleta processados, demonstra a importância da Antártica e de suas ilhas para o descobrimento de novas espécies de micro-organismos, bem como para a busca e identificação de organismos com potencial para futuras aplicações biotecnológicas.
- 25 • Por fim, estudos mais aprofundados sobre a ecologia dos fungos presentes na Ilha *Deception*, bem como as variações populacionais ao longo de diferentes anos poderão elucidar o comportamento da comunidade fúngica e o quanto as constantes variações de temperatura na região afetam as populações destes micro-organismos.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANCHORDOGUY, T. J.; RUDOLPH A. S.; CARPENTER, J. F.; CROWE, J. H.; Modes of interaction of cryoprotectants with membrane phospholipids during freezing. *Cryobiology*, v. 24 (4), p. 324 – 331, 1987.
- 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. *Blanchette*, v. 43,(2), p. 308–315, 2011.
- AZMI, O. R. & SEPPELT, R. D. Fungi of the Windmill Islands, continental Antarctica. Effect of temperature, pH and culture media on the growth of selected microfungi. *Polar Biology*, v. 18, p. 128-134, 1997.
- BAKER, P. E.; MCREATH, I.; HARVEY, M. R.; ROOBOL, M. J. DAVIES, T. G. The geology of the South Shetland Islands: V. Volcanic evolution of *Deception* Island. *British Antarctic Survey Scientific Reports*, v. 78, p. 81, 1975.
- BATISTA, T. M.; MOREIRA, R. G.; HILÁRIO, H. O.; MORAIS, C. G.; FRANCO, G. R.; ROSA, L. H.; ROSA, C. A. Draft genome sequence of *Sugiyamaella xylanicola* UFMG-CM-Y1884T, a xylan-degrading yeast species isolated from rotting wood samples in Brazil. *Genomics Data*, p. 120-121, 2017.
- BECQUEVORT, S.; DUMONT, I.; TISON, J.-L.; LANNUZEL, D. SAUVÉE, M.-L.; CHOU, L.; SCHOEMANN, V. Biogeochemistry and microbial community composition in sea ice and underlying seawater off East Antarctica during early spring. *Polar Biology*, v. 32, p. 879-895, 2009.
- BENNETT, J. W. An overview of the genus *Aspergillus*. In: *Aspergillus: Molecular Biology and Genomics*. (Machida M, Gomi K, eds) Caizer Academic Press, Portland, p. 1–17, 2010.
- BRIZZIO, S.; TURCHETTI, B.; DE GARCIA, V.; LIBKIND, D.; BUZZINI, P.; VAN BROOCK, M. Extracellular enzymatic activities (EEA) of basidiomycetous yeasts

isolated from glacial and subglacial waters of northwest Patagonia (Argentina).
Canadian Journal of Microbiology, v. 53, p. 519-525, 2007.

BRIDGE, P. D.; NEWSHAM, K. K. Soil fungal community composition at Mars Oasis, a southern maritime Antarctic site, assessed by PCR amplification and cloning. Fungal Ecology, v. 2 (2), p. 66 – 74, 2009.

BRIDGE, P. D; SPOONER, B. M. Non-lichenized Antarctic fungi: transient visitors or members of a cryptic ecosystem? Fungal Ecology, v. 5, p. 381-394, 2012.

BROQUEN P.; LOBARTINI, J. C.; CANDAN, F.; FALBO, G. Allophane, aluminum, and organic matter accumulation across a bioclimatic sequence of volcanic ash soils of Argentina. Geoderma, v. 129, p. 167 – 177, 2005.

BRUNATI, M.; ROJAS, J. L.; SPONGA, F.; CICILIATO, I.; LOSI, D.; GÖTTLICH, E.; DE HOOG, S.; GENILLOUD, O.; MARINELLI, F. Diversity and pharmaceutical screening of fungi from benthic mats of Antarctic lakes. Marine Genomics, v. 2, p. 43-50, 2009.

CAMPOS, L. S.; BARBOZA, C. A. M. BASSOI, M.; BERNARDES, M.; BROMBERG, S.; CORBISIER, T. N.; FONTES, R. F. C.; GHELLER, P. F.; HAJDU, E.; KAWALL, H. G.; LANGE, P. K.; LANNA, A. M.; LAVRADO, H. P.; MONTEIRO, G. C. S.; MONTONE, R. S.; MORALES, T.; MOURA, R. B.; NAKAYAMA, C. R.; OACKES, T.; PARANHOS, R.; PASSOS, F. D. PETTI, M. A. V.; PELIZARRI, V. H.; REZENDE, C. E.; RODRIGUES, M. ROSA, L. H.; SECCHI, E.; TENEMBAUM, D. R.; VALENTIN, Y. Y. Environmental Processes, Biodiversity and Changes in Admiralty Bay, King George Island, Antarctica. Adaptation and Evolution in Marine Environments, v. 2, . 127 – 156, 2013.

CASTELLANI, A. A. Maintenance and Cultivation of the common pathogenic fungi of man in sterile distilled water. Further researches Jour. Trop. Med. Hyg, v. 70: p. 181-184, 1967.

- CASTOE, T. A.; KONING, A. P. J.; POLLOCK, D. D. Adaptive molecular convergences, Molecular evolution versus molecular phylogenetics. *Communicative & Integrative Biology*, p. 67 – 69, 2010.
- CELIK, Y.; DRORI, R.; PERTAYA-BRAUN, N.; ALTAN, A.; BARTON, T.; BARDOLEV, M.; GROISMAN, A. DAVIES, P. L. BRALAVSKY, I. Microfluidic experiments reveal that antifreeze proteins bound to ice crystals suffice to prevent their growth. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*, v.110(4), p. 1309–1314, 2013.
- CHEN, J.; MENG, Z.; CHEN, X.; YA-LI, L.; ZHANG, F.; DONG, X.; GUO, S. *Leohumicola*, a genus new to China. *Mycotaxon*, v. 108, p. 337 – 340, 2009.
- CHOWN, S. L.; LEE, J. E.; HUGHES, K. A.; BARNES, J.; BARRETT, P. J.; BERGSTROM, D. M.; CONVEY, P.; COWAN, D. A.; CROSBIE, K.; DYER, G.; FRENOT, Y.; GRANT, S. M.; HERR, D.; KENNICUTT, M. C.; LAMERS, M.; MURRAY, A.; POSSINGHAM, H. P.; REID, K.; RIDDLE, M. J.; RYAN, P. G.; SANSON, L.; SHAW, J. D.; SPARROW, M. D.; SUMMERHAYES, C.; TERAUDS, A.; WALL, D. H. Challenges to the future conservation of the Antarctic. *Science* 337:158–159, 2012.
- CONNELL, L.; REDMANC, R.; CRAIGA, S.; RODRIGUEZB, R. Distribution and abundance of fungi in the soils of Taylor Valley, Antarctica. *Soil Biology & Biochemistry*, v. 38, p. 3083-3094, 2006.
- COOK, A.J.; VAUGHAN, D.G. Overview of areal changes of the ice shelves on the Antarctic Peninsula over the past 50 years. *The Cryosphere*, v. 4 (1). p. 77-98, 2010.
- COWAN, D. A.; CHOWN, S. L.; CONVEY, P.; TUFFIN, M.; HUGHES, K. A.; POINTING, S.; VINCENT, W. F. Non-indigenous microorganisms in the Antarctic—assessing the risks. *Trends Microbiol* 19:540–548, 2011.
- D’AMICO, S.; CLAVERIE, P.; COLLINS, T.; GEORLETTE, D.; GRATIA, E.; HOYOUX, A.; MEUWIS, M. A.; FELLER, G.; GERDAY, C. Molecular basis of cold

- adaptation. *Philosophy Transactions Royal Society Biology Science*, v. 357, p. 917-925, 2002.
- DE MENEZES, G. C. A.; GODINHO, V. M.; PORTO, B. A.; GONÇALVES, V. N.; ROSA, L. H. . *Antarctomyces pellizariae* sp. nov.; a new, endemic, blue, snow resident psychrophilic ascomycete fungus from Antarctica. *Extremophiles* (Tokyo. Print), v. 21, p. 259-269, 2016.
- DECEPTION ISLAND, ANTARCTIC SPECIALLY MANAGED AREA, Volcanic Activity – disponível em: < <http://www.deceptionisland.aq/volcanic.php>>. Acesso em Setembro de 2016.
- DECEPTION ISLAND, ANTARCTIC SPECIALLY MANAGED AREA, Climate - disponível em: <www.deceptionisland.aq/climate.php>. Acesso em Setembro de 2016.
- DEL FRATE, G. & CARETTA, G. Fungi isolated from Antarctic material. *Polar Biology*, v. 11, p. 1-07, 1990.
- DUARTE, A.; PASSARINI, M.; PALLADINO, T.; Pellizzari, F.; CIPRO, C.; PUTZKE, J.; MONTONE, R.; PETRY, V.; ROSA, L. H.; SETTE, L. D. Yeasts from macroalgae and lichens that inhabit the South Shetland Islands, Antarctica. *Environmental Microbiology Reports*, p. 1-10, 2016.
- FISHER, R. A.; CORBET, A. S.; WILLIAMS, C. B. The Relation Between the Number of Species and the Number of Individuals in a Random Sample of an Animal Population. *Journal of Animal Ecology*, v. 12, p. 42 – 58, 1943.
- FRENOT, Y.; CHOWN, S. L.; WHINAM, J.; SELKIRK, P. M.; CONVEY, P.; SKOTNICKI, M.; BERGSTROM, D. M. Biological invasions in the Antarctic: extent, impacts and implications. *Biol Rev.* v. 80, p. 45–72, 2005.
- FURBINO, L. E.; GODINHO, V. M.; SANTIAGO, I. F.; PELLIZARI, F. M.; ALVES, T. M. A.; ZANI, C. L.; JUNIOR, P. A. S.; ROMANHA, A. J.; CARVALHO, A. G. O.; GIL, L. H. V. G.; ROSA, C. A.; MINNIS, A. M.; ROSA, L. H. Diversity Patterns,

- Ecology and Biological Activities of Fungal Communities Associated with the Endemic Macroalgae Across the Antarctic Peninsula. *Microbial Ecology*, v. 1, p. 1-12, 2014.
- FURBINO, L. E.; PELLIZZARI, F.; COLEPICOLO, P.; ROSA, C. A.; ROSA, L. H. . Isolation of fungi associated with macroalgae from maritime Antarctica and their production of agarolytic and carrageenolytic activities. *Polar Biology*, v. 1, p. 1 – 9, 2017.
- GEISER, D. M.; KLICH, M. A.; FRISVAD, J. C.; PETERSON, S. W.; VARGA J.; SAMSON R. A.. The current status of species recognition and identification in *Aspergillus*. *Studies in Mycology*, v. 59, p. 1–10, 2007
- GLASS, N. L.; DONALDSON, G. C. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 61(4), p. 1323 – 1330, 1995.
- GODINHO, V. M.; FURBINO, L. E.; SANTIAGO, I. F.; PELLIZZARI, F. M.; YOKOYA, N. S.; PUPO, D.; ALVES, T. M. A.; JUNIOR, P. A. S.; ROMANHA, A. J.; ZANI, C. L.; CANTRELL, C. L.; ROSA, C. A.; ROSA, L. H. Diversity and bioprospecting of fungal communities associated with endemic and cold-adapted macroalgae in Antarctica. *The ISME Journal (Print)*, v. 7, p. 1434-1451, 2013.
- GODINHO, V. M.; GONÇALVES, V. N.; SANTIAGO, I. F.; FIGUEREDO, H. M.; VITORELI, G. A.; SCHAEFER, C. E. R.; BARBOSA, E. C.; OLIVEIRA, J. G.; ALVES, T. M. A.; ZANI, C. L.; SALES, P. A.; MURTA, S. M. F.; ROMANHA, A. J.; KROON, E. G.; CANTRELL, C. L.; WEDGE DE; DUKE, S. O.; ALI, A.; ROSA, C. A ; ROSA L.H. Diversity and bioprospection of fungal community present in oligotrophic soil of continental Antarctica. *Extremophiles (Tokyo. Print)*, v. 1, p. 1 – 10, 2015.
- GOMES, E. C.; GODINHO, V. M.; SILVA, D. A.; PAULA, M. T. R.; VITORELI, G. A.; ZANI, C. L.; ALVES, T. M. A.; JUNIOR; P. A. S.; MURTA, S. M. F.; BARBOSA, E.

- C.; OLIVEIRA, J. G.; OLIVEIRA, F. S.; CARVALHO, C. R.; FERREIRA, M. C.; ROSA, C. A.; ROSA, L. H. Cultivable fungi present in Antarctic soils: taxonomy, phylogeny, diversity, and bioprospecting of antiparasitic and herbicidal metabolites. *Extremophiles*, p. 1 – 13, 2018.
- GONÇALVES, V. N.; VAZ, A. B. M.; ROSA, C. A.; ROSA, L. H. Diversity and distribution of fungal communities in lakes of Antarctica. *FEMS Microbiology, Ecology (Print)*, v. 1, p. n/a-n/a, 2012.
- GONÇALVES, V. N.; CARVALHO, C. R.; JOHANN, S.; MENDES, G.; ALVES, T. M. A.; ZANI, C. L.; JUNIOR, P. A. S.; MURTA, S. M. F.; ROMANHA, A. J.; CANTRELL, C. L.; ROSA, C. A.; ROSA, L. H. Antibacterial, antifungal and antiprotozoal activities of fungal communities present in different substrates from Antarctica. *Polar Biology*, v. 38, p 1143 – 1152, 2015.
- GONÇALVES, V. N.; VITORELI, G. A.; DE MENEZES, G. C. A.; MENDES, C. R.; SECCHI, E. R.; ROSA, C. A.; ROSA, L. H. Taxonomy, phylogeny and ecology of cultivable fungi present in seawater gradients across the Northern Antarctica Peninsula. *Extremophiles*, v. 1, p. 1 – 10, 2017.
- GONZALEZ-CASADO, J. M.; LÓPEZ-MARTÍNES, J.; GINER, J.; GUMIEL, P. Análisis de la microfracturación en la Isla Decepción, Antártida Occidental. *Geogaceta*, v. 26, p. 27-30, 1999.
- GOOGLE MAPS. Localização da ilha *Deception*. Disponível em <<https://www.google.com.br/maps/place/Ilha+Decep%C3%A7%C3%A3o/@-62.9557498,-60.7644211,11z/data=!3m1!4b1!4m5!3m4!1s0xbc77305ea493cecb:0x31c3841136415bef!8m2!3d-62.9409297!4d-60.5553751?hl=pt-BR>>. Acesso em Janeiro de 2018.
- GUNDE-CIMERMAN, N.; SONJAK, S.; ZALAR, P.; FRISVAD, J. C.; DIDERICHTSEN, B.; PLEMENITAS, A. Extremophilic fungi in arctic ice: a relationship between

adaptation to low temperature and water activity. *Physics and Chemistry of the Earth*, v. 28, p. 1.273-1.278, 2003.

HAMBLETON, S.; NICKERSON, S. L.; SEIFERT, K. A. *Leohumicola*, a new genus of heat-resistant hyphomycetes. *Studies In Mycology*, v. 53, p. 29 – 52, 2005.

HAMMER, Ø.; HARPER, D. A. T.; RYAN, P. D. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica* , v. 4 (1), p. 9, 2001.

HAWKES, D. D. The geology of the South Shetland Islands. II. The geology and petrology of Deception Island. *Fulklund Islands Dependencies Scientific Reports*, No. 27, p. 43, 1961.

HOYOS, N.; COMERFORD, N. B. Land use and landscape effects on aggregate stability and total carbon of Andisols from the Colombian Andes. *Geoderma*, v. 129, p. 268 – 278, 2005.

HUGHES, K. A.; OTT, S.; BRIDGE, P.; CLARK, M. S. Tolerance of Antarctic soil fungi to hydrocarbons. *Science of The Total Environment*, v. 372, p. 539 – 548, 2006.

HUGHES, K. A.; CONVEY, P. Determining the native/non-native status of newly discovered terrestrial and freshwater species in Antarctica—current knowledge, methodology and management action. *J Environ Manag.* v. 93, p. 52–66, 2012.

HUGHES, K. A. , COWAN, D. A.; WILMOTTE, A. Protection of Antarctic microbial communities—‘out of sight, out of mind’. *Frontier Microbiology*, v.6, p.151, 2015.

HYDE, K. D.; HONGSANAN, S.; JEEWON, R.; BHAT, D. J.; MCKENZIE, E. H. C.; JONES, E. B. G.; PHOOKAMSAK, R.; ARIYAWANSA, H. A.; BOONMEE, S.; ZHAO, Q.; ABDEL-AZIZ, F. A.; ABDEL-WAHAB, M. A.; BANMAI, S.; CHOMNUNTI, P.; CUI, B. K.; DARANAGAMA, D. A.; DAS, K.; DAYARATHNE, M. C.; DE SILVA, N. L.; DISSANAYAKE, A. J.; DOILOM, M.; EKANAYAKA, A. H.; GIBERTONI, T. B.; GÓES-NETO, A.; HUANG, S. K.; JAYASIRI, S. C.;

JAYAWARDENA, R. S.; KONTA, S.; LEE, H. B.; LI, W. J.; LIN, C. G.; LIU, J. K.; LU, Y. Z.; LUO, Z. L.; MANAWASINGHE, I. S.; MANIMOHAN, P.; MAPOOK, A.; NISKANEN, T.; NORPHANPHOUN, C.; PAPIZADEH, M.; PERERA, R. H.; PHUKHAMSAKDA, C.; RICHTER, C.; DE SANTIAGO, A. L. C. M. A.; DRECHSLER-SANTOS, E. R.; SENANAYAKE, I. C.; TANAKA, K.; TENNAKOON, T. M. D. S.; THAMBUGALA, K. M.; TIAN, Q.; TIBPROMMA, S.; THONGBAI, B.; VIZZINI, A.; WANASINGHE, D. N.; WIJAYAWARDENE, N. N.; WU, H. X.; YANG, J.; ZENG, X.Y.; ZHANG, H.; ZHANG, J. F.; BULGAKOV, T. S.; CAMPORESI, E.; BAHKALI, A. H.; AMOOZEGAR, M. A.; ARAUJO-NETA, L. S.; AMMIRATI, J. F.; BAGHELA, A.; BHATT, R. P.; BOJANTCHEV, S.; BUYCK, B.; DA SILVA, G. A.; DE LIMA, C. L. F.; DE OLIVEIRA, R. J. V.; DE SOUZA, C. A. F.; DAI, Y. C.; DIMA, B.; DUONG, T. T.; ERCOLE, E.; MAFALDA-FREIRE, F.; GHOSH, A. ; HASHIMOTO, A.; KAMOLHAN, S.; KANG, J. C.; KARUNARATHNA, S. C.; KIRK, P. M.; KYTÖVUORI, I.; LANTIERI, A.; LIIMATAINEN, K.; LIU, Z. Y.; LIU, X. Z.; LÜCKING, R.; MEDARDI, G.; MORTIMER, P. E.; NGUYEN, T. T. T.; PROMPUTTHA, I.; RAJ, K. N. A.; RECK, M. A.; LUMYONG, S.; SHAHZADEH-FAZELI, S. A.; STADLER, M.; SOUDI, M. R.; SU, H. Y.; TAKAHASHI, T.; TANGTHIRASUNUN, N.; UNİYAL, P.; WANG, Y.; WEN, T. C.; XU, J. C.; ZHANG, Z. K.; ZHAO, Y. C.; ZHOU, J. Z.; ZHU, L.

Fungal diversity notes 367–491: taxonomic and phylogenetic contributions to fungal taxa. *Fungal Divers* v. 80, p. 1–270, 2016.

IAATO, International association Antarctica tour operators. *Tourism Statics* 2015. Disponível em <<http://iaato.org/tourism-statistics>>. Acesso em Janeiro de 2018.

INDEX FUNGORUM, FUNGAL DATABASE. Disponível em: <<http://www.indexfungorum.org/>>. Acesso em outubro de 2016.

KANDROR, O. A.; DELEON, A.; GOLDBERG, A. L. Trehalose synthesis is induced upon exposure of *Escherichia coli* to cold and is essential for viability at low temperatures. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*, v. 99, p. 9727–9732, 2002.

- KERRY, K.; RIDDLE, M. Health of Antarctic wildlife: a challenge for science and policy. Springer, London, 2009.
- KIRK, P. M.; CANNON, P. F.; MINTER, D. W.; STALPERS, J. A. Dictionary of the Fungi, Wallingford, UK, 2008.
- KOSTADINOVA, N.; KRUMOVA, E.; TOSI, S.; PASHOVA & ANGELOVA, M. Isolation and Identification of Filamentous Fungi from Island Livingston, Antarctica. Biotechnology & Biotechnological Equipment, v. 23:sup1, p. 267-270, 2009.
- KRIJGSHELD, P.; BLEICHRODT, R.; VELUW, G. J. V.; WANG, F.; MÜLLER, W.H.; DIJKSTERHUIS, J.; WÖSTEN, H. A. B. Development in *Aspergillus*. Studies in Mycology, v. 74, p. 1 – 29, 2013.
- KRISTJÁNSSON J.K & HREGGVIDSSON G.O. Ecology and habitats of extremophiles. World Journal of Microbiology and Biotechnology, v. 11, p. 17-25, 1995.
- LANGWIG, K. E.; FRICK, W. F.; REYNOLDS, R.; PARISE, K. L.; DREES, K. P.; HOYT, J. R ; CHENG, T. L.; KUNZ, T. H.; FOSTER, J. T. KILPATRICK, A. M. Host and pathogen ecology drive the seasonal dynamics of a fungal disease, white-nose syndrome, v. 282, p. n/a – n/a, 2015.
- LIECKEFELDT, E.; WIELAND, M.; BÖRNEER, T. Rapid identification and differentiation of yeasts organic matter: a comparison between *Rhizophora* and *Avicennia* soils in southeastern Brazil. Est. Coast. Shelf. Sci.; v. 40, p. 713-720, 1995.
- LOQUE, C. P.; MEDEIROS, A. O.; PELLIZZARI, F. M.; OLIVEIRA, E. C.; ROSA, C. A.; ROSA, L. H. Fungal community associated with marine macroalgae from Antarctica. Polar Biology, v. 33, p. 641-648, 2010.
- LORCH, J. M.; METEYER, C. U.; BEHR, M. J.; BOYLES, J. G.; CRYAN, P. M.; HICKS, A. C.; BALLMANN, A. E.; COLEMAN, J. T. H.; REDELL, D. N.; REEDER, D. M.; Blehert, D. S. Experimental infection of bats with *Geomyces destructans* causes white-nose syndrome. Nature, v. 480, p. 376-378, 2011.

- MAAYER, P.; ANDERSON, D.; CARY, C.; COWAN, D. A. Some like it cold: understanding the survival strategies of psychrophiles. *EMBO Reports*, v. 19, 2014.
- MAGAN N. Fungi in Extreme Environments. *Environmental and Microbial Relationships*, 2° edi.; *The Micota IV*. Springer-Verlag, Berlin, p. 85-100, 2007.
- MAHESHWARI, R.; BHARADWAJ, G.; BHAT, M. K. Thermophilic Fungi: Their Physiology and Enzymes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 64, p. 461–488, 2000.
- MALKUS, A.; CHANG, P. L.; ZUZGA, S. M.; CHUNG, K.; SHAO, J. CUNFER, B. M.; ARSENIUK, E.; UENG, P. P. RNA polymerase II gene (RPB2) encoding the second largest protein subunit in *Phaeosphaeria nodorum* and *P. avenaria*. *Mycological Research*, v. 110, p. 1152 – 1164, 2006.
- MARTI, J.; VILA, J.; REY, J. *Deception* Island (Bransfield Strait Antarctica): an example of a volcanic caldera developed by extensional tectonics. In MCGUIREW, J.; JONES, A. P.; NEUBERG, J. eds. *Volcano instability on the Earth and other planets*. Special Publication of the Geological Society, London, v. 110, p. 253-265, 1996.
- McRAE, C. F.; HOCKING, A. D.; SEPPELT, R. D. *Penicillium* species from terrestrial habitats in the Windmill Islands, East Antarctica, including a new species, *Penicillium antarcticum*. *Polar Biology*, v. 21, p. 97–111. 1999.
- MELO, I. S.; SANTOS, S. N.; ROSA L. H.; PARMA, M. M.; SILVA, L. J.; QUEIROZ, S. C. N.; PELLIZARI . Isolation and biological activities of an endophytic *Mortierella alpina* strain from the Antarctic moss *Schistidium antarctici*. *Extremophiles* (Tokyo. Print), v. 1, p. 1-10, 2013.
- MELO, I. S.; SANTOS, S. N ; ROSA, L. H.; PARMA, M. M.; SILVA, L. J.; QUEIROZ, S. C.; PELLIZARI, V. H. Isolation and biological activities of an endophytic *Mortierella alpina* strain from the Antarctic moss *Schistidium antarctici*. *Extremophiles*, v. 18, p. 15-23, 2014.

MORGAN-KISS, R. M.; PRISCU, J. C.; POCOCK, T.; GUDYNAITE-SAVITCH, L.; HUNER, N. P. A.; Adaptation and Acclimation of Photosynthetic Microorganisms to Permanently Cold Environments. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 70 (1), p. 222 – 252, 2006.

MYCOBANK DATABASE. Fungal Databases, Nomenclature & Species Banks, disponível em <<http://www.mycobank.org/>>. Acesso em setembro de 2016.

NCBI. Basic Local Alignment Search Tool, disponível em: <<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>>. Acesso em setembro de 2016.

NGUYEN, H. D. T.; SEIFERT, K. A. Description and DNA barcoding of three new species of *Leohumicola* from South Africa and the United States. *Persoonia*, v. 21, p. 57–69, 2008.

OARGA A. Life in extreme environments. *Revista de Biologia e Ciências da Terra*, v. 9, p. 1-10, 2009.

ONOFRI, S.; SELBMANN, L.; ZUCCONI, L.; PAGANO, S. Antarctic microfungi as models for exobiology. *Planetary and Space Science*, v. 52, p. 229 – 237, 2004.

ORHEIM, O. Volcanic activity on *Deception* Island, South Shetland Islands. In ADIE, R. J.; ed. *Antarctic geology and geophysics*. Oslo: Universitetsforlaget, v. 11, p. 7 – 120, 1972.

ORHEIM, O. A 200-year record of glacier mass balance at *Deception* Island, southwest Atlantic Ocean, and its bearing on models of global climate change. Institute of Polar Studies, Ohio State University, Report 42, p. 118, 1972.

PEARCE, D. A. Antarctic subglacial lake exploration: a new frontier in microbial ecology. *Journal of the International Society for Microbial Ecology*, v. 3, p. 877-880, 2009.

- PEAY, K. G.; GARBELOTTO, M.; BRUNS, T. D. Spore heat resistance plays an important role in disturbance-mediated assemblage shift of ectomycorrhizal fungi colonizing *Pinus muricata* seedlings. *Journal of Ecology*, v. 97, p. 537 – 547, 2009.
- PITT, J. I.; CHRISTIAN, H. B. Heat Resistance of Xerophilic Fungi Based on Microscopical Assessment of Spore Survival. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 20 (5), p. 682 – 686, 1970
- PITT, J. I.; HOCKING, A. D. The Ecology of Fungal Food Spoilage. *Fungi and Food Spoilage*, p. 3 – 9, 2009.
- PRIEUR D. An Extreme Environment on Earth: Deep-Sea Hydrothermal Vents Lessons for Exploration of Mars and Europa. In: GRGAUD M. *et al* (Eds), *Lectures in Astrobiology, Advances in Astrobiology and Biogeophysics v. 2*, p. 319-345, 2007.
- ROBINSON, C. H. Cold adaptation in Arctic and Antarctic fungi. *New Phytologist*, v. 151, p. 341-353, 2001.
- ROSA, L. H.; VAZ, A. B. M.; CALIGIORNE, R. B.; CAMPOLINA, S.; ROSA, C. A. Endophytic fungi associated with the Antarctic grass *Deschampsia antarctica* Desv. (*Poaceae*). *Polar Biology*, v 32, p. 161-167, 2009.
- ROSA, L. H.; VIEIRA, M. L. A.; SANTIAGO, I. F.; ROSA, C. A. Endophytic fungi community associated with the dicotyledonous plant *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. (*Caryophyllaceae*) in Antarctica. *Federation of European Microbiological Societies (FEMS) Microbiology Ecology*, v. 73, p.178-189, 2010.
- ROTHSCHILD, L. J. & MANCINELLI, R. L. Life in extreme environments. *Nature*, v. 409, p. 1092-1101, 2001.
- RUISI, S.; BARRECA, D.; SELBMANN, L.; ZUCCONI, L.; ONOFRI, S. Fungi in Antarctica. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, v. 6, p. 127-141, 2007.

- SAMSON, R. A.; VARGA, J. What is a species in *Aspergillus*? *Medical Mycology*, v. 47, p. S13–S20, 2009.
- SANTARIUS, K. A. Freezing of isolated thylakoid membranes in complex media. VIII. Differential cryoprotection by sucrose, proline and glycerol. *Physiologia Plantarum*, v. 84, p. 87 – 93, 1992.
- SANTIAGO, I. F.; ALVES, T. M. A.; RABELLO, A.; JUNIOR, P. A. S.; ROMANHA, A. J.; ZANI, C. L.; ROSA, C. A.; ROSA, L. H. . Leishmanicidal and antitumoral activities of endophytic fungi associated with the Antarctic angiosperms *Deschampsia antarctica* Desv. and *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl.. *Extremophiles* (Tokyo. Print), v. 16, p. 95-103, 2012.
- SANTIAGO, I. F. et al. Diversidade e bioprospecção de fungos associados a líquens presentes em ecossistemas extremos. Tese (Tese em Microbiologia) – UFMG. Belo Horizonte, 2016.
- SELBMANN, L.; TURCHETTI, B.; YURKOV, A.; CECCHINI, C.; ZUCCONI, L.; ISOLA, D.; BUZZINI, P.; ONOFRI, S. Description of *Taphrina antarctica* f.a. sp. nov., a new anamorphic ascomycetous yeast species associated with Antarctic endolithic microbial communities and transfer of four *Lalaria* species in the genus *Taphrina*. *Extremophiles*, v. 18 (4), p. 707 – 721, 2014.
- SILVA, L. J.; SOUZA, D. T.; GENUARIO, D. B.; HOYOS, H. A. V.; SANTOS, S. N.; ROSA, L. H.; ZUCCHI, T. D.; MELO, I. S. *Rhodococcus psychrotolerans* sp. nov.; isolated from rhizosphere of *Deschampsia antarctica*. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*, v. 1, p. 1 – 9, 2017.
- SINGH, S; MADLALA, A. M.; PRIOR, B. A. *Thermomyces lanuginosus*: properties of strains and their hemicellulases. *FEMS Microbiology Reviews* v. 27, p. 3-16, 2003.
- SHIVAJI, S. & PRASAD, G. S. Antarctic Yeasts: Biodiversity and Potential Applications. *Yeast Biotechnology: Diversity and Applications*. Satyanarayana, T. & Kunze, G. (eds.) v, 2009, p. 3-18, 2009.

- SMELLIE, J. L. . Deception Island. *In* DALZIEL, I. W. D.; *ed.* Tectonics of the Scotia arc, Antarctica. 28th International Geological Congress, Field Trip Guidebook T180. Washington, DC: American Geophysical Union, 146 – 152, 1989.
- SMELLIE, J. L. Graham Land and South Shetland Islands. Antarctic Research Series, v. 48, p. 303-312, 1990.
- SMELLIE, J. L.; LÓPEZ-MARTÍNEZ, J.; REY, J.; SERRANO, E. Geological and geomorphological maps of *Deception* Island, South Shetland Islands. *In* RICCI, C. A.; *ed.* The Antarctic region: geological evolution and processes. Siena: Terra Antarctica Publications, p. 1195-1198, 1997.
- SMELLIE J. L. ‘Lithostratigraphy and volcanic evolution of *Deception* Island, South Shetland Islands. Antarctic Science, v. 73 (2), p. 788-209, 2001.
- SOUSA, J. R. P.; GONÇALVES, V. N.; HOLANDA, R. A.; SANTOS, D. A.; COSTA, A. O.; PETRY, M. V.; ROSA, C. A ; ROSA, L. H. . Pathogenic potential of environmental resident fungi from ornithogenic soils of Antarctica. Fungal Biology, v. 1, p. 1-10, 2017.
- STCHIGEL, A. M.; CANO, J.; CORMACK, W. M.; GUARRO, J. Antarctomyces psychrotrophicus gen. et sp. nov., a new ascomycete from Antarctica. Mycological Research, v. 105 (3), p. 377 – 382. 2001.
- TAMURA K.; STECHER G.; PETERSON D. FILIPSKI A.; KUMAR S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 6.0. Molecular Biology and Evolution, v. 30 (12), p. 2725-2729, 2013.
- TEIXEIRA, L. C. R. S.; PEIXOTO, R. S.; CURY, J. C.; SUL, W. J.; PELLIZARI, V. H.; TIEDJE, J.; ROSADO, A. S. Bacterial diversity in rhizosphere soil from Antarctic vascular plants of Admiralty Bay, maritime Antarctica. International Society for Microbial Ecology, v. 4, p. 989-1001, 2010.

- TIN, T.; FLEMING, Z. L.; HUGHES, K. A.; AINLEY, D. G.; CONVEY, P.; MORENO, C. A.; PFEIFFER, S.; SCOTT, J.; SNAPE, I. Impacts of local human activities on the Antarctic environment. *Antarctic Science*, v. 21, p. 3–33
- TOSI, S.; ONOFRI, S.; BRUSONI, M.; ZUCCUNI, L.; VISHNIAC, H. Response of Antarctic soil fungal assemblages to experimental warming and reduction of UV radiation. *Polar Biology*, v. 28 (6), p. 470 – 482, 2005.
- VAN RANST, E.; DE CONNINCK, F. AND DEBAVEYE, J. Implication of Charge Properties and Chemical Management of Volcanic Ash Soils in West Cameroon. *Proceeding In 2nd African Soil Science Society Conference*, p. 255-264, 1993.
- VAN RANST, E.; UTAMI, S. R.; VERDOODT, A.; AND QAFOKU, N. P. Mineralogy of perudic Andosol in Central Java, Indonesia. *Geoderma*, v. 144, p. 379-386, 2008.
- VAN TRAPPEN, S.; VANDECANDELAERE, I.; MERGAERT, J.; SWINGS, J. *Flavobacterium fryxellicola* sp. nov. and *Flavobacterium psychrolimnae* sp. nov.; novel psychrophilic bacteria isolated from microbial mats in Antarctic lakes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 55, 769-772, 2005.
- VARGA, J.; HOUBRAKEN, J.; LEE, H. A. L. V. D.; VERWEIJ, P. E.; SAMSON, R. A. *Aspergillus calidoustus* sp. nov., Causative Agent of Human Infections Previously Assigned to *Aspergillus ustus*. *Eukaryotic Cell*, v. 7 (4), p. 630 – 638, 2008.
- VAZ, A. B. M.; ROSA L. H.; VIEIRA, M. L. A.; GARCIA, V.; BRANDÃO, L. R.; TEIXEIRA, L. C. R. S.; MOLINÉ, M.; LIBKIND, D.; MARIA, VAN B.; ROSA C. A. The diversity, extracellular enzymatic activities and photoprotective compounds of yeasts isolated in Antarctica. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2011.
- VISHNIAC, H. Yeast biodiversity in the Antarctic. *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts*, The Yeast Handbook, first edn, p. 419-440. Edited by C. A. Rosa & G. Peter. Heidelberg: Springer, 2006.

VOLK, G. M.; HARRIS, J. L.; ROTINDO, K. Survival of mint shoot tips after exposure to cryoprotectant solution components. *Cryobiology*, v. 52 (2), p. 305 – 308, 2006.

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

WIKIPÉDIA COMMONS. Localização da ilha *Deception*, disponível em <https://commons.wikimedia.org/wiki/File%3ADeception-Island-location-map.png>. Acesso em janeiro de 2018.

WILSON, S. L.; FRAZER, C.; CUMMING, B. F.; NUIN, P. A.; WALKER, V. K. Cross-tolerance between osmotic and freeze-thaw stress in microbial assemblages from temperate lakes. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 82 (2), p. 405 – 415, 2012.

WU, Z.; KAN F. W.; SHE, Y. M.; WALKER, V. K. Biofilm, ice recrystallization inhibition and freeze-thaw protection in an epiphyte community. *Applied Biochemistry and Microbiology*, v. 48, p. 363–370, 2012

WYNN-WILLIAMS D.D. Antarctic microbial diversity: the basis of polar ecosystem process. *Biodiv. Conservat*, v. 5, 1271–1293, 1996.

YUAN, G.; THENG, B. K. G.; PARFIT, R. L.; Percival, H. Interaction of allophane with humic acid and cations. *European Journal of Soil Science*, vol. 51, p. 35-41, 2000.

ZUCCONI, L.; SELBMANN, L.; BUZZINI, P.; TURCHETTI, B.; GUGLIELMIN, M.; FRISVAD, J. C.; ONOFRI, S. Searching for eukaryotic life preserved in Antarctic permafrost. *Polar Biology*, v. 35, (5), p. 749 – 757, 2012.