

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

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Avaliação do potencial patogênico *in vitro* de fungos presentes
em solos ornitogênicos da Antártica

JORDANA ROSA PAIVA DE SOUSA

BELO HORIZONTE, MG

2016

JORDANA ROSA PAIVA DE SOUSA

Avaliação do potencial patogênico *in vitro* de fungos presentes
em solos ornitogênicos da Antártica

Dissertação de mestrado apresentado ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de mestre.

Orientador: Luiz Henrique Rosa

Laboratório de Sistemática e Biomoléculas de Fungos

Departamento de Microbiologia/ICB

Universidade Federal de Minas Gerais

BELO HORIZONTE, MG

2016

Colaboradores:

Dra. Maria Virginia Petry

Laboratório de Ornitologia e Animais Marinhos

Universidade do Vale do Rio dos Sinos, São Leopoldo, Rio Grande do Sul.

Dr. Carlos Augusto Rosa

Dra. Susana Johann

Laboratório de Taxonomia, Biodiversidade e Biotecnologia de Leveduras

Instituto de Ciências Biológicas

Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus por me dar força e sabedoria nos momentos em que precisei, por me guiar, iluminar meus caminhos sempre.

Ao Dr. Luiz Rosa, por acreditar em mim, mais uma vez, e me oferecer essa oportunidade desafiadora. Obrigada também pela paciência que sempre teve comigo!

Ao Dr. Carlos Rosa e Dra. Susanna Johann pelo apoio e prontidão em ajudar sempre que preciso.

À Dra. Maria Virginia Petry, pela colaboração e coleta das amostras da Antártica.

Aos amigos do laboratório de Sistemática e Biomoléculas de Fungos (LSBF) juntamente com o Laboratório de Taxonomia, Biodiversidade e Biotecnologia de Fungos pelo companheirismo, ensinamentos e alegrias. Agradeço a todos aqueles que sempre estiveram prontos a me ajudar em qualquer dúvida que eu tivesse. Foi tudo muito importante para que eu conseguisse realizar esse trabalho.

A todos os funcionários do Departamento de Microbiologia.

A minha família, em especial minha mãe, que aguentou meus momentos de estresse, e sempre me deu muita força e compreensão. Obrigada pelo amor dedicado em todos os momentos.

Aos meus amigos externos ao laboratório, pelas palavras de motivação e momentos de descontração e alegria de sempre. Obrigada pelo apoio e tranquilidade passados nos momentos mais tensos.

Enfim, o apoio e a força vieram de todas as partes. Cada um tem uma grande parcela de contribuição na conclusão dessa etapa!

Obrigado a todos por tudo!

“Quem nunca errou, nunca experimentou algo novo.”

Albert Einstein

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	ix
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xiii
1. RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA.....	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
2.1. Ecossistemas antárticos.....	16
2.2. Fungos na Antártica.....	17
2.3. Solos ornitogênicos.....	18
2.3.1. Fungos presentes em solos ornitogênicos da Antártica.....	19
2.4. Fatores de virulência dos fungos para humanos.....	20
3. OBJETIVO GERAL.....	24
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	24
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	25
5.1. Área de estudo.....	25
5.2. Processamento das amostras.....	26
5.3. Isolamento e preservação dos fungos.....	27
5.4. Termotolerância.....	27
5.5. Identificação dos fungos.....	28
5.5.1. Extração de DNA.....	28
5.5.1.1. Leveduras.....	28
5.5.1.2. Fungos filamentosos.....	29
5.5.2. Obtenção de amplicons.....	30
5.5.2.1. Amplificação utilizando o iniciador (GTG) ₅	30
5.5.2.2. Amplificação utilizando os iniciadores NL1 e NL4.....	30
5.5.2.3. Amplificação utilizando os iniciadores ITS1 e ITS4.....	31
5.5.2.4. Amplificação do fragmento gênico da β -tubulina.....	31
5.5.2.5. Amplificação fragmento gênico da RNA polimerase II.....	32
5.5.3. Purificação dos produtos de PCR.....	32
5.5.4. Reação de sequenciamento e precipitação das amostras.....	33

5.5.5.	Análise computacional das sequências.....	33
5.6.	Determinação da similaridade entre as comunidades fúngicas.....	34
5.7.	Ensaio dos fatores de virulência.....	34
5.7.1.	Crescimento a 40 °C.....	34
5.7.2.	Atividade hemolítica.....	35
5.7.3.	Crescimento em meio YM com pHs diferentes.....	36
5.7.4.	Diâmetro dos esporos.....	36
5.7.5.	Produção de fosfolipase <i>in vitro</i>	36
5.7.6.	Teste de sensibilidade à anfotericina B.....	36
5.7.7.	Teste da Tinta Nanquim (Tinta da China) e cultivo em Ágar Niger.....	38
6.	RESULTADOS.....	39
6.1.	Isolamento, termotolerância, identificação e similaridade dos fungos	39
6.2.	Ensaio dos fatores de virulência.....	43
7.	DISCUSSÃO.....	48
8.	CONCLUSÕES.....	56
9.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Localização do Arquipélago *Shetland* do Sul e os locais de coleta..25
- Figura 2** Árvores filogenéticas das sequências de fungos obtidos de solos ornitogênicos da Antártica Marítima (em negrito), em comparação com sequências espécies tipo (T) e referências (R) depositadas no banco de dados do GenBank. As árvores foram construídas baseadas na região transcrita interna ITS da região gênica do rRNA por meio do parâmetro composto máximo de *Likelihood*.....42
- Figura 3** Dendograma ilustrando a similaridade de táxons (índice de Sorensen) entre as comunidades de fungos presentes nos diferentes tipos de solos ornitogênicos estudados. *M. giganteus* = *Macronectes giganteus* (petrel gigante do Sul), *P. papua* = *Pygoscellis papua* (pinguim gentoo), *P. atriceps* = *Pygoscellis atriceps* (biguá de olhos azuis) e *P. antarcticus* = *Pygoscellis antarcticus* (pinguim de barbicha).....43
- Figura 4** Halos de hemólise produzidos por fungos obtidos de solos ornitogênicos da Antártica. Isolados que apresentaram hemólise completa: (12) *Cryptococcus laurentii* UFMGCB Y5888; (13) *Cr. laurentii* UFMGCB Y5978; (14) *Cr. laurentii* Y5977; (16) *Cr. laurentii* UFMGCB Y5891; (12102) *Penicillium chrysogenum* UFMGCB 12102. Isolado que apresentou hemólise parcial: (11105) *P. chrysogenum* UFMGCB 11105.....44
- Figura 5** Leitura do teste de produção de fosfolipase *in vitro* por fungos isolados a partir de solos ornitogênicos da Antártica Marítima. Isolados positivos para produção de fosfolipase: (2) *Cryptococcus laurentii* UFMGCB ; (3) *Cr. laurentii* UFMGCB; (4) *Rhizopus oryzae* UFMGCB 11615; (5) *Eutypella* sp. UFMGCB 12173. Isolado negativo para a produção de fosfolipase: (1) *Rhodotorula mucilaginosa* UFMGCB Y382.....45

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** Localização dos pontos de coleta e espécie de ave relacionada a cada solo....26
- Tabela 2** Número de isolados obtidos após processamento das amostras de solos ornitogênicos e capacidade de crescer a 37 °C.....39
- Tabela 3** Identificação dos fungos presentes em solos ornitogênicos da Antártica.....40
- Tabela 4** Condições de cultivo e determinação dos fatores de virulência dos fungos presentes em solos ornitogênicos da Antártica Marítima.....46

LISTA DE ABREVIATURAS

ABI: Applied Biosystems – Sequenciador
ATCC: American Type Culture Collection
BDA: Ágar batata dextrosado
BLASTn: Nucleotide Basic Locus Alignment Search Tool
CIM ou MIC: Concentração inibitória mínima
CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute
CTAB: Brometo de cetil trimetilamônio
DG18: Ágar Dicloran-Glicerol
DMSO: Dimetilsulfóxido
DNA: Ácido desoxiribonucléico
dNTP: Desoxirribonucleotídeos fosfatados
D1/D2: Região da subunidade maior do rRNA
EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético
g: Grama
(GTG)₅, NL1 e NL4, ITS1 e ITS4 – Iniciadores
GYMP: Glucose-Yeast extract-Malt extract-fosfato de potássio
h: horas
HCl: Ácido clorídrico
Hi: Index Hemolítico
IAATO: International Association of Antarctica Tour Operators
ITS1-5.8S-ITS2: Região transcrita interna do gene do rRNA
Kg: Quilogramas
KH₂PO₄: Fosfato monopotássico
Km: Quilômetros
km²: Quilômetro quadrado
L: Litro
MgCl₂: Cloreto de magnésio
m²: Metro quadrado
µg: Microgramas
µL: Microlitros
µm: Micrômetros
mL: Mililitros
mm: Milímetros
mM: Milimolar
mol: Molar

µmol: Micromol

M27-A3: Método referência para testes de diluição em caldo para determinação da susceptibilidade a antifúngicos para leveduras

M38-A2: Método referência para testes de diluição em caldo para determinação da susceptibilidade a antifúngicos para fungos filamentosos

NaCl: Cloreto de sódio

NCBI: National Center for Biotechnology Information

NCCLS: National Committee for Clinical Laboratory Standards

ng: Nanograma

nm: Nanometro

PCR: Reação em cadeia da polimerase

pH: Potencial hidrogeniônico

pmol: Picomol

Pz: Atividade de fosfolipase

RPB2: Gene que codifica a segunda subunidade maior da enzima RNA Polimerase II

RNA: Ácido ribonucléico

r.p.m. :Rotações por minuto

RPMI: Meio de cultura com glutamina, sem bicarbonato e com indicador vermelho de fenol

rDNA:Ácido desoxirribonucleico ribossomal

rRNA: Ácido ribonucleico ribossomal

SDS: Sódio dodecil sulfato

TBE: Tris borato

TE: Tampão Tris-EDTA

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

UFC: Unidades formadoras de colônia

UFMG: Universidade federal de Minas Gerais

V: volume

v/v: Volume por volume

YM: Ágar extrato de malte-extrato de levedura

S: Latitude Sul

W: Longitude Oeste

%: Por cento

°C: Graus celsius

RESUMO

O continente Antártico é caracterizado pelo isolamento geográfico e climático, bem como pela pouca ou nenhuma influência antrópica. Considerado um continente extremófilo, a Antártica apresenta condições classificadas como limitantes para a vida animal e vegetal. Porém, os micro-organismos se destacam por apresentarem diferentes adaptações às condições adversas encontradas nos ecossistemas antárticos. Dentre os micro-organismos, os fungos apresentam destaque por sua elevada capacidade adaptativa às condições extremas. A distribuição de fungos na Antártica está relacionada com os diferentes substratos/habitats presentes na região. Os solos da Antártica são, em geral, oligotróficos, porém, existem os denominados solos ornitogênicos que são ricos em matéria orgânica proveniente da ocupação pelas aves. A presença dos fungos em solos ornitogênicos já é conhecida, porém, as consequências do contato desses solos com humanos ainda não foram abordadas. Desta forma, o objetivo desse trabalho foi verificar se nos solos ornitogênicos da Antártica ocorrem fungos com potencial risco à saúde humana. Para realização do trabalho foram obtidas amostras de solos ornitogênicos em diferentes pontos nas Ilhas Rei George, Livingston e Half Moon, as quais fazem parte do arquipélago Shetland do Sul na Península Antártica. Um grama de solo de cada amostra foi inoculada em solução salina esterilizada e 100 µL da diluição 10^{-1} foram plaqueados em diferentes meios de cultura, temperaturas e faixas de pH. Após o processamento das amostras, foram obtidos 368 isolados de fungos filamentosos e 113 leveduras, os quais foram submetidos ao teste de crescimento a 37 °C. Somente os fungos que apresentaram crescimento a 37 °C foram submetidos aos posteriores testes de virulência *in vitro* (atividade hemolítica, crescimento em diferentes faixas de pHs, medição do diâmetro de esporos, produção de fosfolipase, cápsula e melanina, bem como a sensibilidade ao antifúngico anfotericina B). Os 50 fungos termotolerantes obtidos foram identificados como 14 táxons dos gêneros *Aspergillus*, *Byssochlamys*, *Chrysosporium*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Eutypella*, *Penicillium*, *Peniophora*, *Phanerochaete*, *Phlebia*, *Psathyrella*, *Rhizopus* e *Trametes*. Dos 50 isolados fúngicos, 29 (58%) apresentaram crescimento à 40 °C; 27 (54%) demonstraram atividade hemolítica; 26 produziram esporos com diâmetro compatível com a deposição alveolar; 16 (32%) apresentaram atividade de fosfolipase. Todos os isolados cresceram em pH 7, 45 (90%) cresceram em pH 4 e 48 (96%) em pH 9. Os 12 isolados de

Cryptococcus laurentii apresentaram cápsula polissacarídica e perfil de resistência à anfotericina B (CIM maior que 1 µg/mL). Os resultados desse estudo sugerem que fungos isolados de amostras ambientais da Antártica podem apresentar diferentes fatores de virulência, *in vitro*, o que representa um risco à saúde, em especial de pessoas com alterações do sistema imunológico. Este estudo reforça ainda a hipótese de que a adaptação dos fungos a condições ambientais extremas, como as da Antártica, pode resultar na capacidade destes eucariotos em infectar hospedeiros humanos, ressaltando a importância do estudo de fungos extremófilos como potenciais micro-organismos oportunistas.

ABSTRACT

The Antarctic continent is characterized by its geographical and climatic isolation, as well as for little or no anthropogenic influence. Considered one extremophile continent, Antarctica presents conditions classified as limiting for animal and plant life. However, the microorganisms stand out because they have various adaptations to the harsh conditions found in the Antarctic environment. Among the microorganisms, fungi are highlighted by its high adaptive capacity to extreme conditions. The distribution of fungi in Antarctica is related to the different substrates/habitats in the area. Antarctic soils are generally oligotrophic; however, there are so-called ornithogenic soils that are rich in organic matter from occupation by birds. The presence of fungi in ornithogenic soils is already known, however, the contact consequences of these soils with the humans have not been questioned. The aim of this study was to verify if in these soils exist fungi that may pose some risk to human health. For this work ornithogenic soils samples were collected at different points in the King George, Livingston and Half Moon Islands which are part of the South Shetland Islands in the Antarctic Peninsula. One g of each soil sample will be inoculated in sterile saline and 100 uL of the dilution 10^{-1} was be plated on in various culture media, temperatures and pH ranges. After processing samples, were obtained 368 isolates of filamentous fungi and 113 yeasts, which were subjected to growth test at 37 °C. Only those which grew at 37 °C were subjected to further virulence tests *in vitro* (hemolytic activity, growth in different pH ranges, spores diameter measurement, phospholipase production, capsule and melanin, as well as sensitivity to the antifungal amphotericin B). The 50 thermotolerant fungi were identified as 14 taxa of the genus *Aspergillus*, *Byssochlamys*, *Chrysosporium*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Eutypella*, *Penicillium*, *Peniophora*, *Phanerochaete*, *Phlebia*, *Psathyrella*, *Rhizopus* and *Trametes*. Between 50 fungal isolates, 29 (58%) grew at 40 ° C; 27 (54%) showed hemolytic activity; 26 produced spores diameter compatible with alveolar deposition and 16 (32%) had phospholipase activity. All isolates grew at pH 7, 45 (90%) grew at pH 4 and 48 (96%) at pH 9. The 12 *Cryptococcus laurentii* isolates showed capsular polysaccharide and resistance profile of amphotericin B (MIC greater than 1 µg/mL). The results of this study suggest that fungi isolated from environmental samples from Antarctic may have different virulence factors, *in vitro*, which is a health risk, particularly of immunosuppressed people. In addition, this study supports the hypothesis that the fungal adaptation to extreme

environmental conditions such as the Antarctic, may result in the ability of these eukaryotes to infect human hosts, emphasizing the importance of studying extremophiles fungi as potential opportunistic microorganisms.

1. RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

O continente Antártico é caracterizado pelo isolamento geográfico e climático em relação a outras regiões do planeta e a sua maior parte possui pouca ou nenhuma influência antrópica. A presença de bases de pesquisa e do turismo na região, ambos em progressivo aumento desde o século passado, colocam em xeque a presença humana na Antártica no que se diz respeito ao contato com potenciais riscos biológicos à saúde. Apesar das condições extremas e desafiadoras à sobrevivência dos organismos, o continente Antártico é conhecido por abrigar micro-organismos extremófilos em seus diferentes substratos como solo, rochas, neve, gelo, lagos, invertebrados, aves, mamíferos e plantas. A capacidade dos fungos em se dispersar e colonizar uma variedade de substratos, bem como resistir a diferentes condições ambientais, possibilitaram seu estabelecimento em diferentes substratos da região antártica, incluindo os diferentes tipos de solos.

De maneira geral, os solos da Antártica são oligotróficos, porém, os denominados ornitogênicos, aqueles associados às áreas de nidificação das aves, contam com um constante depósito de matéria orgânica (guano, penas, cascas de ovo, carcaças, vegetação). Desta forma, esses solos apresentam maior biomassa microbiana em relação aos outros tipos de solos da Antártica.

Em alguns locais da Antártica o contato é direto entre o ser humano (turista, pesquisador ou trabalhador) e os solos ornitogênicos. Estes solos podem conter micro-organismos potencialmente patogênicos, pois a Antártica abriga, durante o verão, aves migratórias que podem atuar como carreadoras e disseminadoras de potenciais patógenos de outras regiões do planeta. Além disso, outros fatores como a presença de fortes ventos, característicos da região antártica e o aquecimento, que vem sendo registrado na região, levando a um constante derretimento de algumas áreas, podem contribuir para a dispersão de propágulos fúngicos. A partir das questões apresentadas, surge uma preocupação a respeito do potencial patogênico para humanos dos micro-organismos presentes nos solos ornitogênicos da Antártica.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Ecossistemas antárticos

5 A Antártica é o continente mais meridional do planeta, localizado quase inteiramente dentro do Círculo Polar Antártico. Possui uma superfície de cerca de 14 milhões de Km², equivalente a 1,6 vezes a área do Brasil ou 10% das áreas emersas do globo; seu território é circundado por um tempestuoso oceano com milhares de *icebergs* e por onde se formam plataformas de gelo (Bischoff, 1996; Ferreira, 2009). Trata-se do mais elevado de todos os continentes e um dos
10 ambientes mais extremos da Terra, caracterizado como um continente remoto e inóspito onde o clima é o mais frio e seco do planeta. A Antártica é conhecida como o continente onde a atuação dos ventos é a mais extrema, podendo ultrapassar a velocidade de 100 km/h; a temperatura anual pode variar entre 15 °C no verão a -93 °C no inverno (Robinson *et al.*, 2003; Bremer, 2008; Child & Kelly, 1990; Ferreira, 2009; Ruisi *et al.*, 2007; Woo, 2013).

15 A Antártica pode ser dividida em duas regiões básicas: a (1) Antártica Marítima, que circunda o continente Antártico e inclui as Ilhas Sandwich do Sul e Shetland do Sul e a costa oeste da Península, bem como os arquipélagos adjacentes; e a (2) Antártica Continental, que inclui o continente e a costa leste da Península (Tatur, 1989). O continente Antártico é caracterizado pelo isolamento geográfico e climático e a maior parte possui pouca ou nenhuma influência antrópica
20 (Brunati *et al.*, 2009). As condições que prevalecem são de baixas temperaturas, frequentes ciclos de congelamento e degelo, alta incidência solar (especialmente de radiação ultravioleta), baixa disponibilidade de água, alta sublimação e evaporação, altas concentrações de sal, baixa precipitação anual e fortes ventos, fatores considerados limitantes para a vida animal e vegetal (Onofri *et al.*, 2007; Ruisi *et al.*, 2007; Brunati *et al.*, 2009; Arenz & Blanchette, 2011).

25 Apesar das condições extremas da Antártica, diferentes formas de vida estão presentes na região, tais como bactérias, fungos, invertebrados, plantas, aves e mamíferos. Todos esses seres vivos parecem ter desenvolvido mecanismos especiais para superar a influência das condições adversas da região (Ruisi *et al.*, 2007; Rosa *et al.*, 2009; Shivaji & Prasad, 2009). A flora antártica é considerada “primitiva” e as condições climáticas e a pouca espessura do solo dificultam a
30 sobrevivência da maioria dos vegetais. Assim, a diversidade florística de espécies no continente é limitada a líquens, musgos, algas e apenas duas angiospermas nativas (*Colobanthus quitensis* e *Deschampsia antarctica*). A megafauna inclui principalmente, mamíferos e aves aquáticas, além de espécies migratórias. O *krill* é um crustáceo fundamental para a cadeia alimentar, sendo componente da dieta de baleias, focas, pinguins e outras aves da região, como biguás e petréis. As

populações deste crustáceo, por sua vez, se alimentam de algas que se desenvolvem sob o gelo marinho formado na superfície oceânica nos meses de inverno (Bischoff, 1996; Peck *et al.*, 2005; Simas *et al.*, 2007; Bremer, 2008; Ferreira, 2009).

5 No século XIX já havia investigações científicas no continente Antártico e o interesse científico somente intensificou-se com o passar do tempo (Bischoff, 1996). As primeiras estações de pesquisas foram estabelecidas no começo do século XX e, hoje, aproximadamente 30 países mantêm mais de 70 estações de pesquisa na Antártica (Bischoff, 1996). Além da atividade científica, o turismo na Antártica vem sendo cada vez mais difundido. O turismo antártico teve início no fim dos anos de 1950 e em média 5 mil turistas visitaram a região anualmente nos anos 10 de 1990. Na temporada de 2007/2008 o número de visitantes atingiu aproximadamente 46 mil turistas (Bischoff, 1996; Ferreira, 2009; Fox, 2014; IAATO).

2.2. Fungos na Antártica

15 Onofri (1999) considera a Antártica como o continente dos micro-organismos, sendo estes predominantes tanto na terra quanto no mar. Os micro-organismos parecem representar uma das principais fontes de diversidade biológica no continente Antártico. Dentro dessa comunidade microbiana, os fungos se destacam por sua elevada capacidade adaptativa às condições extremas, sua grande facilidade de dispersão e capacidade de colonizar uma ampla variedade de substratos 20 (Ruisi *et al.*, 2007).

A distribuição de fungos na Antártica está relacionada com os diferentes substratos presentes na região, tais como solos (Arenz & Blanchette, 2011; Alias *et al.* 2013), rochas (Onofri *et al.*, 2000; Selbmann *et al.*, 2005), vegetação (Upson *et al.*, 2009; Rosa *et al.*, 2009; Rosa *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2013), macroalgas (Loque *et al.*, 2010; Godinho *et al.*, 2013; Furbino *et al.*, 2014), 25 invertebrados (Webster *et al.*, 2004; Henríquez *et al.*, 2014), lagos (Ellis-Evans, 1996; Gonçalves *et al.*, 2012) e neve e gelo (Price, 2000; Elster *et al.*, 2007). Mais de 1.000 espécies de fungos não liquenizados já foram descritas para a Antártica e região Sub-antártica, incluindo representantes dos filos *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Zygomycota*, *Chytridiomycota* e *Glomeromycota* (Bridge & Spooner, 2012).

30 Os fungos presentes na Antártica podem ser classificados em psicrófilos ou psicrotolerantes de acordo com as características de crescimento em diferentes temperaturas. Os psicrófilos apresentam crescimento ótimo a ≥ 15 °C e a temperatura máxima de crescimento de 20 °C, enquanto os psicrotolerantes possuem uma temperatura ótima mais elevada e uma temperatura máxima acima de 20 °C. Apesar da maioria dos fungos antárticos ser considerada psicrotolerante,

ambos desempenham um importante papel no ciclo de decomposição neste ambiente (Margesin *et al.*, 2007; Krishnan *et al.*, 2011).

A grande maioria dos fungos encontrada no ambiente antártico vem sendo caracterizada como cosmopolita (Ruisi *et al.*, 2007; Arenz *et al.*, 2014), mas existem algumas espécies consideradas endêmicas. De acordo com Ruisi *et al.* (2007), a maior parte dos fungos registrados na Antártica encontra-se na forma assexuada e têm ciclos de vida curtos provavelmente para economizar energia e gerar muitos propágulos para dispersão e sobrevivência em condições extremas. Além dessas características, os fungos possuem outras adaptações que os permitem sobreviver no ambiente antártico, como por exemplo, proteínas crioprotetoras e enzimas com maior atividade em temperaturas mais baixas, entre outras (Robinson, 2001; Xiao *et al.*, 2010).

2.3. Solos ornitogênicos

O termo “solos ornitogênicos” foi proposto pela primeira vez em 1959 e foi aceito para caracterizar os solos orgânicos presentes nas áreas de colônias de aves, a princípio na Antártica Continental, sendo posteriormente, estendido para a Antártica Marítima por alguns autores (Allen & Heal, 1970; Ugolini, 1972; Tatur & Myrcha, 1984). Blume e colaboradores (1997) redefiniram este termo para “ornitosolos”, sendo utilizado como um sinônimo do primeiro termo.

Durante o verão, a Antártica é ocupada por diversos mamíferos e aves que utilizam o continente para descansar, reproduzir e caçar. Assim, grandes quantidades de excretas são deixadas sobre a terra visitada, formando-se assim, os solos ornitogênicos, sendo os pinguins considerados os principais responsáveis por essa adubação natural em áreas costeiras (Tatur, 1989; Tatur, 2002). Estima-se que aproximadamente 10 kg/m² de massa seca de excretas de pinguins são depositadas por ano no continente Antártico, e as fezes formam cerca de 85% (lembrando que as aves liberam suas excretas na forma de ácido úrico) de todos os depósitos ornitogênicos deixados por aves na terra, incluindo também penas, cascas de ovos e carcaças de animais (Tatur & Myrcha, 1984; Aislabie *et al.*, 2009).

Os solos ornitogênicos representam uma importante fonte de matéria orgânica e nutrientes para os ecossistemas terrestre que os circundam (Tatur, 1989; Ugolini, 1972). Eles apresentam um alto conteúdo de nitrogênio devido à dieta altamente proteica das aves e possuem grande quantidade de carbono e fósforo derivado das fezes, ossos e ovos das aves (Ugolini, 1972). O pH desses solos é, inicialmente alcalino, mas a ação da microbiota e do intemperismo sobre eles gera acidez (Michel *et al.*, 2006). De uma maneira geral, os solos da Antártica Continental são oligotróficos, desprovidos de cobertura orgânica e assim, segundo Allen & Heal (1970), os solos

da Antártica Marítima são mais diversos e desenvolvidos que os solos da Antártica Continental. Devido às condições de alta salinidade, pisoteio dos animais e da presença de substâncias tóxicas nas excretas das aves, o estabelecimento da vegetação nesse tipo de solo é retardado, ocorrendo apenas em manchas ao redor das áreas ocupadas ou somente em áreas já abandonadas pelas aves (Ugolini, 1972; Tatur & Myrcha, 1984; Tatur, 1989; Aislabie *et al.*, 2009). A combinação das características físicas do ambiente antártico com as condições dos solos ornitogênicos leva à possibilidade de considerar estes ornitosolos como um ambiente duplamente extremo para alguns organismos.

2.3.1. Fungos presentes em solos ornitogênicos da Antártica

Em comparação aos outros solos presentes na Antártica, denominados de solos minerais, os ornitosolos apresentam maior biomassa microbiana, predominando uma microbiota bacteriana em solos sob colônias ativas de pinguins (Aislabie *et al.*, 2009). Os estudos acerca de comunidades microbianas em solos da Antártica abordaram principalmente as bactérias (Roser *et al.*, 1993; Bölder *et al.*, 2002; Aislabie *et al.*, 2009). Os fungos estão presentes nos solos ornitogênicos, porém, em menor quantidade em comparação com as bactérias (Roser *et al.*, 1993; Bölder *et al.*, 2002; Aislabie *et al.*, 2009). Essa menor presença de fungos nesse tipo de solo pode estar relacionada com a presença de ácido acrílico em excretas de pinguins (Boyd, 1967) e uma elevada atividade quitinolítica e antifúngica de algumas bactérias (Pietr, 1986, 1993). Entretanto, os ornitosolos da Antártica parecem apresentar maior número e diversidade de fungos em relação aos solos que não apresentam tal influência biótica (Azmi & Seppelt, 1998; Onofri *et al.*, 2000).

De acordo com os estudos realizados até o momento na Antártica, a presença dos fungos nos ornitosolos se comporta da mesma maneira que nos solos antárticos, em que a maioria dos fungos pertence ao filo *Ascomycota*, com poucos representantes *Basidiomycota* e *Zygomycota* (Fletcher *et al.*, 1985; Arenz *et al.*, 2006; Arenz & Blanchette, 2009; Blanchette *et al.*, 2010).

Os fungos filamentosos frequentemente isolados a partir de solos ornitogênicos antárticos são pertencentes aos gêneros *Pseudogymnoascus*, *Penicillium* e *Thelebolus*. O fungo *Pseudogymnoascus pannorum*, anteriormente conhecido como *Geomyces pannorum*, é celulolítico e queratinolítico, cresce bem em baixas temperaturas, é frequentemente isolado em solos ornitogênicos; também já foi isolado a partir de penas e ninhos da ilha subantártica Signy (Pugh & Allsopp 1982; Azmi & Seppelt, 1998; Onofri *et al.*, 2000; Adams *et al.*, 2006; Krishnan *et al.*, 2011; Alias *et al.*, 2013). Espécies de *Penicillium* (*P. biforme*, *P. cyclopium*, *P. notatum*, *P. commune*) apresentam uma grande tolerância a variações de nutrientes, sendo bem adaptados para

5 crescer em substratos ricos, podendo justificar a sua frequente presença em materiais associados a ninhos de aves (Azmi & Seppelt, 1998; McRae *et al.*, 1999; Bölter *et al.*, 2002). A espécie *Thelebolus microsporus* é um fungo cosmopolita, psicrofílico e tipicamente coprofílico, isolado a partir de solos ornitogênicos e, também, de penas de aves da Antártica (Azmi & Seppelt, 1998; de Hoog *et al.*, 2005a; Alias *et al.*, 2013). O fungo termofílico e agente causador da aspergilose aviária e capaz de causar infecções frequentes em imunocomprometidos, *Aspergillus fumigatus*, já foi isolado de solos ornitogênicos da área de Victoria Land (Antártica Continental) (Wicklów, 1968). Entre as leveduras mais frequentemente isoladas em solos ornitogênicos da Antártica, encontram-se representantes dos gêneros *Candida* e *Cryptococcus*. Espécies de outros gêneros como *Bensingtonia*, *Leuconeurospora*, *Leucosporidiella*, *Nadsonia* e *Rhodotorula* também foram reportados em tais tipos de solos na Antártica (Vishniac, 1996; Onofri *et al.*, 2000; Arenz *et al.*, 2006; Arenz & Blanchette, 2009; Vaz *et al.*, 2011).

15 2.4. Fatores de virulência dos fungos para humanos

Dentre as mais de 100 mil espécies de fungos descritas até o momento, menos de 400 já foram associadas com doenças em humanos e menos de 50 são encontradas em mais de 90% de todas as infecções fúngicas humanas (Parrish & Riedel, 2014). A partir da segunda metade de 1990 a detecção das infecções fúngicas aumentou drasticamente como resultado da melhoria dos diagnósticos, alta frequência de cateterismo, instrumentação e um número crescente de pacientes imunossuprimidos (Khan *et al.*, 2010).

Adaptação às condições ambientais é considerada fundamental para a sobrevivência de um fungo durante a infecção em hospedeiros humanos; desta forma, fungos patogênicos apresentam um elevado grau de plasticidade do seu genoma, devido à sua capacidade de propagação e adaptação ao seu hospedeiro ou a uma condição ambiental específica conseguindo, assim, lidar com estresses bióticos e abióticos a que são expostos no corpo humano (Cooney & Klein, 2008; Calo *et al.*, 2013). A exigência para adaptação ambiental é considerada extrema, uma vez que a transição de um estilo de vida sapróbio no ambiente para um estilo de vida parasitário dentro de um hospedeiro mamífero implica mudanças bruscas em diversos parâmetros ambientais, tais como temperatura, pH, concentração de oxigênio, entre outros (Cooney & Klein, 2008). A capacidade de um organismo ocupar uma ampla variedade de ambientes, incluindo aqueles rigorosos como uma superfície de rochas, levou à hipótese de que a sua capacidade de "oportunisticamente" metabolizar diversas substâncias e habitar vários nichos também permite que este fungo habite um ambiente único como o corpo humano (Bennet, 2009; Baumgardner, 2012).

De acordo com Casadevall & Pirofski (1999), um micro-organismo é considerado patogênico quando é capaz de causar dano ao hospedeiro, incluindo os patógenos clássicos e os oportunistas. Dessa forma, um micro-organismo patogênico causa doença quando o dano sofrido ao hospedeiro é suficiente para prejudicar a homeostase, que pode ocorrer como resultado da ação microbiana direta nos tecidos e/ou como resultado da resposta imunológica ao micro-organismo. O sistema imune adaptativo pode mediar a proteção, mas também produz respostas que contribuem para a doença no hospedeiro (Casadevall, 2007).

Os determinantes da patogenicidade são chamados fatores de virulência, os quais são atributos ou componentes do micro-organismo, que permitem sua sobrevivência, crescimento e propagação no hospedeiro (Hogan *et al.*, 1996). Os fatores de virulência auxiliam os micro-organismos a crescer em temperaturas elevadas, facilitam a adesão, penetração e difusão, ou ainda ajudam a resistir contra as defesas imunes inatas (Klein & Tebbets, 2007; Khan *et al.*, 2010). O estabelecimento de uma infecção depende de vários fatores, entre eles, o sistema de defesa do hospedeiro, a via de exposição fúngica, o tamanho do inóculo e a virulência do micro-organismo. Assim, um fator de virulência isolado não é capaz de desencadear uma infecção (Casadevall & Pirofski, 1999). A capacidade de sobreviver à elevada temperatura do corpo humano de 37 °C é essencial para a virulência (Cooney & Klein, 2008; Gostincar *et al.*, 2011). Para fungos que invadem tecidos profundos, a capacidade de crescer a 37 °C e em pH fisiológico ($\pm 7,4$) representa um fator de virulência; além, disso, a transição para uma forma parasitária em razão de alteração na temperatura e/ou nutrientes é essencial para a patogenicidade em fungos dimórficos, como por exemplo *Histoplasma capsulatum* e *Penicillium marneffii*, pois favorece a instalação fúngica e ajuda na proteção contra o sistema imune do hospedeiro (Klein & Tebbets, 2007; Khan *et al.*, 2010).

Algumas espécies de leveduras pertencentes ao gênero *Cryptococcus*, destacando-se *Cr. neoformans* e *Cr. gatti*, possuem uma cápsula polissacarídica que atua inibindo a fagocitose e impedindo a ação do sistema imune do hospedeiro (Hogan *et al.*, 1996; McFadden & Casadevall, 2001; Ferreira-Paim *et al.*, 2012). Representantes desse gênero, além de outros fungos, também são conhecidos por produzirem melanina que protege o fungo de estresses físicos (como por exemplo, radiação ultravioleta, altas e baixas temperaturas) e oxidativos. As células melanizadas são menos suscetíveis a degradação enzimática e ação de antifúngicos (Hogan *et al.*, 1996; McFadden & Casadevall, 2001; Olszewski *et al.*, 2010).

Os fungos compreendem a maior parte da biomassa viável no ar e uma respiração humana média pode conter entre um e 10 esporos de fungos (Fisher *et al.*, 2012). Assim, o trato respiratório é considerado a principal porta de entrada de esporos fúngicos no corpo humano e, desta forma,

um tamanho compatível com a deposição alveolar é um fator de virulência para fungos produtores de infecções por inalação de esporos (Hogan *et al.*, 1996; Tomee & Kauffman, 2000). Partículas com diâmetros maiores que 10 µm têm baixa probabilidade de adentrar a região nasofaríngea, enquanto partículas entre 5-10 µm de diâmetro são depositadas principalmente no trato respiratório superior e aquelas menores que 5 µm são capazes de penetrar nos alvéolos pulmonares (Ahmed, 2012). Desta maneira, os esporos que apresentam diâmetro menores que 5 µm podem ser considerados mais virulentos.

Alguns fungos produzem enzimas hidrolíticas extracelulares (proteínases, lipases, fosfolipases, gelatinases e ureases) que são importantes fatores de virulência exercendo papéis não só na nutrição, mas também em nível de dano tecidual, disseminação no organismo humano, aquisição de ferro e resistência ao sistema imunológico do hospedeiro (Gostincar *et al.*, 2011). As fosfolipases atuam na quebra de ligações ésteres dos fosfolipídeos, que são componentes das membranas biológicas, e por isso, causam danos à membrana celular do hospedeiro e estão associadas aos processos de adesão e penetração (Santangelo *et al.*, 1999; Khan *et al.*, 2010). As fosfolipases são também, capazes de destruir a substância surfactante nos pulmões, facilitando, com isso, a adesão do fungo (Vidotto *et al.*, 1996; Karkowska-Kuleta *et al.*, 2009). Tais enzimas são produzidas por espécies de *Aspergillus*, *Candida* e *Cryptococcus* e são de grande importância no processo de instalação no hospedeiro (Khan *et al.*, 2010).

A capacidade dos organismos patogênicos em adquirir ferro já se mostrou ser de grande importância na sua sobrevivência e capacidade de estabelecimento da infecção no hospedeiro mamífero. Uma vez que não se encontra ferro livre no hospedeiro humano, a maioria dos patógenos adquire esse elemento a partir de moléculas como a hemoglobina. Assim, alguns patógenos são equipados com um mecanismo que é capaz de causar lise em hemácias liberando os íons ferro e supõe-se que com os fungos aconteça de maneira similar (Manns *et al.*, 1994; Luo *et al.*, 2001; Bonassoli *et al.*, 2005; Aktas & Yigit, 2015). Existem relatos de atividade hemolítica em espécies de *Candida*, *Cryptococcus*, *Exophiala*, alguns dermatófitos, entre outros (Luo *et al.*, 2001; Sacristán *et al.*, 2011; Ferreira-Paim *et al.*, 2012; Aktas & Yigit, 2015; Seneviratne *et al.*, 2015).

de Hoog *et al.* (2005b) propõem uma relação entre fungos xerotolerantes e patógenos humanos. De acordo com este autor, os fungos considerados xerotolerantes são capazes de crescer em atividade de água (a_w) $\leq 0,85$. A conclusão a que esses pesquisadores chegaram é a de que a xerotolerância e a capacidade de causar infecções em humanos apresentam uma distribuição semelhante em nível de ordem na classificação filogenética dos fungos. Diferentes ordens que incluem fungos xerotolerantes apresentam também fungos oportunistas. Isto sugere que a estrutura

genética de cada uma dessas ordens codifica propriedades que são úteis para ambas as estratégias de vida. Assim, o aparato que o fungo apresenta para sobreviver em ambientes com baixa atividade de água o torna capaz de sobreviver a outras condições extremas (de Hoog *et al.*, 2005b).

5 A sensibilidade a antifúngicos também é de grande importância ao se considerar o potencial patogênico de um fungo, já que a ocorrência de resistência, tanto intrínseca quanto adquirida, aos fármacos disponíveis no mercado é recorrente. A resistência intrínseca (ou primária) é encontrada naturalmente em alguns fungos sem exposição prévia ao antifúngico, enquanto a resistência adquirida (ou secundária) se desenvolve após a exposição ao antifúngico (Kanafani & Perfect, 2008). A resistência é mensurada como um aumento na concentração inibitória mínima (CIM) em
10 comparação aos valores medidos nos organismos sensíveis de referência. Os antifúngicos pertencentes à classe dos azólicos são os líderes em casos de resistência, mas já existem fungos resistentes a anfotericina B (classe dos polienos), fluorocitosina (classe dos análogos de pirimidina) e echinocandinas (Niimi *et al.*, 2010; Arendrup & Perlin, 2014; Perlin *et al.*, 2015).

3. OBJETIVO GERAL

Caracterizar a comunidade de fungos presentes em diferentes solos ornitogênicos da Antártica e identificar os táxons com potencial patogênico *in vitro* para humanos.

5 4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Coletar amostras de solos ornitogênicos provenientes de diferentes aves em ilhas da Península Antártica.
- Depositar todos os isolados obtidos na Coleção de Micro-organismos e Células da Universidade Federal de Minas Gerais para sua preservação *ex situ* e contribuir para a montagem de uma coleção temática de fungos extremófilos da Antártica.
- Identificar os fungos capazes de crescer a 37 °C por meio de técnicas taxonômicas morfofisiológicas e moleculares.
- Avaliar o potencial patogênico dos fungos obtidos por meio da detecção de fatores de virulência *in vitro*.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Área de estudo

- 5 As amostras de solos ornitogênicos foram coletadas no Arquipélago Shetland do Sul, nas Ilhas: Rei George (locais: Rocha Shag, Ponta Vaureal, Ponta Turret, Two Summit), Livingston (local: Hannah Point) e Half Moon (Figura 1).

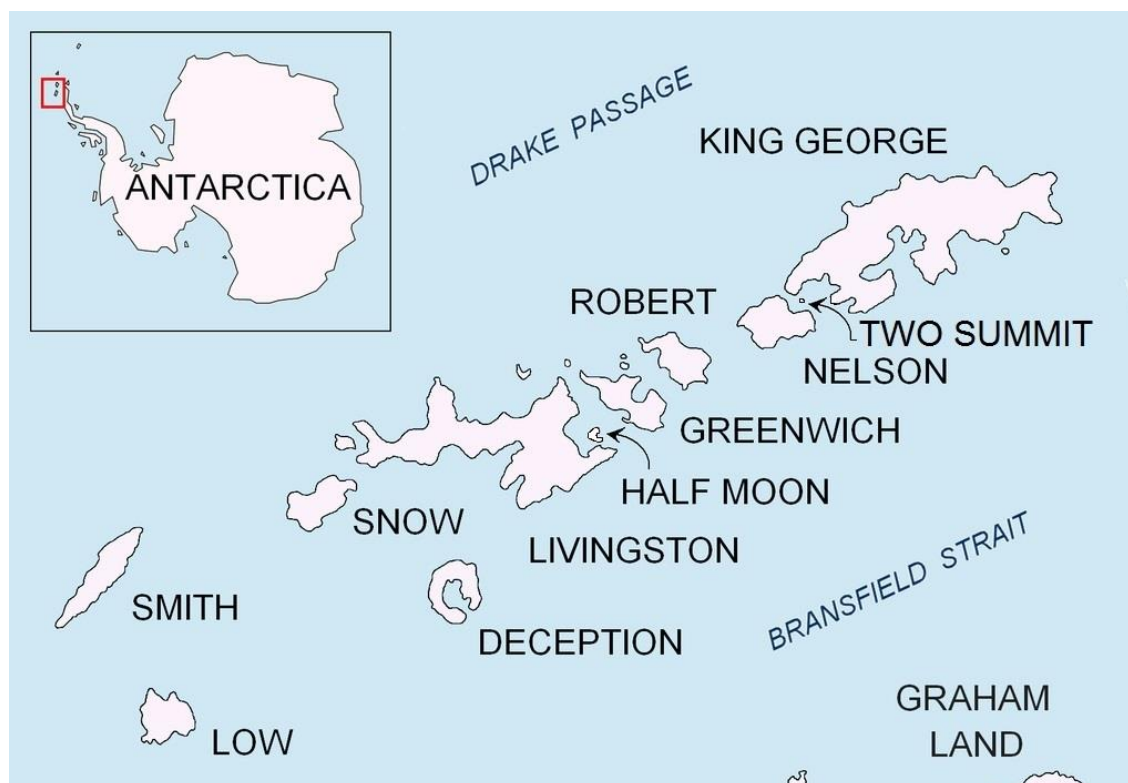


Figura 1 Localização do Arquipélago Shetland do Sul e os locais de coleta.

- 25 As coletas foram realizadas em dezembro de 2013, durante a Operação Antártica XXXII do Programa Antártico Brasileiro (PROANTAR). Cinco amostras dos solos das diferentes regiões foram coletadas em tubos cônicos de 50 mL esterilizados. Para realização das coletas foram aprovadas as devidas licenças junto ao Ministério do Meio Ambiente e Marinha do Brasil. As amostras foram transportadas até o Laboratório de Sistemática e Biomoléculas de Fungos e
- 30 mantidas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o processamento. A localização das áreas de coleta foi determinada por coordenadas geográficas obtidas por meio do Global Positioning System GPS (Tabela 1).

Tabela 1 Localização dos pontos de coleta e espécie de ave relacionada a cada solo.

Ilhas/locais de coleta	Espécie (nome comum) da ave relacionada ao solo	Coordenadas geográficas
Ilha Rei George		
Rocha Shag	<i>Phalacrocorax atriceps</i> (biguá-de-olhos-azuis)	62°11'S; 058°17'W
Ponta Vaureal	<i>Macronectes giganteus</i> (petrel-gigante-do-sul)	62°10'S; 058°17'W
Ponta Turret	<i>Pygoscelis antarcticus</i> (pinguim-de-barbicha)	62°05'092"S; 057°56'763"W
Two Summit	<i>Macronectes giganteus</i> (petrel-gigante-do-sul)	62°14'052"S; 058°56'436"W
Ilha Livingston		
Hannah Point	<i>Pygoscelis papua</i> (pinguim-gentoo)	62°39'231"S; 060°36'336"W
	<i>Pygoscelis antarcticus</i> (pinguim-de-barbicha)	
Ilha Half Moon	<i>Pygoscelis antarcticus</i> (pinguim-de-barbicha)	62°35'779"S; 059°54'088"W

5.2. Processamento das amostras

- 5 Com o auxílio de pinças e espátulas esterilizadas, 1 g de cada amostra de solo foi inoculado em 9 mL de solução salina 0,85% e, posteriormente, 100 µL da diluição 10⁻¹ foram plaqueados nos meios descritos a seguir, suplementados com 0,02% de cloranfenicol (Sigma, EUA) para inibir o crescimento de bactérias. Após até 60 dias de incubação os isolados foram purificados em novas placas de ágar YM.
- 10 1. Ágar YM (Agar Malte Levedura 0,3% extrato de malte, 0,3% de extrato de levedura, 1% glicose, 0,5% peptona, 2% ágar) e, posteriormente, incubado a 37 °C a fim de reproduzir a temperatura humana corporal;
2. Ágar DG18 (Acumedia[®], Índia) suplementado com 18% glicerol e incubados a 15 e 37 °C, a fim de isolar fungos xerofílicos;
- 15 3. Ágar Sangue (Ágar Sabouraud: 2% glicose, 1% peptona, 0,5% extrato de levedura, 2% ágar; suplementado com 3% de glicose e 7% de sangue de carneiro desfibrinado, pH 5,6) e incubação a 25 °C, com o intuito de visualizar halos de hemólise e, portanto, isolar fungos com atividade hemolítica;

4. Ágar YM ajustado para o pH 4 e incubação a 15 e 37 °C; com o objetivo de simular o pH vaginal é em torno de 4 (Davis, 2009);
5. Ágar YM com pH ajustado a 7 e incubação a 15 e 37 °C; considerando que o pH do sangue humano e tecidos fica em torno de 7 (Davis, 2009);
- 5 6. Ágar YM com pH ajustado a 9 e incubação a 15 e 37 °C; sendo que o trato digestivo pode apresentar valores de pH acima de 8 (Davis, 2009).

Além disso, foi realizado um enriquecimento adicionando 1 g de cada amostra de solos em tubos contendo 9 mL de caldo YM acrescido de 1 µg/mL de anfotericina B (Sigma, EUA) protegido da luz e incubados a 15 °C por 7 dias, sob agitação. Este procedimento teve como
10 objetivo selecionar o crescimento dos fungos resistentes a essa concentração do antifúngico. Após crescimento microbiano, determinado por turvação do meio, foi realizado o plaqueamento de 100 µL em ágar YM. As placas foram incubadas a 15 °C.

5.3. Isolamento e preservação dos fungos

15

Após crescimento a 15 °C por 15 dias, os fungos filamentosos obtidos foram preservados em duplicata em água destilada esterilizada (Castellani, 1967) e em glicerol 15% a -80 °C. As culturas puras das leveduras foram inoculadas em meio GYMP (glicose 2%, extrato de levedura 0,5%, extrato de malte 1% e de fosfato de sódio 0,2%) e após o período de 24-48 horas a 15 °C foi
20 acrescido 20% glicerol e depositadas no ultrafreezer a -80 °C. Todos os isolados obtidos foram armazenados na Coleção de Micro-organismos e Células do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG.

5.4. Teste de termotolerância

25

Os isolados obtidos a partir do processamento das amostras incubadas a 15 e 25 °C, também foram submetidos a teste de crescimento à 37 °C. Todos os fungos que cresceram a 37 °C (incluindo aqueles obtidos do processamento inicial selecionados a 37 °C) foram selecionados para os posteriores ensaios de virulência e submetidos à identificação molecular.

5.5. Identificação dos fungos

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), aspecto da borda e produção de pigmentos. As leveduras foram agrupadas de acordo com as características macromorfológicas das colônias (cor, tamanho, borda, forma, aspecto e textura).

Os fungos filamentosos e as leveduras foram submetidos à análise molecular por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) utilizando-se o iniciador (GTG)₅, de acordo com Lieckfeldt e colaboradores (1993). Com base no perfil eletroforético dos produtos amplificados por PCR com o iniciador (GTG)₅, um isolado dentre os que apresentaram um mesmo padrão de bandas foi selecionado para sequenciamento. No caso das leveduras, para o sequenciamento dos domínios D1/D2 da subunidade maior do DNA ribossomal foram utilizados os iniciadores NL1 e NL4. No caso dos fungos filamentosos, para o sequenciamento da região espaçadora transcrita interna ITS1-5.8S-ITS2 da região gênica do rRNA, foram utilizados os iniciadores ITS1 e ITS4. Além disso, alguns táxons de fungos filamentosos, também foram submetidos ao sequenciamento dos fragmentos gênicos da β -butulina e RNA polimerase II (RPB2).

5.5.1. Extração de DNA

20

5.5.1.1. Leveduras

Para extração do DNA total, os isolados foram crescidos em ágar YM. Após o crescimento, as colônias foram ressuspensas em 100 μ L de tampão de lise (Tris-HCl – trishidroximetilaminometano 0,05M, EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético 0,005M, NaCl 0,1M e SDS - sódio dodecil sulfato 1% (p/v)) e incubadas em banho-maria a 65 °C por 30 minutos. Decorrida essa etapa do processo, foram adicionados 100 μ L de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1 – Sigma,EUA) aos tubos e os mesmos vedados com parafilme, homogeneizados em vórtex e centrifugados a 14.000 r.p.m. durante 15 minutos. O sobrenadante foi retirado com auxílio de pipeta e transferido para outro tubo, ao qual foi adicionado isopropanol (Merck) (v/v). Os tubos foram homogeneizados por inversão e deixados em repouso à temperatura ambiente durante 15 minutos para precipitação do DNA. Após essa etapa, os tubos foram centrifugados a 14.000 r.p.m. por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado por inversão, e ao *pellet* formado foi acrescentado 200 μ L de etanol 70 % (Merck) refrigerado. Efetuou-se

novamente uma centrifugação a 14.000 r.p.m. por 10 minutos. O sobrenadante foi novamente descartado por inversão e uma segunda lavagem com 200 µL de etanol 70 % gelado e centrifugação a 14.000 r.p.m. por 10 minutos foram realizadas. Após o descarte do sobrenadante por inversão, os tubos foram incubados *overnight* à temperatura ambiente para total evaporação do etanol. Após essa etapa, o DNA foi ressuspensionado em 50 µL de tampão Tris-EDTA 0,1M (TE) pH 8,0 e estocado a -20 °C.

5.5.1.2. Fungos filamentosos

10 A extração de DNA total foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Rosa *et al.* (2009), com modificações. Os fungos filamentosos foram crescidos por sete dias em YM e então fragmentos de micélio foram colocados em tubos de 1,5 mL acrescidos de 400 µL de tampão de lise (Tris-HCl – trishidroximetilaminometano 0,05 M, EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético 0,005 M, NaCl 0,1 M e SDS – sódio dodecil sulfato 1%) e deixado a - 20 °C até o momento da
15 extração de DNA. O micélio foi triturado com auxílio de esferas de aço inoxidável (*beads*) em um homogeneizador Next Advance Bullet Blender®. Em seguida, foram adicionados 162 µL de CTAB (Tris 2M, NaCl 8,2%, EDTA 2M e CTAB 0,2%), seguido de homogeneização e incubação por 30 minutos a 65 °C. Posteriormente, foram acrescentados 570 µL da mistura clorofórmio/álcool isoamílico (24:1). Após homogeneização, o tubo foi incubado por 30 minutos a
20 0 °C (em gelo). Em seguida, o conteúdo foi centrifugado a 13.200 r.p.m. por 10 minutos e o líquido sobrenadante transferido para um novo tubo de 1,5 mL, e acrescentado 10% do volume de uma solução de acetato de sódio 3 M. O tubo foi vertido para homogeneização, incubado a 0 °C por 30 minutos e centrifugado a 13.200 r.p.m. por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e, em seguida, adicionado 50% do volume de isopropanol (Merck) e a suspensão foi
25 gentilmente homogeneizada. Posteriormente, a amostra foi centrifugada a 13.200 r.p.m. por 5 minutos e o sobrenadante desprezado por inversão. Em seguida, foram adicionados 200 µL de etanol 70% (Merck) gelado, sendo os tubos homogeneizados e submetidos à centrifugação a 13.200 r.p.m. por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado novamente por inversão e os tubos deixados por 2 minutos para secar. Foi feita mais uma lavagem com 200 µL de etanol 70%
30 (Merck) gelado e, por último, mais uma centrifugação 13.200 r.p.m. por 5 minutos, seguido de descarte do sobrenadante. A amostra foi deixada a temperatura ambiente *overnight* para secagem, e então foi adicionado 50 µL de Tris-EDTA (Tris-HCl 0,01 M e EDTA 0,001 M). A amostra foi incubada a 65 °C por 60 minutos para hidratação do DNA e, posteriormente, armazenada em freezer a -20 °C.

5.5.2. Obtenção de amplicons

5.5.2.1. Amplificação utilizando o iniciador (GTG)₅

5 Para confirmação do agrupamento macromorfológico, os isolados foram submetidos à PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) *fingerprinting* utilizando o iniciador (GTG)₅ para amplificação de regiões de microssatélite, conforme descrito por (Lieckfeldt *et al.*, 1993). A PCR foi realizada para um volume final de 25 µL contendo de 1,0 a 5,0 µL de DNA (variando de acordo com a concentração do DNA, a qual deve estar entre 50-500 ng/µL), 2,0 µL do iniciador (GTG)₅ 10
10 µmol⁻¹ (MWG Biotech), 2,5 µL de tampão de PCR 5X (Fermentas), 1,5 µL de MgCl₂ 25mM, 1,0 µL de dNTP 10 mM, 0,2 µL de Taq DNA polimerase 5U (Fermentas) e o volume final completado com água ultrapura esterilizada. As reações de PCR foram realizadas utilizando o termociclador PCR Express (Valpo.protect - Eppendorf). O programa consistiu de uma desnaturação inicial a 94 °C por cinco minutos, seguido por 40 ciclos de 15 segundos de
15 desnaturação a 94 °C, 45 segundos de anelamento a 55 °C e 90 segundos de extensão a 72 °C, e uma extensão final por 6 minutos a 72 °C. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5%, em tampão TBE 0,5X (54 g de tris base, 27,5 g de ácido bórico, 20 mL de EDTA 0,5M, pH 8,0), eluídos durante aproximadamente uma hora e meia a 80 V. As bandas foram coradas com solução de GelRedTM (Biotium), e os géis visualizados sob luz ultravioleta e
20 fotografados pelo sistema de foto-documentação de gel (Vilber Lourmat, França).

5.5.2.2. Amplificação utilizando iniciadores NL-1 e NL-4

Das leveduras que apresentaram perfis moleculares iguais um isolado foi selecionado para o sequenciamento da região D1/D2 da subunidade maior do rDNA, utilizando os iniciadores NL-1
25 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') e NL-4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3'), segundo Lachance e colaboradores (1999). A reação de PCR foi realizada em um volume final de 50 µL contendo 5 µL de tampão de PCR 10X (Fermentas), 3 µL de MgCl₂ 25 mM (Fermentas), 2 µL de dNTP 10 mM, 1 µL de cada iniciador NL-1 e NL-4 a 10 pmol⁻¹ (Invitrogen), 1 a 5 µL do
30 DNA (de modo que a reação final contenha entre 50 e 500 ng), 0,2 µL de TaqDNA polimerase 1.25 U (Fermentas) e água ultrapura esterilizada q.s.p. 50 µL. As reações de PCR foram realizadas utilizando o termociclador MastercycleproS (Eppendorf, EUA). O programa de ciclagem consistiu de uma desnaturação inicial a 95 °C por 2 minutos, seguido por 35 ciclos de 15 segundos de desnaturação a 95 °C, 25 segundos de anelamento do iniciador a 54 °C e 20 segundos de extensão

a 72 °C, e uma extensão final por 10 minutos a 72 °C. Os amplicons foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,0% (Pronadisa), em tampão TBE 0,5X, eluídos durante aproximadamente 30 minutos a 120 V. As amostras foram coradas pela adição de GelRed™ (Biotium), visualizadas sob luz ultravioleta e fotografados pelo sistema de foto-documentação de gel (VilberLourmat, França).

5.5.2.3. Amplificação utilizando os iniciadores ITS-1 e ITS-4

Para amplificação da região transcrita interna ITS1-5.8S da região do gene rRNA foram utilizados os iniciadores ITS-1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) e ITS-4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC), conforme descrito por White e colaboradores (1990). A reação de PCR foi realizada em um volume final de 50 µL contendo 5 µL de tampão de PCR 10X (Fermentas), 3 µL de MgCl₂ 25mM (Fermentas), 2 µL de dNTP 10 mM, 1 µL de cada iniciador ITS1 e ITS4 a 10 pmol⁻¹ (Invitrogen), 0,2 µL de Taq DNA polimerase 1,25U (Fermentas), 1 a 5 µL do DNA (de modo que a reação contenha entre 50 a 500 ng) e água ultrapura esterilizada q.s.p. 50 µL. As reações de PCR foram realizadas utilizando o termociclador MastercycleproS (Eppendorf, EUA). O programa de ciclagem consistiu de uma desnaturação inicial a 94 °C por 5 min, seguido por 35 ciclos de 1 minuto de desnaturação a 94 °C, 1 minuto de anelamento a 55 °C, 1 minuto de extensão a 72 °C, e uma extensão final por 5 minutos a 72 °C. Os amplicons foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,0% (Pronadisa), em tampão TBE 0,5X, eluídos durante aproximadamente 30 minutos a 120 V. As amostras foram coradas pela adição de GelRed™ (Biotium), visualizadas sob luz ultravioleta e fotografados pelo sistema de foto-documentação de gel (Vilber Lourmat, França).

5.5.2.4 Amplificação do fragmento gênico da β-tubulina

Para amplificação do fragmento gênico da β-tubulina foram utilizados os iniciadores BT2a (GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC) e BT2b (ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC), conforme descrito por Glass & Donaldson (1995). A PCR foi realizada em um volume final de 50 µL contendo de 1,0 a 5,0 µL de DNA (de modo que a reação contenha entre 50-500 ng/µL), 1,0 µL de cada iniciador BT2a e BT2b 10 µmol⁻¹ (Invitrogen), 5,0 µL de tampão de PCR 10X (Fermentas), 3,0 µL de MgCl₂ 25 mM, 2,0 µL de dNTP 10 mM, 0,2 µL de Taq DNA polimerase 1.25U (Fermentas) e o volume final completado com água ultrapura esterilizada. As reações de PCR foram realizadas utilizando o termociclador MastercycleproS (Eppendorf, EUA). O

programa consistiu de uma desnaturação inicial a 94 °C por 5 minutos, seguido por 35 ciclos de 1 minuto de desnaturação a 94 °C, 1 minuto de anelamento a 59 °C e 90 segundos de extensão a 72 °C e uma extensão final por 7 minutos a 72 °C. Os amplicons foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,0% (Pronadisa), em tampão TBE 0,5X, resolvidas durante aproximadamente 30 minutos a 120 V. As amostras foram coradas pela adição GelRed™ (Biotium), visualizadas sob luz ultravioleta e fotografados pelo sistema de foto-documentação de gel (VilberLourmat, França).

5.5.2.5. Amplificação fragmento gênico da RNA polimerase II

Para amplificação parcial da RNA polimerase II (RPB2) foram utilizados os iniciadores RBP2 5F (GAYGAYMGWGATCAYYTTYGG) e RPB2 7R (CCCATRGCTTGYYTTRCCCAT) conforme descrito por Malkus *et al.* (2006). A PCR foi realizada em um volume final de 50 µL contendo de 1,0 a 5,0 µL de DNA (de modo que a reação contenha entre 50-500 ng/µL), 1,0 µL de cada iniciador RBP2 5F e RPB2 7R a 10 25 µmol⁻¹ (Invitrogen), 5,0 µL de tampão de PCR 10X (Fermentas), 3,0 µL de MgCl₂ mM, 2,0 µL de dNTP 10 mM, 0,2 µL de Taq DNA polimerase 1.25U (Fermentas) e o volume final completado com água ultrapura esterilizada. As reações de PCR foram realizadas utilizando o termociclador MastercycleproS (Eppendorf, EUA). O programa consistiu de uma desnaturação inicial a 94 °C por 3 minutos, seguido por 35 ciclos de 20 segundos de desnaturação a 94 °C, 55 segundos de anelamento a 55 °C e 1 minuto de extensão a 72 °C e uma extensão final por 10 minutos a 72 °C. Os amplicons foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,0% (Pronadisa), em tampão TBE 0,5X, resolvidas durante aproximadamente 30 minutos a 120 V. As amostras foram coradas pela adição GelRed™ (Biotium), visualizadas sob luz ultravioleta e fotografados pelo sistema de foto-documentação de gel (VilberLourmat, França).

25

5.5.3. Purificação dos produtos de PCR

Os amplicons gerados pela reação de PCR foram purificados utilizando etanol-EDTA. Ao produto de PCR (47 µL) foram adicionados 11,25 µL de EDTA e 141 µL de etanol absoluto e deixados a temperatura ambiente por 15 minutos. O tubo foi centrifugado a 13.200 r.p.m. por 25 minutos e o sobrenadante descartado por inversão. A seguir, foram adicionados 120 µL de etanol 70% gelado, o tubo centrifugado a 13.200 r.p.m. por 10 minutos e o etanol descartado por inversão. O tubo foi deixado à temperatura ambiente para evaporação de todo o excesso de etanol. Foram adicionados 10 µL de água e o conteúdo do tubo homogeneizado em vórtex por 15

segundos. Em seguida, o tubo foi incubado em banho-maria a 37 °C por 40 minutos. O produto da PCR obtido foi dosado em NanoDrop ND 1000 (NanoDrop Technologies, EUA) e armazenado a -20 °C até o momento da reação de sequenciamento.

5 5.5.4. Reação de sequenciamento e precipitação das amostras

As reações de sequenciamento foram realizadas utilizando o kit Big Dye versão 3.1 (Applied Biosystems, EUA) em combinação com o sistema de sequenciamento automatizado ABI 3730 (Applied Biosystems, EUA). A reação de sequenciamento foi realizada em microplacas de 96
10 poços (Applied Biosystems, EUA) preparada para um volume final de 10 µL, em que foram colocados: 1 µL do iniciador (5 µmol⁻¹), 1 µL de tampão (presente no kit de sequenciamento), 1 µL de Big Dye, 1 a 5 µL de DNA (de modo que a reação final contenha entre 5 e 20 ng) e o restante de água para injeção esterilizada para completar o volume. O programa de ciclagem utilizado
15 consistiu de uma desnaturação inicial a 36 °C por 1 minuto, 36 ciclos de anelamento a 96 °C por 15 segundos, seguido por 15 segundos de extensão a 50 °C e 4 minutos de extensão final a 60 °C.

Os produtos do sequenciamento foram submetidos ao processo de precipitação com o acréscimo de 1 µL de EDTA a 125 mM, 1 µL de acetato de amônio e 50 µL de etanol 96% (Merck), em cada poço. A placa foi homogeneizada com auxílio de um vórtex brevemente e então incubada por 15 minutos à temperatura ambiente, protegida da luz. Após incubação, as amostras
20 foram centrifugadas por 45 minutos a 3.700 r.p.m. à temperatura ambiente e o sobrenadante descartado por inversão. Em seguida, foram acrescentados 100 µL de etanol 70% (Merck) e as amostras novamente centrifugadas por 15 minutos a 3.700 r.p.m. à temperatura ambiente. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado por inversão e em cada poço foi acrescentado 10 µL de Formamida HI-DI (Applied Biosystems, EUA). A placa foi armazenada a 4 °C, protegida da
25 luz, até injeção das amostras no sistema automatizado ABI 3730 (Applied Biosystems, EUA).

5.5.5. Análise computacional das sequências

As sequências de DNA foram comparadas com as sequências de espécies tipo ou referência de
30 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 Biothechnology*. Os fungos que apresentaram sequências com valor de E = 0, cobertura e identidade ≥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 diferente de 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. Informações sobre os níveis hierárquicos utilizados na taxonomia dos fungos foram obtidos no MycoBank (<http://www.mycobank.org/>), Index Fungorum (<http://www.Índexfungorum.org/>) e Kirk *et al.* (2008).

15 5.6. Determinação da similaridade entre as comunidades fúngicas

A similaridade entre as comunidades fúngicas presentes nos diferentes ornitosolos da Antártica foi estimada utilizando o coeficiente de Sorensen (QS) representado pela fórmula: $QS = 2C/(A+B)$, onde A e B representam o número de espécies na área A e B , respectivamente, e C o número de espécies presentes em comum nas duas áreas. O índice foi calculado utilizando o programa PAST 1.90 (Hammer *et al.*, 2001).

5.7. Ensaio dos fatores de virulência

25 5.7.1. Crescimento a 40 °C

De acordo com Robert & Casadevall (2009), para cada 1 °C adquirido na temperatura do corpo humano, cerca de 6% das espécies de fungos são excluídos como potenciais agentes patogênicos. Assim, a febre, uma resposta fisiológica à infecção ou lesão no qual ocorre um aumento temporário da temperatura humana corporal, pode reduzir significativamente a capacidade de sobrevivência e colonização de espécies fúngicas (Hasday *et al.*, 2000; Robert & Casadevall, 2009). Dessa forma, os fungos selecionados foram submetidos ao crescimento à 40 °C como uma simulação de febre alta no hospedeiro humano.

Discos de 4 mm de crescimento dos fungos filamentosos e uma suspensão de 10 µL das leveduras ajustada para turvação N° 0,5 da escala de McFarland (1×10^6 a 5×10^6 células por mL, 70% de transmitância a 530 nm) foram inoculados no centro de placas de Petri contendo ágar YM a 40 °C por até 15 dias. Os resultados foram determinados em presença e ausência de crescimento.

5 O ensaio foi realizado em triplicata.

5.7.2. Atividade hemolítica

Os fungos selecionados foram inoculados em ágar sangue a fim de verificar a capacidade hemolítica dos isolados. Para as leveduras foi preparado um inóculo a partir de uma alçada de células novas (até 5 dias de crescimento) de cada táxon ressuspendida em 2 mL de solução salina esterilizada (0,85% de NaCl), a qual foi ajustada para turvação equivalente a solução-padrão da escala de McFarland 0,5 em comprimento de onda de 530 nm. Esse procedimento fornece as suspensões-padrão das leveduras contendo 1×10^6 a 5×10^6 células por mL, o que corresponde a 70% de transmitância. Posteriormente, 10 µL foram inoculados no centro da placa de Petri contendo o meio ágar sangue. O inóculo dos fungos filamentosos consistiu em um disco de 4 mm de diâmetro da parte marginal do crescimento de cada fungo.

As placas contendo os inóculos das leveduras foram incubadas por 7 dias a 37 °C e aquelas com os fungos filamentosos por 7 dias a 25 e 37 °C. Ao realizar o teste de atividade hemolítica de fungos filamentosos em duas temperaturas, 25 e 37 °C, a intenção foi avaliar se havia variação no resultado devido à variação da temperatura, já que os protocolos disponíveis na literatura são diversos e a temperatura de incubação varia desde 25 até 37 °C. Os protocolos disponíveis para dermatófitos, geralmente, utilizam temperaturas entre 25 e 30 °C (Schaufuss *et al.*, 2007; Dogen *et al.*, 2015; Aktas & Yigit, 2015). Diante da existência de relatos de isolamento de fungos queratinofílicos (relacionados filogeneticamente com dermatófitos) a partir de solos ornitogênicos (Bölter *et al.*, 2002), a temperatura de 25 °C foi escolhida, de acordo com a literatura, para abranger esse tipo de fungos, caso fossem obtidos no trabalho. A presença de hemólise foi detectada como um halo ao redor da colônia (halo transparente = beta hemólise (completa), halo esverdeado= alfa hemólise (parcial) e ausência de halo=gama hemólise (ausente). O index hemolítico (Hi) foi calculado como a razão entre o diâmetro da colônia e o diâmetro da colônia mais o halo transparente. Quando Hi for igual a 1, a amostra foi negativa para atividade hemolítica; se Hi for menor que 1, a amostra foi considerada positiva (Price *et al.*, 1982). Como controle positivo foi utilizado *Candida albicans* ATCC 10231 e como controle negativo *Candida parapsilosis* ATCC 22019. O ensaio foi realizado em triplicata.

5.7.3. Crescimento em meio YM com diferentes faixas de pH

Os fungos selecionados foram submetidos ao crescimento em ágar YM com pH ajustado para 4 (próximo ao pH vaginal), 7 (próximo ao pH de tecidos e sangue humano), 9 (próximo ao pH intestinal) e incubados à temperatura de 37 °C (Davis, 2009). Os resultados foram classificados em presença e ausência de crescimento. O ensaio foi realizado em triplicata.

5.7.4. Diâmetro dos esporos

Os esporos dos fungos tiveram o seu maior diâmetro mensurado após a incubação em ágar batata dextrosado (BDA, Difco) às temperaturas de 15 e 25 °C, por meio do preparo de lâmina a fresco e visualização em microscópio óptico Leica (Modelo DM750, Alemanha). Foram medidos 20 esporos de cada fungo, sendo realizada uma média dos valores e com desvio padrão.

5.7.5. Produção de fosfolipase in vitro

O teste para verificação da produção de fosfolipase foi realizado segundo o método descrito por Price e colaboradores (1982) com modificações. Foi preparado um meio base contendo ágar Sabouraud dextrose, 57,5 g de cloreto de sódio, 0,50 g de cloreto de cálcio em 900 mL de água destilada. O meio foi autoclavado e, após o resfriamento até 40 °C foram adicionados 200 mL de uma emulsão de gema de ovo (50% gema de ovo, 50% solução salina). Os inóculos foram obtidos da mesma forma realizada para o teste hemolítico. As placas foram incubadas a 30 °C por até 10 dias. A atividade de fosfolipase (Pz) foi calculada como a razão entre o diâmetro da colônia e o diâmetro da colônia mais a zona de precipitação. Os resultados foram interpretados como descrito anteriormente para a atividade hemolítica. Como controle positivo foi utilizado *Candida albicans* ATCC 10231. Os testes foram realizados em triplicata.

5.7.6. Teste de sensibilidade à anfotericina B

Os fungos que apresentaram crescimento a 37 °C foram avaliados quanto à sensibilidade ao antifúngico anfotericina B (Sigma, EUA). Para tal determinação, foi utilizado o teste de concentração inibitória mínima (CIM) de acordo com os documentos M27-A3, referente às leveduras e M38-A2 para fungos filamentosos, ambos obtidos a partir do *Clinical and Laboratory*

Standards Institute (CLSI, 2008). O meio utilizado para esta metodologia foi o RPMI-1640 (com glutamina, sem bicarbonato e com o indicador de pH, vermelho de fenol). A solução estoque da anfotericina B foi preparada em dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma/EUA) em concentração 10 vezes à maior concentração testada. As concentrações de anfotericina B testadas foram de 0,015 µg/mL a 8 µg/mL. Para os testes, a solução estoque foi diluída cinco vezes com RPMI para se conseguir uma concentração de duas vezes a necessária e em seguida foram feitas as diluições.

Para o preparo dos inóculos das leveduras, colônias jovens dos isolados foram ressuspendidas em 5 mL de solução salina esterilizada 0,145 mol/L (8,5 g/L NaCl; salina a 0,85%). As suspensões resultantes foram homogeneizadas em vórtex por aproximadamente 15 segundos e as densidades celulares, ajustadas com espectrofotômetro, acrescentando-se solução salina suficiente para obter a transmitância de 75-77 % a 530 nm equivalente aquela de uma solução-padrão da escala de McFarland 0,5. Esse procedimento fornece as suspensões-padrão das leveduras contendo 1×10^6 a 5×10^6 células por mL. Estas suspensões foram diluídas 1:50 e depois 1:20 com o meio de cultura RPMI para se obter as densidades dos inóculos necessários para o teste duas vezes concentradas (de 1×10^3 a 5×10^3 células por mL).

Para o preparo dos inóculos dos fungos filamentosos, as colônias, de aproximadamente 7 dias, foram cobertas com 1 mL de solução salina (0,85% de NaCl) esterilizada. O líquido contendo os esporos ou fragmentos de hifas foi transferido para um tubo de ensaio esterilizado e após sedimentação, por decantação em repouso de 3 a 5 minutos a temperatura ambiente, o sobrenadante foi transferido para outro tubo de ensaio esterilizado e homogeneizado em vortex por aproximadamente 15 segundos. As densidades das suspensões dos esporos foram mensuradas e ajustadas para uma transmitância de acordo com o tamanho dos esporos de cada espécie fúngica a 530 nm. Para isolados dos gêneros *Aspergillus* spp. a transmitância variou de 80 a 82%, para os isolados de *Rhizopus* spp. de 68 a 70% e para espécies de *Penicillium* e *Byssoschamys* variou de 73-75%. Estas suspensões foram diluídas 1:50 com o meio de cultura correspondendo a 2x a densidade necessária de $0,4 \times 10^4$ a 5×10^4 células/mL aproximadamente.

Os testes foram realizados em placas de 96 poços. A coluna 1 foi o controle de esterilidade, na qual foi inoculado somente o meio de cultura. Nas colunas de 2 a 11 foram inoculados 100 µL das diluições da anfotericina B 2X. A fileira 2 continha a maior concentração da droga antifúngica e a fileira 11 a menor concentração. Nas fileiras, a partir do segundo poço, foram inoculados 100 µL da suspensão dos inóculos duas vezes concentrados. O volume final de cada poço foi de 200 µL, de forma que tanto as concentrações da droga quanto as concentrações dos inóculos diminuíram de 2X para 1X, atingindo assim os valores desejados. Os poços de controle positivo de crescimento (fileira 12) continham 100 µL de meio, sem droga, inoculados com 100 µL das

suspensões 2X concentradas dos inóculos. As microplacas foram incubadas a 37 °C por até 48 horas. Para leitura do ensaio foi observado a presença ou ausência de crescimento visível nos poços. As concentrações inibitórias mínimas foram determinadas a partir das menores concentrações da droga que levaram a uma redução de 100% do crescimento dos fungos. Os valores de referência para os testes de sensibilidade *in vitro* (µg/mL) para leveduras são os sugeridos para *Candida* spp. de acordo com protocolo CLSI (M27-A3, 2008b), já que não existem testes padronizados para as espécies de leveduras pertencentes a outros gêneros. Os valores de CIM para anfotericina B ainda não estão bem estabelecidos, mas quando se obtém um valor acima de 1 µg/mL para um isolado de *Candida* spp. é provável que o isolado seja resistente à anfotericina B (CLSI, M27-A3, 2008b). Da mesma maneira determinada para as leveduras, ainda não existem dados suficientes para classificar os fungos filamentosos em resistentes a determinado antifúngico, mas o CLSI (M38-A2, 2008a) sugere alguns valores de referência para os testes de sensibilidade com fungos filamentosos. De maneira geral, se a CIM for ≥ 4 , o fungo pode ser resistente a anfotericina B.

15

5.7.7. Teste da Tinta Nanquim (Tinta da China) e cultivo em Ágar Niger

Os isolados identificados como pertencentes ao gênero *Cryptococcus* foram submetidos ao teste utilizando tinta nanquim para visualização daquelas leveduras que possuem cápsula polissacarídica. A cápsula que circunda a célula não se cora com a tinta resultando em células claras em contraste com um fundo negro (Ikeda & Maeda, 2004). Uma gota de tinta nanquim foi colocada sobre uma lâmina e uma alçada da levedura, cultivada em meio Agar YM a 37 °C, foi inoculada sobre a tinta. A preparação foi coberta com uma lamínula e levada para observação ao microscópio óptico Leica (Modelo DM750, Alemanha) utilizando objetivas de 10X e 40X de aumento. As leveduras foram inoculadas em Ágar Niger (10% *Guizotia abyssinica*, 1% glicose, 0,1% KH₂PO₄, 2% ágar) e incubadas a 37 °C por até 8 dias com o intuito de identificar aqueles isolados capazes de produzir melanina. Este pigmento é revelado pela coloração marrom das colônias quando o fungo cresce em meios que contêm compostos fenólicos ou polifenólicos na sua composição, como é o caso da semente de Níger (*Guizotia abyssinica*). A enzima lacase presente na levedura atua sobre esse substrato, gerando quinonas como produtos, que sofrem um processo de autopolimerização, transformando-se em melanina. Esta fica retida na parede celular do fungo, sendo responsável pela expressão do pigmento escuro mostrado pelas colônias (Casadevall *et al.*, 2000). Foi utilizada como espécie referência *Cryptococcus neoformans* ATCC 28957, o qual é capaz de produzir melanina e é uma levedura encapsulada.

6. RESULTADOS

6.1. Isolamento, termotolerância, identificação e similaridade dos fungos

5

Ao final das coletas, 35 amostras de ornitosolos foram obtidas de Ilhas antárticas a partir de quatro espécies de aves. Ao final do processamento foram obtidos 481 isolados fúngicos (368 fungos filamentosos e 113 leveduras) nas diferentes condições de isolamento (Tabela 2). Todos os fungos obtidos foram avaliados quando a capacidade de crescer a 37 °C, dos quais 50 (17 leveduras e 33 fungos filamentosos) apresentaram crescimento (Tabela 2).

10

Tabela 2 Número de isolados obtidos após processamento das amostras de solos ornitogênicos e capacidade de crescer a 37 °C.

Condições de isolamento	Fungos filamentosos	Leveduras	Total
^a YM suplementado com Anfotericina B	54 (2)	15 (0)	69 (2)
^b DG18 suplementado com 18% glicerol 15 °C	0	2 (0)	2 (0)
Agar Sangue incubado a 25 °C	36 (5)	27 (2)	63 (7)
YM ajustado a pH 4 e incubado a 15 °C	92 (2)	32 (3)	124 (5)
YM ajustado a pH 7 e incubado a 15 °C	82 (2)	15 (3)	97 (5)
YM ajustado a pH 9 e incubado a 15 °C	82 (0)	16 (3)	98 (3)
YM ajustado a pH 4 e incubado a 37 °C	0	1	1
YM ajustado a pH 7 e incubado a 37 °C	0	2	2
YM ajustado a pH 9 e incubado a 37 °C	1	1	2
YM incubado a 37 °C	21	2	23
Total	368 (33)	113 (17)	481 (50)

^aYM = Ágar extrato de malte-extrato de levedura. ^bDG18 = Agar dicloran-glicerol. Entre parênteses está o número de isolados capazes de crescer a 37 °C após o ensaio de termotolerância.

15

Os 50 isolados que foram capazes de crescer a 37 °C foram submetidos ao processo de identificação molecular. Estes fungos foram agrupados em 20 morfotipos distintos e então submetidos à amplificação de diferentes regiões para posterior sequenciamento e identificação molecular. Após o sequenciamento, 14 táxons pertencentes aos filos *Ascomycota*, *Basidiomycota* e *Zygomycota* (Tabela 3; Figura 2) foram caracterizados.

20

Tabela 3 Identificação dos fungos presentes em solos ornitogênicos da Antártica.

Local/Ilha/Espécie de ave (nome comum)	Código UFMGCB ^a	Densidade (UFC/g)	Resultado Top BLAST (n° de acesso do GenBank)	Cobertura (%)	Identidade (%)	N° de bp	Espécie ou grupo taxonômico proposto ^f
Half Moon/ <i>Pygoscelis antarcticus</i> (Pinguim-de-barbicha)	Y5873	16	<i>Cryptococcus laurentii</i> (EU266564) ^b	100	98	510	<i>Cr. laurentii</i> (Bankit 1914359, Bankit 1914401)
			<i>Cryptococcus laurentii</i> (FN689393) ^c	100	99	580	
	11637	10	<i>Phlebia floridensis</i> (KP135383) ^b	100	99	560	* <i>Phlebia</i> sp. (Bankit 1914359)
Hannah point/Livingston/ <i>Pygoscelis antarcticus</i> (Pinguim-de-barbicha)	12103	100	<i>Byssochlamys spectabilis</i> (NR130679) ^b	100	100	466	<i>B. spectabilis</i> (Bankit 1914359, Bankit 1919765)
			<i>Talaromyces spectabilis</i> (EU037069) ^c	99	100	386	
	Y5870	20	<i>Cryptococcus laurentii</i> (FN689393) ^c	100	99	566	<i>Cr. laurentii</i> (Bankit 1914401)
	12108	450	<i>Penicillium chrysogenum</i> (AY373902) ^b	100	100	533	<i>P. chrysogenum</i> (Bankit 1914359, Bankit 1920337)
			<i>Penicillium chrysogenum</i> (AY495981) ^c	100	98	414	
Hannah point/Livingston/ <i>Pygoscelis papua</i> (Pinguim-gentoo)	11829	10	<i>Aspergillus fumigatus</i> (NR121481) ^b	100	100	429	<i>A. fumigatus</i> (Bankit 1914359, Bankit 1920306)
			<i>Aspergillus fumigatus</i> (KT150514) ^c	100	100	380	
	12167	10	<i>Chrysosporium keratinophilum</i> (AB361655) ^b	100	99	497	<i>C. keratinophilum</i> (Bankit 1914359)
	12173	10	<i>Eutypella</i> sp. (KP743030) ^b	100	100	516	* <i>Eutypella</i> sp. (Bankit 1914359, Bankit 1919981)
			<i>Eutypella scoparia</i> (EU864427) ^c	90	99	417	
	11830	10	<i>Psathyrella candolleana</i> (AF345810) ^b	100	99	511	* <i>Psathyrella</i> sp. (Bankit 1914359)
	11636	10	<i>Trametes</i> cf. <i>polyzona</i> (JN164979) ^b	100	100	530	* <i>Trametes</i> cf. <i>polyzona</i> (Bankit)

							1914359)
Ponta Vaoreal/Rei George/ <i>Macronectes giganteus</i> (Petrel-gigante-do-sul)	Y5973	57,5	<i>Debaryomyces macquariensis</i> (FR799729) ^e	99	99	554	<i>Debaryomyces</i> sp. (Bankit 1914401)
			<i>Debaryomyces macquariensis</i> (AM992909) ^b	100	100	540	
	11642	10	<i>Phanerochaete sordida</i> (KP986963) ^b	100	100	581	* <i>Phanerochaete</i> sp. (Bankit 1914359)
Rocha Shag/Rei George/ <i>Phalacrocorax atriceps</i> (Biguá-de-olhos-azuis)	11104	317,5	<i>Penicillium chrysogenum</i> (AY373902) ^b	100	100	550	<i>P. chrysogenum</i> (Bankit 1914359, Bankit 1920021, Bankit 1920387)
			<i>Penicillium harmonense</i> (AY495996) ^c	100	99	426	
			<i>Penicillium chrysogenum</i> (JX996668) ^d	100	99	662	
	Y382	310	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (NR073296) ^b	100	100	586	<i>Rh. Mucilaginosa</i> (Bankit 1914359, Bankit 1914401)
		<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (AF070432) ^c	100	100	559		
Two Summit/Rei George/ <i>Macronectes giganteus</i> (Petrel-gigante-do-sul)	11620	458	<i>Aspergillus fumigatus</i> (NR121481) ^b	100	100	474	<i>A. fumigatus</i> (Bankit 1914359, Bankit 1920319)
			<i>Aspergillus fumigatus</i> (KF314730) ^c	100	100	373	
	11616	12,5	<i>Byssochlamys spectabilis</i> (NR130679) ^b	100	100	453	<i>B. spectabilis</i> (Bankit 1914359)
	11631	10	<i>Peniophora crassitunicata</i> (KR093906) ^b	100	100	526	* <i>Peniophora</i> sp. (Bankit 1914359)
		<i>Rhizopus oryzae</i> (DQ119031) ^b	100	100	549	<i>R. oryzae</i> (Bankit 1914359)	

^aUFMGCB= Código da Coleção de Cultura de Micro-organismos e Células da Universidade Federal de Minas Gerais. Táxon sujeito a análise filogenética baseada no sequenciamento da região ^bITS, ^c β -tubulina, ^dPolimerase II e ^eD1/D2 do rRNA. ^fPosição taxonômica sugerida. *Fungos para os quais foram construídas árvores filogenéticas baseadas na região transcrita interna (ITS) da região gênica do rRNA.

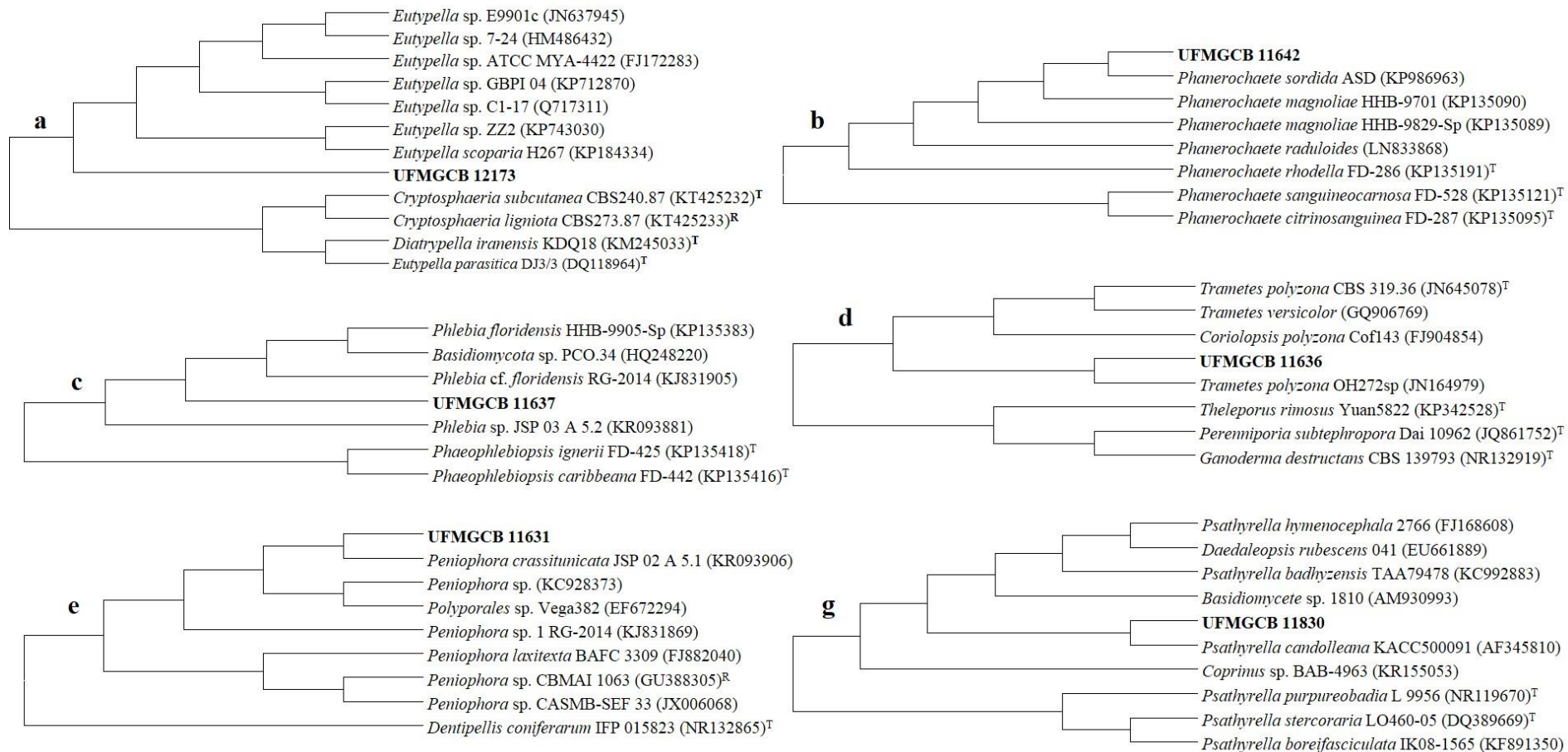


Figura 2 Árvores filogenéticas das sequências de fungos obtidos de solos ornitogênicos da Antártica Marítima (em negrito), em comparação com sequências espécies tipo (T) e referências (R) depositadas no banco de dados do GenBank. As árvores foram construídas baseadas na região transcrita interna ITS da região gênica do rRNA por meio do parâmetro composto máximo de *Likelihood*.

Os táxons mais abundantes encontrados nos ornitosolos das diferentes aves/ilhas, em termos de densidade (UFC/g), foram *Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus fumigatus*, *Rhodotorula mucilaginosa* e *Byssochlamys spectabilis*. Por outro lado, *Chrysosporium keratinophilum*, *Cryptococcus laurentii*, *Eutypella* sp., *Phanerochaete* sp., *Phlebia* sp., *Psathyrella* sp., *Rhizopus oryzae* e *Trametes* cf. *polyzona* apresentaram baixa densidade em UFC/g e podem ser considerados como raros dentro das comunidades obtidas. Em termos de similaridade dentro das comunidades, apenas as espécies *A. fumigatus*, *B. spectabilis* e *P. chrysogenum* ocorreram em mais de um tipo de solo ornitogênico (Figura 3).

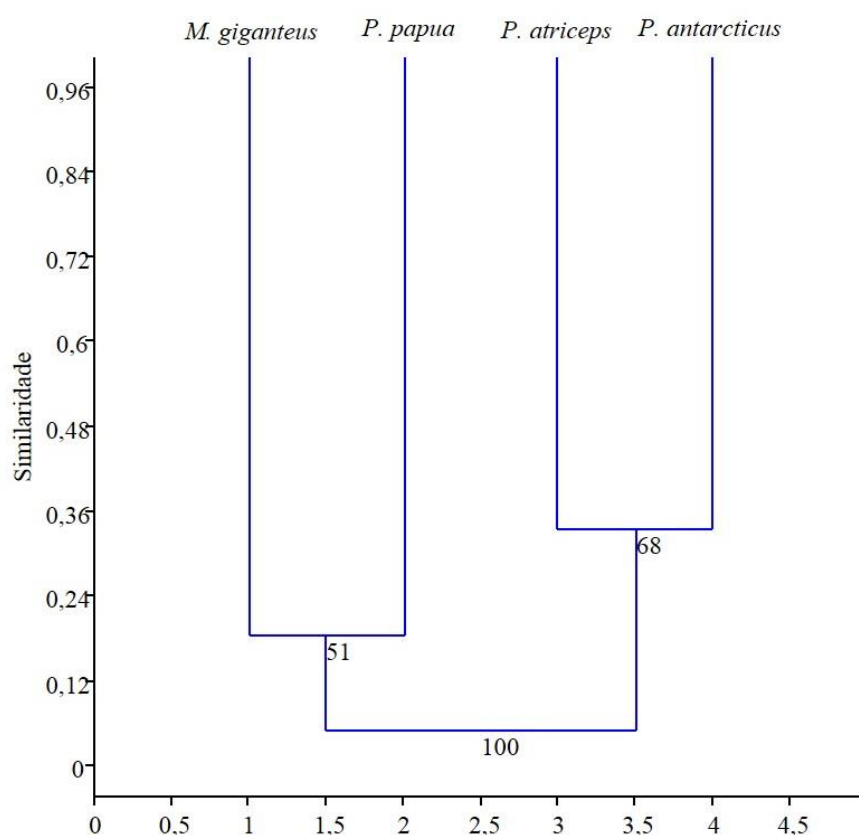


Figura 3 Dendrograma ilustrando a similaridade de táxons (índice de Sorensen) entre as comunidades de fungos presentes nos diferentes tipos de solos ornitogênicos estudados. *M. giganteus* = *Macronectes giganteus* (petrel gigante do Sul), *P. papua* = *Pygoscellis papua* (pinguim gentoo), *P. atriceps* = *Pygoscellis atriceps* (biguá de olhos azuis) e *P. antarcticus* = *Pygoscellis antarcticus* (pinguim de barbicha).

10 6.2. Ensaio dos fatores de virulência

Todos os resultados dos ensaios de virulência estão representados na Tabela 4. Dos 50 fungos selecionados por serem capazes de crescer a 37 °C, 29 isolados, representados pelos

táxons *A. fumigatus*, *B. spectabilis*, *Cr. laurentii*, *Phanerochaete* sp., *Rh. oryzae* e *T. cf. polyzona*, foram capazes de crescer à 40 °C.

Entre as 17 leveduras caracterizadas, todos os 12 isolados de *Cr. laurentii* produziram halo de hemólise completa (beta hemólise) em ágar sangue. Todos os isolados de *P. chrysogenum*, bem como os táxons *Peniophora* sp. UFMGCB 11631 e *C. keratinophilum* UFMGCB 12172 apresentaram halo de hemólise completa a 37 °C. Já os isolados *Psathyrella* sp. UFMGCB 11830 e *B. spectabilis* UFMGCB 12103 apresentaram hemólise parcial (alfa hemólise). Entretanto, a 25 °C todos os isolados de *P. chrysogenum*, *Peniophora* sp. UFMGCB 11631, *Phlebia* sp. UFMGCB 11637, *Psathyrella* sp. UFMGCB 11830, *A. fumigatus* UFMGCB 11829 e *B. spectabilis* UFMGCB 12103 foram capazes de produzir halos de hemólise parcial (Figura 4).

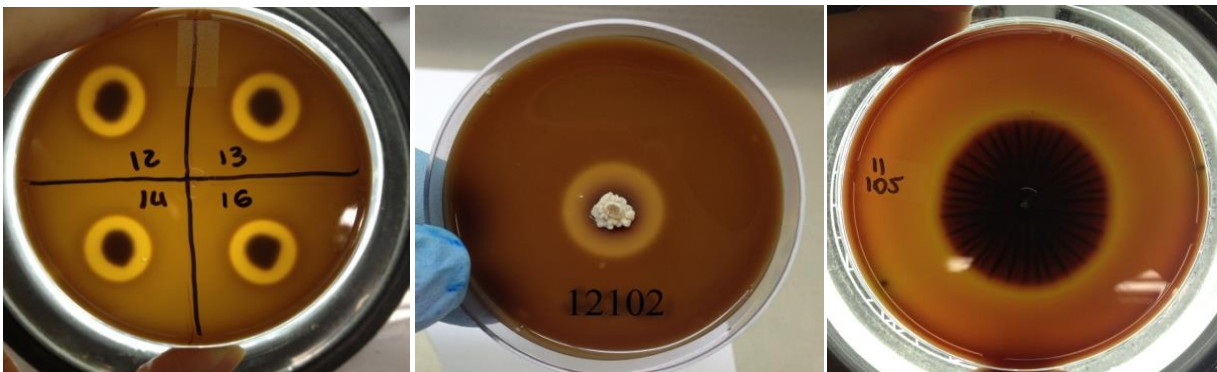


Figura 4 Halos de hemólise produzidos por fungos obtidos de solos ornitogênicos da Antártica. Isolados que apresentaram hemólise completa: (12) *Cryptococcus laurentii* UFMGCB Y5888; (13) *Cr. laurentii* UFMGCB Y5978; (14) *Cr. laurentii* Y5977; (16) *Cr. laurentii* UFMGCB Y5891; (12102) *Penicillium chrysogenum* UFMGCB 12102. Isolado que apresentou hemólise parcial: (11105) *P. chrysogenum* UFMGCB 11105.

A maioria dos fungos selecionados foi capaz de crescer nos três diferentes pHs. Apenas os isolados *C. keratinophilum* UFMGCB 12172, *Eutypella* sp. UFMGCB 12173, *Debaryomyces* sp. UFMGCB Y5913, *P. chrysogenum* UFMGCB 11102 e *Rh. mucilaginoso* UFMGCB Y382 não apresentaram crescimento em pH 4. Os únicos fungos que não cresceram em pH 9 foram *Debaryomyces* sp. UFMGCB Y5913 e *Peniophora* sp. UFMGCB 11631.

A dimensão dos esporos de 45, dos 50 isolados fúngicos, foram mensuradas. Não foram encontrados esporos dos isolados *Eutypella* sp. UFMGCB 12173, *Peniophora* sp. UFMGCB 11631, *Phanerochaete* sp. UFMGCB 11642, *Psathyrella* sp. UFMGCB 11830 e *T. cf. polyzona* UFMGCB 11636. Apenas os isolados de *B. spectabilis* UFMGCB 11618, UFMGCB 11619 e UFMGCB 12103 produziram esporos de tamanho não compatível com a deposição alveolar

(maior que 5 μm) à temperatura de 15 °C. Os esporos dos dois isolados de *C. keratinophilum* apresentaram diâmetros acima de 5 μm a 15, 25 e 37 °C.

Todos os isolados de *Cr. laurentii* foram capazes de produzir fosfolipase *in vitro*. Entre os fungos filamentosos, *Eutypella* sp. UFMGCB 12173, *R. oryzae* UFMGCB 11614, *R. oryzae* UFMGCB 11615 e *T. cf. polyzona* UFMGCB 11636 produziram fosfolipase (Figura 5).

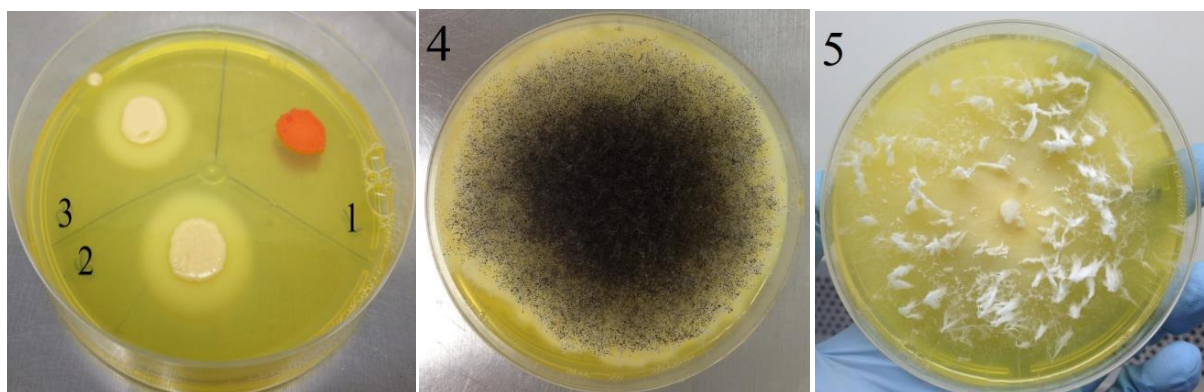


Figura 5 Leitura do teste de produção de fosfolipase *in vitro* por fungos isolados a partir de solos ornitogênicos da Antártica Marítima. Isolados positivos para produção de fosfolipase: (2) *Cryptococcus laurentii* UFMGCB ; (3) *Cr. laurentii* UFMGCB; (4) *Rhizopus oryzae* UFMGCB 11615; (5) *Eutypella* sp. UFMGCB 12173. Isolado negativo para a produção de fosfolipase: (1) *Rhodotorula mucilaginosa* UFMGCB Y382.

Após análise das lâminas com tinta nanquim foi visualizada cápsula polissacarídica em todos os isolados de *Cr. laurentii* (Figura 5). Entretanto, quando estas leveduras foram cultivadas em Ágar Níger, as mesmas apresentaram resultado negativo para produção de melanina.

O teste de susceptibilidade à anfotericina B foi realizado com 45 dos 50 isolados fúngicos selecionados, já que não foi possível a realização do inóculo dos isolados *Eutypella* sp. UFMGCB 12173, *Peniophora* sp. UFMGCB 11631, *Phanerochaete* sp. UFMGCB 11642, *Phlebia* sp. UFMGCB 11637 e *Psathyrella* sp. UFMGCB 11830, os quais não esporularam nos meios de cultura utilizados. Foram obtidas concentrações inibitórias mínimas (CIMs) menores que 0,015 $\mu\text{g/mL}$, e o valor máximo foi de 2 $\mu\text{g/mL}$.

Tabela 4 Condições de cultivo e determinação dos fatores de virulência dos fungos presentes em solos ornitogênicos da Antártica Marítima.

Espécie de fungo	UFMGCB ^a	Condições de isolamento	Crescimento 40 °C	CIM ^g 37°C	Crescimento a 37 °C em diferentes pHs			Atividade de fosfolipase (Pz)	Index hemolítico (Hi)		Tamanho dos esporos (µm) em diferentes temperaturas (°C)		Cápsula	Melanina
					pH 4	pH 7	pH 9		25°C	37°C	15°	25°		
<i>Aspergillus fumigatus</i>	11829	YM ^b /pH 7/15°C	+ ^e	1,0	+	+	+	-	P ⁱ	-	2,92 ± 0,38	2,81 ± 0,51	NA	NA
<i>A. fumigatus</i>	11620	YM/37°C	+	0,5	+	+	+	-	-	-	3,65 ± 0,45	2,53 ± 0,33	NA	NA
<i>A. fumigatus</i>	11621	YM/37°C	+	0,5	+	+	+	-	-	-	2,80 ± 0,50	2,43 ± 0,26	NA	NA
<i>A. fumigatus</i>	11622	YM/37°C	+	1,0	+	+	+	-	-	-	2,95 ± 0,56	2,39 ± 0,41	NA	NA
<i>A. fumigatus</i>	11623	YM/37°C	+	1,0	+	+	+	-	-	-	2,68 ± 0,20	2,74 ± 0,23	NA	NA
<i>A. fumigatus</i>	11624	YM/37°C	+	0,5	+	+	+	-	-	-	3,27 ± 0,55	2,59 ± 0,32	NA	NA
<i>A. fumigatus</i>	11625	YM/37°C	+	0,5	+	+	+	-	-	-	3,01 ± 0,40	2,67 ± 0,18	NA	NA
<i>A. fumigatus</i>	11626	YM/37°C	+	0,5	+	+	+	-	-	-	2,85 ± 0,39	2,76 ± 0,43	NA	NA
<i>A. fumigatus</i>	11627	YM/37°C	+	0,5	+	+	+	-	-	-	3,09 ± 0,69	2,62 ± 0,35	NA	NA
<i>Byssoschlamys spectabilis</i>	12103	YM/AMB ^c /15°C	+	<0,015	+	+	+	-	P	P	7,32 ± 0,77	2,53 ± 0,68	NA	NA
<i>B. spectabilis</i>	11616	YM/37°C	+	<0,015	+	+	+	-	-	-	5,30 ± 1,69	5,20 ± 1,30	NA	NA
<i>B. spectabilis</i>	11617	YM/37°C	+	0,25	+	+	+	-	-	-	5,49 ± 1,39	5,89 ± 1,17	NA	NA
<i>B. spectabilis</i>	11618	YM/37°C	+	1,0	+	+	+	-	-	-	7,29 ± 1,55	2,24 ± 0,37	NA	NA
<i>B. spectabilis</i>	11619	YM/37°C	+	0,0625	+	+	+	-	-	-	7,61 ± 1,66	2,31 ± 0,46	NA	NA
<i>Chrysosporium keratinophilum</i>	12167	AS ^d /25°C	- ^f	0,50	+	+	+	-	-	-	11,80 ± 2,26	8,66 ± 3,56	NA	NA
<i>C. keratinophilum</i>	12172	AS/25°C	-	0,50	-	+	+	-	-	0,91	9,46 ± 1,06	10,22 ± 2,23	NA	NA
<i>Cryptococcus laurentii</i>	Y5873	YM/pH 7/37°C	+	2,0	+	+	+	0,86	NA ^j	0,52	NA	NA	+	-
<i>Cr. laurentii</i>	Y5934	pH 4/15°C	+	2,0	+	+	+	0,85	NA	0,50	NA	NA	+	-
<i>Cr. laurentii</i>	Y5874	pH 7/15°C	+	2,0	+	+	+	0,85	NA	0,50	NA	NA	+	-
<i>Cr. laurentii</i>	Y5977	pH 9/15°C	+	2,0	+	+	+	0,87	NA	0,58	NA	NA	+	-
<i>Cr. laurentii</i>	Y5870	YM/37°C	+	2,0	+	+	+	0,88	NA	0,53	NA	NA	+	-
<i>Cr. laurentii</i>	Y5872	pH 7/37°C	+	2,0	+	+	+	0,86	NA	0,53	NA	NA	+	-
<i>Cr. laurentii</i>	Y5871	pH 9/37°C	+	2,0	+	+	+	0,87	NA	0,51	NA	NA	+	-
<i>Cr. laurentii</i>	Y5869	pH 4/37°C	+	2,0	+	+	+	0,88	NA	0,55	NA	NA	+	-
<i>Cr. laurentii</i>	Y6068	pH 4/15°C	-	2,0	+	+	+	0,88	NA	0,50	NA	NA	+	-
<i>Cr. laurentii</i>	Y5888	pH 7/15°C	+	2,0	+	+	+	0,89	NA	0,58	NA	NA	+	-
<i>Cr. laurentii</i>	Y5978	pH 9/15°C	+	2,0	+	+	+	0,87	NA	0,58	NA	NA	+	-
<i>Cr. laurentii</i>	Y5891	AS/25°C	+	2,0	+	+	+	0,88	NA	0,59	NA	NA	+	-

<i>Debaryomyces sp.</i>	Y5942	pH 4/15°C	-	1,0	+	+	+	-	NA	-	NA	NA	-	NA
<i>Debaryomyces sp.</i>	Y5881	pH 7/15°C	-	1,0	+	+	+	-	NA	-	NA	NA	-	NA
<i>Debaryomyces sp.</i>	Y5973	pH 9/15°C	-	1,0	+	+	+	-	NA	-	NA	NA	-	NA
<i>Debaryomyces sp.</i>	Y5913	AS/25°C	-	1,0	-	+	-	-	NA	-	NA	NA	-	NA
<i>Eutypella sp.</i>	12173	pH 4/15°C	-	ND	-	+	+	+	-	-	NE ^k	NE	NA	NA
<i>Penicillium chrysogenum</i>	11102	YM/37°C	-	0,5	-	+	+	-	P	0,17	2,95 ± 0,22	1,19 ± 0,13	NA	NA
<i>P. chrysogenum</i>	11103	YM/37°C	-	1,0	+	+	+	-	P	0,66	2,86 ± 0,29	1,07 ± 0,13	NA	NA
<i>P. chrysogenum</i>	11104	YM/37°C	-	1,0	+	+	+	-	P	0,32	2,64 ± 0,30	0,96 ± 0,08	NA	NA
<i>P. chrysogenum</i>	11105	YM/37°C	-	2,0	+	+	+	-	P	0,42	3,03 ± 0,42	1,05 ± 0,27	NA	NA
<i>P. chrysogenum</i>	11507	YM/37°C	-	2,0	+	+	+	-	P	0,24	2,63 ± 0,21	2,33 ± 0,29	NA	NA
<i>P. chrysogenum</i>	11508	YM/37°C	-	2,0	+	+	+	-	P	0,31	2,38 ± 0,32	2,62 ± 0,26	NA	NA
<i>P. chrysogenum</i>	12108	pH 4/15°C	-	2,0	+	+	+	-	P	0,45	2,89 ± 0,26	3,06 ± 0,27	NA	NA
<i>P. chrysogenum</i>	11506	YM/37°C	-	2,0	+	+	+	-	P	0,33	2,68 ± 0,35	2,47 ± 0,17	NA	NA
<i>P. chrysogenum</i>	12102	AS/25°C	-	1,0	+	+	+	-	P	0,42	3,07 ± 0,32	3,10 ± 0,41	NA	NA
<i>Peniophora sp.</i>	11631	YM/AMB/15°C	-	ND	+	+	-	-	P	0,86	NE	NE	NA	NA
<i>Phanerochaete sp.</i>	11642	pH 9/37°C	+	ND	+	+	+	-	-	-	NE	NE	NA	NA
<i>Phlebia sp.</i>	11637	AS/25°C	-	ND	+	+	+	-	P	-	2,19 ± 0,58	1,68 ± 0,33	NA	NA
<i>Psathyrella sp.</i>	11830	pH 7/15°C	-	ND	+	+	+	-	P	P	NE	NE	NA	NA
<i>Rhizopus oryzae</i>	11614	YM/37°C	+	2,0	+	+	+	+	-	-	5,30 ± 0,75	2,00 ± 0,45	NA	NA
<i>R. oryzae</i>	11615	YM/37°C	+	2,0	+	+	+	+	-	-	5,15 ± 0,81	2,09 ± 0,26	NA	NA
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	Y382	YM/37°C	-	1,0	-	+	+	-	NA	-	NA	NA	NA	NA
<i>Trametes cf. polyzona</i>	11636	AS/25°C	+	1,0	+	+	+	0,64	-	-	NE	NE	NA	NA

^aUFMGCB = Código da Coleção de Cultura de Micro-organismos e Células da Universidade Federal de Minas Gerais. ^bYM = Ágar extrato de malte-extrato de levedura. ^cAMB = Anfotericina B. ^dAS = Ágar Sangue. ^e(+) presença ^f(-) ausência. ^gCIM = Concentração Inibitória Mínima em µg/mL. ^hND = Não determinado. ⁱP = parcial. ^jNA = Não se aplica. ^kNE = não encontrado.

7. DISCUSSÃO

Após o processo de isolamento seletivo dos fungos presentes nos diferentes solos ornitogênicos, foram identificados táxons pertencentes a 14 gêneros. Os táxons mais abundantes encontrados nos diferentes ornitosolos foram *P. chrysogenum*, *A. fumigatus*, *Rh. mucilaginosa* e *B. spectabilis*. Por outro lado, *Ch. keratinophilum*, *Cr. laurentii*, *Eutypella* sp., *Phanerochaete* sp., *Phlebia* sp., *Psathyrella* sp., *R. oryzae* e *T. cf. polyzona* ocorreram em baixa frequência. Apenas as espécies *A. fumigatus*, *B. spectabilis* e *P. chrysogenum* ocorreram em mais de um tipo de solo ornitogênico.

Os isolados de *P. chrysogenum* apresentaram crescimento nas diferentes faixas de pHs a 37 °C, halo de hemólise parcial e completa, bem como esporos compatíveis com a deposição alveolar. *Penicillium chrysogenum* é um fungo ubíquo de distribuição global que ocupa um grande número de habitats como ambientes internos, desertos, alimentos secos, salinas e queijo (Frisvad & Samson, 2004). Na Antártica, esse fungo foi encontrado em diferentes amostras, incluindo gelo continental (Abyzov & Beliakova, 1982; Abyzov, 1993), solos ornitogênicos (McRae *et al.*, 1999), associado a macroalgas (Godinho *et al.*, 2013) e solos oligotróficos continentais (Godinho *et al.*, 2015). Além disso, *P. chrysogenum* foi isolado por Zucconi e colaboradores (2012) como uma espécie dominante presente no permafrost na Antártica e em altas densidades em rochas da Antártica Continental (Gonçalves *et al.*, 2016). A obtenção de espécies de *Penicillium* a partir de solos influenciados por aves pode ser explicada pela capacidade destes fungos crescerem em substratos ricos em nutrientes como os solos ornitogênicos da Antártica (McRae *et al.*, 1999).

Alguns relatos de infecções humanas estão associados a *P. chrysogenum*, como por exemplo, otomicose, endoftalmite, ceratite, endocardite, infecção cutânea e infecção sistêmica em pacientes imunocomprometidos (de Hoog *et al.*, 2001). *Penicillium chrysogenum* é considerado um dos mais importantes causadores de alergias, como asma e pneumonite de hipersensibilidade (Geltner *et al.*, 2013). Além disso, essa espécie já foi relatada como causadora de infecção em corrente sanguínea e doença intestinal em pacientes imunocomprometidos (Swoboda-Kopec *et al.*, 2003; Barcus *et al.*, 2005), infecções cerebrais invasivas em indivíduos sem comprometimento imunológico (Lyratzopoulos *et al.*, 2002; Kantarcioglu *et al.*, 2004) e micose pulmonar invasiva em um paciente transplantado (Geltner *et al.*, 2013). Donohue e colaboradores (2005) isolaram a hemolisina crisolisina a partir de isolados de *P. chrysogenum* do ar de ambientes internos, que é capaz de promover resposta inflamatória em macrófagos, o que pode ser importante na instalação da infecção pelo fungo. Mais recentemente, Gonçalves e colaboradores (2016) relataram a

produção de hemólise parcial por isolados de *P. chrysogenum* obtidos a partir de rochas da Antártica Continental.

Todos os isolados de *A. fumigatus* apresentaram capacidade de crescer a 40 °C, nos pHs 4, 7 e 9 e seus esporos apresentaram diâmetros $\leq 4,10 \mu\text{m}$. Além disso, um dos isolados foi capaz de gerar hemólise parcial à 25 °C. *Aspergillus fumigatus* é um fungo ubíquo, sapróbio, termotolerante e com distribuição global, o qual desempenha um papel essencial na reciclagem do carbono e nitrogênio na natureza (Latgé, 2001). Seu nicho ecológico natural é o solo, onde sobrevive e cresce em detritos orgânicos, mas devido a sua capacidade de esporular abundantemente seus conídios são facilmente dispersos pelo ar (Latgé, 1999; Perez-Nadales *et al.*, 2014). *Aspergillus fumigatus* é, também, um conhecido patógeno oportunista de aves, incluindo os pinguins (Vishniac, 1996; Alvarez-Perez *et al.*, 2010). Na Antártica, *A. fumigatus* foi isolado a primeira vez a partir de solos ornitogênicos da região do Mar de Ross (Wicklow, 1968) e posteriormente encontrado em solos ornitogênicos, solos com biomassa algal e guano próximo à Estação Davis, Ilha Sabrina e Estação Casey (Península Bailey) (Ellis, 1980), bem como em solos com musgos, líquens e gramínea da Ilha Livingston (Gerginova *et al.*, 2013). A presença de *A. fumigatus* na Ilha Livingston, onde foram obtidas amostras deste estudo, foi previamente relatada por Gerginova e colaboradores (2013), corroborando assim com o resultado obtido neste trabalho. Entretanto, o trabalho desses autores foi realizado em solos minerais diferentes dos ornitogênicos.

Aspergillus fumigatus é o fungo patogênico transportado pelo ar mais perigoso para os seres humanos, o qual pode levar a altas taxas de mortalidade (Perez-Nadales *et al.*, 2014; Pollmächer & Figge, 2015). Esse fungo é uma comum causa de infecção nosocomial (adquirida em ambiente hospitalar) em indivíduos imunocomprometidos e ocasionalmente é encontrado colonizando dispositivos médicos implantados (Desai *et al.*, 2014). Os conídios de *A. fumigatus* infectam, diariamente, milhões de indivíduos causando alergias associadas a asma, sinusite alérgica e broncoalveolite (Perez-Nadales *et al.*, 2014). Em indivíduos com o sistema imune alterado, como por exemplo, portadores de leucemia e transplantados, podem desenvolver aspergilose invasiva, em que o pulmão é o local de infecção em 70% dos casos e representa um alto risco de morte (Perez-Nadales *et al.*, 2014; Pollmächer & Figge, 2015) em imunocomprometidos. A literatura relata a produção de substâncias tóxicas com atividade hemolítica produzidas por *A. fumigatus*, sendo o mais conhecido a Asp-hemolisina que tem efeito citotóxico sobre eritrócitos, macrófagos e células endoteliais causando hemorragia em modelos animais, porém ainda é um assunto pouco estudado e ainda não se sabe claramente a relação das hemolisinas na patogênese causada por fungos (Sharon *et al.*, 2009; Abad *et al.*, 2010; Aboul-Nasr *et al.*, 2013; Theeb *et al.*, 2013).

A levedura *Rh. mucilaginosa* foi capaz de crescer apenas nos pHs 7 e 9 a 37 °C. *Rhodotorula mucilaginosa* (= *Rh. rubra*) é uma das espécies de leveduras basidiomicéticas mais ubíquas presente em substratos de habitats terrestres e aquáticos (águas continental e marinha), incluindo aqueles com condições extremas, e faz parte da microbiota humana normal (Kurtzman *et al.*, 5 2011). Essa levedura é descrita pela caráter psicotolerante e capacidade de crescer em uma ampla faixa de pH (Russo *et al.*, 2008; Villarreal *et al.*, 2015). Na Antártica, *Rh. mucilaginosa* já foi encontrada em solos minerais (Ray *et al.*, 1989; Vishniac, 1996), lagos (Vaz *et al.*, 2011, Gonçalves *et al.*, 2012) e associada com macroalgas (Loque *et al.*, 2010;. Godinho *et al.*, 2013; Furbino *et al.*, 2014) e líquens (Santiago *et al.*, 2015). Pavlova e colaboradores (2001) já havia 10 relatado o isolamento dessa levedura a partir de solos ornitogênicos com colônias de gaivota *Larus domenicanus* na Ilha Livingston, assim, o isolamento de *Rh. mucilaginosa* a partir de solos associados à biguás na Antártica verificado no presente trabalho pode ser o primeiro a ser relatado.

Infecções causadas por *Rh. mucilaginosa* são raras, mas o aumento na frequência com a qual têm sido relatados os casos infecciosos em imunossuprimidos tem indicado que esta levedura pode 15 ser incluída na lista de patógenos oportunistas (Kurtzman *et al.*, 2011). Fungemia associada a catéteres é a forma mais comum de infecção e causa de morte entre todas as doenças associadas com *Rh. mucilaginosa* (Krzyściak & Macura, 2010), mas existem casos relatados de endocardite, infecção de prótese femoral, meningite, linfadenite, infecções cutâneas nos pés e onicomicose (Diekema *et al.*, 2005; da Cunha *et al.*, 2009; Fung *et al.*, 2009; Wirth & Goldani, 2012).

Diferentes isolados de *B. spectabilis* apresentaram a capacidade de crescer a 40 °C e em 20 diferentes pHs, além disso, apresentaram atividade hemolítica e produção de esporos com diâmetro compatível com a deposição alveolar. *Byssochlamys spectabilis* [descrito também como *Talaromyces spectabilis* por Udagawa e Suzuki (1994)] é o teleomorfo de *Paecilomyces variotii* (Houbraken *et al.*, 2008). Como uma espécie sinônima de *P. variotii*, *B. spectabilis* é relatado 25 como um ascomiceto termotolerante, cosmopolita presente em solos, ambientes internos, adubo, madeira e diversos gêneros alimentícios (incluindo sucos de frutas pasteurizados e pão de centeio) (Samson *et al.*, 2009; Houbraken *et al.*, 2010). Por ser uma espécie termotolerante, capaz de crescer rapidamente, produzir micotoxinas e sobreviver a tratamentos térmicos a baixos níveis de oxigênio e na presença de conservantes, *B. spectabilis* é um fungo deteriorador de alimentos 30 provocando, assim, grandes perdas econômicas (Houbraken *et al.*, 2008). Na Antártica, os poucos relatos de isolamento de *B. spectabilis* são a partir de vegetação da Ilha Macquarie, situada entre a Austrália e a Antártica (Kerry & Weste, 1985), do ar atmosférico da Estação Indiana Maitri (Singh & Agarwal, 1998) e em rochas da Antártica Continental (Gonçalves *et al.*, 2016).

Byssochlamys spectabilis encontra-se associado a vários tipos de infecções humanas e está entre os fungos emergentes causadores de micoses oportunistas em hospedeiros imunocomprometidos (Houbraken *et al.*, 2010). Além disso, são relatados casos de endocardite (Castro *et al.*, 1990), pneumonia (Byrd *et al.*, 1992), sinusite (Eloy *et al.*, 1997), otite média (Dhindsa *et al.*, 1995) hialohifomicose cutânea (Athar *et al.*, 1996), onicomicose (Arenas *et al.*, 1998), infecção de feridas em indivíduo transplantado (Lee *et al.*, 2002), endoftalmite (Tarkkanen *et al.*, 2004). Taira e colaboradores (2011) relataram a produção de hemólise parcial por *B. spectabilis*, corroborando com o resultado obtido.

Os isolados de *C. keratinophilum* foram capazes de crescer nas diferentes faixas de pHs e um deles apresentou halo de hemólise completa a 37 °C. *Chrysosporium keratinophilum* é o anamorfo de *Aphanoascus keratinophilus* (de Hoog *et al.*, 2001) e é um fungo ascomiceto queratinofílico que se desenvolve naturalmente em diferentes solos do mundo, o qual é classificado como alcalotolerante crescendo na faixa de pH 4,5 a 9,5 (Deshmukh, 2002; Bohacz & Korniłowicz-Kowalska, 2012; Gugnani *et al.*, 2012; Anane *et al.*, 2015). *Chrysosporium keratinophilum* já foi encontrado em penas e solos associados a pássaros na França, Polônia e Arábia Saudita (Camin *et al.*, 1998; Mandeel *et al.*, 2011; Kitowski *et al.*, 2014) e aves como galinhas e patos na Eslováquia (Kacinova *et al.*, 2013). Além disso, *C. keratinophilum* foi isolado também em poeira doméstica (Nigam & Kushwaha, 1990) e areia do Mar Mediterrâneo (Katiyar & Kushwaha, 1997) que são substratos pobres em matéria orgânica (Kushwaha, 2000). Existem apenas dois relatos do isolamento desse fungo em solos chilenos na Antártica (Caretta & Piontelli, 1977, 2004). De acordo com Bölter e colaboradores (2002), a presença de fungos queratinofílicos em solos em que aves realizam a troca de penas é típica e bem documentada. Uma correlação positiva entre a frequência de *C. keratinophilum* e valores de fósforo já foi observada, lembrando que os solos ornitogênicos apresentam altos níveis de fósforo, encontra-se então, mais uma justificativa para a presença do fungo nesse substrato (Bohacz & Korniłowicz-Kowalska, 2012). Infecções causadas por *C. keratinophilum* não são comuns, mas esse fungo já foi encontrado em alguns casos de onicomicoses e infecções superficiais em humanos, sendo em alguns casos os indivíduos afetados portadores de diabetes do Tipo 2 (de Hoog *et al.*, 2001; Manzano-Gayosso *et al.*, 2008; Kacinova *et al.*, 2013). Não existem dados anteriores sobre hemólise para essa espécie, mas como ela está relacionada a casos de infecção em humanos a atividade hemolítica aqui detectada pode ser importante para o estabelecimento de *C. keratinophilum* como patógeno.

Todos os isolados de *Cr. laurentii* apresentaram crescimento a 40 °C, CIM igual a 2 µg/mL, crescimento em pHs 4, 7 e 9 a 37 °C, produção de fosfolipase, atividade hemolítica e produção de cápsula polissacarídica. *Cryptococcus laurentii* é uma levedura basidiomicética, criotolerante,

encapsulada, originalmente sapróbia, de distribuição mundial e tem sido isolada de solos (incluindo aqueles associados a aves), pombos, excreta de aves e ocos de árvores em decomposição (Ferreira-Paim *et al.*, 2012). Os registros de isolamento de *Cr. laurentii* na Antártica descrevem sua presença em associação a musgos coletados em Livingston e Victoria Land (Zlatanov *et al.*, 2001; Tosi *et al.*, 2002).

Cryptococcus laurentii era considerada uma espécie não patogênica para humanos; no entanto, o número de casos de infecções causadas por ela tem crescido nas últimas décadas tornando-a de grande importância médica (Andrade-Silva *et al.*, 2010). Já existem diferentes relatos de *Cr. laurentii* como o agente etiológico de infecções de pele, ceratites, endoftalmites, abscessos pulmonares, peritonites, meningites e fungemias (Kamalam *et al.*, 1977; Custis *et al.*, 1995; Kordossis *et al.*, 1998; Ajesh & Sreejith, 2012; Neves *et al.*, 2015), sendo a maioria dos indivíduos imunocomprometidos. Entretanto, existe um relato de infecção de pele em uma criança imunocompetente (Molina-Leyva *et al.*, 2013). Em relação ao teste de sensibilidade à anfotericina B, todos os isolados de *Cr. laurentii* apresentaram resistência com CIMs maiores que 1 µg/mL. Poucos ainda são os estudos com essa espécie de levedura, mas já existem relatos de resistência à anfotericina B em isolados ambientais, o que é relevante já que esse fármaco é considerado eficiente para tratamento de criptococose (Pedroso *et al.*, 2006; Ferreira-Paim *et al.*, 2012). Resultados de outros trabalhos corroboram com os dados de produção de fosfolipase encontrados neste trabalho para *Cr. laurentii*, mostrando que possivelmente essa enzima seja um fator de virulência importante para essa espécie, assim como é para *Cr. neoformans* e *Cr. gatti*, atuando no processo de adesão e penetração da levedura (Chan & Tay, 2008; Andrade-Silva *et al.*, 2010; Ferreira-Paim *et al.*, 2012). A produção de halo de hemólise completa pelos isolados de *Cr. laurentii* no presente trabalho está de acordo com o único trabalho, até o momento, que aborda atividade hemolítica nessa espécie (Ferreira-Paim *et al.*, 2012). Esta capacidade de produzir hemólise, de acordo com Ferreira-Paim e colaboradores (2012) pode sugerir a potencial patogenicidade da espécie e, eventualmente, ser associada com a sua capacidade de crescer no sangue como observado em casos humanos relatados. Poucos trabalhos relatam a presença de cápsula polissacarídica em *Cr. laurentii* mas ela pode estar associada a uma maior virulência em isolados da espécie inibindo a fagocitose e impedindo a ação do sistema imune do hospedeiro (Ikeda & Maeda, 2004; Andrade-Silva *et al.*, 2010; Ferreira-Paim *et al.*, 2012).

Rhizopus oryzae foi capaz de crescer a 40 °C e em diferentes faixas pHs, seus esporos apresentaram diâmetro compatível com a deposição alveolar. Além disso, *R. oryzae* produziu fosfolipase. *R. oryzae* [descrito também como *R. arrhizus* por Fischer (1892)] é um fungo zigomiceto de distribuição mundial com alta prevalência nas regiões tropicais e subtropicais

(Battaglia *et al.*, 2011). Conhecido como sapróbio ubíquo em solos, *R. oryzae* é a espécie ambiental mais comum dentro do gênero *Rhizopus* e já foi isolado a partir de diversos substratos, incluindo uma grande variedade de solos, vegetação em decomposição, frutas, legumes, sementes e excretas de animais (Domsch *et al.*, 1980; Ribes *et al.*, 2000; Battaglia *et al.*, 2011).

5 *Rhizopus oryzae* é o principal causador de mucormicose (zigomicose), uma infecção fúngica oportunista angioinvasiva, altamente destrutiva que leva a uma infecção disseminada com necrose de tecidos, afetando principalmente indivíduos imunocomprometidos (Ribes *et al.*, 2000; Ibrahim *et al.*, 2010). Existem evidências *in vitro* de que *R. oryzae* e outros membros da ordem *Mucorales* têm uma reduzida sensibilidade à resposta imune inata em comparação com outros fungos mais
10 comuns, tais como *A. fumigatus* ou *C. albicans* (Katrakko *et al.*, 2013). Indivíduos imunocompetentes podem ser afetados por esse zigomiceto, como é o caso de doenças pulmonares alérgicas (Ribes *et al.*, 2000). Yokoi e colaboradores (1999) relataram a mucormicose pulmonar em um indivíduo não imunocomprometido causada por *R. oryzae*. Em casos de existência de alguma porta de entrada, como por exemplo, um trauma cutâneo ou ferida pós cirúrgica, pode
15 haver a introdução de esporos e uma possível infecção de *R. oryzae* (Ribes *et al.*, 2000). Não existem relatos de produção de fosfolipase por espécies de *Rhizopus* relacionada à virulência em humanos. As fosfolipases produzidas por fungos desse gênero parecem não estar envolvidas no processo infeccioso mas são importantes na sobrevivência nos diversos substratos em que são encontrados, apresentando grande potencial biotecnológico como biocatalisadores em indústrias
20 de biodiesel, alimentos, detergentes, etc (Borrelli & Trono, 2015).

Foram obtidos quatro isolados de *Debaryomyces* sp. a partir de amostras de ornitosolos da Ilha Rei George (Ponta Vaureal) ocupado por colônias de *M. giganteus*. Estes isolados de *Debaryomyces* sp. apresentaram crescimento em diferentes faixas de pHs a 37 °C. O gênero *Debaryomyces* inclui espécies de leveduras ascomicéticas osmotolerantes e capazes de crescer em
25 meios e alimentos contendo até 4 M NaCl e 5 % de glicose, as quais são frequentemente encontradas como deterioradores de alimentos salgados, açucarados e fermentados de alta osmolaridade, além disso podem ser isoladas a partir de solos e água do mar (Kurtzman *et al.*, 2011). Na Antártica, representantes do gênero já foram isolados de solos da Península e Antártica Continental (Arenz & Blanchette, 2009; 2011; Godinho *et al.*, 2015), solos próximos a colônias de
30 pinguins (Arenz *et al.*, 2006) e rizosfera da gramínea antártica *Deschampsia antarctica* na Ilha Rei George (Vaz *et al.*, 2011). Algumas espécies de *Debaryomyces* apresentam importância clínica, como por exemplo: *D. fabryi* e *D. hansenii*, que são ocasionalmente isoladas de infecções cutâneas (Kurtzman *et al.*, 2011) e infecções sanguíneas relacionadas a cateter, bem como de peritonite e mediastinite (Beyda *et al.*, 2013).

Os fungos *T. cf. polyzona*, *Psathyrella* sp., *Eutypella* sp., *Peniophora* sp., *Phlebia* sp. e *Phanerochaete* sp. demonstraram resultados positivos para alguns dos fatores de virulência testados, porém, tais gêneros, de uma maneira geral, não apresentam espécies com importância médica. Assim, as características apresentadas por estes fungos nos testes realizados neste trabalho
5 podem tratar-se somente de atributos que os permitem sobreviver e colonizar os diversos substratos em que são encontrados. Porém, a possibilidade de que algum dia, como consequência do aquecimento global ou da ocorrência de mutações, algum fungo destes gêneros não patogênicos se torne capaz de infectar o ser humano deve ser considerada.

O único isolado obtido de *Trametes cf. polyzona* (= *Coriolopsis polyzona*) foi isolado a partir
10 de solo ornitogênico da Ilha Livingston relacionado à espécie de pinguim *P. papua*. *Trametes polyzona* é um basidiomiceto ligninolítico de distribuição pantropical e causador da podridão branca em madeira (Cabana *et al.*, 2009; Vlasák *et al.*, 2011), e que não havia sido relatado ainda na Antártica.

O gênero *Eutypella* inclui aproximadamente 78 espécies, apresenta distribuição global e inclui
15 fungos endofíticos (Isaka *et al.*, 2011), bem como patógenos de parreiras e angiospermas lenhosas (Ogris *et al.*, 2006; Trouillas *et al.*, 2011) e sapróbios isolados a partir de solos áridos do Ártico (Bergero *et al.*, 1999; Shen *et al.*, 2015), concha do molusco marinho *Onchidium* sp. (Ciavatta *et al.*, 2008), algas marinhas vermelhas (Martins *et al.*, 2015), restos de plantas e madeira em decomposição (Hyde, 1995; Acero *et al.*, 2004; Kirk *et al.*, 2008). É um gênero ainda não relatado
20 na região Antártica.

Phlebia é um gênero de basidiomiceto com aproximadamente 50 espécies descritas, o qual
inclui fungos ligninolíticos de distribuição mundial que podem ser isolados a partir de madeira em decomposição (Boddy *et al.*, 1983; Kuffer & Senn-Irlet, 2005; Kirk *et al.*, 2008), madeira e casca de angiospermas (Nakasone, 1997). Espécies de *Phlebia* estão presentes entre os fungos de
25 podridão branca da madeira (Nakasone, 1997) além de espécies endofíticas (Vieira *et al.*, 2012). É um gênero ainda não relatado na região Antártica.

Phanerochaete é um gênero polifilético de basidiomiceto com aproximadamente 65 espécies e
distribuição global (Kirk *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2010). As espécies desse gênero são sapróbias e
estão associadas à podridão branca da madeira, apresentando caráter ligninolítico, crescendo sobre
30 galhos e troncos em decomposição (Floudas & Hibbett, 2015). Além disso, algumas espécies são endofíticas (Vieira *et al.*, 2012; Sia *et al.*, 2013). Os relatos da presença de espécies de *Phanerochaete* na Antártica são recentes e foram detectados em solos do Vulcão Monte Erebus (Connell & Staudigel, 2013) e solos ornitogênicos da Ilha Rei George (Gonçalves *et al.*, 2015). A única espécie deste gênero com potencial patogênico em humanos é *Ph. chryso sporium*, o qual é

capaz de causar pneumonite de hipersensibilidade em modelos animais e já foi relatado como causa de doença pulmonar granulomatosa em um indivíduo que exercia a atividade de jardinagem diariamente e tinha contato por alguns anos com folhas em decomposição (Lanspa & Hatton, 2013).

5 *Psathyrella* é um gênero polifilético de basidiomiceto com aproximadamente 550 espécies cosmopolitas incluindo sapróbios que crescem em solos, madeira, folhas secas, matéria orgânica em decomposição, musgos e pântanos (Larsson & Orstadius, 2008; Vasutova, 2008). Algumas espécies são coprófilas e crescem em fezes de animais como vaca, cavalo e javali (Larsson & Orstadius, 2008; Amandeep *et al.* 2015). Bridge e Spooner (2012) relatam a presença do gênero na
10 Antártica, apesar de não apresentar o substrato de origem.

Peniophora (*Basidiomycota*) é um gênero que abriga em torno de 62 espécies com distribuição mundial (Kirk *et al.*, 2008). As espécies são, principalmente, sapróbias desenvolvendo-se em ramos e árvores em decomposição, raízes, troncos, entre outros (Lambevskaja *et al.*, 2013), bem como fitopatógenos (Kirk *et al.*, 2008). Na Antártica, espécies de *Peniophora* foram encontradas
15 em solos ornitogênicos e rizosfera da gramínea antártica *D. antarctica* na Ilha Rei George (Gonçalves *et al.*, 2015), e em solos do Vulcão Monte Erebus (Connell & Staudigel, 2013). As espécies desse gênero caracterizam-se por adaptações ecológicas a ambientes secos e expostos, incluindo espécies com uma camada protetora de hifas ou hifas pigmentadas para evitar a desidratação ou radiação solar. Além disso, ocorre também a formação de grandes basidiosporos
20 para auxiliar os primeiros passos da germinação em substratos secos (Lambevskaja *et al.*, 2013). Tais características podem justificar a ocorrência de espécies de *Peniophora* na Antártica. Assim, a presença do gênero já está documentada na Antártica.

8. CONCLUSÕES

Os resultados desse estudo mostram a capacidade de alguns fungos obtidos de amostras ambientais da Antártica (solos ornitogênicos) apresentar diferentes fatores de virulência, *in vitro*,
5 que podem ser importantes o processo de instalação de uma infecção fúngica no ser humano e, portanto, representar um risco à saúde para pessoas com alterações do sistema imunológico. Desta forma, de acordo com nosso conhecimento, este trabalho representa o primeiro estudo que relaciona a composição da comunidade de fungos presentes nos ornitosolos com sua potencial capacidade de causar doenças oportunistas em humanos. Além disso, estes fungos extremófilos
10 que apresentaram um ou mais fatores de virulência *in vitro* podem representar modelos “primitivos”, isolados geograficamente e/ou adaptados a região, e ainda serem possuidores de genomas que permitam estudar as origens evolutivas da virulência em fungos em comparação com aqueles considerados patogênicos e próximos filogeneticamente.

Os táxons *A. fumigatus*, *B. spectabilis*, *C. keratinophilum*, *Cr. laurentii*, *Debaryomyces* sp.,
15 *P. chrysogenum*, *R. oryzae* e *Rh. mucilaginosa*, os quais demonstraram possuir diferentes fatores de virulência *in vitro* e encontrados nos ornitosolos da Antártica são reportados na literatura como fungos oportunistas. Estes fungos merecem, então, um estudo mais detalhado no futuro quanto ao seu potencial patogênico para humanos.

Alguns fungos (como por exemplo, *T. cf. polyzona*, *Psathyrella* sp., *Eutypella* sp., *Peniophora*
20 sp., *Phlebia* sp. e *Phanerochaete* sp.) demonstraram resultados positivos para alguns dos fatores de virulência testados *in vitro*. Porém, tais gêneros, de uma maneira geral, não apresentam espécies descritas até o momento com importância médica. As características apresentadas por estes fungos, nos testes realizados neste trabalho, podem tratar-se somente de atributos que os permitem sobreviver e colonizar os diversos substratos em que são encontrados. Por outro lado,
25 estes fungos possuem, pelo menos *in vitro*, algum potencial de infectar humanos imunocomprometidos.

Não foi possível a identificação de nove fungos em nível de espécie, os quais permaneceram apenas em nível de gênero e podem representar novas espécies. Entretanto, estudos taxonômicos mais detalhados serão necessários para elucidar suas identificações taxonômicas.

30 Além disso, este estudo reforça a hipótese de que a adaptação de algumas espécies de fungos a condições de estresse ambiental (Bennet, 2009; Baumgardner, 2012), como os presentes na Antártica, resulte na capacidade destes eucariotos em infectar hospedeiros humanos com algum grau de deficiência no sistema imunológico, ressaltando assim a importância do estudo de fungos

extremófilos como potenciais micro-organismos oportunistas de humanos. Ainda vale ressaltar que a ocupação da Antártica por várias espécies de aves migratórias, somada à influência de fortes ventos, à presença humana, bem como a forte influência das mudanças climáticas globais na região (como por exemplo o aquecimento global) pode promover tanto a introdução de micro-organismos potencialmente patogênicos na Antártica ou o contrário e talvez o mais preocupante, a dispersão destes micro-organismos presentes na Antártica para o resto do planeta, principalmente para os continentes próximos que incluem o Americano (porção do Sul) e a Oceania.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABAD, A.; FERNANDEZ-MOLINA, J. V.; BIKANDI, J.; RAMIREZ, A. *et al.* What makes *Aspergillus fumigatus* a successful pathogen? Genes and molecules involved in invasive aspergillosis. *Revista Iberoamericana de Micologia*, v. 27 (4), p. 155-182, 2010.
- 5 ABOUL-NASR, M. B.; ZOHRI, A. A.; AMER, E. M. Enzymatic and toxigenic ability of opportunistic fungi contaminating intensive care units and operation rooms at Assiut University Hospitals, Egypt. *Springerplus*, v. 2 (347), p. 1-6, 2013.
- ABYZOV, S. S. Microorganisms in the Antarctic ice. In: Friedmann EI (Ed) Antarctic microbiology. 10 Wiley-Liss, New York, p. 265-295, 1993.
- ABYZOV, S. S.; BELIAKOVA, L. A. Mycelian fungi, isolated from the ice sheet of the Central Antarctic. *Izv. Akad. Nauk SSSR Ser. Biol.* 3, 432-435, 1982.
- ACERO, F. J.; GONZALEZ, V.; SANCHEZ-BALLESTEROS, J.; RUBIO, V.; CHECA, J. Molecular phylogenetic studies on the Diatrypaceae based on rDNA-ITS sequences. *Mycologia*, 15 v. 96 (2), p. 249-259, 2004.
- ADAMS, B. J.; BARDGETT, R. D.; AYRES, E.; WALL, D. H.; AISLABIE, J. *et al.* Diversity and distribution of Victoria Land biota. *Soil Biology & Biochemistry*, v. 38, p. 3003-3018, 2006.
- AHMED, M. M. Theoretical deposition of fungal aerosol particles in the human respiratory tract. *Journal of Advanced Research*, v. 3 (2), p. 133-138, 2012.
- 20 AISLABIE, J.; JORDAN, S.; AYTUN, J.; KLASSEN, J. L.; BARKER, G. M.; TURNER, S. Bacterial diversity associated with ornithogenic soil of the Ross Sea region, Antarctica. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 55 (1), p. 21-36, 2009.
- AJESH, K & SREEJITH, K. *Cryptococcus laurentii* Biofilms: Structure, Development and Antifungal Drug Resistance. *Mycopathologia*, v. 174, p. 409-419, 2012.
- 25 AKTAS, E. & YIGIT, N. Hemolytic activity of dermatophytes species isolated from clinical specimens. *Journal of Medical Mycology*, v. 25 (1), p. 25-30, 2015.
- ALIAS, S. A.; SMYKLA, J.; MING, C. Y.; RIZMAN-IDID, M.; CONVEY, P. Diversity of microfungi in ornithogenic soils from Beaufort Island, continental Antarctic. *Czech Polar Reports*, v. 3 (2), p. 144-156, 2013.
- 30 ALLEN, S. E. & HEAL, O. W. Soils of the maritime Antarctic zone. In: Holdgate, M. W. (Ed) Antarctic ecology, Academic Press, New York, v. 2, p. 693-701, 1970.
- ALVAREZ-PEREZ, S.; MATEOS, A.; DOMINGUEZ, L.; MARTINEZ-NEVADO, E.; BLANCO, J. L.; GARCIA, M. E. Polyclonal *Aspergillus fumigatus* infection in captive penguins. *Veterinary Microbiology*, v. 144, p. 444-449, 2010.
- 35 AMANDEEP, K.; ATRI, N. S.; MUNRUCHI, K. *Psathyrella* (*Psathyrellaceae*, *Agaricales*) species collected on dung from Punjab, India. *Current Research in Environmental & Applied Mycology*, v.5 (2), p. 128-137, 2015.
- ANANE, S.; AL-YASIRI, M. H. Y.; NORMAND, A.; RANQUE, S. Distribution of Keratinophilic Fungi in Soil Across Tunisia: A Descriptive Study and Review of the Literature. *Mycopathologia*, 40 v. 180, p. 61-68, 2015.
- ANDRADE-SILVA, L.; FERREIRA-PAIM, K.; SILVA-VERGARA, M. L.; PEDROSA, A. L. Molecular characterization and evaluation of virulence factors of *Cryptococcus laurentii* and *Cryptococcus neoformans* strains isolated from external hospital areas. *Fungal Biology*, v.114, p. 438-445, 2010.

- ARENAS, R.; ARCE, M.; MUNOZ, H.; RUIZ-ESMENJAUD, J. Onychomycosis due to *Paecilomyces variotii*. Case report and review. *Journal of Medical Mycology*, v. 8, p. 32-33, 1998.
- ARENDRUP, M. C. & PERLIN, D. S. Echinocandin resistance: an emerging clinical problem? *Current Opinion in Infectious Diseases*, v. 27 (6), p. 484-492, 2014.
- ARENZ, B. E. & BLANCHETTE R. A. Investigations of fungal diversity in wooden structures and soils at historic sites on the Antarctic Peninsula. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 55, p. 46-56, 2009.
- ARENZ, B. E. & BLANCHETTE, R. A. Distribution and abundance of soil fungi in Antarctica at sites on the Peninsula, Ross Sea Region and McMurdo Dry Valleys. *Soil Biology & Biochemistry*, v. 43, p. 308-315, 2011.
- ARENZ, B. E.; BLANCHETTE, R. A.; FARRELL, R. L. Fungal Diversity in Antarctic Soils. In: Cowan, D. A. (Ed) *Antarctic Terrestrial Microbiology*, p. 35-53, 2014.
- ARENZ, B. E.; HELDA, B. W.; JURGENSA, J. A.; FARRELL, R. L.; BLANCHETTE, R. A. Fungal diversity in soils and historic wood from the Ross Sea Region of Antarctica. *Soil Biology & Biochemistry*, v. 38, p. 3057-3064, 2006.
- ATHAR, M. A.; Sekhon, A. S.; Mcgrath, J. V.; Malone, R. M. Hyalohyphomycosis caused by *Paecilomyces variotii* in an obstetrical patient. *European Journal of Epidemiology*, v. 12, p. 33-35, 1996.
- AZMI, O. R. & SEPPELT, R. D. The broad-scale distribution of microfungi in the Windmill Islands region, continental Antarctica. *Polar Biology*, v. 19 (2), p. 92-100, 1998.
- BARCUS, A. L.; BURDETTE, S. D. ; HERCHLINE, T. E. Intestinal invasion and disseminated disease associated with *Penicillium chrysogenum*. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, v. 4 (21), p. 1-4, 2005.
- BATTAGLIA, E.; BENOIT, I.; BRINK, J.; WIEBENGA, A.; COUTINHO, P. M.; HENRISSAT, B.; DE VRIES, R. P. Carbohydrate-active enzymes from the zygomycete fungus *Rhizopus oryzae*: a highly specialized approach to carbohydrate degradation depicted at genome level. *BMC Genomics*. v. 12 (38), p. 1-12, 2011.
- BAUMGARDNER, D. J. Soil-Related Bacterial and Fungal Infections. *Journal of the American Board of Family Medicine*, v. 25 (5), p. 734-744, 2012.
- BENNET, J. W. Aspergillus: a primer for the novice. *Med Mycol*, v. 47(1), p. 5-12, 2009.
- BERGERO, R.; GIRLANDA, M.; Varese, G. C.; INTILI, D.; LUPPI, A. M. Psychrooligotrophic fungi from Arctic soils of Franz Joseph Land. *Polar Biology*, v. 21, p. 361-368, 1999.
- BEYDA, N. D.; CHUANG, S. H.; ALAM, M. J.; SHAH, D. N.; MING NG, T.; MCCASKEY, L.; GAREY, K. W. Treatment of *Candida famata* bloodstream infections: case series and review of the literature. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 68, p. 438-443, 2013.
- BISCHOFF, V. Antártica. Trabalho de pesquisa apresentado como requisito para a obtenção do diploma de aprovação do curso superior de Defesa Continental- Colégio Interamericano de Defesa. Washington D. C., 1996.
- BLANCHETTE, R. A.; HELD, B. W.; Arenz, B. E.; JURGENS, J. A.; BALTES N. J.; DUNCAN, S. M.; FARRELL, R. L. An Antarctic Hot Spot for Fungi at Shackleton's Historic Hut on Cape Royds. *Microbial Ecology*, v. 60, p. 29-38, 2010.

- BLUME, H.; BEYER, L.; BÖLTER, M.; ERLLENKEUSER, H.; KALK, E.; KNEESCH, S.; PFISTERER, U.; SCHNEIDER, D. Pedogenic zonation in soils of the southern circum-polar region. *Advances in GeoEcology*, v. 30, p. 69–90, 1997.
- 5 BODDY, L.; COATES, D.; RAYNER, A. D. M. Attraction of fungus gnats to zones of intraspecific antagonism on agar plates. *Transactions of the British Mycological Society*, v. 81 (1), p. 149-151, 1983.
- BOHACZ, J.; KORNILLOWICZ-KOWALSKA, T. Species diversity of keratinophilic fungi in various soil types. *Central European Journal of Biology*, v.7 (2), p. 259-266, 2012.
- 10 BÖLTER, M.; KANDELER, E.; PIETR, S.J.; SEPPELT, R.D. Heterotrophic soil microbes, microbial and enzymatic activity in Antarctic Soils. In: Beyer, L. & Bölter, M. (Eds.) *Geocology of Antarctic Ice-free Coastal Landscapes*, Springer, Heidelberg, Ecological Studies, v. 154, p. 189-214, 2002.
- BONASSOLI, L.A.; BERTOLI, M.; SVIDZINSKI, T. I. E. High frequency of *Candida parapsilosis* on the hands of healthy hosts. *Journal of Hospital Infection*, v. 59 (2), p. 159-162, 2005.
- 15 BORRELLI, G. M. & TRONO, D. Recombinant lipases and phospholipases and their use as biocatalysts for industrial applications.
- BOYD, W. L. Ecology and physiology of soil microorganisms in polar regions. Japanese Antarctic Research Expedition, Scientific Reports, Special issue 1, p. 265–275, 1967.
- BREMER, U. F. Solos e geomorfologia da borda leste da península Warszawa, Ilha Rei George, 20 Antártica Marítima. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas). Universidade Federal de Viçosa, 2008.
- BRIDGE, P. D.; SPOONER, B. M. Non-lichenized Antarctic fungi: transient visitors or members of a cryptic ecosystem? *Fungal Ecology*, v. 5 (4), p. 381-394, 2008.
- 25 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.
- BYRD, R. P.; ROY, T. M.; FIELDS, C. L.; LYNCH, J. A. *Paecilomyces variotii* pneumonia in a patient with diabetes mellitus. *Journal of Diabetes and its Complications*, v. 6, p. 150-153, 1992.
- 30 CABANA, H.; ALEXANDRE, C.; AGATHOS, S. N.; JONES, J. P. Immobilization of laccase from the white rot fungus *Corioloropsis polyzona* and use of the immobilized biocatalyst for the continuous elimination of endocrine disrupting chemicals. *Bioresource Technology*, v. 100, p. 3447-3458, 2009.
- CALO, S.; BILLMYRE, R. B.; HEITMAN, J. Generators of phenotypic diversity in the evolution of pathogenic microorganisms. *PLOS Pathogens*, v. 9 (3), p. 1-4, 2013.
- 35 CAMIN, A. M.; CHABASSE, D.; GUIGUEN, C. Keratinophilic fungi associated with starlings *Sturnus vulgaris* in Brittany, France. *Mycopathologia*, v. 143, p. 9-12, 1998.
- CARETTA, G. & PIONTELLI, E. *Microsporum magellanicum* and *Cunninghamella antarctica*, new species isolated from australic and antarctic soil of Chile. *Sabouraudia*, v. 15, p. 1-10, 1977.
- 40 CARETTA, G. & PIONTELLI, E. Keratinophilous fungi from Antarctic terrestrial habitats. – In: Kushwaha, R. K. S. (Ed.) *Fungi in human and animal health*. Jodhpur, India, p. 29-38, 2004.
- CASADEVALL, A. Determinants of virulence in the pathogenic fungi. *Fungal Biology Reviews*, v. 21(4), p. 130-132, 2007.

- CASADEVALL, A.; ROSAS, A. L.; NOSANCHUK, J. D. Melanin and virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Current Opinion in Microbiology*, v. 3, p. 354-358, 2000.
- CASADEVALL, A. & PIROFSKI, L. Host-Pathogen Interactions: Redefining the Basic Concepts of Virulence and Pathogenicity. *Infection and Immunity*, v. 67 (8), p. 3703–3713, 1999.
- 5 CASADEVALL, A. & PIROFSKI, L. The weapon potential of human pathogenic fungi. *Medical Mycology*, v. 44 (8), p. 689-696, 2006.
- CASTELLANI, A. Maintenance and cultivation of common pathogenic fungi in distilled water. *The Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 42, p.181-184, 1967.
- CASTRO, L. G. M.; SALEBIAN, A.; SOTTO, M. N. Hyalophyphomycosis by *Paecilomyces lilacinus* in a renal transplant recipient and a review of human *Paecilomyces species* infections. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*, v. 28, p. 15-26, 1990.
- 10 CHAN, M. Y & TAY, S. T. Enzymatic characterisation of clinical isolates of *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus gattii* and other environmental *Cryptococcus* spp. *Mycoses*, v. 53, p. 26-31, 2008.
- 15 CHILD, J. & KELLY, P. Geopolítica, Integración y conflicto en El Cono Sur y la Antártida, p. 1-10, 1990.
- CIAVATTA, M. L.; LOPEZ-GRESA, M. P.; GAVAGNIN, M.; NICOLETTI, R.; MANZO, E.; *et al.* *Tetrahedron*, v. 64, p. 5365-5369, 2008.
- CLSI. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; approved standard CLSI document M38-A2. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, 2008a.
- 20 CLSI. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard-third edition; CLSI document M27-A3 . Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, 2008b.
- 25 CONNELL, L. & STAUDIGEL, H. Fungal diversity in a dark oligotrophic volcanic ecosystem (DOVE) on Mount Erebus, Antarctica. *Biology*, v. 2, p. 798-809, 2013.
- COONEY, N. M. & KLEIN, B. S. Fungal Adaptation to the Mammalian Host: It's a New World, After All. *Current Opinion in Microbiology*, v. 11 (6), p. 511-516, 2008.
- CUSTIS, P. H.; HALLER, J. A.; DE JUAN, E. J. An unusual case of cryptococcal endophthalmitis. *Retina (Philadelphia.)* v. 15 (4), p. 300-304, 1995.
- 30 DA CUNHA, M. M. L.; DOS SANTOS, L. P. B.; DORNELAS-RIBEIRO, M.; VERMELHO, A. B. & ROZENTAL, S. Identification, antifungal susceptibility and scanning electron microscopy of a keratinolytic strain of *Rhodotorula mucilaginosa*: a primary causative agent of onychomycosis. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, v. 55, p. 396-403, 2009.
- 35 DAVIS, D. A. How human pathogenic fungi sense and adapt to pH: the link to virulence. *Current Opinion in Microbiology*, v. 12 (4), p. 365-370, 2009.
- DE BERNARDIS, F.; MONDELLO, F.; SAN MILLAN, R.; PONTON, J.; CASSEONE, A. Biotyping and virulence properties of skin isolates of *Candida parapsilosis*. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 37 (11), p. 3282-3286, 1999.
- 40 DE HOOG, G. S.; GÖTTLICH, E.; PLATAS, G.; GENILLOUD, O.; LEOTTA, G.; VAN BRUMMELEN, J. Evolution, taxonomy and ecology of the genus *Thelebolus* in Antarctica. *Studies on Mycology*, v. 51, p. 33–76, 2005a.

- DE HOOG, S.; GUARRO, J.; GENE, J.; FIGUERAS, M. J. *Atlas of clinical fungi*. 2th.edn. Réus: ASM Press, 1126 p, 2001.
- DE HOOG, S.; ZALAR, P.; GERRITS VAN ENDE, A. H. G.; GUNDE-CIMERMAN, N. Relation of halotolerance to human-pathogenicity in the fungal tree of life: an overview of ecology and evolution under stress, In: *Adaptation to Life at High Salt Concentrations in Archaea, Bacteria, and Eukarya*. Springer, Dordrecht, The Netherlands, p. 373-395, 2005b.
- DESAI, J. V.; MITCHELL, A. P.; ANDES, D. R. Fungal biofilms, drug resistance, and recurrent infection. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, v. 4 (10), 1-18, 2014.
- DESHMUKH, S. K. Incidence of keratinophilic fungi from selected soils of Kerala state (India). *Mycopathologia*, v. 156, p. 177-181, 2002.
- DHINDSA, M. K.; Naidu, J.; Singh, S. M.; Jain, S. K. Chronic suppurative otitis media caused by *Paecilomyces variotii*. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*, v.33, p. 59-61, 1995.
- DIEKEMA, D. J.; PETROELJE, B.; MESSER, S. A.; HOLLIS, R. J.; PFALLER, M. A. Activities of available and investigational antifungal agents against *Rhodotorula* species. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 43, p. 476-478, 2005.
- DOGEN, A.; GUMRAL, R.; ILKIT, M. Haemolytic and co-haemolytic (CAMP-like) activity in dermatophytes. *Mycoses*, v. 58, p. 40-47, 2015.
- DOMSCH, K. H.; GAMS, W.; ANDERSON, T. *Compendium of soil fungi*. London, UK: Academic Press, Ltd, 1980.
- DONOHUE, M.; CHUNG, Y.; MAGNUSON, M. L.; WARD, M.; SELGRADE, M. J.; VESPER, S. J. Hemolysin Chrysolysin from *Penicillium chrysogenum* promotes inflammatory response. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, v. 208 (4), p. 279-85, 2005.
- ELLIS, D. H. Thermophilic fungi isolated from some Antarctic and sub-Antarctic soils. *Mycologia*, v. 72, 1033-1036, 1980.
- ELLIS-EVANS, J. C. Microbial diversity and function in Antarctic freshwater ecosystems. *Biodiversity and Conservation*, v. 5 (11), p. 1395-1431, 1996.
- ELOY, P.; BERTRAND, B.; ROMBEAUX, P.; DELOS, M.; TRIGAUX, J. P. Mycotic sinusitis. *Acta Otorhinolaryngol. Belg.* v. 51, p. 339-352, 1997.
- ELSTER, J.; DELMAS, R. J.; PETIT, J. R.; REHÁKOVÁ, K. Composition of microbial communities in aerosol, snow and ice samples from remote glaciated areas (Antarctica, Alps, Andes). *Biogeosciences Discussions*, v. 4 (3), p. 1779-1813, 2007.
- FERREIRA, F. O sistema do Tratado da Antártica: evolução do regime e seu impacto na política externa brasileira, 2009.
- FERREIRA-PAIM, K.; ANDRADE-SILVA, L.; MORA, D. J.; LAGES-SILVA, E.; PEDROSA, A. L.; *et al.* Antifungal susceptibility, enzymatic activity, PCR-fingerprinting and ITS sequencing of environmental *Cryptococcus laurentii* isolates from Uberaba, Minas Gerais, Brazil. *Mycopathologia*, v. 174, p. 41-52, 2012.
- FISCHER, A. Rabenhorst's Kryptogamen-Flora, Pilze – Phycomycetes. 1892.
- FISHER, M. C.; HENK, D. A.; BRIGGS, C. J.; BROWNSTEIN, J. S.; MADOFF, L. C.; MCCRAW, S. L.; GURR, S. J. Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. *Nature*, v. 484, p. 186-194, 2012.
- FLETCHER, L. D.; KERRY, E. J.; WESTE, G. M. Microfungi of Mac.Robertson and Enderby Lands, Antarctica. *Polar Biology*, v. 4 (2), p. 81-88, 1985.

- FLOUDAS, D. & HIBBETT, D. S. Revisiting the taxonomy of Phanerochaete (Polyporales, Basidiomycota) using a four gene dataset and extensive ITS sampling. *Fungal Biology*, v. 119, p. 679-719, 2015.
- 5 FOX, A. Examining the Impacts of Antarctic Tourism on Whales. Master's Project submitted in partial fulfillment of the requirements for the Master of Environmental Management degree at the Nicholas School of the Environment, Duke University, 2014.
- FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A. Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*. A guide to identification of food and air-borne terverticillate *Penicillia* and their mycotoxins. *Studies in Mycology*, v. 49, 2004.
- 10 FUNG, H. B.; MARTYN, C. A.; SHAHIDI, A.; BROWN, S. T. *Rhodotorula mucilaginosa* lymphadenitis in an HIV-infected patient. *International Journal of Infectious Diseases*, v. 13, p. 27-29, 2009.
- FURBINO, L. E.; GODINHO, V. M.; SANTIAGO, I. F.; PELLIZARI, F. M.; ALVES, T. M.; ZANI, C. L.; JUNIOR, P. A. S.; ROMANHA, A. J.; CARVALHO, A. G. O.; GIL, L. H. V. G.; ROSA, A. C.; 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. 67 (4), p. 775-787, 2014.
- 15 GELTNER, C.; LASS-FLORL, C.; BONATTI, H.; MULLER, L.; STELZMULLER, I. Invasive pulmonary mycosis due to *Penicillium chrysogenum*: a new invasive pathogen. *Transplantation*, v. 95 (4), p. 21-23, 2013.
- 20 GERGINOVA, N.; MANASIEV, J.; YEMENDZHIEV, H.; TERZIYSKA, A.; PENEVA, N.; ALEXIEVA, Z. Biodegradation of phenol by antarctic strains of *Aspergillus fumigatus*. *Z Naturforsch C*, v. 68 (9-10), p. 384-93, 2013.
- 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, 1323-1330, 1995.
- 25 GODINHO, V. M.; FURBINO, L. E.; SANTIAGO, I. F.; PELLIZZARI, F. M.; YOKOYA, N. S.; PUPO, D.; T. M. A.; JUNIOR, P; 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*, v. 7 (7), p. 1434-1451, 2013.
- 30 GODINHO, V. M.; GONÇALVES, V. N.; SANTIAGO, I. F., FIGUEREDO, H. M.; VITORELI, G. A.; SCHAEFER, C. E. G. R. *et al.* Diversity and bioprospection of fungal community present in oligotrophic soil of continental Antarctica. *Extremophiles*, v.19, p. 585-596, 2015.
- GONÇALVES, V. N.; CARVALHO, C. R.; JOHANN, S.; MENDES, G. *et al.* Antibacterial, antifungal and antiprotozoal activities of fungal communities present in different substrates from Antarctica. *Polar Biology*, v. 38, p. 1143-1152, 2015.
- 35 GONÇALVES, V. N.; OLIVEIRA, F. S.; SCHAEFER, C. E. G. R.; CARVALHO, C. R.; ROSA, C. A.; ROSA, L. H. Antarctic rocks: an unexpected microhabitat of potential innate virulent fungi "trapped" and/or hidden in a polar desert of continental Antarctica. *ISME Journal*, 2016 –
- 40 Submetido.
- 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*, v. 82 (2), p. 1-13, 2012.
- GOSTINCAR, C.; GRUBE, M.; GUNDE-CIMERMAN, N. Evolution of Fungal Pathogens in Domestic Environments? *Fungal Biology*, v. 115, p. 1008-1018, 2011.

- GUGNANI, H. C.; SHARMA, S.; GUPTA, B.; GADDAM, S. Prevalence of keratinophilic fungi in soils of St. Kitts and Nevis. *Journal of Infection in Developing Countries*, v. 6 (4), p. 347-351, 2012.
- HAMMER, O; HARPER, D. A. T.; RYAN, P. D. PAST: Paleontological Statistics Software
5 Package for Education and Data Analysis. *Paleontologia Electronica*, v. 4, p. 1-9, 2001.
- HASDAY, J. D.; FAIRCHILD, K. D.; SHANHOLTZ, C. The role of fever in the infected host. *Microbes and Infection*, v. 2, p. 1891-1904, 2000.
- HENRÍQUEZ, M.; VERGARA, K.; NORAMBUENA, J.; BEIZA, A.; MAZA, F. *et al.* Diversity of cultivable fungi associated with Antarctic marine sponges and screening for their antimicrobial,
10 antitumoral and antioxidant potential. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 30 (1), p. 65-76, 2014.
- HOGAN, L. H.; KLEIN, B. S.; LEVITZ, S. M. Virulence factors of medically important fungi. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 9 (4), p. 469-488, 1996.
- HOUBRAKEN, J.; VARGA, J.; RICO-MUNOZ, E.; JOHNSON, S.; SAMSON, R. A. Sexual
15 reproduction as the cause of heat resistance in the food spoilage fungus *Byssoschlamys spectabilis* (anamorph *Paecilomyces variotii*). *Applied and Environmental Microbiology*, v. 74, p. 1613-1619, 2008.
- HOUBRAKEN, J.; VERWEIJ, P. E.; RIJS, A. J. M. M.; BORMAN, A. M.; SAMSON, R. A. Identification of *Paecilomyces variotii* in Clinical Samples and Settings. *Journal of Clinical
20 Microbiology*, v. 48 (8), p. 2754-2761, 2010.
- IAATO. International Association of Antarctica Tour Operators. <http://iaato.org/home>
- IBRAHIM, A. S. & KONTOYIANNIS, D. P. Update on mucormycosis pathogenesis. *Current Opinion in Infectious Diseases*, v. 26 (6), p. 508-515, 2013.
- IKEDA, R. & MAEDA, T. Structural studies of the capsular polysaccharide of a non-neoformans
25 *Cryptococcus* species identified as *C. laurentii*, which was reclassified as *Cryptococcus flavescens*, from a patient with AIDS. *Carbohydrate Research*, v. 339, p. 503-509, 2004.
- ISAKA, M.; PALASARN, S.; PRATHUMPAL, W.; LAKSANACHAROEN, P. Pimarane Diterpenes from the Endophytic Fungus *Eutypella* sp. BCC 13199. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, v. 59 (9), p. 1157-1159, 2011.
- 30 KACINOVA, J.; TANCINOVA, D.; LABUDA, R. Keratinophilic fungi from soils stressed by occurrence of animals. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, v. 2 (1), p. 1436-1446, 2013.
- KAMALAM, A.; YESUDIAN, P.; THAMBIAH, A. S. Cutaneous infection by *Cryptococcus laurentii*. *British Journal of Dermatology*, v. 97, p. 221-223, 1977.
- 35 KANAFANI, Z. A. & PERFECT, J. R. Resistance to Antifungal Agents: Mechanisms and Clinical Impact. *Clinical Infectious Diseases*, v. 46, p. 120-8, 2008.
- KANTARCIOGLU, A.; APAYDIN, H.; YUCEL, A.; DE HOOG, G. S.; SAMSON, R. A.; VURAL, M. Central nervous system infection due to *Penicillium chrysogenum*. *Mycoses*, v. 47, p. 242-248, 2004.
- 40 KARKOWSKA-KULETA, J.; RAPALA-KOKIK, M.; KOZIK, A. Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigates*. *Acta Biochimica Polonica*, v. 56 (2), p. 211-224, 2009.

- KATIYAR, S. & KUSHWAHA, R. K. S. Human hair invasion by keratinophilic fungi isolated from Mediterranean Sea beach. *National Academy Science Letters*, v. 20, p. 71-74, 1997.
- KATRAGKOU, A.; WALSH, T. J.; ROILIDES, E. Why is mucormycosis more difficult to cure than more common mycoses? *Clinical Microbiology and Infection*, v. 20 (6), p. 74-81, 2013.
- 5 KERRY, E.; WESTE, G. M. Succession in the microflora of leaves and litter of three plant species at sub-Antarctic Macquarie Island. In: Siegfried, W. R; Condy, P. R.; Laws, R. M. (Eds) Antarctic nutrient cycles and food web. Berlin: Springer Verlag, p. 597-605, 1985.
- KHAN, M. S. A.; AHMAD, I.; AQIL, F.; OWAIS, M.; SHADID, M.; MUSARRAT, J. Virulence and Pathogenicity of Fungal Pathogens with Special Reference to *Candida albicans*. In: Ahmad, I.; Owais, M.; Shahid, M.; Aqil, F. (Eds.) Combating Fungal Infections: Problems and Remedy, Springer- Verlag, Berlin, p. 21-45, 2010.
- 10 KIRK, P. M.; CANNON, P. F.; MINTER, D. W.; STALPERS, J. A. Dictionary of the Fungi, 10th Edition. CAB International, Wallingford, 2008.
- KITOWSKI, I.; Ciesielska, A.; KORNILLOWICZ-KOWALSKA, T.; BOHACZ, J.; SWIETLICKI, M. Estimation of *Chrysosporium keratinophilum* dispersal by the Rook *Corvus frugilegus* in Chełm (East Poland). In: Indykiewicz, P. & Böhner, J. (Eds) Urban Fauna. Animal, Man, and the City – Interactions and Relationships, 263-269, 2014.
- 15 KLEIN, B. S. & TEBBETS, B. Dimorphism and virulence in fungi. *Current Opinion in Microbiology*, v. 10 (4), p. 314-319, 2007.
- 20 KORDOSSIS, T.; AVLAMI, A.; VELEGRAKI, A.; STEFANO, I.; GEORGAKOPOULOS, G.; PAPALAMBROU, C. *et al.* First report of *Cryptococcus laurentii* meningitis and a fatal case of *Cryptococcus albidus* cryptococcaemia in AIDS patients. *Medical Mycology*, v. 36 (5), p.335-9, 1998.
- KRISHNAN, A.; ALIAS, S.A.; WONG, C.; PANG, K.; CONVEY, P. Extracellular hydrolase enzyme production by soil fungi from King George Island, Antarctica. *Polar Biology*, v. 34, p. 1535-1542, 2011.
- 25 KRZYSCIĄK, P. & MACURA, A. B. Drug susceptibility of 64 strains of *Rhodotorula* sp. *Wiadomości Parazytologiczne*, v. 56 (2), p. 167-170, 2010.
- KÜFFER, N. & SENN-IRLET, B. Diversity and ecology of wood-inhabiting aphylophoroid basidiomycetes on fallen woody debris in various forest types in Switzerland. *Mycological Progress*, v. 4(1), 2005.
- 30 KURTZMAN, C. P.; Fell, J. W.; BOEKHOUT, T. The Yeasts: A Taxonomic Study, 5th edn. Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2011.
- KUSHWAHA, R. K. S. The genus *Chrysosporium*, its physiology and biotechnological potential. *Revista Iberoamericana de Micología*, 2000.
- 35 LACHANCE, M. A.; BOWLES, J. M.; STARMER, W. T.; BARKER, J. S. F. *Kodamaea kakaduensis* and *Candida tolerans*, two new ascomycetous yeast species from Australian Hibiscus flowers. *Canadian journal of microbiology*, v. 45, 172-177, 1999.
- LAMBEVSKA, A.; RUSEVSKA, K.; KARADELEV, M. New data on the taxonomy, distribution and ecology of the genus *Peniophora* Cooke (Basidiomycota, Fungi) in the Republic of Macedonia. *Macedonian Journal of Ecology and Environment*, v. 15 (2), p. 69-79, 2013.
- 40 LANSPA, M. J. & HATTON, N. D. *Phanerochaete chrysosporium* and granulomatous lung disease in a mulch gardener. *APSR Respiratory Case Reports*, v. 2 (1), p. 7-9, 2014.

- LARSSON, E. & ORSTADIUS, L. Fourteen coprophilous species of *Psathyrella* identified in the Nordic countries using morphology and nuclear rDNA sequence data. *Mycological Research*, v. 112, p.1165-1185, 2008.
- LATGE, J. P. *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 12 (2), p. 310-350, 1999.
- LATGE, J. P. The pathobiology of *Aspergillus fumigatus*. *Trends in Microbiology*, v. 9, p. 382-389, 2001.
- LEE, J.; YEW, W. W.; CHIU, C. S.; WONG, P. C.; WONG, C. F.; Wang, E. P. J. Delayed sternotomy wound infection due to *Paecilomyces variotii* in a lung transplant recipient. *Heart Lung Transplant*, v. 21, p. 1131-1134, 2002.
- LIECKFELDT, E.; MEYER, W.; BORNER, T., Rapid identification and differentiation of yeast by DNA and PCR fingerprinting. *Journal of Basic Microbiology*, v. 33, p. 413-426, 1993.
- 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.
- LUO, G.; SAMARANAYAKE, L. P.; YAU, J. Y. Y. *Candida* species exhibit differential in vitro hemolytic activities. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 39 (8), p. 2971-2974, 2001.
- LYRATZOPOULOS, G.; ELLIS, M.; NERRINGER, R.; DENNING, D. W. Invasive Infection due to *Penicillium* Species other than *P. marneffei*. *Journal of Infection*, v. 45, p. 184-207, 2002.
- MALKUS, A.; CHANG, P. F. L.; ZUZGA, S. M.; CHUNG, K. R.; 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, 1152-1164, 2006.
- MANDEEL, Q.; NARDONI, S.; MANCIANTI, F. Keratinophilic fungi on feathers of common clinically healthy birds in Bahrain. *Mycoses*, v. 54, p.71-77, 2011.
- MANNS, J. M.; MOSSER, D. M.; BUCKLEY, H. R. Production of a hemolytic factor by *Candida albicans*. *Infection and Immunity*, v. 62 (11), p. 5154-5156, 1994.
- MANZANO-GAYOSSO, P.; HERNANDEZ-HERNANDEZ, F.; MENDEZ-TOVAR, L. J.; PALACIOS-MORALES, Y. *et al.* Onychomycosis Incidence in Type 2 Diabetes Mellitus Patients. *Mycopathologia*, v. 166, p. 41-45, 2008.
- MARGESIN, R.; NEUNER, G.; STOREY, K. B. Cold-loving microbes, plants, and animals - fundamental and applied aspects. *Naturwissenschaften*, v. 94 (2), p. 77-99, 2007.
- MARTINS M. P.; OUAZZANI, J.; ARCILE, G.; JELLER, A. H.; DE LIMA, J. P. F. Biohydroxylation of (-)-Ambrox®, (-)-Sclareol, and (+)- Sclareolide by Whole Cells of Brazilian Marine-Derived Fungi. *Marine Biotechnology*, v. 17, p. 211-218, 2015.
- MCFADDEN, D. C. & CASADEVALL, A. Capsule and melanin synthesis in *Cryptococcus neoformans*, *Medical Mycology*, v. 39 (1), p. 19-30, 2001.
- 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 (2), p. 97-111, 1999.
- MICHEL, R. F. M.; SCHAEFER, C. E. G. R.; DIAS, L. E.; SIMAS, F. N. B.; BENITES, V. M.; MENDONÇA, E. S. Ornithogenic Gelisols (Cryosols) from Maritime Antarctica: Pedogenesis,

- Vegetation, and Carbon Studies. *Soil Science Society of America Journal*, v. 70, p. 1370-1376, 2006.
- MOLINA-LEYVA, A.; RUIZ-CARRASCOSA, J. C.; LEYVA-GARCIA, A.; HUSEIN-ELAHMED, H. Cutaneous *Cryptococcus laurentii* infection in an immunocompetent child. *International Journal of Infectious Diseases*, v. 17, p. 1232-1233, 2013.
- 5 NAKASONE, K. K. Studies in *Phlebia*. Six species with teeth. *Sydowia*, v. 49(1), p. 49-79, 1997.
- NEVES, R. P.; NETO, R. G. L.; LEITE, M. C.; DA SILVA, V. K. A.; DOS SANTOS, F. A. G.; MACEDO, D. P. C. *Cryptococcus laurentii* fungaemia in a cervical cancer patient. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v.9 (6), p. 660-663, 2015.
- 10 NIGAM, N. & KUSHWAHA, R. K. S. Occurrence of keratinophilic fungi with special reference to *Chrysosporium* species in India. *Sydowia*, v. 42, p. 200-208, 1990.
- NIIMI, M.; FIRTH, N. A.; CANNON, R. D. Antifungal drug resistance of oral fungi. *Odontology*, v. 98, p. 15-25, 2010.
- OGRIS, N.; JURC, D.; JURC, M. Spread risk of *Eutypella* canker of maple in Europe. *Bulletin OEPP / EPPO Bulletin*, v. 36, p. 475-485, 2006.
- 15 OLSZEWSKI, M. A.; ZHANG, Y.; HUFFNAGLE, G. B. Mechanisms of cryptococcal virulence and persistence. *Future Microbiology*, v. 5 (8), p. 1269-1288, 2010.
- ONOFRI, S. Antarctic Microfungi. In: Seckbach, J. (Ed.) *Enigmatic Microorganisms and Life in Extreme Environments*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, p. 323-336, 20 1999.
- ONOFRI, S.; FENICE, M.; CICALINI, A. R.; TOSI, S.; MAGRINO, A.; PAGANO, S. *et al.* Ecology and biology of microfungi from Antarctic rocks and soils. *Italian Journal of Zoology*, v. 67 (S1), p. 163-167, 2000.
- ONOFRI, S.; SELBMANN, L.; DE HOOG, G. S.; GRUBE, M.; BARRECA, D.; RUISI, S.; 25 ZUCCONI, L. Evolution and adaptation of fungi at boundaries of life. *Advances in Space Research*, v. 40, p. 1657-1664, 2007.
- PARRISH, N. M. & RIEDEL, S. Microbiology Tools for the Epidemiologist. In: Nelson, K. E. & Williams, C. M. (Eds) *Infectious disease epidemiology: theory and practice*, Jones & Bartlett Learning, Burlington, USA, Third Edition, p. 198-204, 2014.
- 30 PAVLOVA, K.; GRIGOROVA, D.; HRISTOZOVA, T.; ANGELOV, A. Yeast strains from Livingston Island, Antarctica. *Folia Microbiologica*, v.46 (5), p. 397-401, 2001.
- PECK, L. S.; CLARK, M. S.; CLARKE, A.; COCKELL, C. S.; CONVEY, P.; DETRICH, H. W. *et al.* Genomics: applications to Antarctic ecosystems. *Polar Biology*, v. 28 (5), p. 351-365, 2005.
- PEDROSO, R. S.; FERREIRA, J. C.; CANDIDO, R. C. In vitro susceptibility to antifungal agents of 35 environmental *Cryptococcus* spp. isolated in the city of Ribeirao Preto, Sao Paulo, Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. v. 101 (3), p. 239-243, 2006.
- PEREZ-NADALES, E.; NOGUEIRA, M. F. A.; BALDIN, C.; CASTANHEIRA, S.; GHALID, M. E.; GRUND, E. *et al.* Fungal model systems and the elucidation of pathogenicity determinants. *Fungal Genetics and Biology*, v. 70, p. 42-67, 2014.
- 40 PERLIN, D. S.; SHOR, E.; ZHAO, Y. Update on Antifungal Drug Resistance. *Current Clinical Microbiology Reports*. v. 2 (2), p. 84-95, 2015.

- PIETR, S. J. The physiological groups of microorganisms in different soils at Admiralty Bay region (King George Island, South Shetland Islands, Antarctica). *Polish Polar Research*, v. 7 (4), p. 395-406, 1986.
- PIETR, S. J. Soil microorganisms In: Rakusa-Suszczewski, S. (Ed) The maritime Antarctic coastal ecosystem of Admiralty Bay, Department of Antarctic Biology, Polish Academy of Sciences, Warsaw, p. 167–172, 1993.
- POLAK, A. Virulence of *Candida albicans* mutants. *Mycoses*, v. 35, p. 9-16, 1992.
- POLLMACHER, J. & FIGGE, M. T. Deciphering chemokine properties by a hybrid agent-based model of *Aspergillus fumigatus* infection in human alveoli. *Frontiers in Microbiology*, v. 6 (503), p. 1-14, 2015.
- PRICE, P. B. A habitat for psychrophiles in deep Antarctic ice. *Proceedings of the National Academy of Sciences U. S. A.*, v. 97 (3), p. 1247-1251, 2000.
- PUGH, G. J. F.; ALLSOPP, A. Microfungi on Signy Island, South Orkney Islands. *British Antarctic Survey Bulletin*, v. 57, p. 55–67, 1982.
- 15 RAY, M. K.; SHIVAJI, S.; RAO, N. S.; BHARGAVA, P. M. Yeast strains from the Schirmacher Oasis, Antarctica. *Polar Biology*, v. 9, p. 305-309, 1989.
- RIBES, J. A.; VANOVER-SAMS, C. L.; BAKER, D. J. Zygomycetes in human disease. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 13, p.236-301, 2000.
- ROBERT, V. A. & CASADEVALL, A. Vertebrate endothermy restricts most fungi as potential
20 pathogens. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 200, p. 1623-1626, 2009.
- ROBINSON, C. H. Cold adaptation in Arctic and Antarctic fungi. *New Phytologist*, v. 151, p. 341-353, 2001.
- ROBINSON, S. A.; WASLEY, J.; TOBIN, A. K. Living on the edge – plants and global change in continental and maritime Antarctica. *Global Change Biology*, v. 9 (12), p. 1681-1717, 2003.
- 25 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. 10
30 (*Caryophyllaceae*) in Antarctica. *Federation of European Microbiological Societies (FEMS) Microbiology Ecology*, v. 73, p.178-189, 2010.
- ROSER, D. J.; SEPPELT, R. D.; ASHBOLT, N. Microbiology of ornithogenic soils from the Windmill Islands, Budd Coast, Continental Antarctica: microbial biomass distribution. *Soil Biology & Biochemistry*, v. 25, p. 165–175, 1993.
- 35 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.
- RUSSO, G.; Libkind, D.; SAMPAIO, J. P.; van Broock, M. R. Yeast diversity in the acidic Rio Agrio-Lake Caviahue volcanic environment (Patagonia, Argentina). *FEMS Microbiology Ecology*, v. 65, p. 415-424, 2008.
- 40 SAMSON, R. A.; HOUBRAKEN, J.; VARGA, J.; FRISVAD, J. C. Polyphasic taxonomy of the heat resistant ascomycete genus *Byssochlamys* and its *Paecilomyces* anamorphs. *Persoonia*, v. 22, p. 14-27, 2009.

- SANGLARD, D. Resistance of human fungal pathogens to antifungal drugs. *Current Opinion in Microbiology*, v. 5, p. 379-385, 2002.
- SANTANGELO, R. T.; NOURI-SORKHABI, M. H.; SORREL, T. C.; CAGNEY, M.; CHEN, S. C.; KUCHEL, P. W.; WRIGHT, L. C. Biochemical and functional characterisation of secreted phospholipase activities from *Cryptococcus neoformans* in their naturally occurring state. *Journal of Medical Microbiology*, v. 48 (8), p. 371-740, 1999.
- SANTIAGO, I. F.; SOARES, M. A.; ROSA, C. A.; ROSA, L. H. Lichensfere: a protected natural microhabitat of the non-lichenised fungal communities living in extreme environments of Antarctica. *Extremophiles*, v. 19 (6), p. 1087-1097, 2015.
- 10 SCHAUFUSS, P.; MULLER, F.; VALENTIN-WEIGAND, P. Isolation and characterization of a haemolysin from *Trichophyton mentagrophytes*. *Veterinary Microbiology*, v. 122, p. 342-349, 2007.
- SELBMANN, L.; DE HOOG, G. S.; MAZZAGLIA, A.; FRIEDMANN, E. I.; ONOFRI, S. Fungi at the edge of life: cryptoendolithic black fungi from Antarctic desert. *Studies in Mycology*, v. 51, p. 1-32, 2005.
- 15 SENEVIRATNE, C. J.; FONG, P. H. L.; WONG, S. S. W.; LEE, V. H. F. Antifungal susceptibility and phenotypic characterization of oral isolates of a black fungus from a nasopharyngeal carcinoma patient under radiotherapy. *BMC Oral Health*, v. 15 (1), p. 39-45, 2015.
- SHARON, H.; HAGAG, S.; OSHEROV, N. Transcription factor PrtT controls expression of multiple secreted proteases in the human pathogenic mold *Aspergillus fumigatus*. *Infection and Immunity*, v. 77 (9), p. 4051-4060, 2009.
- SHEN, C.; XU, N.; GAO, Y.; SUN, X.; YIN, Y.; CAI, M.; ZHOU, X.; ZHANG, Y. Stimulatory effect of ethanol on libertellenone H biosynthesis by Arctic fungus *Eutypella* sp. D-1. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2015.
- 25 SHIVAJI, S. & PRASAD, G. S. Antarctic Yeasts: Biodiversity and Potential Applications. In: Satyanarayana, T. & Kunze, G. (Eds.) *Yeast Biotechnology: Diversity and Applications*, p. 3-18, 2009.
- SIA, E. F.; MARCON, J.; LUVIZOTTO, D. M.; QUECINE, M. C. *et al.* Endophytic fungi from the Amazonian plant *Paullinia cupana* and from *Olea europaea* isolated using cassava as an alternative starch media source. *SpringerPlus*, v. 2 (579), 1-9, 2013.
- 30 SINGH, L. & AGARWAL, M. K. Air Microflora of Antarctica. Fourteenth Indian Expedition to Antarctica, Scientific Report. Department of Ocean Development, Technical Publication, No. 12, p. 193-198, 1998
- SIMAS, F. N. B.; SCHAEFER, C. E. G. R.; MELO, V. F.; ALBUQUERQUE-FILHO, M. R.; MICHEL, R. F. M.; PEREIRA, V. V.; GOMES, M. R. M.; COSTA, L. M. Ornithogenic cryosols from Maritime Antarctica: Phosphatization as a soil forming process. *Geoderma*, v. 138, p. 191-203, 2007.
- 35 SWOBODA-KOPEC, E.; WROBLEWSKA, M. M.; ROKOSZ, A.; LUCZAK, M. Mixed bloodstream infection with *Staphylococcus aureus* and *Penicillium chrysogenum* in an immunocompromised patient: case report and review of the literature. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 9 (11), p. 1116-1117, 2003.
- 40 TAIRA, C. L.; MARCONDES, N. R.; MOTA, V. A.; SVIDZINSKI, T. I. E. Virulence potential of filamentous fungi isolated from poultry barns in Cascavel, Paraná, Brazil. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. v. 47 (1), p. 155-160, 2011.

- TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, v. 30, p. 2725-2729, 2013.
- TARKKANEN, A.; RAIVIO, V.; ANTTILA, V. J.; TOMMMILA, P.; RALLI, R.; MERENMIES, L.; IMMUNEN, I. Fungal endophthalmitis caused by *Paecilomyces variotii* following cataract surgery: a presumed operating room air-conditioning system contamination. *Acta Ophthalmologica. Scandinavica*, v. 82, p. 232-235, 2004.
- TATUR, A. Ornithogenic soils of the maritime Antarctic. *Polish Polar Research*, v. 10 (4), p. 481-532, 1989.
- 10 TATUR, A. Ornithogenic ecosystems in the maritime Antarctic – formation, development and disintegration. *Ecological Studies*, v. 154, p. 161–184, 2002.
- TATUR, A. & MYRCHA, A. Ornithogenic soils on King George Island, South Shetland Islands (Maritime Antarctic Zone). *Polish Polar Research*, v. 5 (1), p. 31-60, 1984.
- THEEB, B. O.; MOHAMMAD, F. I.; HASHIM, A. J.; HASHIM, S. S. Purification of hemolysin from *Aspergillus fumigatus* and study its cytotoxic effect on normal cell line (REF) *in vitro*. v. *Egyptian Academic Journal of Biological Sciences*, v. 5 (2), p. 35-43, 2013.
- 15 TOMEE, J. F. C. H. & KAUFFMAN, H. F. Putative virulence factors of *Aspergillus fumigatus*., *Clinical & Experimental Allergy*, v. 30, p. 476–484, 2000.
- TOSI, S.; CASADO, B.; GERDOL, R.; CARETTA, G. Fungi isolated from Antarctic mosses. *Polar*
20 *Biology*, v. 25, p. 262-268, 2002.
- TROUILLAS, F. P.; PITT, W. M.; SOSNOWSKI, M. R.; HUANG, R.; PEDUTO, F.; LOSCHIAVO, A.; SAVOCCHIA, S.; SCOTT, E. S.; GUBLER, W. D. Taxonomy and DNA phylogeny of Diatrypaceae associated with *Vitis vinifera* and other woody plants in Australia. *Fungal Diversity*, v. 49, p. 203-223, 2011.
- 25 UDAGAWA, S. & SUZUKI, S. *Talaromyces spectabilis*, a new species of food-borne ascomycetes. *Mycotaxon*, v. 50, p. 81–88, 1994.
- UGOLINI, F. C. Ornithogenic soils of Antarctica. In: Llano, G. A. (Ed) Antarctic Terrestrial Biology, Antarctic Research Series, American Geophysical Union, Washington, v. 20, p. 181-193, 1972.
- 30 UPSON, R.; NEWSHAM, K. K.; BRIDGE, P. D.; PEARCE, D. A.; READ, D. J. Taxonomic affinities of dark septate root endophytes of *Colobanthus quitensis* and *Deschampsia antarctica*, the two native Antarctic vascular plant species. *Fungal Ecology*, v. 2, p. 184–196, 2009.
- VAŠUTOVÁ, M. Taxonomic studies on *Psathyrella* sect. *Spadiceae*. *Czech Mycology*, v. 60 (2), p. 137-171, 2008.
- 35 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 1 compounds of yeasts isolated in Antarctica. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 42 (3), p. 937-947, 2011.
- VIDOTTO, V.; SINICCO, A.; DI FARIA, D.; CARDAROPOLI, S.; AOKI, S.; ITO-KUWA, S.
40 Phospholipase activity in *Cryptococcus neoformans*. *Mycopathologia*, v. 136, p. 119-123, 1996.
- VIEIRA, M. L. A.; HUGHES, A. F. S.; GIL, V. B.; Vaz, A. B. M. *et al.* Diversity and antimicrobial activities of the fungal endophyte community associated with the traditional Brazilian medicinal plant *Solanum cernuum* Vell. (*Solanaceae*). *Canadian Journal of Microbiology*, v. 58, p. 54-66, 2012.

- VILLARREAL, P.; CARRASCO, M.; BARAHONA, S.; ALCAÍNO, J.; CIFUENTES, V.; BAEZA, M. Tolerance to Ultraviolet Radiation of Psychrotolerant Yeasts and Analysis of Their Carotenoid, Mycosporine, and Ergosterol Content. *Current Microbiology*, v. 72 (1), p. 94-101, 2016.
- 5 VISHNIAC, H.S. Biodiversity of yeasts and filamentous microfungi in terrestrial Antarctic ecosystems. *Biodiversity and Conservation*, v. 5, p. 1365-1378, 1996.
- VLASAK, J.; KOUT, J.; VLASAK JR, J.; RYVARDEN, L. New records of polypores from southern Florida. *Mycotaxon*, v. 118, p. 159-176, 2011.
- WEBSTER, N. S.; NEGRI, A. P.; MUNRO, M. M. H. G.; BATTERSHILL, C.N. Diverse microbial
10 communities inhabit Antarctic sponges. *Environmental Microbiology*, v. 6, p. 288-300, 2004.
- WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, S; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M. A., GELFAND, D. H., SNINSKY, J. J., WHITE, T. J. (Eds.) PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. San Diego: Academic Press, p. 315-322, 1990.
- 15 WICKLOW, D. T. *Aspergillus fumigatus* Fresenius isolated from ornithogenic soil collected at Hallett Station, Antarctica. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 14 (6), p. 717-719, 1968.
- WIRTH, F. & GOLDANI, L. Z. Epidemiology of *Rhodotorula* : An Emerging Pathogen. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, p. 1-7, 2012.
- WOO, M. New Record for Coldest Place on Earth, in Antarctica. 2013. Disponível
20 em: <<http://news.nationalgeographic.com/news/2013/12/131210-coldest-place-on-earth-antarctica-science/>>. Acesso em: 22 de setembro de 2015.
- WU, S.; NILSSON, H. R.; CHEN, C.; YU, S.; HALLENBERG, N. The white-rotting genus *Phanerochaete* is polyphyletic and distributed throughout the phleboid clade of the *Polyporales* (Basidiomycota). *Fungal Diversity*, v. 42, p. 107-118, 2010.
- 25 YOKOI, S.; IIZASA, T.; YOSHIDA, S.; KAMEI, K.; HIROSHIMA, K.; OHWADA, O.; FUJISAWA, T. Case Report. Localized pulmonary zygomycosis without pre-existing immunocompromised status. *Mycoses*, v. 42, p. 675-677, 1999.
- XIAO, N.; INABA, S.; TOJO, M.; DEGAWA, Y.; FUJII, S.; HANADA, Y.; KUDOH, S.; HOSHINO, T. Antifreeze activities of various fungi and Stramenopila isolated from Antarctica.
30 *North American Fungi*, v. 5 (5), p. 215-220, 2010.
- ZHANG, T.; XIANG, H. B.; ZHANG, Y. Q.; LIU, H. Y.; WEI, Y. Z.; ZHAO, L. X.; YU, L. Y. Molecular analysis of fungal diversity associated with three bryophyte species in the Fildes Region, King George Island, maritime Antarctica. *Extremophiles*, v. 17 (5), p. 757-765, 2013.
- ZLATANOV, M.; PAVLOVA, K.; GRIGOROVA, D. Lipid Composition of Some Yeast Strains
35 from Livingston Island, Antarctica. *Folia Microbiologica*, v. 46 (5), p. 402-406, 2001.
- 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, p. 749-757, 2012.