

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia

Láuren Machado Drumond de Souza

**DIVERSIDADE DE FUNGOS PRESENTES EM LAGOS DA ANTÁRTICA E
DETECÇÃO DE ENZIMAS E BIOSSURFACTANTES DE INTERESSE
INDUSTRIAL**

Belo Horizonte, Minas Gerais

2021

Universidade Federal de Minas Gerais

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-Graduação em Microbiologia

Láuren Machado Drumond de Souza

**DIVERSIDADE DE FUNGOS PRESENTES EM LAGOS DA ANTÁRTICA E
DETECÇÃO DE ENZIMAS E BIODISSURFACTANTES DE INTERESSE
INDUSTRIAL**

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

Orientador: Prof. Dr. Luiz Henrique Rosa
Co-orientadora: Mayara Baptistucci Ogaki

Belo Horizonte, Minas Gerais,

2021

043

Souza, Láuren Machado Drumond de.

Diversidade de fungos presentes em lagos da Antártica e detecção de enzimas e biossurfactantes de interesse industrial [manuscrito] / Láuren Machado Drumond de Souza. – 2021.

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

Orientador: Prof. Dr. Luiz Henrique Rosa. Co-orientadora: Mayara Baptistucci Ogaki.

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

1. Microbiologia. 2. Regiões Antárticas. 3. Enzimas. 4. Tensoativos. 5. Fungos. 6. Diversidade. I. Rosa, Luiz Henrique. II. Ogaki, Mayara Baptistucci. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 579



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

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE **LÁUREN MACHADO DRUMOND DE SOUZA**

Nº REGISTRO: **2019655661**

Às 14:00 horas do dia **20 de AGOSTO de 2021**, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora composta pelos Drs. Viviane de Souza Alves, Alysson Wagner Fernandes Duarte e o Prof. Luiz Henrique Rosa – Orientador, para julgar o trabalho final “Diversidade de fungos presentes em lagos da Antártica e detecção de enzimas e biossurfactantes de interesse industrial”, da aluna **Láuren Machado Drumond de Souza**, requisito final para a obtenção do Grau de **MESTRE EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA**. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Prof. Luiz Henrique Rosa - orientador, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para a apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. A candidata foi considerada **APROVADA**. O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. O candidato tem 60 (sessenta) dias, a partir desta data, para entregar a versão final da dissertação ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da UFMG e requerer seu diploma.

Membros da banca:

Dra. Viviane de Souza Alves

Dr. Alysson Wagner Fernandes Duarte

De acordo:

Prof. Luiz Henrique Rosa

(orientador)

Profa. Danielle da Glória de Souza

(Coordenadora do PPGM/UFMG)

Belo Horizonte, 20 de agosto de 2021



Documento assinado eletronicamente por **Luiz Henrique Rosa, Professor do Magistério Superior**, em 23/08/2021, às 07:58, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Viviane de Souza Alves, Professora do Magistério Superior**, em 24/08/2021, às 06:52, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Alysson Wagner Fernandes Duarte, Usuário Externo**, em 24/08/2021, às 10:55, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Daniele da Gloria de Souza, Coordenador(a) de curso de pós-graduação**, em 24/08/2021, às 13:04, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0838555** e o código CRC **C91425C1**.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, Clara e Sormane, pelo carinho, apoio, confiança, dedicação e, acima de tudo, por serem meu suporte desde o início da minha jornada em Belo Horizonte. Essa base extremamente forte fez com que eu pudesse seguir todos os meus sonhos, mesmo nos momentos mais difíceis, que superamos juntos.

Ao Kaique por tanto companheirismo, tanto suporte, tanta compreensão e, além de tudo, por ter sido meu braço direito durante esses anos. Acolheu-me em cada momento de tristeza e comemorou comigo cada uma das minhas conquistas.

Ao meu orientador Luiz, pela oportunidade, confiança, suporte e compreensão desde o início da minha Iniciação Científica, há quatro anos. Sou grata a todos os membros do Laboratório de Microbiologia Polar e Conexões Tropicais e também aos alunos do Prof. Carlos e Prof. Susana, pela amizade, pelas risadas, pelos conhecimentos compartilhados e por todos os dias que passamos juntos.

A todo corpo docente e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da UFMG por todo seu esforço, dedicação e competência, e também ao apoio financeiro fornecido pela CAPES e pelo CNPq.

À minha co-orientadora Mayara, pela prestabilidade, carinho, apoio e incentivo durante todo o período que trabalhamos juntas.

À Gisele, que encontrou uma filha mais velha no laboratório e resolveu cuidar. Obrigada por todo o suporte em absolutamente tudo, tanto nas questões de laboratório quanto pessoais.

Aos meus amigos que estiveram ao meu lado durante toda essa caminhada.

Por fim, não poderia deixar de agradecer aos meus muitos cachorros/filhos, por sempre me esperarem voltar para Itaúna com muito amor e muitos lambeijos.

Obrigada a todos que fizeram parte dessa jornada.

RESUMO

A Antártica é conhecida por suas características ambientais extremas com baixas temperaturas, salinidade elevada, alta exposição à radiação UV, dessecação, escassez de nutrientes, variações de pH e ciclos de congelamento e degelo. Frente a estas condições limitantes à vida, os micro-organismos representam as formas de vida dominante nesse ambiente. Os micro-organismos residentes na Antártica são conhecidos como extremófilos, pois possuem estratégias adaptativas para garantir sua sobrevivência frente às condições extremas da região. Entre os micro-organismos antárticos, as comunidades de fungos presentes nos lagos se destacam, pois são os responsáveis por ciclos biogeoquímicos e mineralização da matéria orgânica presente nesses habitats e, conseqüentemente, são potenciais produtores de enzimas ativas em baixas temperaturas de grande interesse industrial, as quais podem ser até 10 vezes mais ativas em baixas temperaturas quando comparadas às dos mesofílicos. Considerando a capacidade dos fungos antárticos em produzir diversas enzimas com potencial biotecnológico, o objetivo do presente trabalho foi caracterizar os fungos residentes em lagos da Península Antártica e avalia-los quanto à produção de enzimas e biossurfactantes de interesse industrial. Os fungos foram obtidos de dois lagos antárticos, o primeiro localizado na ponta Hennequin, na Ilha Rei George, utilizando iscas de barbante submersas por dois anos e o segundo a partir de biofilmes formados no Kroner Lake, na Ilha Deception. Nos substratos avaliados foram obtidos 154 isolados fúngicos cultiváveis, dos quais 89 (58%) foram representados por fungos filamentosos e 65 (42%) por leveduras. Desses isolados, 94 (61%) foram obtidos das iscas de barbante coletadas na Ilha Rei George, sendo 45 (48%) fungos filamentosos e 49 (52%) leveduras. Os outros 60 (39%) isolados foram obtidos do biofilme coletado na Ilha Deception, sendo 44 (73%) fungos filamentosos e 16 (27%) leveduras. O filo *Ascomycota* foi o mais abundante e representado por 89 (58%) isolados, seguido por *Basidiomycota* com 58 (38%) isolados e, por último, *Mortierellomycota* com sete (4%) isolados. Dos 94 isolados do barbante, *Thelebolus globosus* com 24 (26%) isolados e *Goffeauzyma* sp. com 19 (20%) isolados foram o fungo filamentoso e a levedura, respectivamente, mais abundantes. Já com relação aos 60 isolados do biofilme, *Pseudogymnoascus verrucosus*, com 27 (45%) isolados, foi o táxon mais abundante entre os fungos filamentosos e *Metschnikowia australis* a levedura mais abundante, com cinco (8%) isolados. Nos testes enzimáticos com os fungos cultiváveis, 133 isolados do barbante e do biofilme foram avaliados para a produção das enzimas celulase, protease, lipase, agarase, carragenase, invertase, amilase, esterase, pectinase, inulinase e gelatinase. A enzima mais

comumente detectada foi protease (77%), seguida por lipase (63%); já as menos produzidas foram celulase (32%) e pectinase (12%). Os mesmos 133 isolados foram submetidos ao teste de colapso da gota para a avaliação da produção de biossurfactantes e todos os isolados apresentaram resultado negativo. Com relação aos fungos não cultiváveis, caracterizados nas iscas de barbante obtidas dos lagos de ponta Hennequin da Ilha Rei George e Soto da Ilha Deception, foram detectadas 258.326 leituras de DNA distribuídas em 34 *amplicon sequence variants* (ASVs) pertencentes aos filos *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Mortierellomycota*, *Chytridiomycota* e *Rozellomycota*. A maioria das ASVs (27) foi detectada no lago Hennequin e 13 ASVs detectadas no lago Soto. *Tetracladium marchalianum*, *Tetracladium* sp., *Rozellomycota* sp., Fungal sp. 1 e Fungal sp. 2 foram os táxons mais comuns dentro das comunidades de fungos dos lagos. *Tetracladium marchalianum* (142.805) e *Tetracladium* sp. (99.392) apresentaram os maiores números de leituras de DNA. Os dados obtidos nesse trabalho contribuem para ampliar o conhecimento das comunidades fúngicas presentes nos ambientes lacustres oligotróficos da Antártica com a presença de táxons endêmicos e cosmopolitas adaptados ao frio, bem como possíveis espécies novas. Estes fungos residentes nos lagos antárticos demonstraram ser potenciais fontes de diferentes enzimas, as quais podem ter sua atividade em baixas temperaturas e, por isso, representarem grande potencial para uso biotecnológico no setor industrial.

Palavras-chaves: Antártica; enzimas; biossurfactantes; fungos; diversidade.

ABSTRACT

Antarctica is known for its extreme environmental characteristics with low temperatures, high salinity, high exposure to UV radiation, desiccation, nutrient scarcity, pH variations and freeze-thaw cycles. Faced with these life-limiting conditions, microorganisms represent the dominant forms of life in this environment.. The microorganisms residing in Antarctica are known as extremophiles, as they have adaptive strategies to ensure their survival in the face of extreme conditions in the region. Among the Antarctic microorganisms, fungal communities present in lakes stand out, as they are responsible for biogeochemical cycles and mineralization of organic matter present in these habitats and, consequently, are potential producers of enzymes active at low temperatures of great industrial interest, which can be up to 10 times more active at low temperatures compared to mesophilic. Considering the capacity of Antarctic fungi to produce several enzymes with biotechnological potential, the objective of the present work was to characterize the resident fungi in lakes of the Antarctic Peninsula and evaluate them regarding the production of enzymes and biosurfactants of industrial interest. The fungi were obtained from two Antarctic lakes, the first located at the Hennequin Point, on King George Island, using submerged string baits for two years and the second from biofilms formed at Kroner Lake, on Deception Island. In the evaluated substrates, 154 cultivable fungal isolates were obtained, of which 89 (58%) were represented by filamentous fungi and 65 (42%) by yeasts. Of these isolates, 94 (61%) were obtained from string baits collected on King George Island, 45 (48%) of which were filamentous fungi and 49 (52%) yeasts. The other 60 (39%) isolates were obtained from the biofilm collected on Deception Island, being 44 (73%) filamentous fungi and 16 (27%) yeasts. The phylum *Ascomycota* was the most abundant and represented by 89 (58%) isolates, followed by *Basidiomycota* with 58 (38%) isolates and, finally, *Mortierellomycota* with seven (4%) isolates. Of the 94 isolates from string baits, *Thelebolus globosus* with 24 (26%) isolates and *Goffeauzyma* sp. with 19 (20%) isolated were the filamentous fungus and yeast, respectively, more abundant. Regarding the 60 isolates from the biofilm, *Pseudogymnoascus verrucosus*, with 27 (45%) isolates, was the most abundant taxon among the filamentous fungi and *Metschnikowia australis* the most abundant yeast, with five (8%) isolates. In enzymatic tests with cultivable fungi, 133 isolates from string and biofilm were evaluated for the production of cellulase, protease, lipase, agarase, carrageenase, invertase, amylase, esterase, pectinase, inulinase and gelatinase enzymes. The most commonly detected enzyme was protease (77%), followed by lipase (63%); the least produced were cellulase (32%) and pectinase (12%). The

same 133 isolates were submitted to the drop-collapse test to evaluate the production of biosurfactants and all isolates were negative. Regarding the uncultivable fungi, characterized in the string baits obtained from the lakes of Hennequin Point on King George Island and Soto on Deception Island, 258.326 DNA reads were detected distributed in 34 amplicon sequence variants (ASVs) belonging to the phyla *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Mortierellomycota*, *Chytridiomycota* and *Rozellomycota*. The majority of ASVs (27) were detected in Lake Hennequin and 13 ASVs detected in Lake Soto. *Tetracladium marchlianum*, *Tetracladium* sp., *Rozellomycota* sp., Fungal sp. 1 and Fungal sp. 2 were the most common taxa within the lake fungus communities. *Tetracladium marchlianum* (142.805) and *Tetracladium* sp. (99.392) had the highest numbers of DNA reads. The data obtained in this work contribute to broaden the knowledge of fungal communities present in oligotrophic lacustrine environments in Antarctica with the presence of endemic and cosmopolitan taxa adapted to cold, as well as possible new species. These fungi residing in Antarctic lakes proved to be potential sources of different enzymes, which can have their activity at low temperatures and, therefore, represent great potential for biotechnological use in the industrial sector.

Key-words: Antarctica; enzymes; biosurfactants; fungi; diversity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Imagens de satélite com a localização das Ilhas Rei George e Deception no Arquipélago de Shetlands do Sul, Antártica. (a) Continente Antártico com a Península Antártica destacada pelo retângulo vermelho e (b) Península Antártica com as Ilhas Rei George (KGI) e Deception (DI) destacadas pelo retângulo vermelho. Fonte: Google Earth Pro, 2019.	36
Figura 2. Fotos dos lagos nos quais as iscas de barbante foram implantadas. (a) lago em ponta Hennequin, Ilha Rei George e (b) Lago Soto na Ilha Deception. Fotos: Luiz Henrique Rosa.	37
Figura 3. Foto do Kroner Lake, Ilha Deception, Antártica, mostrando sua conexão com o mar à esquerda. Foto: Luiz Henrique Rosa.	38
Figura 4. Isolamento dos fungos cultiváveis. (a) número de isolados fúngicos obtidos na Ilha Rei George (iscas de barbante) e na Ilha Deception (biofilme) e (b) número de isolados fúngicos obtidos por substrato.	52
Figura 5. Curva de rarefação (índice de Mao Tau) das comunidades fúngicas isoladas das amostras de barbantes e biofilme dos lagos antárticos.	57
Figura 6. Diagrama de Venn demonstrando a similaridade de espécies fúngicas entre as amostras de barbante e biofilme obtidas de lagos antárticos.	58
Figura 7. Observação da produção de enzimas extracelulares com base na formação de halos de hidrólise, os quais estão indicados por setas. (a) celulase (halo alaranjado no fundo vermelho), (b) protease (halo branco no fundo claro), (c) gelatinase (marca transparente de “derretimento” do meio de cultura), (d) agarase (halo claro no fundo roxo), (e) e (f) lipase (amarelo fluorescente no fundo rosa), (g) carragenase (halo claro no fundo roxo), (h) invertase (halo amarelo no fundo verde), (i) amilase (halo claro no fundo escuro), (j) esterase (halo branco no fundo claro), (k) pectinase (halo claro no fundo branco) e (l) inulinase (halo claro no fundo roxo). Fotos: L.M.D. de Souza.	60
Figura 8. Número de sequências de amplicons variantes de fungos (ASVs) detectadas nas iscas de barbante implantadas no Lago Hennequin (Ilha Rei George) e no Lago Soto (Ilha Deception), Antártica.	70
Figura 9. Diagrama de Venn demonstrando a similaridade das comunidades de fungos não cultiváveis detectados nas amostras de barbante dos lagos Hennequin (Ilha Rei George) e Soto (Ilha Deception).	70
Figura 10. Curvas de rarefação de sequência de amplicons variantes de fungos (ASVs) obtidas de iscas de barbante: (a) comunidade fúngica total em ambos os lagos, (b) Lago Hennequin, Ilha Rei George e (c) Lago Soto, Ilha Deception, Ilhas Shetland do Sul, Antártica. As linhas azuis representam limites de confiança de 95%.	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Fungos de ambientes frios e sua produção enzimática.....	23
Tabela 2. Identificação dos fungos antárticos isolados das iscas de barbante por meio do sequenciamento de regiões do rDNA e análise utilizando o <i>Basic Local Alignment Search Tool</i> (BLASTn).	53
Tabela 3. Identificação dos fungos antárticos isolados do biofilme por meio do sequenciamento de regiões do rDNA e análise utilizando o <i>Basic Local Alignment Search Tool</i> (BLASTn).	55
Tabela 4. Índices de diversidade das comunidades de fungos e características físico-químicas dos lagos antárticos.....	58
Tabela 5. Médias dos Índices Enzimáticos (MIE) produzidos pelos fungos isolados de biofilme e de iscas de barbante dos lagos da Antártica.	63
Tabela 6. Número de leituras de sequências de amplicons variantes (ASVs) detectadas nas iscas de barbante depositadas por dois anos em lagos das Ilhas Shetland do Sul, Antártica. ..	71
Tabela 7. Índices ecológicos do DNA fúngico de água doce recuperado de iscas de barbante depositadas no Lago Hennequin, Ilha Rei George e Lago Soto, Ilha Deception, Ilha Shetlands do Sul, Antártica.	72

LISTA DE ABREVIATURAS

%: Por cento

°C: Graus Celcius

$\mu\text{g mL}^{-1}$: Micrograma por mililitro

μg : Micrograma

$\mu\text{L mL}^{-1}$: Microlitro por mililitro

μL : Microlitro

ABI: Applied Biosystems

AM: Ágar marinho

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool

BLASTn: Nucleotide Basic Locus Alignment Search Tool

Cm: Centímetros

CMC: Carboximetilcelulose

CTAB: Brometo de cetil trimetilamônio

D1/D2: Região da Subunidade Maior do rRNA

DMSO: Dimetilsulfóxido

DNA: Ácido desoxirribonucleico

dNTP: Desoxirribonucleotídeo trifosfato

DRBC: Ágar Dicloran Rosa Bengala

EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético

g L^{-1} : Grama por litro

g: Grama

GYMP: Glucose-Yeasts Extract-Malt Extract-Fosfato de Potássio

h: Horas

HCl: Ácido clorídrico

ICB: Instituto de Ciências Biológicas

ITS: Região transcrita interna

ITS1-5.8S-ITS2: Região Transcrita Interna do Gene do rRNA

Km: Quilômetros

L: Litro

M: Molar

MEA: Meio extrato de malte

mg mL^{-1} : Miligrama por mililitro

mg: Miligrama

MgCl₂: Cloreto de Magnésio

mL: Mililitro

MM: Meio mínimo

mm: Milímetros

NaCl: Cloreto de sódio

PCR: Reação em cadeia da polimerase

pH: Potencial Hidrogeniônico

pmol: Picomol

RNA: Ácido Ribonucléico

rpm: Rotações por minuto

TBE: Tris-borato

TE: Tampão Tris-EDTA

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

UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais

UFMGCB: Coleção de Microrganismos e Células da UFMG

UV: Ultravioleta

v/v: Volume por volume

V: Volts

YM: Ágar extrato de malte - Extrato de levedura

YNB: Yeast nitrogen base

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1. Antártica.....	18
2.2. Fungos na Antártica	19
2.3. Comunidade de fungos presentes em lagos da Antártica	20
2.4. Enzimas produzidas por micro-organismos de ambientes frios e suas aplicações biotecnológicas	21
2.4.1. Celulases	26
2.4.2. Proteases	26
2.4.3. Gelatinases.....	27
2.4.4. Agarases	28
2.4.5. Carragenases.....	28
2.4.6. Lipases	29
2.4.7. Invertases	29
2.4.8. Amilases	30
2.4.9. Esterases	31
2.4.10. Pectinases	31
2.4.11. Inulinases	32
2.5. Biossurfactantes e sua produção por micro-organismos extremófilos	33
3. OBJETIVOS.....	35
3.1. Objetivos Gerais	35
3.2. Objetivos Específicos	35
4. MATERIAIS E METODOLOGIA.....	36
4.1. Localização dos lagos e obtenção das amostras	36
4.1.1. Iscas de barbante para captura dos fungos.....	37
4.1.2. Coleta dos biofilmes	38
4.2. Isolamento dos fungos cultiváveis	38
4.2.1. Iscas de barbante.....	38
4.2.2. Biofilmes	39
4.3. Preservação dos fungos cultiváveis	39
4.4. Isolamento seletivo de fungos celulolíticos presentes nos barbantes	40
4.5. Identificação dos fungos cultiváveis.....	40
4.5.1. Identificação de fungos filamentosos	40
4.5.1.1. Extração do DNA total	41
4.5.1.2. Amplificação utilizando o iniciador (GTG) ⁵	41
4.5.1.3. Amplificação da região ITS	42
4.5.1.4. Amplificação parcial do gene da β -tubulina	42

4.5.2.	Identificação de leveduras	43
4.5.2.1.	Extração do DNA total	43
4.5.2.2.	Amplificação do domínio D1/D2	43
4.5.3.	Purificação dos amplicons dos fungos cultiváveis	44
4.5.4.	Sequenciamento dos fungos cultiváveis	44
4.5.4.1.	Reações de sequenciamento.....	44
4.5.4.2.	Precipitação da reação de sequenciamento	45
4.5.4.3.	Análise computacional das sequências	45
4.6.	Detecção das enzimas produzidas pelos fungos cultiváveis	46
4.6.1.	Celulases	46
4.6.2.	Proteases	46
4.6.3.	Lipases	46
4.6.4.	Agarases	47
4.6.5.	Carragenases	47
4.6.6.	Invertases	47
4.6.7.	Amilases	47
4.6.8.	Esterases	47
4.6.9.	Pectinases	48
4.6.10.	Inulinases	48
4.6.11.	Gelatinases.....	48
4.7.	Produção de biossurfactantes pelos fungos cultiváveis	48
4.7.1.	Preparação do inóculo	48
4.7.2.	Triagem da produção de biossurfactantes	48
4.7.2.1.	Teste de colapso da gota	49
4.8.	Extração de DNA ambiental total (eDNA) e caracterização da comunidade de fungos não cultiváveis	49
4.9.	Análise da diversidade dos fungos cultiváveis e não cultiváveis: cálculo dos índices de abundância, riqueza e dominância	50
5.	RESULTADOS.....	52
5.1.	Isolamento dos fungos cultiváveis	52
5.1.1.	Identificação e distribuição dos fungos cultiváveis.....	52
5.1.2.	Análise da diversidade da comunidade fúngica cultivável.....	57
5.1.3.	Avaliação das atividades enzimáticas dos fungos cultiváveis.....	59
5.1.4.	Avaliação da Produção de Biossurfactantes	69
5.2.	Identificação e distribuição dos táxons não cultiváveis.....	69
5.2.1.	Análise da diversidade da comunidade fúngica não cultivável.....	72
6.	DISCUSSÃO.....	73
7.	CONCLUSÕES	82
	REFERÊNCIAS	83
	PRODUÇÃO ACADÊMICA.....	112

1. INTRODUÇÃO

Apesar de representar um ambiente polar, a Antártica possui diferentes ecossistemas, os quais abrigam diferentes comunidades de seres vivos adaptados, principalmente, às baixas temperaturas (Francelino & Schaefer, 2004). Entretanto, com o potencial efeito do aquecimento global, a biodiversidade da região pode sofrer alterações significativas em sua composição (Comin & Justino, 2017). Nesse contexto, os fungos, nosso alvo de estudo, também podem ser afetados, tornando ainda mais importante a realização de estudos acerca da sua diversidade nos diferentes ecossistemas antárticos.

De acordo com Martorell *et al.* (2019a), os micro-organismos isolados da Antártica são uma fonte expressiva de enzimas ativas a baixas temperaturas, as quais podem ser utilizadas em diversos processos industriais. Ainda de acordo com estes autores, em um ambiente com escassez de nutrientes, essas enzimas contribuem de forma ativa para a realização do ciclo de nutrientes e a mineralização da matéria orgânica pelos fungos. As enzimas de micro-organismos psicrófilos podem ser até 10 vezes mais ativas em temperaturas baixas e moderadas quando comparadas às de mesófilos e, além disso, enzimas de organismos endêmicos a ambientes frios podem ser uma fonte valiosa de catalisadores com novas especificidades de substrato ou propriedades para se tornarem bioprodutos de interesse industrial (Margesin & Feller, 2010). Dessa forma, considerando a diversidade e ecologia de fungos residentes nos ambientes lacustres da Antártica e, principalmente, seu potencial enzimático relacionado à ciclagem de nutrientes, ainda pouco explorado, é importante que mais estudos sejam conduzidos para detectar espécies e linhagens de fungos antárticos produtores de enzimas com potenciais aplicações biotecnológicas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Antártica

O continente antártico alcançou sua posição atual há cerca de 45 milhões de anos e foi geograficamente isolado dos outros continentes desde a separação da Península Antártica da América do Sul há aproximadamente 30 milhões de anos (Bargagli, 2008). A abertura e o aprofundamento da passagem de Drake (canal de águas profundas entre a América do Sul e a Antártica Ocidental) permitiram o estabelecimento da corrente circumpolar antártica, um sistema de correntes oceânicas que contribuiu para o isolamento térmico da Antártica dos demais continentes (Barker & Burrell, 1977; Brasil, 2006; Bargagli, 2008; Rintoul, 2010). Envoltos pelo Oceano Antártico ou Austral e com uma superfície de aproximadamente 14 milhões de km², cerca de 1,6 vezes a área do Brasil, é o continente que circunda o Polo Sul até o paralelo de 60° S (Bischoff, 1996; Brasil, 2006).

A Antártica é o continente mais frio do mundo, com temperatura média entre -25 °C e -45 °C, sendo que a mais baixa já registrada foi de -93,2 °C (Brasil, 2006; Nasa, 2013), além de ser uma das regiões mais secas do planeta, com a predominância de ventos que podem chegar a 327 km/h (Bischoff, 1996). Cerca de 98% do continente é permanentemente coberto de gelo (espessura média de cerca de 2 km e espessura máxima de mais de 4 km) e, no inverno, a superfície do gelo, do continente, dos lagos e do mar é essencialmente desprovida de água disponível no estado líquido, apresentando características de um deserto frio, que duram até o degelo na primavera (Wynn-Williams, 1990; Bargagli, 2008).

Os organismos que habitam a Antártica são submetidos a uma variedade de condições ambientais extremas, como grandes variações de temperaturas, verões com alta incidência de radiação solar, invernos com longos períodos de escuridão, salinidade elevada, dessecação, escassez de nutrientes, variação de pH e ciclos de congelamento e degelo (Brasil, 2006; Gocheva *et al.*, 2006; Gonçalves *et al.*, 2012). Apesar de inóspito, o continente abriga organismos como aves, mamíferos, invertebrados marinhos e terrestres, plantas e macroalgas (Eklund, 1956; Clarke *et al.*, 2004; Liliana *et al.*, 2017). Os micro-organismos antárticos são representados por fungos, bactérias, vírus e arqueias que apresentam destaque nos diferentes ecossistemas da região devido à sua elevada diversidade e capacidade adaptativa às condições extremas (Russell, 2006).

A colonização microbiana no tempo e no espaço é uma função da emigração, imigração, crescimento e morte, sendo que o sucesso da colonização dos propágulos pode ocorrer por meio do transporte via correntes áreas, correntes marinhas ou introduzidas de

forma antrópica (por turistas ou pesquisadores) para a Antártica que, de acordo com Pearce *et al.* (2009), depende dos seguintes fatores:

- (1) sobrevivência durante os diferentes modos de transferência;
- (2) as capacidades fisiológicas e bioquímicas dos propágulos na deposição;
- (3) condições de habitat.

Ainda segundo Pearce *et al.* (2009), o habitat afeta o sucesso da colonização porque o potencial e a viabilidade de um propágulo devem corresponder a um habitat favorável para seu assentamento, crescimento e estabelecimento, com tempo suficiente para o estabelecimento antes que as condições se tornem desfavoráveis.

A Antártica é geralmente vista como um lugar remoto e hostil e como um símbolo da última grande região selvagem ainda pouco atingida pelas atividades antrópicas. Contudo, a presença humana na Antártica teve seu início nos anos 1900 para pesca e caça de baleias e focas e, durante este período, muitas espécies invasoras de plantas e animais foram introduzidas em diferentes ilhas subantárticas (Bargagli, 2008). Embora o Protocolo sobre Proteção Ambiental para Tratado da Antártica forneça diretrizes estritas para a proteção do meio ambiente antártico e estabeleça obrigações para todas as atividades humanas no continente e no oceano, o aquecimento global, o crescimento populacional e o desenvolvimento industrial nos países do Hemisfério Sul vêm aumentando o impacto de contaminantes antropogênicos nos ecossistemas antárticos (Bargagli, 2008; Flocco *et al.*, 2019; Rosa *et al.*, 2019b).

2.2. Fungos na Antártica

O elevado número de micro-organismos cosmopolitas encontrados nos diferentes ambientes antárticos sugere que a Antártica recebe constantemente diferentes propágulos microbianos de fora da região, especialmente da América do Sul e Oceania, regiões mais próximas da Antártica (Kappen, 1993). Segundo Ruisi *et al.* (2007), vetores como micropartículas suspensas nas correntes aéreas e animais são alguns dos responsáveis por essa dispersão a longa distância. Contudo, além da grande variedade de espécies cosmopolitas, também são encontradas espécies endêmicas na Antártica (Bridge & Spooner, 2012).

Segundo Ruisi *et al.* (2007), a maioria dos fungos encontrados na Antártica se apresenta na forma anamórfica (estágio assexuado), o que pode implicar em ciclos de vida concluídos em intervalo de tempo mais curto, o que gera menos gastos metabólicos e,

consequentemente, economia de energia, a qual é fundamental para sobrevivência nas condições extremas da Antártica. Apesar disso, existem exceções, como espécies do gênero *Thelebolus*, que foram relatadas no estágio teleomorfo (sexuada) na Antártica (de Hoog *et al.*, 2004).

A distribuição de fungos na Antártica se relaciona com a distribuição de seus hospedeiros, como pássaros, invertebrados e a vegetação (Tosi *et al.*, 2002). Fungos já foram encontrados em rochas (Onofri *et al.*, 2000), solos (Arenz *et al.*, 2006; Godinho *et al.*, 2015), madeira introduzida de cabanas instaladas na região (Arenz *et al.*, 2006), gelo glacial e neve (de Menezes *et al.*, 2019b), *permafrost* (Zucconi *et al.*, 2012; da Silva *et al.*, 2020), sedimentos marinhos (Gonçalves *et al.*, 2013; Ogaki *et al.*, 2020a), líquens (Park *et al.*, 2015; Santiago *et al.*, 2015), plantas (Rosa *et al.*, 2009; Rosa *et al.*, 2010; Melo *et al.*, 2014; Santiago *et al.*, 2017), invertebrados (Simões *et al.*, 2019; Godinho *et al.*, 2019), entre outros. Espécies pertencentes aos filós *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Glomeromycota*, *Mucoromycota*, *Mortierellomycota* e *Chytridiomycota* já foram encontradas no continente (Bridge & Spooner, 2012; Rosa *et al.*, 2019a).

Segundo Kappen (1993), é possível que os micro-organismos antárticos apresentem uma combinação de mecanismos fisiológicos capazes de aumentar sua sobrevivência frente às condições extremas do ambiente, sugerindo capacidades adaptativas pré-existentes e que foram selecionados positivamente ao longo dos anos. Como exemplos desses mecanismos, já foram reportadas a produção de substâncias anticongelantes, capacidade de sobreviver à desidratação, alta tolerância ao frio e ao congelamento, tolerância à anóxia, alteração da composição lipídica da membrana, produção de pigmentos fotoprotetores e de enzimas adaptadas ao frio e presença de exopolissacarídeos capazes de evitar o congelamento celular (Robinson, 2001; Duarte *et al.*, 2018).

2.3. Comunidade de fungos presentes em lagos da Antártica

De acordo com Ellis-Evans (1996), os lagos da Península Antártica são rasos, transparentes, recebem elevada incidência de luz e de radiação ultravioleta, livres de gelo por apenas algumas semanas a cada ano, frios e apresentam baixa disponibilidade de nutrientes; todas essas características representam fatores limitantes à microbiota residente. A maioria dos lagos na superfície terrestre do continente antártico é formada quando o gelo recua e por depressões expostas no terreno, que podem ser formadas pela erosão glacial ou devido a dobras e depressões na topografia geológica (Hodgson, 2012).

Uma vez que os fungos são grandes decompositores, o principal papel funcional desses organismos nos ecossistemas de água continental é a quebra e a mineralização de matéria orgânica (Kuehn, 2016). Diversos autores já isolaram fungos presentes em diferentes lagos na Antártica, como na Ilha Deception (Stanley & Rose, 1967; Vaz *et al.*, 2011; Gonçalves *et al.*, 2012), Ilha Rei George (Vaz *et al.*, 2011; Gonçalves *et al.*, 2012, 2015), Ilha Signy (Willoughby, 1971; Ellis-Evans, 1985; McInnes, 2003), Vales Secos do McMurdo (Goto *et al.*, 1969; Knox & Paterson, 1973; Waguri *et al.*, 1975; Kriss *et al.*, 1976; Waguri, 1976; Nagashima *et al.*, 1990; Baublis *et al.*, 1991; de Hoog *et al.*, 2004; Brunati *et al.*, 2009; Rojas-Jimenez *et al.*, 2017; Connell *et al.*, 2018), Colinas Vestfold (de Hoog *et al.*, 2004; Brunati *et al.*, 2009), Colinas Larsemann (de Hoog *et al.*, 2004; Brunati *et al.*, 2009), Skarvsnes (Tsuji *et al.*, 2013a) e Estação Vostok (D’Elia *et al.*, 2009; Rogers *et al.*, 2013). Gonçalves *et al.* (2012) isolaram 128 fungos de água de lagos nas Ilhas Rei George e Deception e os gêneros mais frequentes foram *Pseudogymnoascus*, *Antarctomyces*, *Mortierella*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Phoma* e *Thelebolus*.

De acordo com Ogaki *et al.* (2019a, 2020b), as comunidades fúngicas dos lagos podem ter uma grande importância ecológica na Antártica, desempenhando papel importante na decomposição primária de materiais orgânicos, participando ativamente na ciclagem de nutrientes essenciais para o equilíbrio dos micro e macronutrientes nos sistemas lacustres, contribuindo para demonstrar os efeitos das mudanças climáticas globais e pela sua capacidade de produzir bioprodutos para novas aplicações biotecnológicas.

2.4. Enzimas produzidas por micro-organismos de ambientes frios e suas aplicações biotecnológicas

Enzimas são proteínas globulares complexas encontradas nas células dos seres vivos, as quais agem como bio-catalisadores que facilitam as reações metabólicas no corpo de um organismo (Kulshrestha *et al.*, 2013). Elas eram conhecidas pela humanidade desde o final do século XVII, onde se pensava que a digestão de carne em humanos ocorria usando secreções estomacais, e foram denominadas em 1878 por Wilhelm Kühne como referência à palavra grega “enzimas”, que se refere à fermentação do pão por leveduras (Kulshrestha *et al.*, 2013; Sayali *et al.*, 2013).

As enzimas participam de uma reação sem serem consumidas na mesma, atingindo uma alta taxa de formação de produto e, devido à sua natureza específica, elas podem diferenciar produtos químicos com estruturas semelhantes e catalisar reações em uma ampla

faixa de temperaturas (0-110 °C); em aplicações industriais, essas qualidades com uma enzima não tóxica e biodegradável podem resultar em produtos de alta qualidade e quantidade, menos subprodutos e procedimentos mais simples de purificação (Kulshrestha *et al.*, 2013).

Em geral, as enzimas biologicamente ativas podem ser obtidas de plantas, animais e micro-organismos; contudo, as enzimas microbianas têm sido geralmente mais estudadas por seu isolamento mais fácil em grandes quantidades, produção de baixo custo em pouco tempo, estabilidade em várias condições extremas, grande variedade de atividades catalíticas disponíveis, maiores rendimentos, possível facilidade de manipulação genética, fornecimento regular e rápido crescimento dos micro-organismos nos meios econômicos, produção relativamente mais conveniente e segura, e seus compostos são também mais controláveis e menos prejudiciais (Kasana & Gulati, 2011; Gopinath *et al.*, 2017). Além disso, por serem secretadas no meio externo, elas são mais confiáveis em processos e aplicações industriais (Gopinath *et al.*, 2017).

Os genomas fúngicos parecem ser uma fonte quase inesgotável para a descoberta de novas enzimas quando se considera quantas enzimas já foram encontradas, descritas e utilizadas, uma vez que abrangem apenas uma pequena parte do reino fúngico (Lange *et al.*, 2020). Entre um grande número de micro-organismos não patogênicos capazes de produzir enzimas úteis, os fungos filamentosos são particularmente interessantes devido ao seu fácil cultivo e alta produção de enzimas extracelulares de grande potencial industrial (Guimarães *et al.*, 2006). Embora algumas espécies individuais de fungos sejam capazes de produzir muitas enzimas diferentes, comunidades que compreendem diferentes fungos geralmente contribuem coletivamente para a decomposição de substratos físicos e quimicamente complexos, como folhas, troncos e frutos (Kjøller & Struwe, 1980; Kjøller & Struwe, 2002). As enzimas extracelulares degradativas mais importantes produzidas pelos fungos são as proteases, amilases, pectinases, celulases, ligninases e xilanases, embora enzimas como quitinases, cutinases, fitases e fosfatases também desempenhem um papel (Kjøller & Struwe, 2002).

Alguns gêneros fúngicos são conhecidos por apresentarem ótima produção enzimática, como por exemplo, *Phoma*, *Cladosporium*, *Cylindrocarpon*, *Verticillium*, *Mortierella*, *Aureobasidium*, *Epicoccum*, *Acremonium*, *Trichoderma*, *Aspergillus* e *Penicillium* (de Vries & Visser, 2001; Kjøller & Struwe, 2002). Alguns táxons de fungos com origem em ambientes frios e produtores de enzimas estão representados na **Tabela 1**.

Tabela 1. Fungos de ambientes frios e sua produção enzimática.

Enzimas	Espécies fúngicas	Referências
Celulase	<i>Cryptococcus gastricus</i> , <i>Holtermanniella wattica</i> , <i>Leuconeuospora</i> sp., <i>Mrakia blollopis</i> , <i>Mrakia gelida</i> , <i>Mrakia psychrophila</i> , <i>Mrakia robertii</i> , <i>Aureobasidium pullulans</i> , <i>Mortierella</i> sp., <i>Pseudogymnoascus pannorum</i> , <i>Mrakia frigida</i> , <i>Antarctomyces</i> sp., <i>Trichocladium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp., <i>Microdochium</i> sp., <i>Penicillium citrinum</i> , <i>Penicillium frequentans</i> , <i>Penicillium rugulosum</i> , <i>Phialophora</i> sp., <i>Pithomyces chartarum</i> e <i>Leucosporidiella fragaria</i>	Gawas-Sakhalkar & Singh (2011), Carrasco et al. (2012) e Krishnan et al. (2011)
Protease	<i>Cryptococcus</i> sp., <i>Leuconeuospora</i> sp., <i>Mrakia gelida</i> , <i>Sporidiobolus salmonicolor</i> , <i>Wickerhamomyces anomalus</i> , <i>Aureobasidium</i> sp., <i>Pseudogymnoascus pannorum</i> , <i>Mortierella alpine</i> , <i>Mrakia frigida</i> , <i>Thelebolus</i> sp., <i>Trichocladium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp., <i>Botrytis verrucosa</i> , <i>Aureobasidium pullulans</i> , <i>Penicillium citrinum</i> e <i>Penicillium rugulosum</i>	Gawas-Sakhalkar & Singh (2011), Krishnan et al. (2011) e Carrasco et al. (2012)
Lipase	<i>Cryptococcus gilvescens</i> , <i>Leucosporidiella fragaria</i> , <i>Leucosporidiella creatinivora</i> , <i>Mrakia gélida</i> , <i>Mrakia robertii</i> , <i>Metschnikowia</i> sp., <i>Rhodotorula glacialis</i> , <i>Cystobasidium laryngis</i> , <i>Geomyces</i> sp., <i>Leucosporidium scottii</i> , <i>Mrakia blollopis</i> , <i>Penicillium expansum</i> e <i>Penicillium allii</i>	Bradner et al. (2003), Carrasco et al. (2012), Florczak et al. (2013), Mohammed et al. (2013), Tsuji et al. (2013b) e Duarte et al. (2015)
Agarase	<i>Penicillium chrysogenum</i> , <i>Beauveria bassiana</i> , <i>Cladosporium</i> sp., <i>Pseudogymnoascus</i> sp. e <i>Doratomyces</i> sp.	Furbino et al. (2018)
Carragenase	<i>Penicillium chrysogenum</i> , <i>Beauveria bassiana</i> , <i>Cladosporium</i> sp., <i>Pseudogymnoascus</i> sp. e <i>Doratomyces</i> sp.	Furbino et al. (2018)
Invertase	<i>Glaciozyma antarctica</i> , <i>Vishniacozyma victoriae</i> , <i>Cryptococcus gilvescens</i> , <i>Hyphozyma</i> sp., <i>Mrakia gélida</i> , <i>Leucosporidium</i> sp., <i>Kriegeria</i> sp., <i>Cystobasidium</i> sp., <i>Sporobolomyces roseus</i> , <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> , <i>Fellozyma</i> sp., <i>Sporidiobolus metaroseus</i> e <i>Sporidiobolus salmonicolor</i>	Turkiewicz et al. (2005), Barahona et al. (2016) e Troncoso et al. (2017)
Amilase	<i>Cryptococcus gastricus</i> , <i>Holtermanniella wattica</i> , <i>Leuconeuospora</i> sp., <i>Mrakia blollopis</i> , <i>Mrakia gelida</i> , <i>Mrakia robertii</i> , <i>Rhodotorula glacialis</i> , <i>Aureobasidium</i> sp., <i>Pseudogymnoascus pannorum</i> , <i>Trichocladium</i> sp.,	Gawas-Sakhalkar & Singh (2011), Krishnan et al. (2011) e Carrasco et al. (2012)

	<i>Penicillium citrinum</i> e <i>Pithomyces chartarum</i>	
Esterase	<i>Glaciozyma Antarctica</i> , <i>Leucosporidiella creatinivora</i> , <i>Leucosporidiella fragaria</i> , <i>Mrakia blollopis</i> , <i>Mrakia psychrophila</i> , <i>Rhodotorula glacialis</i> , <i>Hyphozyma</i> sp., <i>Leucosporidium</i> sp., <i>Cystobasidium larynges</i> , <i>Sporobolomyces roseus</i> , <i>Vishniacozyma victoriae</i> , <i>Holtermanniella</i> sp., <i>Botrytis verrucosa</i> , <i>Cladosporium cladosporioides</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Pseudogymnoascus pannorum</i> , <i>Microdochium</i> sp., <i>Penicillium citrinum</i> , <i>Penicillium frequentans</i> e <i>Phialophora</i> sp.	Gawas-Sakhalkar & Singh (2011), Carrasco et al. (2012), Martorell et al. (2017) e Troncoso et al. (2017)
Pectinase	<i>Dioszegia fristingensis</i> , <i>Leucosporidiella fragaria</i> , <i>Mrakia psychrophila</i> , <i>Mrakia robertii</i> , <i>Metschnikowia</i> sp., <i>Rhodotorula glacialis</i> , <i>Cystobasidium laryngis</i> , <i>Cryptococcus gilvescens</i> , <i>Mrakia gélida</i> , <i>Leucosporidium</i> sp., <i>Kriegeria</i> sp., <i>Fellozyma</i> sp., <i>Geomyces</i> sp., <i>Pseudogymnoascus</i> sp., <i>Cladosporium</i> sp., <i>Acremonium</i> sp., <i>Penicillium polonicum</i> , <i>Cryptococcus cylindricus</i> , <i>Cystofiliobasidium lari-marini</i> , <i>Cystofiliobasidium capitatum</i> , <i>Rhodotorula psychrophenolica</i> , <i>Mrakia frigida</i> , <i>Aureobasidium pullulans</i> e <i>Mortierella simplex</i>	Alimardani-Theuil et al. (2011), Gawas-Sakhalkar & Singh (2011), Carrasco et al. (2012), Troncoso et al. (2017) e Poveda et al. (2018)
Inulinase	<i>Candida glabosa</i> , <i>Candida davisiana</i> , <i>Cryptococcus gastricus</i> , <i>Cryptococcus tephrensis</i> , <i>Vishniacozyma victoriae</i> , <i>Guehomyces pullulans</i> , <i>Leucosporidiella fragaria</i> e <i>Metschnikowia australis</i>	Martinez et al. (2016)
Gelatinase	<i>Trichosporon pullulans</i> , <i>Pseudogymnoascus pannorum</i> , <i>Mrakia gelida</i> , <i>Kriegeria</i> sp., <i>Cystobasidium laryngis</i> , <i>Sporobolomyces roseus</i> , <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> , <i>Fellozyma</i> sp., <i>Cryptococcus</i> sp. e <i>Sporidiobolus salmonicolor</i>	Loperena et al. (2012), Barahona et al. (2016) e Troncoso et al. (2017)

Considerando que mais de 80% da Terra é permanente ou periodicamente exposta a temperaturas abaixo de 5 °C (mares profundos, desertos frios e habitats glaciais) e que cerca de 10% da sua superfície é representada por habitats glaciais, os micro-organismos possuem estratégias de adaptação para superar a influência direta e indireta do risco de vida em baixas temperaturas (Cavicchioli & Tortsen, 2000; Margesin *et al.*, 2007a; Margesin *et al.*, 2007b; Margesin & Miteva, 2011; Buzzini *et al.*, 2012). Os micro-organismos que colonizaram os ambientes frios são referidos como psicrófilos e, por isso, considerados extremófilos, pois são adaptados não apenas a temperaturas baixas, mas frequentemente também a outras restrições ambientais como forte radiação UV e baixa disponibilidade de água e de nutrientes, sendo sua temperatura ótima de sobrevivência e reprodução 15 °C e máxima de 20 °C (Feller & Gerday, 2003; Ibrar *et al.*, 2020).

Os ambientes psicrófilos, com alta radiação UV e ciclos de congelamento e descongelamento, têm efeito direto na integridade estrutural e no genoma de fungos, os quais têm mecanismo específico para sobreviver nesses ambientes (Ibrar *et al.*, 2020). A síntese de enzimas psicrófilas é uma das estratégias de adaptação mais investigadas a baixas temperaturas; e o aumento de sua atividade a baixas temperaturas é baseado em sua flexibilidade estrutural aprimorada, incluindo uma possível modificação do sítio ativo (Gerday *et al.*, 1997; Feller & Gerday, 2003; Buzzini *et al.*, 2012). O metabolismo enzimático dos psicrófilos apresenta características marcantes, uma vez que lidam com um ambiente severo (Martorell *et al.*, 2019a), o que os torna extremamente relevantes no ramo científico e em processos industriais (Cavicchioli *et al.*, 2011). Com relação a este último, as vantagens mais notáveis dessas enzimas são a redução nos custos de energia durante sua produção tecnológica (não exigiria o aquecimento caro dos reatores) por apresentarem atividades catalíticas mais altas e adaptações estruturais que garantem uma estrutura mais flexível do que as encontradas em mesófilos e termófilos (Siddiqui & Cavicchioli, 2006; Javed & Qazi, 2016). Segundo Sarmiento *et al.* (2015), as seguintes características são importantes adaptações para manter alta flexibilidade enzimática e atividade a baixas temperaturas:

- Diminuição da hidrofobicidade do núcleo;
- Aumento da hidrofobicidade da superfície;
- Mudanças nas composições de aminoácidos;
- Interações mais fracas entre proteínas;
- Diminuição das estruturas secundárias e oligomerização (complexos proteicos formados a partir da ligação de duas ou mais cadeias peptídicas).

As enzimas ativas a baixas temperaturas podem ser utilizadas na indústria de alimentos como, por exemplo, na redução da lactose, melhor extração do suco da fruta, amaciamento da carne, fermentação, produção de cerveja e vinho, fabricação de queijos (Gerday *et al.*, 2000; Hoyoux *et al.*, 2001; Javed & Qazi, 2016), indústria têxtil para o biopolimento de tecidos e lavagem de jeans (Gerday *et al.*, 2000), produção de detergentes (Javed & Qazi, 2016), indústria de papel (Javed & Qazi, 2016), indústria farmacêutica (Novak *et al.*, 2013), aplicação ambiental em biorremediação (Margesin, 2007) e produção de cosméticos (Javed & Qazi, 2016), entre outros.

2.4.1. Celulases

A celulose é o recurso biológico natural renovável mais abundante produzido na biosfera (Zhang *et al.*, 2006). Em ambientes naturais, sua degradação é realizada principalmente por celulases produzidas por diversas bactérias e fungos (Singh & Hayashi, 1995; Gaudin *et al.*, 2000; Garsoux *et al.*, 2004; Grant *et al.*, 2004; Kasana & Gulati, 2011). As celulases (EC 3.2.1.4) são enzimas hidrolíticas que catalisam a hidrólise total da celulose em açúcares e são produzidas por vários grupos de micro-organismos; no entanto, os psicrófilicos são os candidatos ideais para a produção de enzimas ativas a baixas temperaturas e estáveis em condições alcalinas, na presença de oxidantes e detergentes, que são muito procurados como aditivos na indústria têxtil (Kasana & Gulati, 2011). Além disso, as celulases são utilizadas nas indústrias de papel; de alimentos; na agricultura e na fermentação (Kirk *et al.*, 2002; Cherry & Fidantsef, 2003; Kuhad *et al.*, 2011).

Os fungos são responsáveis por 80% da quebra de celulose na Terra, sendo os mais eficientes representados por espécies dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Chaetomium*, *Trichoderma*, *Fusarium*, *Stachybotrys*, *Cladosporium*, *Alternaria*, *Acremonium*, *Ceratocystis*, *Myrothecium*, *Humicola*, entre outros (Wood *et al.*, 1985; Mehrotra & Aneja, 1990; Moore-Landecker *et al.*, 1996; Sajith *et al.*, 2016). A maioria das celulases comerciais é produzida por espécies dos gêneros *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Penicillium* e *Sclerotium* (Cherry & Fidantsef, 2003; Zhang *et al.*, 2006; Sajith *et al.*, 2016).

2.4.2. Proteases

As proteases (EC 3.4.x.x) são enzimas que conduzem a proteólise, ou seja, iniciam o catabolismo da proteína por hidrólise das ligações peptídicas que ligam aminoácidos na cadeia polipeptídica que forma a proteína (Sawant & Nagendran, 2014). Elas catalisam a hidrólise de proteínas em peptídeos e aminoácidos menores para posterior absorção nas células, constituindo uma etapa muito importante no metabolismo do nitrogênio (Sabotič & Kos, 2012). São as principais

enzimas produzidas a partir de fontes microbianas (Pant *et al.*, 2015) e representam cerca de 60% do total de vendas de enzimas no mundo (Zambare *et al.*, 2011).

Essas enzimas são utilizadas nas indústrias de detergentes, do couro, de alimentos, farmacêutica, no bioprocessamento de filmes de raio-X usados para recuperação de prata, no gerenciamento de resíduos de indústrias de processamento de alimentos, na pesquisa básica (sequenciamento de proteínas) e na medicina associadas ao desenvolvimento de agentes antineoplásicos, anti-inflamatórios, antimicrobianos e dissolventes de coágulos (Rao *et al.*, 1998; Kumar & Takagi, 1999; Sabotič & Kos, 2012; Srilakshmi *et al.*, 2015).

Os fungos têm sido amplamente utilizados para a produção de proteases e as espécies que mais se destacam pertencem aos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Humicola*, *Thermoascus*, *Thermomyces*, entre outros (Souza *et al.*, 2015). Vários fungos de mar profundo são capazes de produzir protease psicrófila, incluindo *Aspergillus terreus*, *Beauveria brigiartii* e *Acremonium butyri* (Srilakshmi *et al.*, 2015).

2.4.3. Gelatinases

As gelatinases (EC 3.4.24.x) fazem parte do diverso grupo de proteases, sendo metaloendopeptidases extracelulares ou metaloproteínases que são capazes de hidrolisar a gelatina e outros compostos como feromônio, colágeno, caseína e fibrinogênio (Mäkinen *et al.*, 1989; Mäkinen & Mäkinen, 1994; Balan *et al.*, 2012). Elas são metaloproteases importantes e são amplamente utilizadas não apenas nas indústrias químicas e médicas, mas também em alimentos e ciências biológicas básicas (Hisano *et al.*, 1989; Balan *et al.*, 2012). A gelatinase produzida pelo micro-organismo hidrolisa a gelatina em seus subcompostos (polipeptídeos, peptídeos e aminoácidos) que podem atravessar a membrana celular e serem utilizados pelo organismo (Balan *et al.*, 2012).

Sua produção já foi relatada em alguns fungos, como *Acremonium strictum*, *Aspergillus clavatus*, *Aspergillus flavipes*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus versicolor*, *Cunninghamella echinulata*, *Cunninghamella verticillata*, *Curvularia lunata*, *Fusarium oxysporum*, *Geotrichum candidum*, *Mucor racemosus*, *Paecilomyces variotii*, *Penicillium funiculosum*, *Penicillium oxalicum*, *Rhizomucor miehei*, *Syncephalastrum racemosum*, *Trichoderma viride*, *Trichothecium roseum*, *Ceriosporopsis halima*, *Corollospora integra*, *Culcitalna achraspora*, *Halosphaeria mediosetigera*, *Humicola alopallonella*, *Lulworthia floridana*, *Orbimyces spectabili*, *Torpedospora radiata*, *Zalerion raptor* e *Zalerion xylestrix* (Pisano *et al.*, 1964; Gopinath *et al.*, 2005).

2.4.4. Agarases

Os ágaros constituem uma família de polissacarídeos complexos encontrados nas paredes celulares de algumas algas vermelhas (classe *Rhodophyceae*) (McCandless, 1981; Chi *et al.*, 2012). No Japão, o ágar tem sido usado como alimento há várias centenas de anos, o que se estendeu a outros países, sendo um aditivo alimentar “geralmente reconhecido como seguro” (GRAS), utilizado em esmaltes, queijo processado, doces de geleia e marshmallows (Fu & Kim, 2010). Atualmente, devido às suas características estabilizadoras e gelificantes, ele apresenta uma grande variedade de usos (Armisen & Gaiatas, 2009; Fu & Kim, 2010). O ágar tem sido utilizado principalmente em meios microbiológicos, uma vez que não é fácil para os micro-organismos o metabolizarem, além de formar géis transparentes, estáveis e firmes (Fu & Kim, 2010). As agarases (EC 3.2.1.x) são enzimas que catalisam a hidrólise do ágar e são classificadas em α -agarase e β -agarase de acordo com o padrão de clivagem (Fu & Kim, 2010).

A maioria dos estudos sobre a caracterização da agarase se concentrou em espécies bacterianas, e poucos estudos caracterizaram os fungos como produtores dessa enzima (Furbino *et al.*, 2018). Até o momento, poucos fungos foram relatados por produzirem agarases, como *Cladosporium* sp., *Phoma lingam*, *Hypocreaceae* sp., *Dendryphiella arenaria*, *Penicillium chrysogenum*, *Pseudogymnoascus* sp., *Penicillium* sp., *Doratomyces* sp. e *Beauveria bassiana* (Solis *et al.*, 2010; Kawaroe *et al.*, 2015; Furbino *et al.*, 2018; Fawzy *et al.*, 2018). Considerando que os ágaros são uns dos principais componentes da parede celular das algas vermelhas, os fungos agarolíticos podem ter um importante papel ecológico como agentes para decompor a biomassa de algas no ambiente marinho da Antártica (Craigie, 1990; Furbino *et al.*, 2018).

2.4.5. Carragenases

As carrageninas são polissacarídeos lineares sulfatados que constituem o componente essencial da matriz extracelular de algas vermelhas (classe *Rhodophyceae*), como em espécies dos gêneros *Eucheuma*, *Gracilaria*, *Gigartina*, *Hypnea* e *Chondrus* (Campo *et al.*, 2009; Zhu *et al.*, 2018). Elas têm sido amplamente aplicadas nas indústrias de alimentos, bebidas e cosméticos como agentes espessantes, clarificantes e gelificantes devido às suas excelentes propriedades, como capacidade de formação de gel, estabilidade química e várias atividades fisiológicas (Aliste *et al.*, 2000; Yu *et al.*, 2002; Bonnaud *et al.*, 2010; Zhu *et al.*, 2018). As carragenases (endohidrolases) (EC 3.2.1.x) degradam a carragenina e são agrupadas em três categorias: j-carragenase, i-carragenase e k-carragenase, com base em suas especificidades de substrato e sequências primárias (Chauhan & Saxena, 2016; Zhu *et al.*, 2018). Segundo Zhu *et al.* (2018), todas as carragenases

caracterizadas até o momento foram isoladas e purificadas do meio marinho, principalmente a partir de bactérias e animais que vivem nesse ambiente.

Assim como relatado para a enzima agarase, a maioria dos estudos sobre a caracterização da carragenase se concentrou em espécies bacterianas, e poucos estudos caracterizaram os fungos como produtores dessa enzima (Chauhan & Saxena, 2016; Furbino *et al.*, 2018). Dessa forma, poucos fungos foram relatados por produzirem carragenases até o momento, como *Cladosporium* sp., *Phoma* sp., *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus terreus*, *Penicillium chrysogenum*, *Pseudogymnoascus* sp., *Penicillium* sp., *Doratomyces* sp. e *Beauveria bassiana* (Solis *et al.*, 2010; Furbino *et al.*, 2018).

2.4.6. Lipases

As lipases (E.C. 3.1.1.3) são uma classe de hidrolases que catalisam a hidrólise de triglicerídeos em glicerol e ácidos graxos livres em uma interface óleo-água, sendo solúveis em água e desempenhando um papel fundamental no metabolismo e na digestão da gordura (Reis *et al.*, 2009; Treichel *et al.*, 2010). Elas são enzimas ubíquas encontradas na maioria dos microorganismos, vegetais e animais (Reis *et al.*, 2009). São utilizadas nas indústrias têxtil, do papel, de detergentes, alimentícia, farmacêutica, na produção de chá preto, no desengorduramento do couro e em processos de panificação (Kirk *et al.*, 2002; Singh & Mukhopadhyay, 2012).

Alguns dos fungos produtores de lipase mais importantes comercialmente são reconhecidos como pertencentes aos gêneros *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Geotrichum*, *Mucor*, *Humicola*, *Ashbya*, *Beauveria*, *Fusarium*, *Acremonium*, *Alternaria*, *Eurotrium*, *Ophiostoma* e *Rhizomucor* (Treichel *et al.*, 2010; Singh & Mukhopadhyay, 2012). Com relação às leveduras, a produção dessa enzima já foi relatada em espécies dos gêneros *Candida* (incluindo *Candida antarctica*), *Yarrowia*, *Rhodotorula*, *Pichia*, *Saccharomycopsis*, *Torulasporea*, *Trichosporon*, *Aureobasidium*, *Saccharomyces* e *Williopsis* (Treichel *et al.*, 2010). A produção de lipases ativas em baixas temperaturas já foi relatada nas espécies *Aspergillus nidulans*, *Candida antarctica*, *Candida lipolytica*, *Geotrichum candidum*, *Rhizopus* sp., *Mucor* sp. e *Penicillium roqueforti* (Joseph *et al.*, 2007).

2.4.7. Invertases

Invertases (EC.3.2.1.26) são hidrolases glicosídicas que catalisam a clivagem de sacarose em dois monossacarídeos: glicose e frutose (Nadeem *et al.*, 2015). Ela é amplamente distribuída na biosfera, sendo encontrada em plantas, animais, fungos filamentosos, leveduras e bactérias, sendo

sintetizada pelas abelhas para produzir mel a partir de néctar. (Kulshrestha *et al.*, 2013; Nadeem *et al.*, 2015). Essa enzima é usada principalmente na indústria de alimentos, onde a frutose é preferida à sacarose, porque é mais doce e não cristaliza facilmente (Aranda *et al.*, 2006). Segundo Nadeem *et al.* (2015), a invertase não é apenas essencial na digestão, mas também é importante para a prevenção de doenças humanas, processos antienvhecimento e rejuvenescimento físico.

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é a principal linhagem utilizada para a produção comercial de invertase, mas *Candida utilis* e *Aspergillus niger* também são consideradas ideais (Romero-Gómez *et al.*, 2000; Silveira *et al.*, 2000; Tanaka *et al.*, 2000; Sikander, 2007; Venkateshwar *et al.*, 2009; Uma *et al.*, 2010; Kulshrestha *et al.*, 2013). Além dessas espécies, outras já foram relatadas por produzirem tal enzima, como *Aspergillus flavus*, *Aspergillus wentii*, *Aspergillus ochraceus*, *Trichotecium roseum*, *Trichoderma viride*, *Penicillium aurantiogriseum*, *Penicillium echinulatum*, *Rhizopus stolonifer*, *Cladosporium sphaerospermum* e *Verticillium tenerum* (Matei *et al.*, 2017).

2.4.8. Amilases

O amido é a principal reserva de polissacarídeos produzidos pelas plantas e é considerada a terceira fonte de biomassa na terra, depois de lignoceluloses e quitinas (Choubane *et al.*, 2015). As amilases (EC 3.2.1.x) realizam a quebra do amido em açúcar e são muito conhecidas por estarem presentes na saliva humana, onde iniciam o processo químico da digestão (Saranraj & Stella, 2013). Elas representam aproximadamente 25% do mercado mundial de enzimas e podem ser utilizadas na indústria de detergentes, na panificação, na produção de bebidas, na indústria farmacêutica, na indústria de processamento de amido para a produção de glicose e frutose, na indústria do álcool, uma vez que os açúcares fermentáveis são produzidos pela conversão de amidos com a ajuda das amilases, na indústria têxtil, na indústria do papel e na indústria alimentícia (Kirk *et al.*, 2002; Saranraj & Stella, 2013; Paul, 2016; Gopinath *et al.*, 2017).

As espécies fúngicas mais eficientes produtoras de amilase incluem *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus kawachii*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium brunneum*, *Penicillium fellutanum*, *Penicillium expansum*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium roqueforti*, *Penicillium janthinellum*, *Penicillium camemberti*, *Penicillium olsonii*, *Streptomyces rimosus*, *Thermomyces lanuginosus*, *Pycnopus sanguineus*, *Saccharomyces kluyveri*, *Mucor* sp. e *Cryptococcus flavus* (Gupta *et al.*, 2003; Souza, 2010; Hussain *et al.*, 2013; Sundarram & Murthy, 2014; Gopinath *et al.*, 2017).

2.4.9. Esterases

As esterases (EC 3.1.1.x) são hidrolases lipolíticas que catalisam a hidrólise e a formação de ligações éster (Sayali *et al.*, 2013). Elas desempenham um papel importante na degradação de materiais naturais e poluentes industriais, como resíduos de cereais, plásticos e outros produtos químicos tóxicos (Kohli & Gupta, 2016). Essas enzimas podem ser utilizadas nas indústrias farmacêuticas, na agricultura, na indústria alimentícia e na indústria de bebidas alcoólicas (Shen *et al.*, 2002; Panda & Gowrishankar, 2005; Bhardwaj *et al.*, 2012; Sayali *et al.*, 2013; Kohli & Gupta, 2016). As esterases de origem extremofílica são enzimas robustas, funcionais sob as duras condições dos processos industriais devido à sua termoestabilidade inerente e resistência a solventes orgânicos, o que as tornam biocatalisadores muito atraentes para uma variedade de aplicações industriais (López-López *et al.*, 2014).

Essas enzimas são amplamente distribuídas em animais, plantas e micro-organismos, mas as fontes microbianas são consideradas proeminentes na sua produção, sendo elas: bactérias (incluindo actinobactérias), fungos filamentosos e leveduras (Kohli & Gupta, 2016). Alguns fungos foram relatados pela sua produção, como *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus awamori*, *Pichia pastoris*, *Trichoderma reesei*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Piromyces equi*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium funiculosum*, *Ophiostoma piceae*, *Trichosporon brassicae*, *Bjerkandera adusta*, *Botrytis cinerea*, *Chaetomium globosum*, *Cladosporium fulvum*, *Cryptococcus neoformans* var *neoformans*, *Dichomitus squalens*, *Fomitiporia mediterranea*, *Laccaria bicolor*, *Mycosphaerella graminicola*, entre outros (Poutanen *et al.*, 1990; Tenkanen *et al.*, 1995; Koseki *et al.*, 1997; Christakopoulos *et al.*, 1998; de Vries & Visser, 1999; Fillingham *et al.*, 1999; Kroon *et al.*, 2000; Giuliani *et al.*, 2001; Juge *et al.*, 2001; Asther *et al.*, 2002; Calero-Rueda *et al.*, 2002; Shen *et al.*, 2002; Lomolino *et al.*, 2003).

2.4.10. Pectinases

A pectina é uma mistura complexa de polissacarídeos que compõe cerca de um terço da substância seca da parede celular de plantas superiores e apresenta usos farmacêuticos promissores, sendo atualmente considerado um material transportador em sistemas de administração de medicamentos específicos do cólon, para ação sistêmica ou tratamento tópico de doenças como colite ulcerativa, doença de Crohn e carcinomas do cólon (Sriamornsak, 2003). As pectinases (EC 3.2.1.15, EC 4.2.2.x ou EC 3.1.1.11) são um grupo heterogêneo de enzimas relacionadas que hidrolisam as substâncias da pectina (Sharma *et al.*, 2013). Elas são comumente utilizadas em processos que envolvem a degradação de materiais vegetais, como acelerar a extração de suco de frutas, incluindo maçãs e sapota, sendo também utilizadas na produção de vinho desde a década de

1960 (Semenova *et al.*, 2006; Sharma *et al.*, 2013). Essas enzimas podem ser utilizadas na indústria têxtil, na fermentação do café, na fabricação de chá, na alimentação animal e na purificação de vírus de plantas (as enzimas são utilizadas para liberar o vírus dos tecidos) (Sørensen *et al.*, 2000; Jayani *et al.*, 2005; Sharma *et al.*, 2013).

Quase todas as preparações comerciais de pectinases são produzidas a partir de fungos, sendo que a espécie *Aspergillus niger* é normalmente a mais utilizada (Jayani *et al.*, 2005). Essas enzimas já foram relatadas em fungos como *Rhodotorula* sp., *Phytophthora infestans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces bayanus*, *Saccharomyces chevalieri*, *Saccharomyces paradoxus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium frequentans*, *Aspergillus japonicus*, *Pichia angusta*, *Candida krusei*, *Candida norvengensis*, *Debaryomyces hansenii*, *Debaryomyces nepalensis*, *Cryptococcus cylindricus*, *Cryptococcus aquaticus*, *Cryptococcus liquefaciens*, *Cryptococcus macerans*, *Cystofilobasidium lari-marini*, *Cystofilobasidium capitatum*, *Mrakia frigida*, *Kluyveromyces fragilis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Kluyveromyces wickerhamii*, entre outros (Förster, 1988; Gainvors *et al.*, 1994; Maldonado *et al.*, 1994; Maldonado & Saad, 1998; Kawano *et al.*, 1999; Semenova *et al.*, 2003; Libkind *et al.*, 2004; Alimardani-Theuil *et al.*, 2011).

2.4.11. Inulinases

A inulina é um polímero linear de planta, que é composto de unidades de monômero de frutose unidas umas às outras por ligações glicosídicas e que possui uma fração de glicose; depois do amido, é o segundo polissacarídeo vegetal mais abundante encontrado na natureza (Singh & Singh, 2017). Ainda segundo Singh & Singh (2017), as inulinases (EC 3.2.1.x) são enzimas hidrolíticas que pertencem à família das hidrolases glicosídicas e que, com base em sua ação hidrolítica na inulina, produz frutose ou frutooligossacarídeos como principais produtos. Elas podem ser utilizadas nas indústrias alimentícia, farmacêutica, na produção de bebidas, na produção de etanol e na produção de oligofrutos (frutooligossacarídeos e inulooligossacarídeos), que são considerados prebióticos (López-Molina *et al.*, 2005; Rocha *et al.*, 2006; Chi *et al.*, 2009).

Alguns fungos já foram relatados pela produção de inulinases, como *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus niger*, *Cladosporium cladosporioides*, *Cryptococcus aureus*, *Kluyveromyces bulgaricus*, *Kluyveromyces fragilis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Penicillium citrinum*, *Penicillium expansum*, *Penicillium subrubescens*, *Rhodotorula glutinis*, *Ulocladium atrum*, *Zygosaccharomyces bailii* (Byun & Nahm, 1978; Derycke & Vandamme, 1984; Parekh & Margaritis, 1985; Ferreira *et al.*, 1991; Öngen-Baysal *et al.*, 1994; Nakamura *et al.*, 1995; Kalil *et al.*, 2001; Vranešić *et al.*, 2002; Prabhakar *et al.*, 2004; Sheng *et al.*, 2007; Saber & El-Naggar, 2009; AbdAl-Aziz *et al.*, 2012; Fernandes *et al.*, 2012; Flores-Gallegos *et al.*, 2012; Lafuente-

Castaneda *et al.*, 2012; Mansouri *et al.*, 2013; Paixão *et al.*, 2013; El-souod *et al.*, 2014; Tasar *et al.*, 2015; Ali & Shahzadi, 2015).

2.5. Biossurfactantes e sua produção por micro-organismos extremófilos

Os biossurfactantes são, em sua maioria, uma classe de metabólitos que podem ser tanto primários quanto secundários e compreendem um grupo de moléculas anfipáticas (possuem porção hidrofílica e hidrofóbica) com estruturas distintas e sintetizadas por diferentes organismos (Sperb *et al.*, 2015). Eles também são conhecidos como substâncias tensoativas (que influenciam a superfície de contato entre dois líquidos) estrutural e funcionalmente diversos, os quais reduzem a tensão superficial e interfacial entre as moléculas individuais nas respectivas superfícies e interfaces entre dois fluidos que não se misturam como, por exemplo, óleo/água (Bhardwaj *et al.*, 2013; Varjani & Upasani, 2017). Os biossurfactantes são representados pelos glicolipídeos, lipossacarídeos, fosfolipídeos, ácidos graxos, lipídeos neutros, lipopeptídeos e alguns polímeros como resultado de sua atividade surfactante com capacidade de interagir com moléculas polares (como a água) e apolares (gorduras); por isso, são importantes para o setor industrial em processos de detergência, emulsificação, lubrificação, capacidade de formação de espuma, capacidade de umectação (hidratação) e solubilização de substâncias apolares (Silva *et al.*, 2021).

Embora altamente eficazes em muitas aplicações industriais e de remediação ambiental, os surfactantes sintéticos tendem a ser tóxicos e podem representar riscos ambientais e atividade biocida (Edwards *et al.*, 2003). Além disso, os surfactantes sintéticos têm baixa biodegradabilidade e podem solubilizar xenobióticos hidrofóbicos (substâncias químicas poluentes), afetando a qualidade da água potável em lagoas e riachos (Haigh, 1996; Palmer & Hatley, 2018). Já os surfactantes naturais (biossurfactantes), produzidos principalmente por micro-organismos, representam uma alternativa atraente em relação aos surfactantes convencionais sintéticos e veem sendo considerados uma tecnologia alternativa chave a ser desenvolvida no século XXI (Rahman & Gakpe, 2008; Marchant & Banat, 2012; Cheok *et al.*, 2014; Santos *et al.*, 2016). Os biossurfactantes possuem várias vantagens em relação aos seus similares sintéticos, incluindo maior biodegradabilidade, baixa toxicidade, propriedades de alta formação de espuma, produção sustentável e alta estabilidade em níveis extremos de pH, temperaturas e salinidade (Pacwa-Plociniczak *et al.*, 2011; Vijayakumar & Saravanan, 2015; Santos *et al.*, 2016; Akbari *et al.*, 2018; Khademolhosseini *et al.*, 2019).

Os fungos produzem uma boa quantidade de biossurfactantes, quando comparados às bactérias, e o motivo pode ser a presença de uma parede celular rígida (Bhardwaj *et al.*, 2013).

Entre os fungos, *Candida bombicola*, *Candida lipolytica*, *Candida ishiwadae*, *Candida batistae*, *Aspergillus ustus*, *Ustilago maydis* e *Trichosporon ashii* têm ganhado destaque por serem capazes de produzir principalmente biossurfactantes soforolipídios (glicolipídios) (Bhardwaj *et al.*, 2013). Atualmente, um dos micro-organismos produtores de biossurfactantes mais valiosos no mercado é a levedura *Moesziomyces antarcticus* (anteriormente conhecido como *Candida antarctica*), a qual foi originalmente isolada do Lago Vanda no Vale Wright, Antártica (Goto *et al.*, 1969). Além dessa levedura, espécies do gênero *Rhodotorula* são altamente representadas em ambientes polares e glaciais (por exemplo, *R. arctica*, *R. glacialis*, *R. psychrophenolica*, *R. psychrophila* e *R. mucilaginoso*) e são conhecidas por serem hiperprodutoras de biossurfactantes soforolipídeos (Perfumo *et al.*, 2018).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos Gerais

Caracterizar a diversidade de fungos presentes em lagos da Antártica e avaliar seu potencial como produtores de enzimas e biossurfactantes de interesse industrial.

3.2. Objetivos Específicos

- Isolar fungos a partir de amostras de iscas de barbante e biofilme de dois lagos antárticos;
- Identificar os fungos cultiváveis por meio de técnicas de taxonomia polifásica (técnicas de biologia molecular, morfológicas e fisiológicas);
- Preservar os fungos obtidos para preservação da biodiversidade ex situ na Coleção de Micro-organismos e Células da UFMG;
- Caracterizar as comunidades de fungos não cultiváveis de iscas depositadas em lagos da Ilha Deception e da Ilha Rei George;
- Determinar, por meio de índices ecológicos, a diversidade das comunidades fúngicas encontradas;
- Avaliar a capacidade dos fungos obtidos em produzir diferentes enzimas hidrolíticas e biossurfactantes de interesse industrial.

4. MATERIAIS E METODOLOGIA

4.1. Localização dos lagos e obtenção das amostras

As amostras de barbante e biofilme foram obtidas em lagos presentes nas ilhas Rei George e Deception, respectivamente, localizadas no Arquipélago de Shetlands do Sul, Antártica durante o verão austral de 2018 (**Figura 1**). Em relação à Ilha Rei George, os lagos são pequenos e rasos, localizados em depressões formadas por deglaciação, apesar de lagos grandes e profundos também existirem (Shevnina & Kourzeneva, 2017). O Kroner Lake, localizado na Ilha Deception, é um lago com intrusão de água marinha, que apresenta uma vasta heterogeneidade ambiental e biológica devido à sua conexão com o mar (Izaguirre *et al.*, 2006). Ele ocupa uma depressão circular e rasa em uma planície de lava, onde a atividade de fumarolas lhe fornece calor (Priddle & Heywood, 1980).

Com relação aos ambientes marinhos, considerando que o Kroner Lake recebe influência do *spray* marinho (Izaguirre *et al.*, 2006), os biofilmes neles presentes são comunidades microbianas complexas que preenchem nichos funcionais distintos (Webster & Negri, 2006). Os microorganismos presentes nos biofilmes são capazes de se auto-organizar estruturalmente em resposta às condições externas e às atividades dos vários membros do biofilme (Tolker-Nielsen & Molin, 2000).

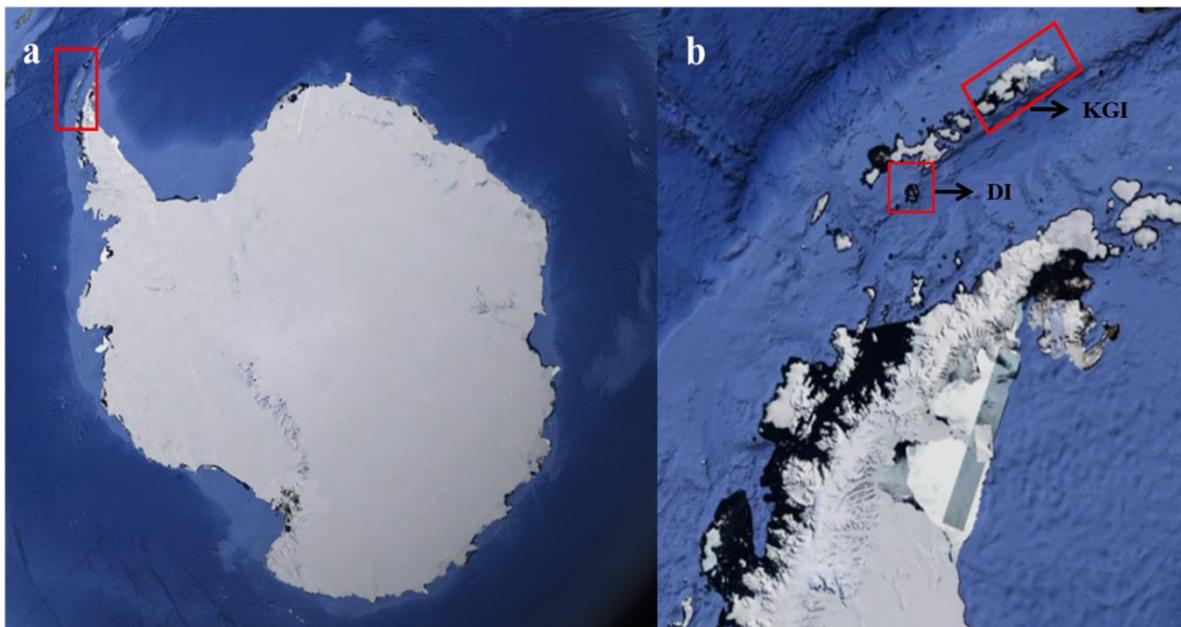


Figura 1. Imagens de satélite com a localização das Ilhas Rei George e Deception no Arquipélago de Shetlands do Sul, Antártica. (a) Continente Antártico com a Península Antártica destacada pelo retângulo vermelho e (b) Península Antártica com as Ilhas Rei George (KGI) e Deception (DI) destacadas pelo retângulo vermelho. Fonte: Google Earth Pro, 2019.

4.1.1. Iscas de barbante para captura dos fungos

Sacos de poliestireno contendo três fragmentos de barbante de algodão esterilizados foram lançados e fixados em dois pontos (A e B), cada ponto contendo três amostras (1, 2 e 3), em um lago em ponta Hennequin, na Ilha Rei George e lago Soto na Ilha Deception (**Figura 2**). Os barbantes permaneceram nos lagos por dois anos e foram resgatadas no verão austral de 2018. Após a coleta, as amostras foram mantidas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para que suas características fossem preservadas. No Brasil, essas amostras foram levadas ao Laboratório de Microbiologia Polar e Conexões Tropicais (MICROPOLAR) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e mantidas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o processamento.



Figura 2. Fotos dos lagos nos quais as iscas de barbante foram implantadas. (a) lago em ponta Hennequin, Ilha Rei George e (b) Lago Soto na Ilha Deception. Fotos: Luiz Henrique Rosa.

4.1.2. Coleta dos biofilmes

Sacos plásticos previamente esterilizados (*Wilpacks*) foram utilizados para a coleta de biofilme em 15 pontos no Kroner Lake (**Figura 3**), localizado em uma pequena baía denominada Whalers Bay, na Ilha Deception, Antártica. A coleta foi realizada durante o verão austral de 2018 e as amostras foram processadas no Laboratório de Microbiologia Antártica do Navio Polar Almirante Maximiano (H-41).

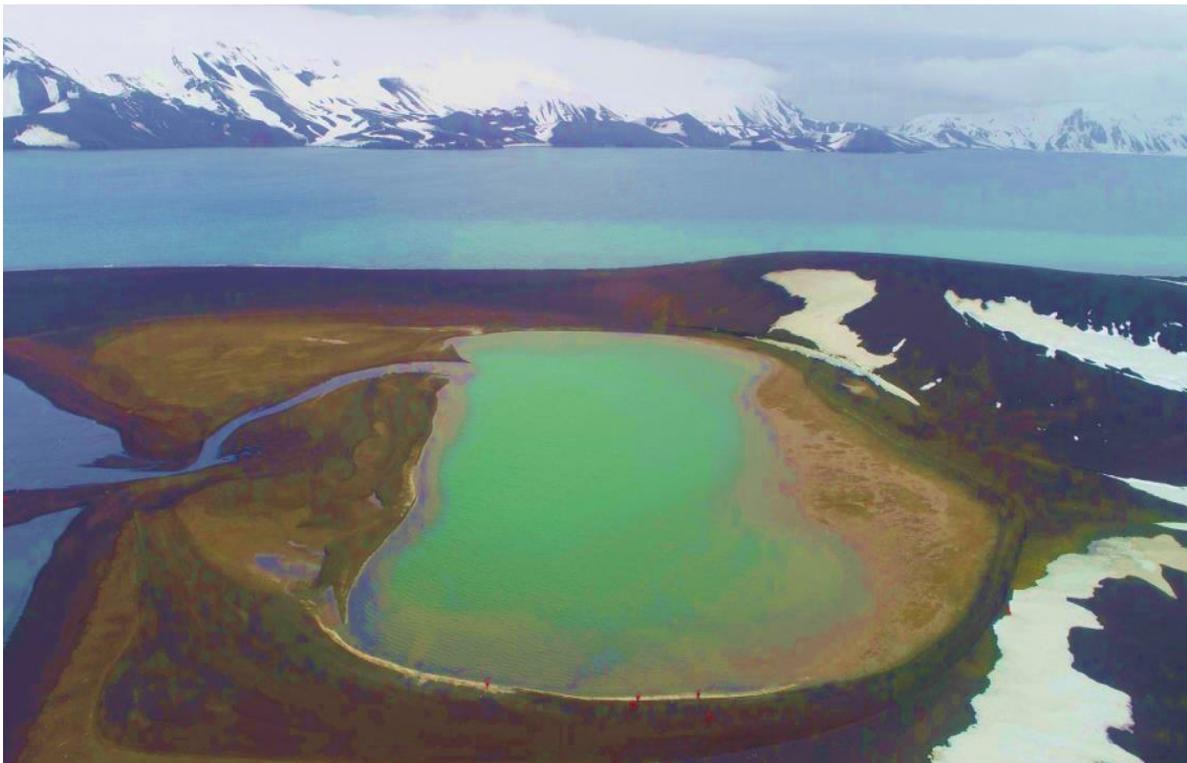


Figura 3. Foto do Kroner Lake, Ilha Deception, Antártica, mostrando sua conexão com o mar à esquerda. Foto: Luiz Henrique Rosa.

4.2. Isolamento dos fungos cultiváveis

4.2.1. Iscas de barbante

As amostras foram descongeladas e mantidas à temperatura de 4 °C até o momento do processamento e isolamento dos fungos, para o qual foram utilizados os seguintes meios de cultivo sólidos (2% ágar m/v):

1. Ágar Dicloran Rosa Bengala (0,5% de peptona, 1% de glicose, 0,1% de KH_2PO_4 , 0,05% de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,0002% de dicloran, 0,0025% de rosa bengala, 0,01% de cloranfenicol);

2. Meio Mínimo (0,025% de peptona, 0,5% de glicose, 0,698% de K_2HPO_4 , 0,544% de KH_2PO_4 , 0,1% de $(NH_4)_2SO_4$, 0,11% de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,01% de cloranfenicol);
3. Ágar Marinho (0,5% de peptona, 2% de glicose, 0,1% de extrato de levedura, 0,01% de citrato férrico, 0,01% de NaCl, 0,88% de $MgCl_2$, 0,32% de Na_2SO_4 , 0,18% de $CaCl_2$, 0,05% de KCl, 0,01% de $NaHCO_3$, 0,008% de KBr, 0,34% de $SrCl_2$, H_2BO_3 , 0,4% de Na_2SiO_3 , 0,24% de NaF, 0,16% de NH_4NO_3 , 0,8% de Na_2HPO_4 , 0,01% de cloranfenicol);
4. Meio Extrato de Malte (5% de extrato de malte, 0,01% de cloranfenicol).

Duas técnicas de semeadura distintas foram usadas: (a) semeadura direta: cerca de 1 cm de cada uma das três iscas de algodão e de cada um dos dois pontos do lago (A1, A2, A3, B1, B2 e B3) foi inoculado em placas de Petri contendo os diferentes meios de cultura; e (b) diluição seriada: aproximadamente 1 cm de barbante de cada amostra (A1, A2, A3, B1, B2 e B3) foi diluído em 900 μL de salina (0,85% de NaCl), correspondente à diluição 10^{-1} , e 100 μL de cada suspensão foram plaqueados por “*spread plate*” nos mesmos meios de cultura da técnica anterior, utilizando pérolas de vidro. Em seguida, 100 μL da diluição 10^{-1} foram diluídos em 900 μL de salina (0,85% de NaCl), correspondente à diluição 10^{-2} , e 100 μL de cada suspensão foram plaqueados por “*spread plate*” nos mesmos meios de cultura utilizados anteriormente, com o auxílio de pérolas de vidro. Foram feitas duplicatas de cada meio de cultura e todas as placas foram incubadas a 10 °C.

4.2.2. Biofilmes

As amostras foram processadas em duplicatas em dois meios de cultura: Sabouraud dextrose ágar (0,5% de digestão enzimática de caseína, 0,5% de digestão enzimática de tecido animal, 4% de dextrose, 1,5% de ágar e 0,01% de cloranfenicol) e ágar marinho (0,5% de peptona, 2% de glicose, 0,1% de extrato de levedura, 0,01% de citrato férrico, 0,01% de NaCl, 0,88% de $MgCl_2$, 0,32% de Na_2SO_4 , 0,18% de $CaCl_2$, 0,05% de KCl, 0,01% de $NaHCO_3$, 0,008% de KBr, 0,34% de $SrCl_2$, H_2BO_3 , 0,4% de Na_2SiO_3 , 0,24% de NaF, 0,16% de NH_4NO_3 , 0,8% de Na_2HPO_4 , 0,01% de cloranfenicol e 2% de ágar). Foram plaqueados, por “*spread plate*”, 100 μL de biofilme de cada um dos 15 pontos coletados em cada meio de cultura. As placas foram incubadas a 10 °C.

4.3. Preservação dos fungos cultiváveis

As colônias fúngicas obtidas foram quantificadas em unidades formadoras de colônias e cada isolado foi purificado em placas de Petri contendo o meio de cultura YM (0,3% de extrato de levedura, 0,3% de extrato de malte, 0,5% de peptona, 2% de glicose, 2% de ágar). Repiques dos fungos purificados foram incubados a 10 °C por 7 a 21 dias e preservados para serem depositados

na coleção de Microrganismos e Células do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) com o código UFMGCB.

Os isolados de fungos filamentosos foram preservados em duplicatas em Castellani (Castellani, 1939) e mantidos a temperatura ambiente. Além disso, foram preservados, também em duplicatas, em criotubos esterilizados contendo 10 fragmentos do micélio fúngico (com aproximadamente 5 mm de diâmetro) e 1 mL de solução de glicerol 15%, sendo mantidos a -80 °C em ultrafreezer. Para a criopreservação das leveduras, uma alçada de cada levedura isolada foi inoculada em tubo de ensaio contendo 2 mL de caldo GYMP (1% de extrato de malte, 0,2% de fosfato de potássio dibásico, 2% de glicose e 0,5% de extrato de levedura) e incubada por 48 horas a 10 °C. Após o período de incubação, 800 µL desse caldo foi transferido para criotubos esterilizados em duplicatas, nos quais foi acrescido 200 µL de glicerol puro.

4.4. Isolamento seletivo de fungos celulolíticos presentes nos barbantes

Para o isolamento dos fungos celulolíticos presentes nas amostras de barbantes foi utilizado o método de enriquecimento. Um fragmento de 5 cm de cada uma das três iscas de algodão e de cada um dos dois pontos do lago (A1, A2, A3, B1, B2 e B3) foi inoculado em 20 mL de meio de cultura líquido CMC (0,67% de YNB – yeast nitrogen base, 1% de CMC – carboximetilcelulose, 0,01% de cloranfenicol). Após sete dias de crescimento a 10 °C, 100 µL dessa suspensão foram plaqueados em meio de cultura sólido CMC (0,67% de YNB – yeast nitrogen base, 1% de CMC – carboximetilcelulose, 2% de ágar, 0,01% de cloranfenicol) por “*spread plate*” utilizando pérolas de vidro. As placas foram mantidas a 10 °C. A purificação das amostras foi realizada da mesma forma citada no tópico anterior.

4.5. Identificação dos fungos cultiváveis

4.5.1. Identificação de fungos filamentosos

Todos os isolados foram agrupados de acordo com suas características macromorfológicas, como, por exemplo, coloração da colônia (frente e verso), aspecto da borda, textura da superfície e presença ou ausência de pigmentos. Posteriormente, o agrupamento molecular foi realizado por meio da técnica de PCR microssatélite (PCR-MST), conhecida como “DNA *fingerprint*”, utilizando como iniciador o oligonucleotídeo sintético (GTG)₅. Um isolado de cada grupo foi identificado pela amplificação da região transcrita interna (ITS1-5.8S-ITS2) do gene do rRNA e/ou amplificação parcial do gene da β-tubulina. A escolha da região a ser amplificada foi determinada de acordo com os gêneros encontrados pela amplificação da região ITS (identifica alguns táxons apenas em nível de gênero).

4.5.1.1. Extração do DNA total

A extração do DNA total foi adaptada de Rosa *et al.* (2009). Os fungos filamentosos foram crescidos em meio de cultura YM (0,3% de extrato de levedura, 0,3% de extrato de malte, 0,5% de peptona, 2% de glicose, 2% de ágar) por 7 a 14 dias e, em seguida, fragmentos do micélio foram retirados e colocados em microtubos estéreis de 2 mL acrescidos de 400 µL de tampão de lise (Tris-HCl 0,05 M, EDTA 0,005 M, NaCl 0,1 M e SDS 1%), sendo mantidos a -20 °C por no mínimo 30 min. Foram adicionadas de duas a três pérolas de aço inoxidável aos microtubos contendo os fragmentos de micélio, os quais foram submetidos à trituração com auxílio de microdesmembranador sob intensa agitação. Após homogeneização, foram adicionados 162 µL de CTAB (Tris 2M, NaCl 8,2%, EDTA 2M e CTAB 0,2%), os microtubos foram incubados a 65 °C por 40 min. Em seguida, foram acrescidos 570 µL de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1), os microtubos foram homogeneizados e mantidos em gelo por 30 min e, posteriormente, centrifugados a 14.000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo com adição de 10% de seu volume de uma solução acetato de sódio 3M. Essa suspensão foi homogeneizada, incubada a 0 °C por 30 min e, em seguida, centrifugada a 14.000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo acrescido de 50% de seu volume de isopropanol (Merck). A suspensão foi homogeneizada e centrifugada a 14.000 rpm por 5 min. O sobrenadante foi desprezado, o sedimento homogeneizado com etanol 70% (Merck) v/v. As amostras foram secas a 37 °C por 30 min e acrescidas de 50 µL de tampão TE/Tris-EDTA (Tris-HCl 0,01 M e EDTA 0,001 M) e incubadas a 65 °C por 60 min para a hidratação do DNA. Em seguida, foram armazenadas em freezer a -20 °C.

4.5.1.2. Amplificação utilizando o iniciador (GTG)₅

O iniciador (GTG)₅ (5'-GTGGTGGTGGTGGTG-3') foi utilizado para amplificar regiões microssatélites por meio de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), segundo a metodologia descrita por Lieckfeldt *et al.* (1993). A PCR foi conduzida em microtubos de 0,2 mL, com volume final de 25 µL, contendo: 1 a 5 µL de DNA (dependendo da concentração de DNA, variável de 50-500 ng µL⁻¹); 2 µL do iniciador (GTG)₅ 10 µmol µL⁻¹ (MWG Biotech); 2,5 µL de tampão de PCR 5X (Fermentas); 1,5 µL de MgCl₂ 25mM; 1 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 em termociclador PCR Mastercycler (Eppendorf), nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94 °C por 5 min, seguida por 40 ciclos de desnaturação a 94 °C por 15 s,

pareamento a 55 °C por 1 min e extensão a 72 °C por 90 s, e uma extensão final a 72 °C por 6 min. A observação dos produtos da PCR (*amplicons*) foi feita 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), que foram submetidos a 80 V por 1h e 30 min e corados com uma solução de agente intercalante (GelRed). Os géis foram visualizados sob luz ultravioleta e fotodocumentados (Vilber Lourmat, França).

4.5.1.3. Amplificação da região ITS

A amplificação da região transcrita interna (ITS1-5.8S-ITS2) do gene do rRNA foi realizada segundo a metodologia de White *et al.* (1990), com a utilização dos iniciadores universais ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) e ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC). A reação de PCR foi realizada com volume final de 50 μL , contendo: 1 a 5 μL de DNA (dependendo da concentração de DNA, variável de 50-500 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$); 1 μL de cada iniciador ITS1 e ITS4 10 $\mu\text{mol } \mu\text{L}^{-1}$ (MWG Biotech); 5 μL de tampão de PCR 5X (Fermentas); 2 μL de MgCl_2 25mM; 2 μL de dNTP 10 mM; 0,2 μL de Taq DNA polimerase 5U (Fermentas), com o volume final completado com água esterilizada. As reações da PCR foram realizadas utilizando o termociclador PCR Mastercycler (Eppendorf), nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94 °C por 5 min, seguido por 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 min, pareamento a 55 °C por 1 min, extensão a 72 °C por 1 min, e uma extensão final a 72 °C por 5 min. Os *amplicons* foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1%, em tampão TBE 0,5X, sendo submetidos a 120 V por 20 min, e, em seguida corados com solução de GelRed. Os géis foram visualizados sob luz ultravioleta e fotodocumentados (Vilber Lourmat, França).

4.5.1.4. Amplificação parcial do gene da β -tubulina

A amplificação parcial do gene da β -tubulina foi realizada utilizando os iniciadores BT2a (GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC) e BT2b 15 (ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC), segundo Glass & Donaldson (1995). A PCR foi realizada com volume final de 50 μL , contendo: 1 a 5 μL de DNA (dependendo da concentração de DNA, variável de 50-500 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$); 1 μL de cada iniciador BT2a e BT2b 10 $\mu\text{mol } \mu\text{L}^{-1}$ (MWG Biotech), 5,0 μL de tampão de PCR 5X 20 (Fermentas), 2,0 μL de MgCl_2 25 mM, 2,0 μL de dNTP 10 mM, 0,2 μL de Taq DNA polimerase 5U (Fermentas) e o volume final completado com água esterilizada. As reações de PCR foram realizadas utilizando o termociclador PCR Mastercycler (Eppendorf), nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94 °C por 5 min, seguido por 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 min,

pareamento a 59 °C por 1 min e extensão a 72 °C por 90 s e uma extensão final a 72 °C por 7 min. Os *amplicons* foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1%, em tampão TBE 0,5X, onde foram submetidos a 120 V por 20 min e, em seguida, corados com solução de GelRed. Os géis foram visualizados sob luz ultravioleta e fotodocumentados (Vilber Lourmat, França).

4.5.2. Identificação de leveduras

As culturas de leveduras obtidas foram fotografadas e agrupadas de acordo com as características macro morfológicas, como coloração e aspecto da colônia (mucoide, cremosa e rugosa). Os grupos formados foram submetidos à análise de perfis moleculares por meio da técnica de PCR microsatélite (PCR-MST), idem ao item 4.5.1.2. Um isolado de levedura de cada grupo molecular formado foi selecionado para sequenciamento dos domínios D1/D2 da subunidade maior do DNA ribossomal utilizando os iniciadores ITS1/NL4.

4.5.2.1. Extração do DNA total

Uma alçada do cultivo foi ressuspensa em 100 µL de tampão de lise (Tris-HCl 0,05 M, EDTA 0,005 M, NaCl 0,1 M e SDS 1%) em tubos de 0,6 mL e incubada a 65 °C por no mínimo 30 min. Em seguida, foram adicionados 200 µL de clorofórmio: álcool isoamílico 24:1 e os tubos foram homogeneizados e centrifugados a 14.000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo acrescido de isopropanol (Merck) v/v e mantido em repouso por 15 min para precipitar o DNA. Posteriormente, os tubos foram centrifugados a 14.000 rpm por 10 min, foram adicionados 200 µL de etanol 70% (Merck) e os tubos foram centrifugados novamente a 14.000 rpm por 10 min. O sobrenadante contendo etanol deverá ser desprezado e as amostras foram secas por 60 min. Em seguida, foram adicionados 50 µL de tampão TE e as amostras foram incubadas a 65 °C por 60 min para a hidratação do DNA. Posteriormente, foram armazenadas em freezer a -20 °C. As concentrações de DNA de filamentosos e leveduras foram acertadas de 50 a 500 ng µL⁻¹ para posterior utilização.

4.5.2.2. Amplificação do domínio D1/D2

Um isolado de cada um dos perfis moleculares de leveduras obtido foi selecionado e submetido ao sequenciamento da região D1/D2 da subunidade maior (26S) do gene do rRNA como descrito por Lachance *et al.* (1999). Para a reação de PCR, foram utilizados os iniciadores ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e NL4 (5'GGTCCGTGTTTCAAGACGG3'), que abrangem a região dos espaçadores transcritos internos (ITS1-5.8S-ITS2) do gene do RNA ribossomal e o

domínio D1/D2. A reação foi realizada com um volume final de 50 μL , contendo 5 μL de tampão de PCR 10X (MBI Fermentas), 3 μL de MgCl_2 25 mM (MBI Fermentas), 1 μL de dNTP 2,5 mM (Invitrogen, USA), 1 μL de cada primer ITS1 e NL4 10 pmol (Invitrogen, USA), 0,2 μL de taq DNA polimerase 1,25U (MBI Fermentas) e 1 a 5 μL de DNA (dependendo da concentração de DNA, que deve estar entre 50-500 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$). O volume da reação foi ajustado com a adição de água esterilizada. A reação foi realizada no termociclador PCR Mastercycler (Eppendorf) nas seguintes condições: desnaturação inicial a 95 °C por 2 min, 35 ciclos de desnaturação a 95 °C por 15 segundos, anelamento a 54 °C por 25 segundos e extensão a 72 °C por 20 segundos, seguidos de extensão final a 72 °C por 10 min. Os *amplicons* foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1%, em tampão TBE 0,5X, sendo submetidos a 120 V por 20 min e, em seguida, corados com solução de GelRed. Os géis foram visualizados sob luz ultravioleta e fotodocumentados (Vilber Lourmat, França).

4.5.3. Purificação dos amplicons dos fungos cultiváveis

Os *amplicons* gerados ao final da reação de PCR (volume de 47 μL) foram purificados com a adição de 11,25 μL de EDTA 125 mM e 141 μL de etanol absoluto (Merck). Em seguida, os tubos foram homogeneizados por inversão, deixados à temperatura ambiente por 30 min e centrifugados a 14.000 rpm por 30 min. O sobrenadante foi descartado e o sedimento tratado com 120 μL de etanol 70%, homogeneizado e centrifugado a 14.000 rpm por 15 min. O sobrenadante foi descartado novamente e o restante do etanol foi evaporado a 37 °C por 30 min. O DNA foi ressuscitado em 10 μL de água esterilizada, dosado em NanoDrop ND 1000 (NanoDrop Technologies) e armazenado a -20 °C para ser utilizado nas reações de sequenciamento.

4.5.4. Sequenciamento dos fungos cultiváveis

4.5.4.1. Reações de sequenciamento

As reações de sequenciamento foram realizadas utilizando-se o Kit BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems, EUA) em combinação com o sistema de sequenciamento automatizado ABI 3730x1 (Applied Biosystems, EUA) do Laboratório de Parasitologia Celular e Molecular (LPCM) da FIOCRUZ/Instituto René Rachou. A reação de PCR foi realizada em microplacas de 96 poços (Applied Biosystems, EUA) e preparada para um volume final de 10 μL , contendo: 1 μL do iniciador (5 pmol), 1 μL de tampão (presente no kit de sequenciamento), 1 μL de Big Dye, 1 μL de DNA (contendo entre 10-20 $\text{ng}/\mu\text{L}$) e o volume foi completado com água ultrapura esterilizada. O programa de ciclagem utilizado consistiu de uma desnaturação inicial a 36 °C por 1 min, 36 ciclos

de anelamento a 96 °C por 15 segundos, seguido de extensão a 50 °C por 15 segundos e 4 min de extensão final a 60 °C.

4.5.4.2. Precipitação da reação de sequenciamento

Para precipitação das reações de sequenciamento, 1 µL de EDTA a 125 mM, 1 µL de acetato de sódio 3M e 50 µL de etanol absoluto (Merck) gelado, foram adicionados em cada poço da placa de 96 poços. A placa foi submetida à agitação em vórtex e incubada por 15 min à temperatura ambiente. Após a incubação, a placa foi centrifugada por 45 min a 4.000 rpm a 4 °C e o sobrenadante descartado por inversão. Em seguida, foram acrescentados 100 µL de etanol 70% (Merck) gelado, a placa foi novamente centrifugada por 15 min a 4.000 rpm a 4 °C e o sobrenadante descartado por inversão. Para remoção do excesso de etanol, o selante foi retirado e a placa invertida sobre um papel absorvente e submetida a um spin (pulso até a centrífuga atingir 900 rpm). Após essa etapa, a placa foi mantida em repouso, sem o selante, durante 20 min em temperatura ambiente para evaporação do etanol residual. Em seguida, o DNA das amostras precipitado em cada poço foi ressuscitado em 10 µL de Formamida HI DI (Applied Biosystems, EUA). A placa foi armazenada a 4 °C, protegida da luz, até a injeção das amostras no sistema automatizado ABI 3730 (Applied Biosystems, EUA).

4.5.4.3. Análise computacional das sequências

As sequências de DNA foram analisadas de acordo com sua qualidade no portal Embrapa (<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>) e comparadas com as sequências de espécies de fungos referências depositadas no *GenBank*, incluindo “*type species*”, pertencentes às 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 Biotechnology.

Fungos com sequências de valor $E = 0$, cobertura e identidade $\geq 99\%$, e similaridade quando analisadas com o programa BLASTn, foram considerados como pertencentes à mesma espécie. Já fungos com sequências de valor $E \neq 0$ e cobertura e identidade $\leq 98\%$ foram identificados em nível de espécie, gênero ou níveis hierárquicos mais altos. Para alguns táxons o termo ‘cf.’ (latim “*for confer*” = comparado com) poderá ser utilizado para indicar a espécie a qual se assemelha, mas apresenta pequenas diferenças com a espécie referência. Para identificação molecular, foram utilizadas sequências com ≥ 350 pares de bases.

4.6. Detecção das enzimas produzidas pelos fungos cultiváveis

Os isolados foram inoculados em meios de cultura contendo o substrato específico para cada enzima, sendo que, para os fungos filamentosos, foi inoculado um fragmento do micélio fúngico de aproximadamente 05 mm de diâmetro. Já para as leveduras, foi realizado um inóculo de 1 cm com o auxílio de alças plásticas de inoculação. A atividade enzimática foi verificada após sete dias em placas de Petri incubadas a 15 °C. Todos os ensaios foram realizados em duplicatas.

A atividade enzimática foi determinada de acordo com Hankin & Anagnostakis (1975) através da relação entre o diâmetro do halo de degradação e o diâmetro da colônia, expresso como Índice Enzimático (IE), segundo a fórmula a seguir:

$$\text{Índice Enzimático (IE)} = \frac{\text{diâmetro do halo de degradação}}{\text{diâmetro da colônia}}$$

Para considerar um micro-organismo bom produtor de enzimas extracelulares em meio sólido, Lealem & Gashe (1994) estabeleceram que o IE deve ser maior ou igual a 2,0 (Soares *et al.*, 2010).

4.6.1. Celulases

Os isolados foram cultivados em meio YM (1:10) com carboximetilcelulose (5 g L⁻¹) substituindo a glicose. As placas de Petri foram inundadas com uma solução de vermelho Congo (2,5 g L⁻¹ em tampão Tris HCl 0,1 M, pH 8), que foi descartada após 15 min. As placas foram então inundadas com NaCl 1M por 15 min, o qual também foi descartado. A atividade de celulase positiva foi definida como um halo claro ao redor da colônia em um fundo vermelho (Bortolazzo, 2011; Martorell *et al.*, 2017).

4.6.2. Proteases

Os isolados foram cultivados em Sabouraud dextrose ágar com leite desnatado, contendo 10 g L⁻¹ de leite desnatado (Oxoid) e 65 g L⁻¹ de Sabouraud Dextrose Ágar. Após a incubação, uma reação positiva foi detectada como um halo claro (produzido pela degradação da caseína) ao redor da colônia no meio opaco (Brizzio *et al.*, 2007, Duarte *et al.*, 2013).

4.6.3. Lipases

Os isolados foram cultivados em meio contendo: 1 g L⁻¹ de peptona, 0,5 g L⁻¹ de extrato de levedura, 15 g L⁻¹ de ágar, 31,25 mL L⁻¹ de azeite de oliva como fonte de carbono e solução de rodamina B 0,01% v/v (10 mL L⁻¹) em etanol absoluto. A atividade positiva foi detectada pela

presença de um halo fluorescente de cor laranja sob luz UV a 350 nm. O método se baseia na observação da fluorescência causada pela interação da rodamina B com os ácidos graxos liberados pela hidrólise enzimática do azeite (Duarte *et al.*, 2013).

4.6.4. Agarases

O ensaio para a observação da produção de agarase foi adaptado de Furbino *et al.* (2018) no qual os isolados foram cultivados em meio YM suplementado com 1,5% de ágar. As determinações das atividades agarolíticas foram realizadas pela adição de lugol à placa, na qual a presença de um halo foi usada como um indicador da atividade enzimática.

4.6.5. Carragenases

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

4.6.6. Invertases

Os isolados foram cultivados em meio YM com 2% de sacarose e 0,003% de bromocresol verde. O aparecimento de um halo amarelo foi indicativo de atividade positiva (Troncoso *et al.*, 2017).

4.6.7. Amilases

Os isolados foram cultivados em ágar amido, que consiste em 6,7 g L⁻¹ de YNB (Difco), 2 g L⁻¹ de amido solúvel e 20 g L⁻¹ de ágar. Após a incubação, as placas foram inundadas com solução de iodo de lugol (3,3 mg L⁻¹ de iodo e 6,7 mg L⁻¹ de iodeto de potássio). Um halo amarelo claro ao redor da colônia em um fundo roxo indicará a degradação do amido (Brizzio *et al.*, 2007; Carrasco *et al.*, 2012).

4.6.8. Esterases

Os isolados foram cultivados em meio composto de (em g L⁻¹): peptona bacteriológica, 10; NaCl, 5; CaCl₂ 2H₂O, 4 e Tween 80, 10. A atividade da esterase foi evidenciada como um precipitado branco ao redor da colônia (Martorell *et al.*, 2017).

4.6.9. Pectinases

Os isolados foram cultivados em meio YM (1:10), pH 7,0, contendo 10 g L⁻¹ de pectina. As placas foram inundadas com 10 g L⁻¹ de CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio), o qual tem a capacidade de precipitar polissacarídeos em solução. A atividade positiva foi indicada por um halo claro ao redor da colônia em um fundo branco (Martorell *et al.*, 2017; Poveda *et al.*, 2018).

4.6.10. Inulinases

O ensaio para a observação da produção de inulinase foi realizado de acordo com Martinez *et al.* (2016), no qual os isolados foram cultivados em ágar inulina, que consiste em 10 g L⁻¹ de inulina, 2 g L⁻¹ de extrato de levedura, 5 g L⁻¹ de peptona, 0,5 g L⁻¹ MgSO₄, NaCl 0,5 g L⁻¹, CaCl₂ 0,15 g L⁻¹ e ágar 20 g L⁻¹ (pH 6,0). As placas foram inundadas com solução de iodo de Lugol. Uma zona amarela pálida ao redor da colônia indicará a degradação da inulina.

4.6.11. Gelatinases

Os isolados foram cultivados em meio YM preparado com 160 g L⁻¹ de gelatina como agente gelificante em substituição ao ágar. A liquefação do meio ao redor da colônia foi considerada como atividade positiva (Troncoso *et al.*, 2017).

4.7. Produção de biossurfactantes pelos fungos cultiváveis

4.7.1. Preparação do inóculo

Os fungos foram inoculados em ágar YM (0.3% de extrato de levedura, 0.3% de extrato de malte, 0.5% de peptona, 2% de glicose e 2% de ágar) suplementado com óleo de girassol filtrado (0,5 mg mL⁻¹) como fonte para a produção de biossurfactantes (Silva *et al.*, 2021). Três fragmentos de 5 mm de diâmetro de ágar YM contendo o crescimento micelial do fungo foram removidos e inoculados em meio YM líquido contendo óleo de girassol para observação da produção de biossurfactantes.

4.7.2. Triagem da produção de biossurfactantes

O caldo YM foi esterilizado e suplementado com 0,5 mg mL⁻¹ de óleo de girassol filtrado como fonte para a produção de biossurfactantes. Tubos cônicos esterilizados de 15 mL foram preenchidos com 7 mL do caldo YM suplementado com óleo de girassol filtrado. Para fungos filamentosos, três fragmentos de micélio (5 mm de diâmetro) crescidos em ágar YM foram então inoculados. Para as leveduras, células de uma colônia foram transferidas para tubos de 15 mL

contendo 7 mL de caldo YM também suplementado com óleo de girassol filtrado e cultivadas a 15 °C com agitação a 150 rpm por 48 horas (Camargo *et al.*, 2018). Em seguida, foi padronizado em espectrofotômetro com absorvância entre 0,4-0,5 no comprimento de onda de 660 nm e 350 µL (5%) dessa solução foram transferidos para novos tubos contendo 7 mL de caldo YM também suplementado com óleo de girassol filtrado.

Os fungos foram cultivados a 15 °C com agitação a 150 rpm durante 10 dias. Ao final do crescimento fúngico, o caldo foi centrifugado a $7.197 \times g$ por 8 min a 15 °C. O sobrenadante resultante foi utilizado para o teste qualitativo de produção de biossurfactantes (teste de colapso da gota).

4.7.2.1. Teste de colapso da gota

O teste de colapso da gota segue o protocolo estabelecido por Bodour & Miller-Maier (1998). Resumidamente, 5 µL do extrato filtrado obtido de cada meio foram inoculados separadamente em placas de microtitulação de 96 poços previamente preenchidas com 1,8 µL de óleo mineral e deixadas em temperatura ambiente por 24 h. O resultado de colapso da gota foi determinado visualmente após 1 minuto de reação. Os resultados observados nos poços onde ocorreu o colapso da gota de óleo mineral foram considerados positivos e, para aqueles que não colapsaram, o resultado foi negativo. O controle positivo foi preparado com 25% (p/v) de dodecilsulfato de sódio (SDS) e o controle negativo foi o próprio meio de cultura. Os ensaios foram realizados em duplicata.

4.8. Extração de DNA ambiental total (eDNA) e caracterização da comunidade de fungos não cultiváveis

A avaliação da comunidade fúngica não cultivável foi realizada nas iscas de barbante que ficaram suspensas por dois anos no Lago Hennequin, localizado na Ilha Rei George, e no Lago Soto, localizado na Ilha Deception. Foram coletadas três amostras (A, B e C) de dois pontos (1 e 2) de cada lago.

A extração de DNA total da comunidade foi feita em triplicata de cada ponto de cada lago, utilizando o kit comercial *DNeasy PowerLyzer PowerSoil* (QIAGEN) de acordo com as recomendações do fabricante. A eficiência do método de extração e a qualidade do material extraído foram avaliados por meio da eletroforese em gel de agarose 0,8%, corado com GelRed (Uniscience), visualização em transluminador (Applied Biosystems) e, por meio do espectrofotômetro NanoDrop ND 1000 (NanoDrop Technologies). O DNA extraído foi utilizado

como molde para gerar amplicons de PCR. O espaçador transcrito interno 2 (ITS2) do DNA ribossômico nuclear foi utilizado como um código de barras de DNA para a identificação de espécies moleculares (Chen *et al.*, 2010; Richardson *et al.*, 2015). Os amplicons de PCR foram gerados usando os primers universais ITS3 e ITS4 (White *et al.*, 1990) e foram sequenciados por sequenciamento de alto rendimento na MacroGen Inc. (Coreia do Sul) em um sequenciador Illumina MiSeq (3x300 bp), usando o kit de reagentes MiSeq v3 (600 ciclos) seguindo o protocolo do fabricante.

Sequências menores que 50 pb foram descartadas e as sequências restantes foram importadas para o QIIME2 versão 2019 para análises de bioinformática (Bolyen *et al.*, 2019). O plug-in qiime2-dada2 é um pipeline completo que foi usado para filtrar, desreplicar, transformar arquivos fastq emparelhados em mesclados e remover quimeras (Callahan *et al.*, 2016). As atribuições taxonômicas foram determinadas para sequências de amplicons variantes (ASVs) usando o classificador de características qiime2 (Bokulich *et al.*, 2018) contra o banco de dados referência para fungos UNITE versão 8.2 (Abarenkov *et al.*, 2020) com um limite de confiança de 98,5%.

Muitos fatores, incluindo extração, PCR e tendência de primer, podem afetar o número de leituras obtidas (Medinger *et al.*, 2010) e, portanto, levar a uma interpretação errônea da abundância absoluta (Weber & Pawlowski, 2013). No entanto, Giner *et al.* (2016) concluíram que tais vieses não afetaram a proporcionalidade entre leituras e abundância celular, implicando que mais leituras estão ligadas a maior abundância (Deiner *et al.*, 2017; Hering *et al.*, 2018). Portanto, para fins comparativos, utilizamos o número de leituras como um proxy para abundância relativa. As informações sobre a classificação fúngica geralmente seguem Kirk *et al.*, (2011), Tedersoo *et al.*, (2018), MycoBank (<http://www.mycobank.org>) e Index Fungorum (<http://www.indexfungorum.org>).

4.9. Análise da diversidade dos fungos cultiváveis e não cultiváveis: cálculo dos índices de abundância, riqueza e dominância

A diversidade de espécies foi avaliada utilizando os seguintes índices: (a) Fisher- α (diversidade), (b) Margalef (riqueza) e (c) Simpson (dominância). O índice de diversidade de Fisher- α é adequado para frequências em que diferentes espécies ocorrem de forma aleatória, na qual, comumente, algumas espécies são tão raras que sua chance de inclusão é pequena (Fisher *et al.*, 1943). Este índice é calculado pela fórmula $S = a \cdot \ln(1 + n/a)$ onde, S é o número de táxons presente na amostra, n é o número de indivíduos e a representa o índice de Fisher- α . O Índice de Margalef é uma medida utilizada em ecologia para estimar a riqueza de espécies de uma

comunidade com base na distribuição numérica dos indivíduos das diferentes espécies em função do número total de indivíduos existentes na amostra analisada. Sua fórmula é dada por $S = (n-1)/\ln(N)$, onde n é o número de táxons encontrados e N representa o número de indivíduos. Quanto mais alto o valor de S , maior a riqueza de espécies do local amostrado. O índice de Simpson é muitas vezes utilizado para quantificar a biodiversidade de um ecossistema. Ele leva em conta o número de espécies presentes no local, bem como a abundância de cada espécie. Trata-se de um índice de dominância que mede a probabilidade de dois indivíduos, selecionados ao acaso na amostra, pertencerem à mesma espécie. O cálculo da Dominância de Simpson (1-D) é dado pela fórmula $D = \sum(n / N)^2$, onde n é o número total de organismos de uma mesma espécie e N o número total de organismos de todas as espécies. O valor estimado de $1 - D$ pode variar de 0 a 1, sendo que 0 representa o mínimo de diversidade e 1 o máximo de diversidade, com as espécies distribuídas igualmente.

Uma curva de rarefação foi traçada utilizando o índice de Mao Tau, que interpola valores entre zero e o número de amostras analisadas, e calcula a riqueza esperada e o intervalo de confiança. Para a construção dessas curvas foi utilizada a densidade de cada táxon obtido. Este cálculo permite uma comparação estatística direta entre a riqueza e os conjuntos de dados (Colwell *et al.*, 2004). Todos os resultados foram obtidos com 95% de confiança, e os valores de bootstrap foram calculados a partir de 1.000 repetições. Todos os índices foram calculados utilizando o programa computacional PAST 1.90 (Hammer *et al.*, 2001).

5. RESULTADOS

5.1. Isolamento dos fungos cultiváveis

Após os diferentes processos de isolamento foram obtidos 154 isolados fúngicos, dos quais 89 (58%) foram representados por fungos filamentosos e 65 (42%) por leveduras. Desses isolados, 94 foram obtidos das iscas de barbante coletadas na Ilha Rei George, sendo 45 fungos filamentosos e 49 leveduras. Assim, os outros 60 isolados foram obtidos do biofilme coletado na Ilha Deception, sendo 44 fungos filamentosos e 16 leveduras (**Figura 4**).

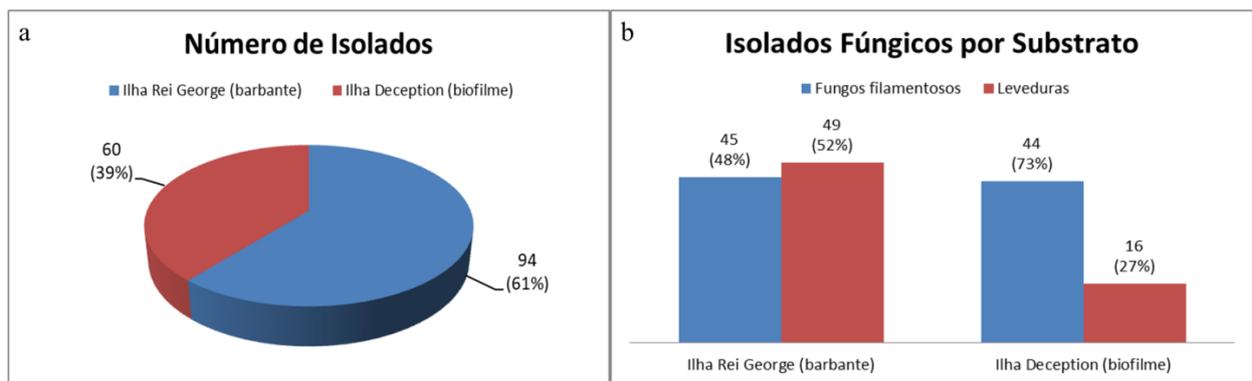


Figura 4. Isolamento dos fungos cultiváveis. (a) número de isolados fúngicos obtidos na Ilha Rei George (iscas de barbante) e na Ilha Deception (biofilme) e (b) número de isolados fúngicos obtidos por substrato.

5.1.1. Identificação e distribuição dos fungos cultiváveis

A identificação dos isolados fúngicos das amostras de barbante e de biofilme realizada por meio de técnicas de biologia molecular está representada na **Tabela 2** e **Tabela 3**, respectivamente. Os filos identificados foram *Ascomycota*, *Basidiomycota* e *Mortierellomycota*. *Ascomycota* foi o mais abundante, sendo representado por 89 (58%) isolados, seguido por *Basidiomycota* com 58 (38%) isolados e, por último, o filo menos abundante foi *Mortierellomycota* com sete (4%) isolados. Dos 94 isolados do barbante, *Thelebolus globosus* foi a espécie de fungo filamentoso mais abundante, com 24 isolados, e *Goffeauzyma* sp. foi a levedura mais encontrada. Já com relação aos 60 isolados do biofilme, *Pseudogymnoascus verrucosus*, com 27 isolados, foi o mais abundante entre os filamentosos e *Metschnikowia australis* a mais abundante entre as leveduras com cinco isolados. O gênero *Penicillium* foi isolado como singletos (apenas um isolado) das amostras de barbante, e os gêneros *Holtermanniella*, *Vishniacozyma*, *Rhodotorula*, *Debaryomyces* e a espécie *Mortierella elongatula* foram isolados como singletos das amostras de biofilme.

Tabela 2. Identificação dos fungos antárticos isolados das iscas de barbante por meio do sequenciamento de regiões do rDNA e análise utilizando o *Basic Local Alignment Search Tool* (BLASTn).

Tipo de semeadura	Resultado do top BLASTn (código de acesso no GenBank)	Código UFMGCB ^a	Densidade (UFC cm ⁻¹)	Identidade (%)	Cobertura (%)	Nº de pb ^c analisados	Táxon sugerido (código de acesso no GenBank)
ID/DS1/DS2	<i>Thelebolus globosus</i> (MH862951) ^b	18535	>300	100	100	442	<i>Thelebolus globosus</i> (MZ556815 ^f)
ID/DS2	<i>Dactylaria dimorphospora</i> (NR164282) ^b	18554	>300	94	97	412	<i>Helotiales</i> sp. 1 (MZ556816 ^f)
ID/DS1/DS2	<i>Dactylaria dimorphospora</i> (NR164282) ^b	17085	>300	95	94	405	<i>Helotiales</i> sp. 2 (MZ556817 ^f)
ID	<i>Mortierella gamsii</i> (MH859222) ^b	18526	20	99	100	520	<i>Mortierella gamsii</i> (MZ556818 ^f)
DS2	<i>Pseudogymnoascus roseus</i> (MH858631) ^b	17097	>300	99	100	397	<i>Pseudogymnoascus</i> sp. (MZ556819 ^f)
DS2	<i>Leucosporidium intermedium</i> (KY108445) ^c	18545	>300	97	100	473	<i>Leucosporidium</i> sp. (MZ557060 ^g , MZ556820 ^f)
	<i>Leucosporidium escuderoi</i> (NR155310) ^b			93	96	438	
DS2	<i>Chalara pseudoaffinis</i> (NR154761) ^b	18550	>300	96	100	432	<i>Chalara</i> sp. (MZ556821 ^f)
ID	<i>Penicillium tardochrysogenum</i> (MH865983) ^b	17098	1	100	100	400	<i>Penicillium</i> sp. (MZ556822 ^f)
	<i>Penicillium chrysogenum</i> (AY495981) ^d			98	100	334	
ID/DS1/DS2	<i>Mrakia blollopis</i> (NR155360) ^b	L32	>300	99	100	512	<i>Mrakia blollopis</i> (MZ556831 ^f , MZ557045 ^g)
	<i>Mrakia gelida</i> (KY108585) ^c			99	100	524	
ID/DS1/DS2	<i>Leucosporidium muscorum</i> (KY108280) ^c	L63	>300	100	100	472	<i>Leucosporidium muscorum</i> (MZ557046 ^g)
DS1/DS2	<i>Vishniacozyma victoriae</i> (NG057678) ^c	L69	>300	100	100	516	<i>Vishniacozyma victoriae</i> (MZ557047 ^g)
DS2	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (KY109056) ^c	L36	>300	100	100	465	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (MZ557048 ^g)
DS1	<i>Cystobasidium laryngis</i> (AF189937) ^c	L72	200	99	100	519	<i>Cystobasidium laryngis</i> (MZ557049 ^g)
ID/DS1/DS2	<i>Goffeauzyma gilvescens</i> (NG058297) ^c	L74	>300	100	100	444	<i>Goffeauzyma</i> sp. (MZ557050 ^g , MZ556832 ^f)
	<i>Goffeauzyma gilvescens</i>			99	100	431	

Tipo de semeadura	Resultado do top BLASTn (código de acesso no GenBank)	Código UFMGCB ^a	Densidade (UFC cm ⁻¹)	Identidade (%)	Cobertura (%)	Nº de pb ^e analisados	Táxon sugerido (código de acesso no GenBank)
	(KY103487) ^b						
	<i>Hamamotoa singularis</i>						
DS2	(KY107777) ^c	L82	>300	99	100	421	<i>Hamamotoa singularis</i>
	<i>Phenoliferia psychrophila</i>			99	100	384	(MZ557051 ^g , MZ556833 ^f)
	(NR154359) ^b						

ID: inóculo direto; DS1: diluição seriada equivalente a 10⁻¹; DS2: diluição seriada equivalente a 10⁻². ^aUFMGCB = Coleção de Micro-organismos e Células da Universidade Federal de Minas Gerais; ^epb = pares de bases. Táxons sujeitos à análise no BLAST baseada em ^bITS, ^cDomínio D1-D2, ^db-tubulina. Sequências de ^fITS e ^gD1-D2 depositadas no banco de dados GenBank.

Tabela 3. Identificação dos fungos antárticos isolados do biofilme por meio do sequenciamento de regiões do rDNA e análise utilizando o *Basic Local Alignment Search Tool* (BLASTn).

Resultado do top BLASTn (código de acesso no GenBank)	Código UFMGCB ^a	Densidade (UFC μL^{-1})	Identidade (%)	Cobertura (%)	Nº de pb ^e analisados	Táxon sugerido (código de acesso no GenBank)
<i>Pseudogymnoascus verrucosus</i> (KJ755525) ^b	17059	>300	100	100	457	<i>Pseudogymnoascus verrucosus</i> (MZ556823 ^f)
<i>Antarctomyces psychrotrophicus</i> (NR164292) ^b	17047	42	100	100	444	<i>Antarctomyces psychrotrophicus</i> (MZ556824 ^f)
<i>Mortierella amoeboides</i> (JX976073) ^b	17041	60	99	99	443	<i>Mortierella</i> sp. 1 (MZ556825 ^f)
<i>Mortierella elongatula</i> (NR111582) ^b	17048	1	96	100	428	<i>Mortierella</i> sp. 2 (MZ556826 ^f)
<i>Beauveria amorpha</i> (NR111601) ^b	17049	2	99	100	408	<i>Beauveria amorpha</i> (MZ556827 ^f)
<i>Arthroderma curreyi</i> (MH858822) ^b	17052	15	87	100	505	<i>Arthroderma</i> sp. (MZ556828 ^f)
<i>Pseudogymnoascus roseus</i> (NR165894) ^b	17051	38	100	97	433	<i>Pseudogymnoascus</i> sp. (MZ556829 ^f)
<i>Penicillium goetzii</i> (MT558933) ^b	17078	>300	100	100	458	<i>Penicillium</i> sp. (MZ556830 ^f)
<i>Penicillium chrysogenum</i> (AY495981) ^d			98	100	372	
<i>Holtermanniella wattica</i> (NG058307) ^c	LB2	1	100	100	514	<i>Holtermanniella wattica</i> (MZ557052 ^g)
<i>Metschnikowia australis</i> (KY108453) ^c	LB6	6	100	100	374	<i>Metschnikowia australis</i> (MZ557053 ^g)
<i>Leucosporidium fragarium</i> (NG058330) ^c	LB1	32	99	100	569	<i>Leucosporidium fragarium</i> (MZ557054 ^g)
<i>Vishniacozyma victoriae</i> (NG057678) ^c	LB5	1	100	100	569	<i>Vishniacozyma victoriae</i> (MZ557055 ^g)

Resultado do top BLASTn (código de acesso no GenBank)	Código UFMGCB ^a	Densidade (UFC μL^{-1})	Identidade (%)	Cobertura (%)	Nº de pb ^e analisados	Táxon sugerido (código de acesso no GenBank)
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (KY109056) ^c	LB15	1	100	100	420	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (MZ557056 ^g)
<i>Debaryomyces hansenii</i> (MK394104) ^c	LB7	1	100	100	457	<i>Debaryomyces</i> sp. (MZ557057 ^g ,
<i>Debaryomyces fabryi</i> (MK394103) ^b			100	100	409	MZ556834 ^f)
<i>Tetracladium globosum</i> (NG059961) ^c	LB20	3	97	100	409	<i>Tetracladium</i> sp. (MZ557058 ^g)
<i>Mrakia blollopis</i> (NG057710) ^c	LB21	3	99	100	523	<i>Mrakia blollopis</i> (MZ557059 ^g)

^aUFMGCB = Coleção de Micro-organismos e Células da Universidade Federal de Minas Gerais; ^epb = pares de bases. Táxons sujeitos à análise no BLASTn baseada em ^bITS, ^cD1-D2, ^db-tubulina. Sequências de ^fITS e ^gD1-D2 depositadas no banco de dados GenBank.

5.1.2. Análise da diversidade da comunidade fúngica cultivável

O esforço amostral para obtenção das comunidades de fungos dos dois lagos da Antártica, demonstrado pela curva de rarefação (índice de Mao Tau) apresentada na **Figura 5**, foi suficiente em relação aos resultados encontrados, uma vez que as curvas chegaram à assíntota indicando que as comunidades obtidas alcançaram o intervalo de riqueza esperada para essas amostras. Os índices de Fisher- α (diversidade), Margalef (riqueza) e Simpson (dominância) para a comunidade de fungos cultiváveis, bem como as características físico-químicas da água dos lagos estão apresentados na **Tabela 4**. A comunidade presente no biofilme foi mais diversa e rica quando comparada aquela do barbante. Entretanto, a dominância de alguns táxons foi maior dentro da comunidade do barbante em relação a do biofilme.

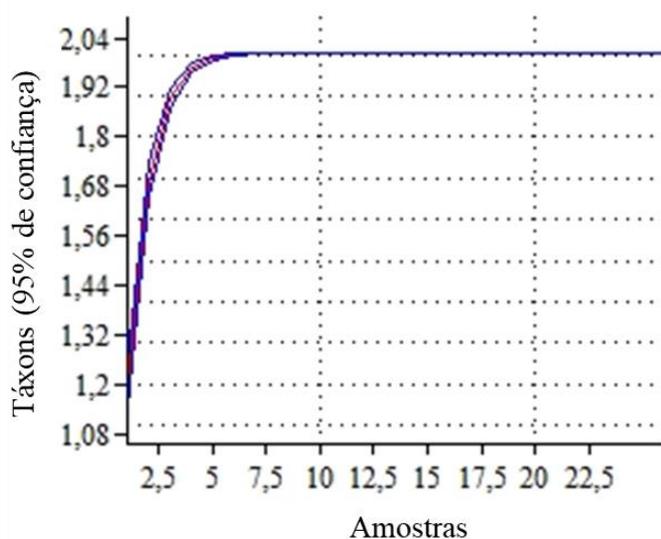


Figura 5. Curva de rarefação (índice de Mao Tau) das comunidades fúngicas isoladas das amostras de barbantes e biofilme dos lagos antárticos.

Tabela 4. Índices de diversidade das comunidades de fungos e características físico-químicas dos lagos antárticos.

Índice	Barbante (ponta Hennequin)	Biofilme (Kroner Lake)	Total
Número de táxons	15	16	31
Número de isolados	94	60	154
Fisher- α	5,04	7,14	8,97
Margalef	3,08	3,66	4,96
Simpson	0,85	0,76	0,91
Temperatura (°C)	6,5	6,5	-
Condutividade (mS cm ⁻¹)	105	323	-
pH	9	7,86	-

No total foram encontrados 26 táxons, sendo 10 exclusivos das amostras de barbantes, 11 exclusivos das amostras de biofilme e apenas cinco compartilhados entre os dois substratos (**Figura 6**). Os táxons exclusivos do barbante foram: *Thelebolus globosus*, *Helotiales* sp. 1, *Helotiales* sp. 2, *Mortierella gamsii*, *Leucosporidium* sp., *Chalara* sp., *Leucosporidium muscorum*, *Cystobasidium laryngis*, *Goffeauzyma* sp. e *Hamamotoa singularis*. Já com relação ao biofilme, os táxons exclusivos foram: *Pseudogymnoascus verrucosus*, *Antarctomyces psychrotrophicus*, *Mortierella* sp. 1, *Mortierella* sp. 2, *Beauveria amorpha*, *Arthroderma* sp., *Holtermanniella wattica*, *Metschnikowia australis*, *Debaryomyces* sp., *Tetracladium* sp. e *Leucosporidium fragarium*. Os táxons *Pseudogymnoascus* sp., *Penicillium* sp., *Mrakia blollopis*, *Vishniacozyma victoriae* e *Rhodotorula mucilaginosa* foram compartilhados entre os dois substratos.

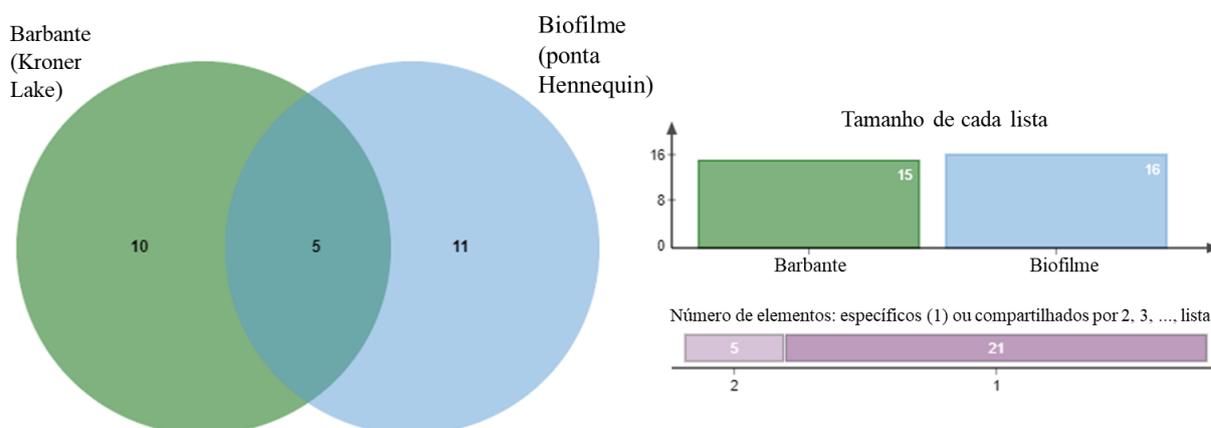


Figura 6. Diagrama de Venn demonstrando a similaridade de espécies fúngicas entre as amostras de barbante e biofilme obtidas de lagos antárticos.

5.1.3. Avaliação das atividades enzimáticas dos fungos cultiváveis

Dos 154 isolados fúngicos, 133 foram avaliados para a atividade das 11 enzimas (Erro! Fonte de referência não encontrada.), pois 21 isolados não cresceram ou foram contaminaram após o processo de preservação (**Tabela 5**). Para as enzimas lipase e gelatinase, não foi possível determinar a atividade enzimática com base na média do índice enzimático dos isolados, uma vez que a formação de halos não foi nítida e mensurável; devido a isso, os fungos foram avaliados como positivos (+) ou negativos (-).

A produção enzimática dos isolados variou a nível intraespecífico, uma vez que os isolados das mesmas espécies não foram capazes de produzir as mesmas enzimas. Dos 22 isolados de *Thelebolus globosus*, três produziram invertase, um amilase, nove protease, um celulase, dois esterase, um pectinase, um carragenase, um inulinase, 19 lipase e 17 gelatinase. Dentre os quatro isolados de *Helotiales* sp. 1, um produziu invertase, três amilase, dois protease, um celulase, dois foram bons produtores de celulase (índice enzimático maior ou igual a 2,0), um pectinase, dois agarase, um carragenase, três inulinase, três lipase e um gelatinase.

O único isolado testado de *Helotiales* sp. 2 foi capaz de produzir apenas invertase, protease, celulase, e inulinase. Dos oito isolados testados de *Antarctomyces psychrotrophicus*, quatro produziram protease, quatro celulase, sete lipase, um gelatinase e dois foram bons produtores de esterase. Os quatro isolados de *Mortierella amoeboides* não foram capazes de produzir nenhuma das enzimas testadas no presente trabalho. O único isolado testado de *Beauveria amorpha* produziu apenas protease e invertase, sendo considerado bom produtor dessa última.

Arthroderma sp., com um isolado testado, foi capaz de produzir apenas gelatinase. O isolado de *Pseudogymnoascus* sp. se mostrou capaz de produzir amilase, esterase, agarase, carragenase e gelatinase, sendo um bom produtor de protease, celulase e inulinase. Dos 27 isolados testados de *Pseudogymnoascus verrucosus*, todos produziram inulinase (nove bons produtores), nenhum foi capaz de produzir pectinase, apenas um não produziu esterase (dois bons produtores), apenas dois não produziram agarase (oito bons produtores), apenas três não produziram gelatinase, seis produziram invertase, 16 amilase, 24 protease (13 bons produtores), 19 celulase (dois bons produtores), 23 carragenase (três bons produtores) e oito lipase.

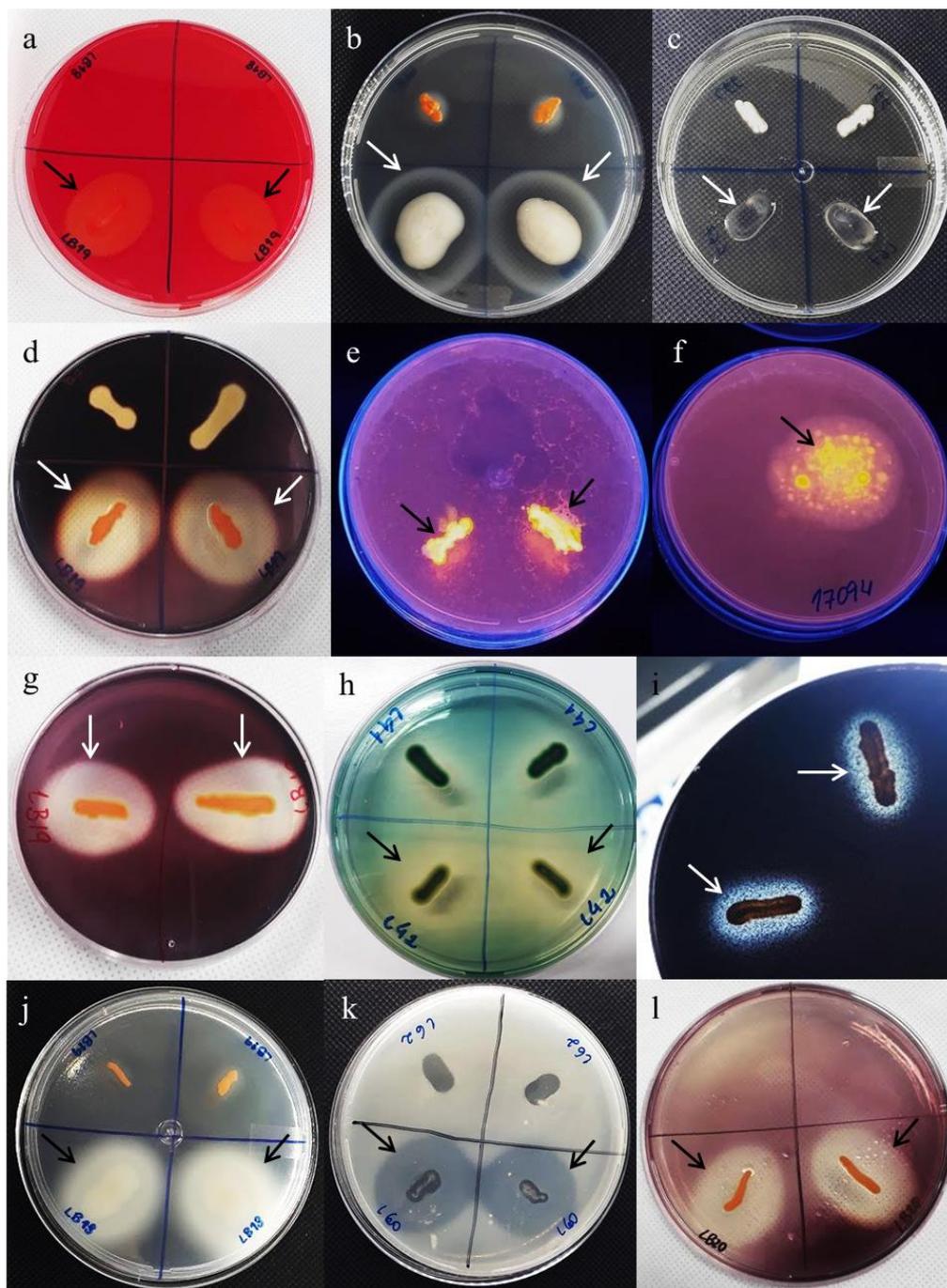


Figura 7. Observação da produção de enzimas extracelulares com base na formação de halos de hidrólise, os quais estão indicados por setas. **(a)** celulase (halo alaranjado no fundo vermelho), **(b)** protease (halo branco no fundo claro), **(c)** gelatinase (marca transparente de “derretimento” do meio de cultura), **(d)** agarase (halo claro no fundo roxo), **(e)** e **(f)** lipase (amarelo fluorescente no fundo rosa), **(g)** carragenase (halo claro no fundo roxo), **(h)** invertase (halo amarelo no fundo verde), **(i)** amilase (halo claro no fundo escuro), **(j)** esterase (halo branco no fundo claro), **(k)** pectinase (halo claro no fundo branco) e **(l)** inulinase (halo claro no fundo roxo). Fotos: L.M.D. de Souza.

Dos 10 isolados de *Leucosporidium muscorum*, todos produziram lipase e gelatinase, apenas um não foi capaz de produzir protease (três bons produtores) e apenas um não foi capaz de produzir carragenase, dois produziram invertase (um bom produtor), um esterase e seis inulinase (um bom produtor). Dentre os 19 isolados de *Goffeauzyma* sp., todos foram capazes de produzir protease (seis bons produtores) e esterase (todos bons produtores), apenas um não produziu invertase (17 bons produtores), apenas dois não produziram amilase (um bom produtor), apenas dois não produziram inulinase, apenas três não produziram agarase (um bom produtor), apenas três não produziram carragenase e 12 foram capazes de produzir lipase.

Dos 14 isolados de *Mrakia blollopis*, todos foram capazes de produzir protease (10 bons produtores) e apenas um não foi capaz de produzir lipase e carragenase, sendo que nove produziram invertase (todos bons produtores), 12 amilase, nove celulase (todos bons produtores), 12 esterase (dois bons produtores), 12 pectinase (todos bons produtores), nove agarase, três inulinase e quatro gelatinase. É importante ressaltar que o maior produtor enzimático do presente trabalho foi um isolado de *Mrakia blollopis* (LB21), que apresentou uma média de índice enzimático de $9,34 \pm 1,36$ para pectinase.

Dois isolados de *Rhodotorula mucilaginosa* foram testados, sendo que ambos foram capazes de produzir protease (todos bons produtores), esterase (um bom produtor) e lipase, e apenas um foi capaz de produzir invertase e carragenase. Dos três isolados de *Vishniacozyma victoriae*, todos foram capazes de produzir invertase (dois bons produtores), esterase (todos bons produtores), inulinase e lipase, apenas dois produziram protease e celulase, e apenas um produziu carragenase. Dentre os dois isolados de *Hamamotoa singularis*, ambos produziram protease (todos bons produtores), carragenase (um bom produtor), inulinase (um bom produtor) e gelatinase, e apenas um produziu agarase e lipase. O único isolado testado de *Cystobasidium laryngis* produziu apenas invertase e esterase, sendo que foi considerado bom produtor para a última.

Dos quatro isolados de *Leucosporidium fragarium*, todos produziram protease (dois bons produtores), esterase (todos bons produtores) e inulinase (todos bons produtores), apenas um não produziu invertase (dois bons produtores), agarase (três bons produtores), lipase e gelatinase, dois produziram celulase (todos bons produtores) e um amilase. O único isolado de *Holtermanniella wattica* produziu amilase, protease e agarase, e foi bom produtor de invertase, esterase e carragenase. O único isolado de *Debaryomyces* sp. produziu apenas esterase e protease, sendo considerado um bom produtor para a última. Dentre os cinco isolados de *Metschnikowia australis*, quatro produziram protease (todos bons produtores), dois inulinase, um carragenase e um lipase. Dos dois isolados de *Tetracladium* sp., ambos produziram amilase, protease, celulase (dois bons produtores), esterase,

pectinase, agarase (dois bons produtores), carragenase (um bom produtor), inulinase (dois bons produtores) e lipase, e um foi bom produtor de invertase.

Dessa forma, observamos atividade positiva para todas as onze enzimas avaliadas no presente trabalho, sendo que, dos 133 isolados testados, apenas os quatro (3%) isolados de *Mortierella amoeboides* não foram capazes de produzir nenhuma das enzimas. A enzima detectada com mais frequência pelos isolados foi protease (77%), seguida por lipase (63%), e a menos produzida foi pectinase (12%), seguida por celulase (32%). Em suma, 34 (67%) isolados se mostraram produtores de invertase e o isolado *Holtermanniella wattica* UFMGCB LB2 o melhor produtor; 54 (41%) isolados foram capazes de produzir amilase e o isolado *Goffeauzyma* sp. UFMGCB L68 foi o mais prolífero; 44 (43%) isolados foram considerados bons produtores de protease e *Metschnikowia australis* UFMGCB LB13 foi o melhor produtor; 16 (38%) isolados foram considerados bons produtores de celulase e o isolado *Mrakia blollopis* UFMGCB L76 o melhor produtor; 37 (47%) isolados foram bons produtores de esterase e o isolado *Holtermanniella wattica* UFMGCB LB2 o mais prolífero; 12 (75%) isolados se destacaram quanto à produção de pectinase e o isolado *Mrakia blollopis* UFMGCB LB21 o melhor produtor; 14 (23%) isolados produziram em destaque agarase, em especial *Pseudogymnoascus verrucosus* UFMGCB 17076; oito (11%) isolados foram bons produtores de carragenase e o isolado *Pseudogymnoascus verrucosus* UFMGCB 17076 o melhor produtor; 18 (25%) isolados bons produtores de inulinase e *Leucosporidium fragarium* UFMGCB LB4 o melhor produtor; 64 (48%) isolados foram capazes de produzir gelatinase.

Tabela 5. Médias dos Índices Enzimáticos (MIE) produzidos pelos fungos isolados de biofilme e de iscas de barbante dos lagos da Antártica.

Fungo	Índice Enzimático										LIP	GEL	
	UFMGCB	MIE											
		INV	AMI	PRO	CEL	EST	PEC	AGA	CAR	INU			
<i>Thelebolus globosus</i>	17082	-	-	-	-	1,05 ± 0,02	-	-	-	-	-	-	-
<i>T. globosus</i>	17083	-	-	1,6 ± 0,13	-	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>T. globosus</i>	18544	1,54 ± 0,17	-	1,7 ± 0,13	1,29 ± 0,03	-	1,14 ± 0,01	-	1,16 ± 0,04	1,22 ± 0,01	-	-	-
<i>T. globosus</i>	18540	1,26 ± 0,04	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>T. globosus</i>	17101	-	-	1,18 ± 0,01	-	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>T. globosus</i>	18536	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>T. globosus</i>	18535	1,35 ± 0,06	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>T. globosus</i>	18534	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>T. globosus</i>	18533	-	-	1,13 ± 0	-	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>T. globosus</i>	18531	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>T. globosus</i>	18529	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>T. globosus</i>	18528	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>T. globosus</i>	18525	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>T. globosus</i>	18524	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>T. globosus</i>	17100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>T. globosus</i>	17099	-	-	1,03 ± 0	-	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>T. globosus</i>	17096	-	-	1,16 ± 0,01	-	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>T. globosus</i>	17095	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>T. globosus</i>	17094	-	-	-	-	1,07 ± 0,05	-	-	-	-	-	+	-
<i>T. globosus</i>	17091	-	1,48 ± 0,08	1,17 ± 0,06	-	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>T. globosus</i>	17089	-	-	1,16 ± 0,02	-	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>T. globosus</i>	17087	-	-	1,21 ± 0,1	-	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>Helotiales</i> sp. 1	18546	1,54 ± 0,11	1,4 ± 0,03	1,48 ± 0,08	1,26 ± 0,1	-	-	-	1,09 ± 0	1,21 ± 0,05	-	-	-

Fungo	Índice Enzimático										LIP	GEL	
	UFMGCB	MIE											
		INV	AMI	PRO	CEL	EST	PEC	AGA	CAR	INU			
<i>Helotiales</i> sp. 1	17090	-	-	1,12 ± 0,04	-	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>Helotiales</i> sp. 1	17093	-	1,41 ± 0,03	-	-	2,24 ± 0,01	-	1,45 ± 0,05	-	1,97 ± 0,07	-	+	-
<i>Helotiales</i> sp. 1	18552	-	1,36 ± 0,1	-	-	2,53 ± 0,1	1,19 ± 0,02	1,16 ± 0,02	-	1,83 ± 0,33	-	+	-
<i>Helotiales</i> sp. 2	18542	1,39 ± 0,03	-	1,63 ± 0	1,31 ± 0,06	-	-	-	-	1,2 ± 0,02	-	-	-
<i>Antarctomyces psychrotrophicus</i>	17039	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>A. psychrotrophicus</i>	17040	-	-	1,3 ± 0,09	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>A. psychrotrophicus</i>	17045	-	-	1,44 ± 0,23	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>A. psychrotrophicus</i>	17047	-	-	1,17 ± 0,11	-	2 ± 0,12	-	-	-	-	-	+	-
<i>A. psychrotrophicus</i>	17056	-	-	-	1,17 ± 0,02	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>A. psychrotrophicus</i>	17057	-	-	-	1,28 ± 0,06	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>A. psychrotrophicus</i>	17060	-	-	-	1,51 ± 0	2,74 ± 0,05	-	-	-	-	-	+	-
<i>A. psychrotrophicus</i>	17081	-	-	1,96 ± 0,29	1,94 ± 0,06	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Mortierella amoeboides</i>	17041	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. amoeboides</i>	17042	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. amoeboides</i>	17043	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. amoeboides</i>	17075	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Beauveria amorpha</i>	17049	2,21 ± 0,02	-	1,96 ± 0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Arthroderma</i> sp.	17052	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	17051	-	1,51 ± 0,01	2,08 ± 0,18	3,01 ± 0,02	1,88 ± 0,01	-	1,52 ± 0,09	1,69 ± 0,29	2,07 ± 0,1	-	-	+
<i>Pseudogymnoascus verrucosus</i>	17046	-	1,19 ± 0,08	1,55 ± 0,3	1,24 ± 0,05	1,5 ± 0,09	-	1,24 ± 0,07	1,49 ± 0,16	1,69 ± 0,06	-	-	+
<i>P. verrucosus</i>	17050	-	1,3 ± 0,15	2,07 ± 0	2,48 ± 0,05	1,71 ± 0,06	-	2,15 ± 0,02	1,45 ± 0,01	1,97 ± 0,16	-	-	+
<i>P. verrucosus</i>	17054	-	-	2,32 ± 0,16	1,48 ± 0,04	1,77 ± 0,12	-	1,62 ± 0,11	1,61 ± 0,01	1,75 ± 0,14	-	-	+
<i>P. verrucosus</i>	17055	1,66 ± 0,15	-	2,92 ± 0,22	1,56 ± 0,24	1,76 ± 0,2	-	1,58 ± 0,03	1,55 ± 0,35	1,91 ± 0,25	-	-	+

Fungo	Índice Enzimático										LIP	GEL
	UFMGCB	MIE										
		INV	AMI	PRO	CEL	EST	PEC	AGA	CAR	INU		
<i>P. verrucosus</i>	17058	-	1,58 ± 0	1,81 ± 0,06	1,39 ± 0,04	1,44 ± 0,04	-	2,57 ± 0,01	1,89 ± 0,1	1,83 ± 0,1	+	+
<i>P. verrucosus</i>	17059	-	-	1,53 ± 0,05	-	1,4 ± 0,16	-	-	-	1,29 ± 0,09	+	+
<i>P. verrucosus</i>	17061	-	1,41 ± 0,01	1,82 ± 0,29	2,09 ± 0,11	1,57 ± 0,14	-	2,02 ± 0,58	1,25 ± 0,08	1,88 ± 0,14	-	+
<i>P. verrucosus</i>	17062	-	-	2,1 ± 0,14	1,65 ± 0,07	2,39 ± 0,12	-	3,08 ± 0,44	1,62 ± 0,03	2 ± 0,17	-	-
<i>P. verrucosus</i>	17063	-	1,53 ± 0,24	2,25 ± 0,03	1,48 ± 0,17	1,89 ± 0,18	-	1,48 ± 0,21	1,42 ± 0,12	1,95 ± 0,04	-	+
<i>P. verrucosus</i>	17064	-	1,35 ± 0,05	1,98 ± 0,04	1,22 ± 0	1,64 ± 0,07	-	2,13 ± 0,03	2,26 ± 0,04	2,04 ± 0,16	+	+
<i>P. verrucosus</i>	17065	-	-	2,41 ± 0,18	1,39 ± 0,08	2,04 ± 0,14	-	1,67 ± 0,02	1,73 ± 0,18	1,6 ± 0,11	-	+
<i>P. verrucosus</i>	17066	-	-	2,01 ± 0,64	-	1,7 ± 0,18	-	1,42 ± 0,12	-	1,54 ± 0,32	-	+
<i>P. verrucosus</i>	17067	-	-	-	-	1,16 ± 0,03	-	1,16 ± 0,02	-	1,24 ± 0,03	-	+
<i>P. verrucosus</i>	17068	-	1,12 ± 0,03	-	-	1,7 ± 0,21	-	2,77 ± 0,01	1,34 ± 0,05	1,65 ± 0,32	-	-
<i>P. verrucosus</i>	17069	1,25 ± 0,01	-	2,33 ± 0,13	1,44 ± 0,05	1,9 ± 0,06	-	2,24 ± 0,01	1,81 ± 0,04	1,86 ± 0,24	-	+
<i>P. verrucosus</i>	17071	-	1,18 ± 0,1	1,79 ± 0,1	1,18 ± 0,03	1,76 ± 0,14	-	1,56 ± 0	1,49 ± 0,14	2,05 ± 0,05	+	-
<i>P. verrucosus</i>	17072	-	1,3 ± 0,06	1,62 ± 0,14	-	1,29 ± 0,08	-	1,26 ± 0,09	1,88 ± 0,11	2,03 ± 0,08	-	+
<i>P. verrucosus</i>	17074	-	-	2,18 ± 0,04	1,6 ± 0,07	1,86 ± 0,21	-	1,42 ± 0,02	1,51 ± 0,02	1,7 ± 0,02	-	+
<i>P. verrucosus</i>	17076	1,34 ± 0,01	1,48 ± 0,06	2,02 ± 0,01	1,68 ± 0,05	1,39 ± 0,12	-	3,29 ± 0,35	2,55 ± 0,12	2,44 ± 0,09	-	+
<i>P. verrucosus</i>	17077	1,34 ± 0,07	1,15 ± 0,16	2,14 ± 0,17	1,39 ± 0,03	1,45 ± 0,08	-	1,82 ± 0,12	2 ± 0,18	2,48 ± 0,04	+	+
<i>P. verrucosus</i>	17079	1,5 ± 0,06	1,3 ± 0,01	1,54 ± 0,13	1,25 ± 0,05	1,45 ± 0,1	-	1,67 ± 0,09	1,98 ± 0	2,37 ± 0,15	+	+
<i>P. verrucosus</i>	17080	1,41 ± 0,07	1,38 ± 0,02	2,08 ± 0,46	1,54 ± 0,07	1,4 ± 0,05	-	1,8 ± 0,02	1,87 ± 0,1	2,06 ± 0,06	-	+
<i>P. verrucosus</i>	17070	-	-	1,8 ± 0,02	-	1,46 ± 0,1	-	1,63 ± 0,21	1,53 ± 0,02	2,24 ± 0,13	-	+
<i>P. verrucosus</i>	17073	-	1,28 ± 0,18	1,59 ± 0,11	1,53 ± 0,21	1,21 ± 0,07	-	1,56 ± 0,14	1,79 ± 0,01	1,89 ± 0,15	-	+
<i>P. verrucosus</i>	17044	-	1,24 ± 0,02	1,63 ± 0,09	1,73 ± 0,06	1,72 ± 0	-	1,47 ± 0,13	1,85 ± 0,01	1,82 ± 0,25	-	+
<i>P. verrucosus</i>	17038	-	-	-	-	-	-	-	-	1,22 ± 0,05	+	+
<i>P. verrucosus</i>	17053	-	1,26 ± 0,02	2,01 ± 0,09	-	1,51 ± 0,01	-	1,59 ± 0,22	1,81 ± 0,08	1,71 ± 0,16	+	+
<i>Leucosporidium muscorum</i>	L3	-	-	1,87 ± 0,06	-	-	-	-	1,68 ± 0,2	-	+	+
<i>L. muscorum</i>	L33	-	-	1,6 ± 0,05	-	1,38 ± 0,03	-	-	1,56 ± 0,05	-	+	+

Fungo	Índice Enzimático										LIP	GEL
	UFMGCB	MIE										
		INV	AMI	PRO	CEL	EST	PEC	AGA	CAR	INU		
<i>L. muscorum</i>	L52	-	-	-	-	-	-	-	1,13 ± 0,01	-	+	+
<i>L. muscorum</i>	L56	2,13 ± 0,09	-	1,98 ± 0,02	-	-	-	-	1,59 ± 0,17	2,27 ± 0,05	+	+
<i>L. muscorum</i>	L59	1,97 ± 0,13	-	2,16 ± 0,11	-	-	-	-	1,68 ± 0,05	1,89 ± 0,16	+	+
<i>L. muscorum</i>	L63	-	-	1,98 ± 0,02	-	-	-	-	1,7 ± 0,03	1,69 ± 0,16	+	+
<i>L. muscorum</i>	L67	-	-	2,15 ± 0,29	-	-	-	-	-	1,53 ± 0,26	+	+
<i>L. muscorum</i>	L70	-	-	1,69 ± 0,01	-	-	-	-	1,56 ± 0,03	1,4 ± 0,22	+	+
<i>L. muscorum</i>	L75	-	-	1,86 ± 0,01	-	-	-	-	1,42 ± 0,01	1,52 ± 0,17	+	+
<i>L. muscorum</i>	L81	-	-	2,22 ± 0,16	-	-	-	-	1,13 ± 0,01	-	+	+
<i>Goffeauzyma</i> sp.	L4	2,25 ± 0,07	1,46 ± 0,04	2,28 ± 0,02	-	2,96 ± 0,16	-	1,83 ± 0,03	1,3 ± 0,04	1,47 ± 0,09	+	-
<i>Goffeauzyma</i> sp.	L6	1,99 ± 0,03	1,6 ± 0,17	2,2 ± 0,03	-	2,96 ± 0,27	-	1,32 ± 0,09	1,17 ± 0,01	1,51 ± 0,13	+	-
<i>Goffeauzyma</i> sp.	L7	2,46 ± 0,16	1,68 ± 0,22	2,4 ± 0,16	-	2,83 ± 0,14	-	1,93 ± 0,26	1,28 ± 0,03	1,39 ± 0,11	-	-
<i>Goffeauzyma</i> sp.	L10	2,21 ± 0,09	1,76 ± 0,03	2,41 ± 0,18	-	2,63 ± 0,36	-	1,45 ± 0,14	-	1,42 ± 0,03	-	-
<i>Goffeauzyma</i> sp.	L11	2,54 ± 0,19	-	2,15 ± 0,01	-	3,03 ± 0,09	-	1,27 ± 0,18	-	1,29 ± 0,01	-	-
<i>Goffeauzyma</i> sp.	L16	2,59 ± 0,3	1,53 ± 0,22	1,42 ± 0,04	-	2,58 ± 0,03	-	1,57 ± 0,07	1,19 ± 0	1,26 ± 0,13	+	-
<i>Goffeauzyma</i> sp.	L25	2,22 ± 0,02	1,43 ± 0,22	1,42 ± 0,15	-	2,62 ± 0,03	-	1,96 ± 0,13	1,28 ± 0,07	1,41 ± 0,07	-	-
<i>Goffeauzyma</i> sp.	L27	2,4 ± 0,35	1,54 ± 0	1,54 ± 0	-	2,76 ± 0,07	-	1,54 ± 0,09	1,2 ± 0,06	1,58 ± 0,05	-	-
<i>Goffeauzyma</i> sp.	L28	-	1,62 ± 0,03	1,97 ± 0,02	-	2,63 ± 0,05	-	1,3 ± 0,01	1,21 ± 0,01	-	+	-
<i>Goffeauzyma</i> sp.	L34	2,15 ± 0,01	1,57 ± 0,01	2,67 ± 0,35	-	2,7 ± 0	-	1,71 ± 0,1	1,33 ± 0,05	-	+	-
<i>Goffeauzyma</i> sp.	L39	2,15 ± 0,27	1,67 ± 0,16	1,53 ± 0,06	-	2,74 ± 0,02	-	1,69 ± 0,14	1,16 ± 0,04	1,32 ± 0,04	+	-
<i>Goffeauzyma</i> sp.	L42	2,56 ± 0,1	1,56 ± 0,01	1,55 ± 0,08	-	3,13 ± 0,2	-	1,52 ± 0,08	1,33 ± 0,05	1,32 ± 0,06	+	-
<i>Goffeauzyma</i> sp.	L43	2,13 ± 0,34	1,54 ± 0,13	1,75 ± 0,07	-	2,94 ± 0,42	-	1,86 ± 0,09	1,24 ± 0	1,48 ± 0,19	+	-
<i>Goffeauzyma</i> sp.	L50	2,43 ± 0,05	1,38 ± 0,07	1,83 ± 0,17	-	2,45 ± 0,01	-	2,08 ± 0,25	1,26 ± 0,05	1,52 ± 0,09	-	-
<i>Goffeauzyma</i> sp.	L53	2,43 ± 0,02	1,56 ± 0,03	1,63 ± 0,04	-	3,21 ± 0,13	-	1,45 ± 0,15	1,2 ± 0,02	1,41 ± 0,08	+	-
<i>Goffeauzyma</i> sp.	L62	2,31 ± 0,13	1,52 ± 0,07	1,62 ± 0,21	-	2,68 ± 0,13	-	1,46 ± 0,05	1,22 ± 0	1,31 ± 0,09	+	-
<i>Goffeauzyma</i> sp.	L65	2,21 ± 0,1	1,55 ± 0,06	1,34 ± 0,03	-	2,73 ± 0,15	-	-	1,14 ± 0,06	1,3 ± 0,06	+	-

Fungo	UFMGCB	Índice Enzimático									LIP	GEL
		MIE										
		INV	AMI	PRO	CEL	EST	PEC	AGA	CAR	INU		
<i>Goffeauzyma</i> sp.	L68	2,14 ± 0,19	2,09 ± 0,03	1,54 ± 0,07	-	2,6 ± 0,02	-	-	-	1,53 ± 0,12	+	-
<i>Goffeauzyma</i> sp.	L74	2,29 ± 0,05	-	1,32 ± 0,02	-	2,89 ± 0	-	-	1,24 ± 0,03	1,45 ± 0,02	-	-
<i>Mrakia lollopolis</i>	L5	2,64 ± 0,19	1,4 ± 0,09	2,92 ± 0,37	3,02 ± 0,5	1,65 ± 0,06	2,64 ± 0,08	1,71 ± 0,19	1,39 ± 0,14	-	+	+
<i>M. lollopolis</i>	L14	2,28 ± 0,11	1,88 ± 0,26	1,38 ± 0,07	-	3,06 ± 0,24	-	1,46 ± 0,03	-	-	-	-
<i>M. lollopolis</i>	L18	-	-	1,97 ± 0,01	-	1,56 ± 0,16	-	-	1,49 ± 0,38	-	+	+
<i>M. lollopolis</i>	L29	-	1,45 ± 0,01	2,78 ± 0,17	2,83 ± 0,23	1,45 ± 0,1	3,28 ± 0,06	1,3 ± 0,06	1,27 ± 0,09	-	+	-
<i>M. lollopolis</i>	L32	-	1,48 ± 0,21	2,9 ± 0,04	-	1,33 ± 0,01	2,63 ± 0,33	1,76 ± 0,4	1,23 ± 0,02	-	+	-
<i>M. lollopolis</i>	L38	2,01 ± 0,28	1,71 ± 0,01	1,88 ± 0,1	3,4 ± 0,12	-	2,82 ± 0,21	1,42 ± 0,18	1,37 ± 0,08	-	+	+
<i>M. lollopolis</i>	L46	2,65 ± 0,03	1,4 ± 0,05	3,04 ± 0,36	2,54 ± 0,05	2,15 ± 0,11	3,06 ± 0,24	1,44 ± 0,08	1,15 ± 0	1,49 ± 0,11	+	-
<i>M. lollopolis</i>	L54	-	-	2,64 ± 0,17	-	1,75 ± 0,03	2,08 ± 0,35	1,26 ± 0,03	1,7 ± 0,09	1,63 ± 0,06	+	-
<i>M. lollopolis</i>	L60	2,74 ± 0,39	1,27 ± 0,09	3,46 ± 0,1	2,59 ± 0,08	1,63 ± 0,06	3,48 ± 0,1	-	1,24 ± 0,01	1,36 ± 0,13	+	-
<i>M. lollopolis</i>	L66	2,63 ± 0,64	1,47 ± 0,22	3,54 ± 0,05	-	1,7 ± 0,02	3,29 ± 0,12	1,56 ± 0,12	1,59 ± 0,16	-	+	-
<i>M. lollopolis</i>	L71	2,68 ± 0,1	1,3 ± 0,06	2,82 ± 0,16	3,42 ± 0,16	1,63 ± 0	3,18 ± 0,03	-	1,36 ± 0,02	-	+	-
<i>M. lollopolis</i>	L76	-	1,56 ± 0,12	1,79 ± 0,01	4,28 ± 0,11	-	2,45 ± 0,04	1,52 ± 0,06	1,54 ± 0,19	-	+	-
<i>M. lollopolis</i>	L77	2,39 ± 0,47	1,34 ± 0,01	3,17 ± 0,02	3,64 ± 0,14	1,63 ± 0,05	2,9 ± 0,05	-	1,47 ± 0,16	-	+	-
<i>M. lollopolis</i>	LB21	2,32 ± 0,09	1,37 ± 0	3,16 ± 0,09	3,59 ± 0,47	1,4 ± 0,09	9,34 ± 1,36	-	1,48 ± 0,28	-	+	+
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	L36	-	-	2,41 ± 0	-	1,45 ± 0,12	-	-	-	-	+	-
<i>R. mucilaginosa</i>	LB15	1,94 ± 0,02	-	2,67 ± 0,01	-	2,66 ± 0,09	-	-	1,2 ± 0,07	-	+	-
<i>Vishniacozyma victoriae</i>	L41	1,74 ± 0,11	-	1,66 ± 0,15	1,97 ± 0,04	3,5 ± 0,01	-	-	1,24 ± 0,03	1,42 ± 0,02	+	-
<i>V. victoriae</i>	L69	2 ± 0,02	-	-	-	2,83 ± 0,62	-	-	-	1,51 ± 0,01	+	-
<i>V. victoriae</i>	LB5	2,42 ± 0,17	-	1,72 ± 0,08	1,74 ± 0,56	4,28 ± 0,43	-	-	-	1,54 ± 0,02	+	-
<i>Hamamotoa singularis</i>	L51	-	-	2,01 ± 0,14	-	-	-	-	1,23 ± 0,04	1,81 ± 0,11	-	+
<i>H. singularis</i>	L55	-	-	2,14 ± 0,15	-	-	-	1,97 ± 0,14	2,16 ± 0,28	2,11 ± 0,11	+	+
<i>Cystobasidium</i>	L72	1,81 ± 0,01	-	-	-	3,21 ± 0,07	-	-	-	-	-	-

Fungo	UFMGCB	Índice Enzimático									LIP	GEL
		MIE										
		INV	AMI	PRO	CEL	EST	PEC	AGA	CAR	INU		
<i>laryngis</i>												
<i>Leucosporidium fragarium</i>	LB1	1,93 ± 0,04	-	2,56 ± 0,03	-	4,31 ± 0,01	-	2,61 ± 0,29	-	2,67 ± 0,29	-	+
<i>L. fragarium</i>	LB3	2,6 ± 0,09	-	1,87 ± 0,13	2,13 ± 0,11	3,95 ± 0,01	-	2,64 ± 0,17	2,32 ± 0,24	2,73 ± 0,03	+	-
<i>L. fragarium</i>	LB4	2,51 ± 0,14	-	1,99 ± 0,02	2,31 ± 0,18	3,08 ± 0,43	-	3,3 ± 0,32	2,42 ± 0,15	3,81 ± 0,12	+	+
<i>L. fragarium</i>	LB22	-	1,58 ± 0,31	2,44 ± 0,24	-	2,65 ± 0,32	-	-	1,52 ± 0,25	2,83 ± 0,56	+	+
<i>Holtermanniella wattica</i>	LB2	2,9 ± 0,37	1,73 ± 0,08	1,45 ± 0,08	-	4,64 ± 0,17	-	1,84 ± 0,03	2 ± 0,13	-	-	-
<i>Debaryomyces</i> sp.	LB7	-	-	2,5 ± 0,12	-	1,53 ± 0,01	-	-	-	-	-	-
<i>Metschnikowia australis</i>	LB6	-	-	2,72 ± 0,06	-	-	-	-	1,16 ± 0,01	-	-	-
<i>M. australis</i>	LB8	-	-	2,86 ± 0,15	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. australis</i>	LB9	-	-	3,35 ± 0,01	-	-	-	-	-	1,73 ± 0,18	-	-
<i>M. australis</i>	LB13	-	-	3,6 ± 0,1	-	-	-	-	-	1,72 ± 0,01	-	-
<i>M. australis</i>	LB14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>Tetracladium</i> sp.	LB19	-	1,61 ± 0,1	1,2 ± 0,03	2,25 ± 0,05	1,48 ± 0,06	1,41 ± 0,07	3,09 ± 0,13	2,52 ± 0,3	2,41 ± 0,13	+	-
<i>Tetracladium</i> sp.	LB20	2,14 ± 0,39	1,39 ± 0,04	1,69 ± 0,02	2,48 ± 0,08	1,79 ± 0,2	1,74 ± 0,03	2,28 ± 0,13	1,99 ± 0,11	3,12 ± 0,15	+	-

UFMGCB = Coleção de Micro-organismos e Células da Universidade Federal de Minas Gerais. MIE = Média do Índice Enzimático, INV = Invertase, AMI = Amilase, PRO = Protease, CEL = Celulase, EST = Esterase, PEC = Pectinase, AGA = Agarase, CAR = Carragenase, INU = Inulinase, LIP = Lipase e GEL = Gelatinase. + (positivo) e - (negativo). Negrito = bons produtores (≥ 2) e grifado cinza = melhor produtor ($9,34 \pm 1,36$).

5.1.4. Avaliação da Produção de Biossurfactantes

Os mesmos 133 isolados citados anteriormente foram submetidos ao teste de colapso da gota, o qual foi realizado em duplicata. Todos os isolados apresentaram resultado negativo, ou seja, não houve o colapso da gota de óleo mineral, indicando que nenhum deles foi capaz de produzir biossurfactantes.

5.2. Identificação e distribuição dos táxons não cultiváveis

Das iscas de barbante foram detectados 258.326 leituras de DNA distribuídas em 34 ASVs fúngicos (**Figura 8** e **Tabela 6**), pertencentes aos filos *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Mortierellomycota*, *Chytridiomycota* e *Rozellomycota*. A maioria das ASVs fúngicas (27) foi detectada no barbante obtido do lago Hennequin (Ilha Rei George); no lago Soto (Ilha Deception) foram detectadas 13 ASVs. Entre as 34 ASVs fúngicos, apenas seis (17,6%) foram detectadas em ambos os lagos (**Figura 9**), incluindo os táxons mais dominantes *Tetracladium marchalianum* e *Tetracladium* sp. Quatorze ASVs foram identificadas apenas em níveis taxonômicos elevados (reino, filo, classe, ordem, família) e podem representar táxons ausentes nas bases de dados consultadas ou serem novas espécies e/ou novos registros para a Antártica. *Tetracladium marchalianum*, *Tetracladium* sp., *Rozellomycota* sp., Fungal sp. 1 e Fungal sp. 2 foram os táxons mais comuns nas comunidades de fungos dos lagos e *T. marchalianum* e *Tetracladium* sp. os mais abundantes. No entanto, dentro de ambas as comunidades, a maioria dos fungos foi representada por táxons intermediários e raros.

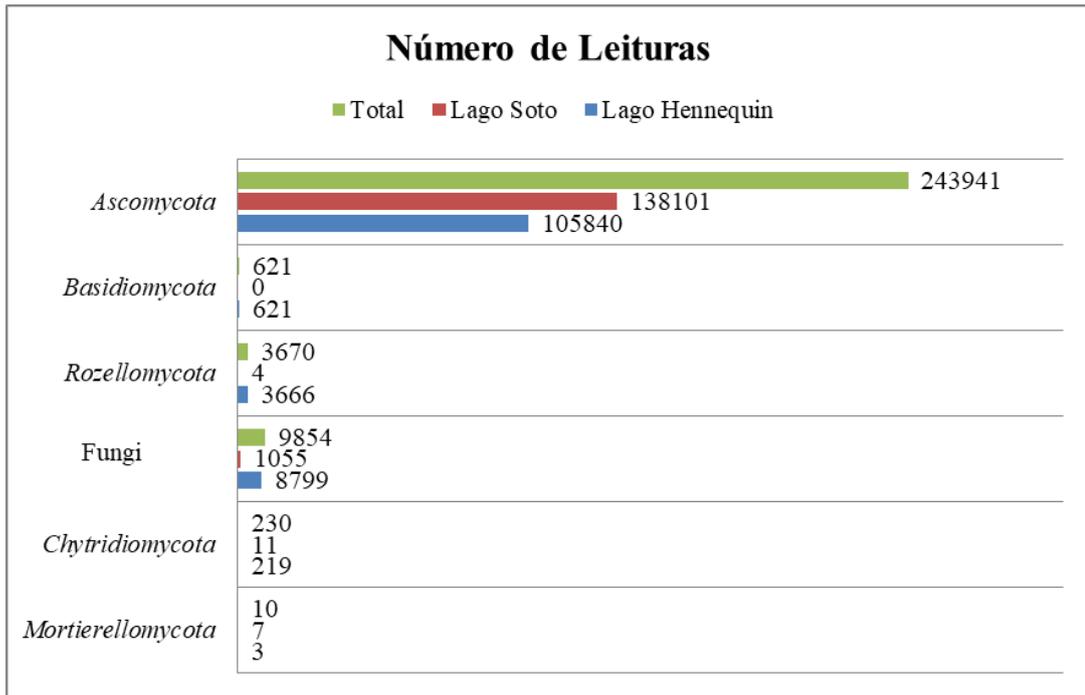


Figura 8. Número de seqüências de amplicons variantes de fungos (ASVs) detectadas nas iscas de barbante implantadas no Lago Hennequin (Ilha Rei George) e no Lago Soto (Ilha Deception), Antártica.

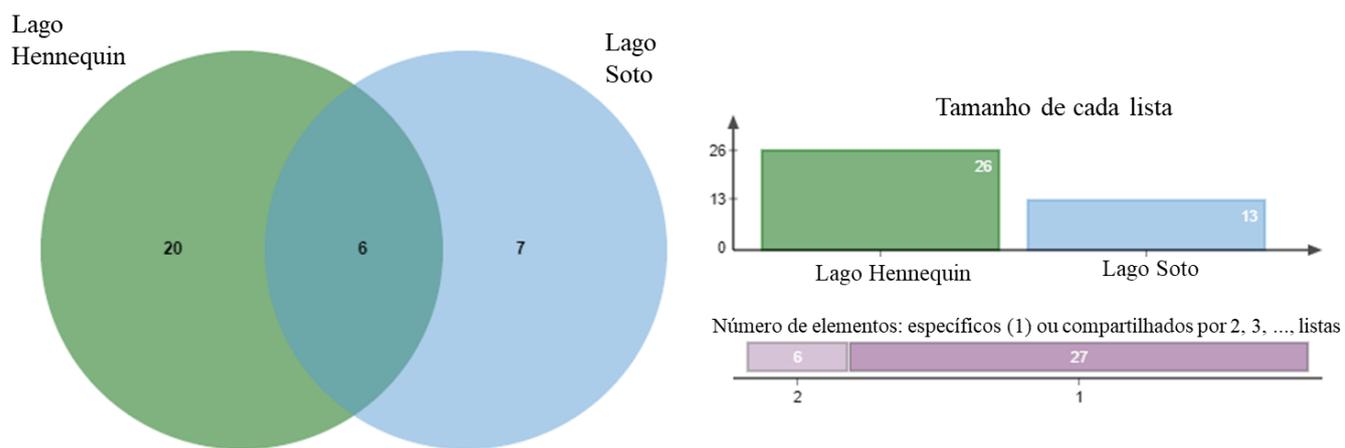


Figura 9. Diagrama de Venn demonstrando a similaridade das comunidades de fungos não cultiváveis detectados nas amostras de barbante dos lagos Hennequin (Ilha Rei George) e Soto (Ilha Deception).

Tabela 6. Número de leituras de sequências de amplicons variantes (ASVs) detectadas nas iscas de barbante depositadas por dois anos em lagos das Ilhas Shetland do Sul, Antártica.

Filo	ASV*	Lago Hennequin (Ilha Rei George)	Ilha Deception (Lago Soto)	Total
	<i>Tetracladium marchalianum</i>	5.971**	136.834	142,805
	<i>Tetracladium</i> sp.	98.363	1.029	99.392
	<i>Thelebolus globosus</i>	627	0	627
	<i>Arthoniomycetes</i> sp.	543	0	543
	<i>Helotiales</i> sp.	220	0	220
	<i>Microdochium lycopodium</i>	0	190	190
	<i>Gyoeerffyyella entomobryoides</i>	42	0	42
<i>Ascomycota</i>	<i>Alatospora acuminata</i>	28	0	28
	<i>Knufia peltigerae</i>	25	0	25
	<i>Penicillium</i> sp.	0	22	22
	<i>Chalara pseudoaffinis</i>	14	0	14
	<i>Penicillium herquei</i>	0	14	14
	<i>Leotiomycetes</i> sp.	0	7	7
	<i>Cladosporium</i> sp.	0	5	5
	<i>Hypocreales</i> sp.	4	0	4
	<i>Ramalinaceae</i> sp.	3	0	3
	<i>Microbotryomycetes</i> sp.	276	0	276
	<i>Mrakia frigida</i>	233	0	233
	<i>Microbotryomycetes</i> sp.	43	0	43
<i>Basidiomycota</i>	<i>Goffeauzyma</i> sp.	20	0	20
	<i>Glaciozyma antarctica</i>	18	0	18
	<i>Pucciniomycetes</i> sp.	13	0	13
	<i>Mastigobasidium</i> sp.	11	0	11
	<i>Leucosporidiaceae</i> sp.	7	0	7
	<i>Mortierella gamsii</i>	0	5	5
<i>Mortierellomycota</i>	<i>Mortierella</i> sp.	3	0	3
	<i>Mortierella parvispora</i>	0	2	2
	<i>Chytridiomycota</i> sp. 1	189	11	200
<i>Chytridiomycota</i>	<i>Rhizophyidium</i> sp.	25	0	25
	<i>Chytridiomycota</i> sp. 2	3	0	3
	<i>Paranamyces uniporus</i>	2	0	2
	<i>Rozellomycota</i> sp.	3.666	4	3.670
<i>Rozellomycota</i>	Fungal sp. 1	5.096	996	6.092
	Fungal sp. 2	3.703	59	3.762

*ASVs = sequências de amplicons variantes. **número de leituras.

5.2.1. Análise da diversidade da comunidade fúngica não cultivável

As curvas de rarefação de Mao Tao das comunidades fúngicas de ambos os lagos, consideradas separadamente e da comunidade fúngica total, alcançaram a assíntota (**Figura 10**), indicando que os dados fornecem uma boa descrição da amostragem obtida. A comunidade fúngica total detectada apresentou índices moderados de diversidade (Fisher α), riqueza (Margalef) e dominância (Simpson). No entanto, os índices diferiram entre os lagos (**Tabela 7**). Os maiores índices de diversidade fúngica foram detectados no Lago Hennequin.

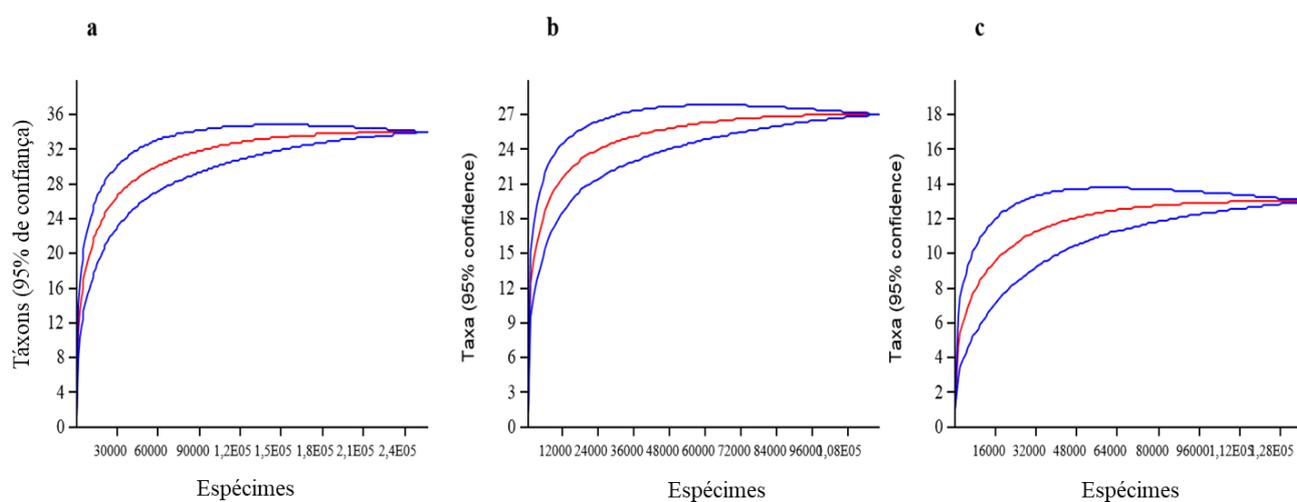


Figura 10. Curvas de rarefação de sequência de amplicons variantes de fungos (ASVs) obtidas de iscas de barbante: **(a)** comunidade fúngica total em ambos os lagos, **(b)** Lago Hennequin, Ilha Rei George e **(c)** Lago Soto, Ilha Deception, Ilhas Shetland do Sul, Antártica. As linhas azuis representam limites de confiança de 95%.

Tabela 7. Índices ecológicos do DNA fúngico de água doce recuperado de iscas de barbante depositadas no Lago Hennequin, Ilha Rei George e Lago Soto, Ilha Deception, Ilha Shetlands do Sul, Antártica.

Índice	Lago Hennequin (Ilha Rei George)	Lago Soto (Ilha Deception)	Total
Número de leituras	119.148	139.178	258.326
Número de ASVs	27	13	34
Fisher- α	2,5	1,11	3,0
Margalef	2,22	1,0	2,64
Simpson	0,31	0,03	0,55
Temperatura (°C)	6,5	4,9	-
Condutividade (mS cm ⁻¹)	105	313	-
pH	9	9,2	-

ASVs = sequências de amplicons variantes.

6. DISCUSSÃO

Isolamento e identificação de fungos cultiváveis

Existem poucos relatos detalhados de comunidades de fungos em lagos de água continental da Antártica, a maioria deles se encontra na Antártica marítima em comparação com aqueles na Antártica continental (Ellis-Evans, 1996; Brunatti *et al.*, 2009; Gonçalves *et al.*, 2012; Ogaki *et al.*, 2019a). Em relação à diversidade da microbiota lacustre, há variação nas comunidades de micro-organismos de acordo com o gradiente de temperatura que ocorre latitudinalmente no continente (Ogaki *et al.*, 2019a). Nesse trabalho observamos que os índices de Fisher (diversidade) e Margalef (riqueza) apresentaram maiores valores no lago com pH mais baixo e condutividade mais alta (Kroner Lake, Ilha Deception – biofilme), ou seja, possivelmente há uma maior quantidade de matéria orgânica na água desse lago. Além disso, nota-se que o índice de Simpson (dominância) foi menor nesse lago com pH mais baixo e alta condutividade, ou seja, menos táxons dominaram as amostragens do mesmo.

Brunatti *et al.* (2009) analisaram a diversidade de fungos e sua bioprospecção na região de Victoria Land; eles isolaram fungos de lagos nas Colinas Larsemann (Lagos Manning e Rei), Colinas Vestfold (Lagos Ace e Druzby) e Vales Secos McMurdo (Lagos Fryxell e Hoare). Nesse estudo foram identificados gêneros de fungos psicrófilos como *Thelebolus* e *Pseudogymnoascus*, bem como as espécies cosmopolitas adaptadas ao frio, como *Acremonium*, *Aspergillus*, *Beauveria*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Debaromyces* e *Penicillium*. Propágulos fúngicos de táxons pertencentes aos gêneros *Rhodotorula*, *Aureobasidium*, *Penicillium*, *Cystofilobasidium*, *Aspergillus*, *Cryptococcus* e *Pseudozyma* foram detectados em antigas seções de gelo do Lago Vostok da Antártica que tinham de 3-5 mil anos (D'Elia *et al.*, 2009), bem como em seções de gelo glacial profundas de 1-2 milhões de anos. Esses dados indicaram que o Lago Vostok contém uma mistura de espécies de fungos psicrotolerantes heterotróficos (D'Elia *et al.*, 2009). Espécies de leveduras dos antigos gêneros polifiléticos *Rhodotorula* e *Cryptococcus* foram encontradas nas camadas glaciais antigas e profundas do centro do Lago Vostok (Poglazova *et al.*, 2001; Abyzov *et al.*, 2004).

Bacias lacustres permanentemente cobertas de gelo localizadas nos Vales Taylor e Miers (incluindo duas amostras do Lago Bonney) foram analisadas com base na diversidade e na composição da comunidade fúngica utilizando um método de análise independente de cultura (Rojas-Jimenez *et al.*, 2017). *Rozellomycota* e *Chytridiomycota* dominavam nas comunidades de fungos de todos os lagos e *Rozellomycota* era particularmente dominante nos lagos Miers, Bonney West e Fryxell, enquanto *Chytridiomycota* era dominante em Bonney East e Hoare (Rojas-Jimenez *et al.*,

2017). Além disso, membros de *Ascomycota*, *Mortierellomycota*, *Blastocladiomycota* e *Basidiomycota* também estiveram presentes; entre eles *Basidiomycota* foi dominante na camada superior do Lago Hoare e os principais gêneros identificados foram *Glaciozyma* e *Mrakia* (Rojas-Jimenez *et al.*, 2017; Ogaki *et al.*, 2019a). Rogers *et al.* (2013) utilizaram metagenômica/metatranscriptômica para analisar o gelo derretido do Lago Vostok e observaram que apenas cerca de 6% das sequências únicas eram mais próximas de eucariotos. Desses, foram identificados táxons os filos *Ascomycota*, *Basidiomycota* e *Mucoromycota*.

O Filo *Ascomycota* foi o mais representado dentre as espécies encontradas no presente trabalho, apresentando gêneros que incluem espécies cosmopolitas adaptadas ao frio e endêmicas. Espécies do gênero *Pseudogymnoascus*, detectadas tanto nas iscas de barbante quanto no biofilme, são frequentemente encontradas em regiões polares e são abundantes na Antártica, onde podem representar novas espécies endêmicas que apresentem papel ecológico desconhecido (Rosa *et al.*, 2019b). Segundo Diaz *et al.* (2019), esses fungos são produtores de metabólitos secundários com propriedades bioativas relevantes e de enzimas com potenciais aplicações biotecnológicas. *Pseudogymnoascus verrucosus*, a espécie com o maior número de isolados encontrados no presente trabalho (27), já foi relatada no continente antártico em invertebrados marinhos (Godinho *et al.*, 2019), sedimentos de lagos (Ogaki *et al.*, 2020c), solos (Gomes *et al.*, 2018), rochas (Alves *et al.*, 2019) e sedimentos marinhos (Ogaki *et al.*, 2020a).

O gênero *Antarctomyces*, detectado no biofilme, está relacionado à *Thelebolaceae* e abriga apenas duas espécies, *Antarctomyces psychrotrophicus* e *Antarctomyces pellizariae*, as quais são psicrófilas e endêmicas do continente antártico (Stchigel *et al.*, 2001; de Menezes *et al.*, 2017). A espécie encontrada no presente trabalho, *Antarctomyces psychrotrophicus*, já foi encontrada em macroalgas (Loque *et al.*, 2010; Furbino *et al.*, 2014; Ogaki *et al.*, 2019b), sedimentos de lagos (Ogaki *et al.*, 2020c), invertebrados (Simões *et al.*, 2019), lagos (Gonçalves *et al.*, 2012), líquens (Santiago *et al.*, 2015) e solo (Arenz *et al.*, 2006).

Detectado em biofilme nesse trabalho, *Beauveria* é um gênero cosmopolita anamórfico de patógenos de artrópodes que inclui espécies agronomicamente importantes, uma vez que podem ser utilizadas como micoinseticidas para o controle biológico de insetos pragas (Rehner *et al.*, 2011). Esses fungos produzem uma grande variedade de metabólitos secundários biologicamente ativos, como pigmentos e antibióticos peptídicos (Vey *et al.*, 2001). Segundo Campos *et al.* (2005), a capacidade da espécie *Beauveria amorpha* para o controle biológico ainda não foi estudada, mas ela possui características endofíticas e entomopatogênicas, produzindo várias enzimas extracelulares hidrolíticas, incluindo proteases e quitinases. Esse parece ser o primeiro relato dessa espécie na Antártica.

Uma espécie do gênero *Metschnikowia* foi detectada no biofilme lacustre coletado na Ilha Deception, um gênero conhecido por espécies que utilizam sacarose e l-sorbose e, em sua maioria, são moderadamente fermentativas, além de produzirem proteases e lipases extracelularmente, as quais podem auxiliar na patogenicidade (Lachance, 2016). Segundo Batista *et al.* (2017), *Metschnikowia australis* é uma espécie endêmica da Antártica, podendo apresentar características metabólicas únicas que auxiliem na sua sobrevivência em condições tão estressantes. No continente antártico essa espécie já foi encontrada em macroalgas (Furbino *et al.*, 2014), esponjas (Vaca *et al.*, 2013), sedimento marinho (Vaz *et al.*, 2011), água do mar (Vaz *et al.*, 2011; Gonçalves *et al.*, 2017b), solo (Martinez *et al.*, 2016) e invertebrados (Godinho *et al.*, 2019; Simões *et al.*, 2019).

O gênero *Thelebolus* foi detectado nas iscas de barbante implantadas em ponta Hennequin (Ilha Rei George), e é conhecido por combinar psicofilia com crescimento em guano, sugerindo que as linhagens dos lagos se originaram de vetores de aves (de Hoog *et al.*, 2004). *Thelebolus globosus*, a segunda espécie com o maior número de isolados encontrados no presente trabalho (24), é endêmica da Antártica e apresenta uma distribuição mais limitada, sugerindo que vive em submersão durante grande parte do seu ciclo de vida (de Hoog *et al.*, 2004) e pode ser encontrada em invertebrados (Godinho *et al.*, 2019), rocha (Alves *et al.*, 2019), sedimentos de lagos (Ogaki *et al.*, 2020c), macroalga (Furbino *et al.*, 2014), solos ornitogênicos (Alias *et al.*, 2013), neve (de Menezes *et al.*, 2019a) e lago permanentemente coberto de gelo (Connell *et al.*, 2018).

Táxons de *Helotiales* foram detectados nas iscas de barbante. *Helotiales* é uma das ordens de fungos mais diversa, com mais de 350 gêneros e mais de 2.000 espécies e inclui muitos patógenos de plantas importantes (Youssar *et al.*, 2013), a qual está entre as ordens mais representativas de fungos encontrados nos solos da Antártica, atingindo 41-56% das sequências (Newsham *et al.*, 2018). Essa ordem já foi relatada em diversos substratos da Antártica, como solo (Newsham *et al.*, 2018), permafrost e camada ativa (da Silva *et al.*, 2020), sedimentos de lagos (Ogaki *et al.*, 2020c), macroalga (Godinho *et al.*, 2013), musgo (Rosa *et al.*, 2020) e lagos (Gonçalves *et al.*, 2012; Ogaki *et al.*, 2020b; de Souza *et al.*, 2021).

Chalara, encontrado nas iscas de barbante, é um gênero de fungos anamórficos que vivem principalmente como saprotróficos de serapilheira, muitos deles em serapilheira de coníferas, sendo que várias espécies parasitam árvores ou líquenes (Koukol, 2011). Esse gênero já foi relatado em alguns substratos da Antártica, como musgo (de Carvalho *et al.*, 2019; Rosa *et al.*, 2020) e líquen (Santiago *et al.*, 2015; de Carvalho *et al.*, 2019).

O gênero *Penicillium* foi isolado tanto das iscas de barbante quanto do biofilme. *Penicillium* é um importante gênero do filo *Ascomycota*, encontrado no ambiente natural e também na produção de alimentos e medicamentos, sendo que, como destaque, alguns membros do gênero produzem

penicilina, uma molécula utilizada como antibiótico que mata ou interrompe o crescimento de certos tipos de bactérias (Yadav *et al.*, 2018). O gênero possui distribuição mundial e grande impacto econômico na vida humana, considerando que sua principal função na natureza é a decomposição de materiais orgânicos, onde as espécies causam podridões devastadoras como patógenos pré e pós-colheita em plantações de alimentos, bem como para a produção de uma ampla gama de micotoxinas (Frisvad & Samson, 2004; Yadav *et al.*, 2018). A capacidade metabólica de ciclagem de nutrientes de *Penicillium* se deve à produção de enzimas hidrolíticas (Yadav *et al.*, 2018). Por ser cosmopolita, o gênero já foi relatado em diversos substratos na Antártica, como sedimentos marinhos (Gonçalves *et al.*, 2013; Ogaki *et al.*, 2020a), esponja (Shah *et al.*, 2020), gelo glacial e neve (de Menezes *et al.*, 2019b; de Menezes *et al.*, 2020), solo oligotrófico (Godinho *et al.*, 2015), macroalga (Godinho *et al.*, 2013) e rochas (Gonçalves *et al.*, 2017a).

Por outro lado, o gênero *Arthroderma*, detectado no biofilme, engloba espécies de dermatófitos geofílicos que raramente causam infecções superficiais em humanos e animais, sendo o gênero mais diverso entre os dermatófitos, englobando espécies que ocorrem em solo, cavernas, tocas de animais, material clínico e outros ambientes (Hainsworth *et al.*, 2021). Na Antártica o gênero já foi identificado em musgo (de Carvalho *et al.*, 2019) e invertebrado (Simões *et al.*, 2019).

O gênero ascomiceto *Tetracladium*, detectado no biofilme, é mais conhecido por conter hifomicetos aquáticos, que são importantes decompositores em teias alimentares de riachos, mas podem ser encontrados em diversos ecossistemas, como solos, plantas, solos glaciais e subglaciais, mar, a altitudes elevadas, e abrangendo o globo desde o Ártico até a Antártica (Anderson & Marvanová, 2020). Na Antártica o gênero já foi relatado em lagos (Ogaki *et al.*, 2020b; de Souza *et al.*, 2021), rochas (Alves *et al.*, 2019), musgos (de Carvalho *et al.*, 2019) e solo (Bridge & Newsham, 2009; Durán *et al.*, 2019).

O gênero *Debaryomyces*, isolado no biofilme, compreende espécies generalistas de leveduras ascomicetas tolerantes ao sal e ao frio, capazes de colonizar ambientes extremos e diversos nichos ecológicos, bem como uma variedade de produtos alimentícios fermentados; além disso, esse gênero geralmente não é considerado nocivo, embora várias infecções, incluindo fungemia e micose disseminada devido a essa levedura, tenham sido documentadas em pacientes imunocomprometidos e imunocompetentes (Torriani, 2018). As atividades proteolítica e lipolítica das espécies de *Debaryomyces* têm sido utilizadas na indústria alimentícia (Martorell *et al.*, 2005). Na Antártica o gênero já foi relatado em rochas (Gonçalves *et al.*, 2017a), neve (de Menezes *et al.*, 2019a), solo (Godinho *et al.*, 2015), sedimento marinho (Zhang *et al.*, 2012), fezes de pinguim (Chryssanthou *et al.*, 2011), invertebrados marinhos (Godinho *et al.*, 2019; Simões *et al.*, 2019), lagos (Ogaki *et al.*,

2019a), biofilme em superfície de poça de degelo, briófitas e plantas vasculares (Ferreira *et al.*, 2019).

O Filo *Basidiomycota* foi o segundo mais frequente nos isolados do presente estudo. Segundo Wuczkowski *et al.* (2011), o gênero *Holtermanniella*, detectado no biofilme, é frequentemente encontrado de regiões temperadas a frias, sendo que duas das cinco espécies conhecidas, *Holtermanniella wattica* e *Holtermanniella nyarrowii*, foram originalmente descritas no continente antártico. *Holtermanniella wattica* já foi descrita na Antártica em solos (Tsuji, 2018), briófitas (de Carvalho *et al.*, 2019; Ferreira *et al.*, 2019), neve (de Menezes *et al.*, 2019a) e sedimento de lago (Ogaki *et al.*, 2020c).

Diversas espécies do gênero *Leucosporidium*, detectado tanto nas iscas de barbante quanto no biofilme, são conhecidas de regiões polares (Summerbell, 1983). Na Antártica, a espécie *Leucosporidium fragarium* já foi encontrada em sedimento de lago (Ogaki *et al.*, 2020c), neve (de Menezes *et al.*, 2019a), briófitas (de Carvalho *et al.*, 2019; Ferreira *et al.*, 2019), lagos (Brandão *et al.*, 2017), biofilme e angiospermas (Ferreira *et al.*, 2019). Já *Leucosporidium muscorum*, foi relatada em sedimento de lago (Ogaki *et al.*, 2020c), lagos (Brandão *et al.*, 2017), macroalga (Duarte *et al.*, 2016; Furbino *et al.*, 2018), sedimento marinho e planta vascular (Vaz *et al.*, 2011).

Os membros do gênero *Vishniacozyma*, detectado nas iscas de barbante, foram frequentemente observados em associação com flores visitadas por pássaros e foram capazes de crescer em néctar artificial (Yurkov & Pozo, 2017). *Vishniacozyma victoriae* é uma espécie de levedura cosmopolita que já foi isolada de ambientes frios ao redor do mundo (Tsuji, 2018) e na Antártica já foi relatada em sedimentos de lagos (Ogaki *et al.*, 2020c), solo (Tsuji, 2018), lagos (Brandão *et al.*, 2017), neve (de Menezes *et al.*, 2019a), angiospermas (de Carvalho *et al.*, 2019; Ferreira *et al.*, 2019), líquens (de Carvalho *et al.*, 2019), rocha (Alves *et al.*, 2019), invertebrado (Godinho *et al.*, 2019), briófitas e biofilme (Ferreira *et al.*, 2019).

Segundo Thomas-Hall *et al.* (2010), *Mrakia*, isolado tanto das iscas de barbante quanto do biofilme, é um gênero quase inteiramente composto por linhagens isoladas de ambientes frios, como Antártica, Groelândia, Alpes e Islândia, sendo capazes de utilizar D-xilose, L-arabinose, α -trealose, salicina, rafinose, D-sorbitol, D-manitol, D-gluconato, D-glucuronato e nitrato, mas não eritritol. *Mrakia blollopis* já foi relatada em solo (Carrasco *et al.*, 2012; Duarte *et al.*, 2018), tapete de algas em sedimentos (Duarte *et al.*, 2018) e angiosperma (Ferreira *et al.*, 2018).

Dentre as espécies de leveduras isoladas de habitats frios, as pertencentes ao gênero *Goffeauzyma*, detectado nas iscas de barbante, são umas das mais frequentes da criosfera, mas também foram relatadas em habitats não extremos (climas boreais e temperados) (Buzzini *et al.*,

2018). Na Antártica o gênero já foi relatado em solo (Białkowska *et al.*, 2017; Gomes *et al.*, 2018; Tsuji, 2018), sedimentos de lagos (Ogaki *et al.*, 2020c) e líquen (de Carvalho *et al.*, 2019).

A síntese de diversos carotenoides comercialmente importantes (β -caroteno, toruleno, torularodina e astaxantina) por várias espécies de leveduras pertencentes ao gênero *Rhodotorula*, isolado tanto das iscas de barbante quanto do biofilme, levou a considerar esses microrganismos como potenciais fontes de pigmentos (Frengova & Beshkova, 2009). A espécie *Rhodotorula mucilaginosa* apresenta várias aplicações biotecnológicas, como biorremediação, produção de pigmentos e degradação de plastificantes, além de estar relacionada com a microbiota humana (fezes, pele, escarro e trato digestivo) e ser capaz de causar infecção em hospedeiro imunocomprometido (Sampaio, 2011). Na Antártica, essa espécie já foi relatada em líquens (Duarte *et al.*, 2013; Santiago *et al.*, 2015), angiosperma (Santiago *et al.*, 2017), gelo marinho (Kan *et al.*, 2019), macroalga (Loque *et al.*, 2010; Furbino *et al.*, 2014; Furbino *et al.*, 2018), rocha (Gonçalves *et al.*, 2017a; Alves *et al.*, 2019), solo (Connell *et al.*, 2008; Troncoso *et al.*, 2017), solo ornitogênico (de Sousa *et al.*, 2017), invertebrados (Duarte *et al.*, 2013; Godinho *et al.*, 2019), alga (Loque *et al.*, 2010; Duarte *et al.*, 2013), gelo (de Menezes *et al.*, 2020) e neve (de Menezes *et al.*, 2019a).

O gênero *Cystobasidium*, detectado nas iscas de barbante, apresenta como principal característica a associação micoparasitária com ascomicetos coprófilos, como *Lasiobolus*, *Saccobolus* e *Thelebolus* (Sampaio & Oberwinkler, 2011), sendo esse último também relatado no presente trabalho. A espécie *Cystobasidium laryngis*, isolada na Antártica, já foi relatada como produtora de esterase, lipase, gelatinase e fosfatase alcalina (Martorell *et al.*, 2017; Troncoso *et al.*, 2017). No continente antártico, há relatos dessa espécie em angiosperma (Santiago *et al.*, 2017; de Carvalho *et al.*, 2019; Ferreira *et al.*, 2019), solo (Troncoso *et al.*, 2017), briófitas (de Carvalho *et al.*, 2019; Ferreira *et al.*, 2019), macroalga (Furbino *et al.*, 2014), sedimento de lago e água do mar (Vaz *et al.*, 2011). A espécie *Hamamotoa singularis* (*Sporobolomyces singularis*) foi descrita associada às fezes de insetos sob a casca de *Tsuga heterophylla* (Cicuta Ocidental) e é uma espécie não pigmentada (Phaff & do Carmo-Sousa, 1962). No ambiente antártico essa espécie já foi isolada na neve (de Menezes *et al.*, 2019a).

Mortierella, isolado tanto das iscas de barbante quanto do biofilme, pertencente ao Filo *Mortierellomycota*, é um gênero conhecido pelo seu potencial na produção de lipídios, uma vez que uma parcela significativa do lipídio fúngico apresenta ácidos graxos essenciais, os quais têm sua quantidade extremamente variável entre as espécies desse gênero (Dyal & Narine, 2005). A espécie *Mortierella gamsii* já foi relatada no continente antártico em musgos (de Carvalho *et al.*, 2019), invertebrados (Simões *et al.*, 2019), solo (Ding *et al.*, 2016) e líquens (Santiago *et al.*, 2015). Por fim, nesse estudo os táxons *Tetracladium*, *Thelebolus*, *Helotiales*, *Chalara*, *Mrakia*, *Goffeauzyma*,

Mortierella e *Penicillium* foram encontrados utilizando tanto as técnicas para obtenção de fungos cultiváveis quanto nas análises do eDNA para fungos não cultiváveis.

Produção enzimática pelos fungos cultiváveis

A crescente demanda por novos ou melhores biocatalisadores com diferentes seletividade de substrato, seletividade quiral, estabilidade e atividade em vários pH's e temperaturas pode ser atendida por meio da investigação de microrganismos, o maior reservatório de atividades biológicas na natureza (Bruno *et al.*, 2019). Devido à sua complexidade estrutural e funcional, o uso de enzimas naturais em biotecnologia tem sido limitado nas últimas décadas, sendo que essas enzimas geralmente requerem modificação para uso industrial (melhorias na eficiência catalítica, estereo seletividade e estabilidade por meio de estratégias de engenharia combinatória); as tecnologias de engenharia de proteínas permitem desenvolver enzimas altamente ativas em alvos não naturais, na presença de solventes orgânicos, e até enzimas para transformações químicas não encontradas na natureza (Bruno *et al.*, 2019). Até 40% das reações químicas industrialmente relevantes que requerem solventes orgânicos prejudiciais ao meio ambiente podem ser substituídas por catálise enzimática até 2030; espera-se que seu mercado alcance \$ 7,0 bilhões em 2023, ante \$ 5,5 bilhões em 2018, com uma taxa de crescimento anual de 4,9% para o período 2018–2023; os detergentes industriais atingirão US \$ 10,8 bilhões em 2022, com uma taxa de crescimento anual de 4,2% para o período 2017-2022, enquanto o mercado global de enzimas nas indústrias de alimentos e bebidas deverá crescer de US \$ 1,8 bilhão em 2017, para quase \$ 2,2 bilhões até 2022, com uma taxa de crescimento anual de 4,6% de 2017 a 2022 (Staff, 2018; Bruno *et al.*, 2019).

Os resultados obtidos no presente trabalho corroboram com os descritos por Krishnan *et al.* (2011), Carrasco *et al.* (2012), Duarte *et al.* (2013), Carrasco *et al.* (2016), Martinez *et al.* (2016), Martorell *et al.* (2017), Troncoso *et al.* (2017), Furbino *et al.* (2018), Poveda *et al.* (2018), Tsuji (2018) e Martorell *et al.* (2019b), nos quais os táxons de fungos isolados da Antártica (*Vishniacozyma victoriae*, *Cystobasidium laryngis*, *Holtermanniella* sp., *Rhodotorula mucilaginosa*, *Leucosporidium* sp., *Hamamotoa* sp., *Mrakia blollopis*, *Metschnikowia australis*, *Beauveria* sp., *Pseudogymnoascus* sp., *Debaryomyces* sp., *Leucosporidium muscorum*, *Helotiales* sp., *Antarctomyces* sp., *Thelebolus* sp., *Goffeauzyma* sp. e *Tetracladium* sp.) também produziram algumas das enzimas aqui relatadas, apesar de todos os trabalhos não avaliarem as mesmas enzimas de todos os isolados aqui encontrados.

Diferente do relatado por Krishnan *et al.* (2011) e Martorell *et al.* (2019), que encontraram isolados de *Mortierella* sp. capazes de produzir celulase, lipase e protease, nossos isolados do mesmo gênero foram os únicos que não produziram nenhuma das enzimas testadas. Como relatado na

Tabela 1, a produção de todas essas enzimas aqui estudadas já foi relatada por fungos isolados de ambientes frios. *Arthroderma* sp. UFMGCB 17052 foi capaz de produzir gelatinase, o que parece ser o primeiro relato dessa atividade enzimática para o gênero.

Identificação de fungos não cultiváveis

O conhecimento da diversidade de fungos de água doce presente nos lagos da Antártica tem aumentado nos últimos anos. No entanto, até o momento, a maioria dos estudos tem sido baseada principalmente na cultura tradicional e abordagens morfológicas (Ogaki *et al.*, 2019a) e estudos envolvendo o uso de abordagens de metabarcoding permanecem escassos. Rojas-Jimenez *et al.* (2017) utilizaram o metabarcoding para estudar os fungos de água doce presentes em lagos cobertos de gelo dos Vales Secos de McMurdo, Antártica Continental e detectaram sequências representando táxons dos filos *Cryptomycota*, *Chytridiomycota*, *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Zygomycota* tradicional e *Blastocladiomycota*, em ordem decrescente de dominância.

O presente estudo, usando iscas de algodão depositadas em lagos nas Ilhas Shetlands do Sul por dois anos contínuos, revelou a presença de uma diversidade fúngica moderada quando comparada com estudos usando abordagens de cultivo. Os lagos aqui estudados foram dominados por membros dos filos *Ascomycota*, *Rozellomycota* e *Basidiomycota*, com menos representantes de *Chytridiomycota* (quitrídios) e *Mortierellomycota*. Dentre os táxons identificados, os conhecidos hifomicetos aquáticos *T. marchalianum* e *Tetracladium* sp. foram as ASVs dominantes. Também detectamos o DNA de *Thelebolus globosus*, *Microdochium lycopodium* e *Mrakia frigida*, que representam componentes intermediários conhecidos como fungos comuns presentes na Antártica (de Hoog *et al.*, 2005; Bridge & Spooner, 2012; Carvalho *et al.*, 2020; Rosa *et al.*, 2020a) e *Alatospora acuminata*, *Paranamyces uniporus* e *Knufia peltigerae*, táxons raramente registrados para a Antártica e detectados como componentes menos abundantes (Bridge & Spooner, 2012; Rosa *et al.*, 2019a). Muitos dos outros táxons de fungos detectados, incluindo algumas ASVs dominantes (*Rozellomycota* sp., Fungal sp. 1, Fungal sp. 2) só puderam ser atribuídos a níveis taxonômicos mais altos, fornecendo mais evidências de que existem muitos táxons de fungos atualmente desconhecidos na Antártica (Rosa *et al.*, 2020b,c,d).

Os maiores índices de diversidade, riqueza e dominância da comunidade fúngica detectados no Lago Hennequin podem ser devido às condições mais amenas de temperatura e condutividade desse lago, quando comparados com aqueles do Lago Soto. Além disso, o Lago Hennequin é mais raso e recebe mais intensidade de luz do que o Lago Soto, o que pode levar a uma maior produtividade biológica. O Lago Hennequin é cercado por grandes tapetes de musgos, que irão inserir matéria orgânica abundante no lago. Em contraste, o Lago Soto é mais profundo, mais frio,

mais escuro e pode apresentar baixa produtividade fitoplanctônica. Além disso, a Ilha Deception é uma ilha geologicamente jovem, cujos substratos vulcânicos levam a uma drenagem geralmente alta, e o desenvolvimento de musgo e vegetação de líquen é muito mais limitado ao redor do Lago Soto.

O gênero *Tetracladium* (*Ascomycota*, *Leotiomycetes*, *Helotiales*) inclui hifomicetos aquáticos conhecidos, incluindo *T. marchalianum* que ocorre globalmente em ambientes tropicais, subtropicais e temperados (Abdel-Raheem & Ali, 2004; Anderson & Shearer, 2011; Kirk *et al.*, 2011). Os hifomicetos aquáticos são fungos saprotróficos importantes e são mediadores importantes do fluxo de energia e nutrientes em teias alimentares de água doce (Suberkropp, 2001). *Tetradadium marchalianum* é um hifomiceto saprofítico aquático comum em tecidos mortos e em decomposição (Karling, 2018). De acordo com Abdel-Raheem & Ali (2004), *T. marchalianum* produz enzimas lignocelulolíticas extracelulares como a celulase e representa um componente importante da comunidade fúngica aquática Ingoldiana, também conhecidos como hifomicetos aquáticos e de água doce que inclui espécies de fungos anamórficos capazes de crescer e esporular em ecossistemas aquáticos como rios, riachos ou lagos (Bärlocher, 1992). Membros do gênero foram detectados anteriormente em lagos antárticos usando técnicas de cultura (Brunatti *et al.*, 2009; Tsuji *et al.*, 2013; Rojas-Jimenez *et al.*, 2017; Connell *et al.*, 2018; Ogaki *et al.*, 2020b); no entanto, nossa detecção de *T. marchalianum* é a primeira nos lagos antárticos. A detecção e identificação de fungos Ingoldianos geralmente requer o exame da morfologia dos esporos. Nosso estudo demonstra uma abordagem alternativa eficaz para sua detecção nos lagos antárticos.

Membros do gênero *Thelebolus* também são distribuídos globalmente (Crous *et al.*, 2004). As espécies ocorrem em ambientes árticos e antárticos, incluindo algumas consideradas psicrotolerantes (Kobayasi, 1967; Montemartini *et al.*, 1993). Espécies de *Thelebolus* são frequentemente relatadas em lagos da Antártica (de Hoog *et al.*, 2005; Brunatti *et al.*, 2009; Gonçalves *et al.*, 2012; Connell *et al.*, 2018). *Microdochium lycopodium* foi originalmente recuperado de caules vivos e posteriormente mortos e folhas de *Spinulum annotinum* (*Lycopodium annotinum*) e tem uma distribuição conhecida na Europa Central boreal (Áustria, Alemanha) (Walter & Hermann, 2012). Na Antártica, *M. lycopodium* foi relatado como um endófito do musgo *Polytrichastrum alpinum* (Carvalho *et al.*, 2020) e no ar sobre a Península de Keller, Ilha Rei George (Rosa *et al.*, 2020c). *Mrakia* é um gênero basidiomiceto de leveduras que inclui espécies psicrófilas e psicrotolerantes encontradas em habitats frios, incluindo lagos antárticos (Brunatti *et al.*, 2009; Tsuji *et al.*, 2013; Rojas-Jimenez *et al.*, 2017; Connell *et al.*, 2018; Ogaki *et al.*, 2020b).

O gênero *Alatospora* (*Leotiaceae*) inclui espécies amplamente distribuídas em água doce (Kirk *et al.*, 2011), incluindo a Ingoldiana *Alatospora acuminata*, que foi relatada como capaz de colonizar madeira submersa e serapilheira em ambientes temperados e tropicais

(<https://www.discoverlife.org>; Lindsey & Glover, 1976; Fiuza *et al.*, 2017). O gênero *Paranamyces* (*Rhizophydiales*; *Chytridiomycota*) inclui a espécie única *Paranamyces uniporus*, que foi registrada em habitats anóxicos, salinos ou sulfurosos, como manguezais, solos de lama, planícies de lama, lamas vulcânicas, água doce e sedimentos costeiros em ecossistemas temperados da Argentina e os Estados Unidos (Letcher *et al.*, 2015; Page & Flannery, 2018). O gênero *Knufia* compreende leveduras pretas e tem seis espécies conhecidas (He *et al.*, 2013). *Knufia peltigerae* foi descrita pela primeira vez com seu ascoma em talos de espécies do gênero líquen *Peltigera* (Réblová *et al.*, 2013), que ocorrem na Antártica (Zúñiga *et al.*, 2015). Nossos registros das espécies *A. acuminata*, *P. uniporus* e *K. peltigerae* são os primeiros de ambientes de água doce na Antártica.

7. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nesse trabalho demonstram que os lagos amostrados nas ilhas Rei George e Deception possuem alta diversidade de assembleias fúngicas cultiváveis, as quais demonstraram produção de diferentes enzimas ativas a baixas temperaturas que podem auxiliar esses micro-organismos a sobreviverem nas condições extremas da Antártica. Dentro das assembleias foram detectadas espécies cosmopolitas adaptadas ao frio e endêmicas, como *Penicillium* spp. e *Antarctomyces psychrotrophicus*, respectivamente. A produção das enzimas estudadas já foi relatada por fungos isolados de ambientes frios; contudo, o isolado *Arthroderma* sp. UFMGCB 17052 foi capaz de produzir gelatinase, o que parece ser o primeiro relato da produção dessa enzima para o gênero.

Além disso, o uso de uma abordagem de *metabarcoding* revelou uma porção críptica da diversidade de fungos de água continental nos lagos da Antártica, incluindo espécies não detectadas utilizando métodos com meios de cultura tradicionais. O alto número de leituras de DNA detectadas dos hifomicetos saprotróficos aquáticos conhecidos *T. marchalianum* e *Tetracladium* sp. em iscas de barbante submersas em lagos por dois anos sugere que esses táxons fúngicos podem ter um papel funcional importante na degradação de material orgânico (como material vegetal) nesse ecossistema antártico. No entanto, o papel funcional dos fungos de água continental nos lagos antárticos, e em particular na ciclagem de nutrientes, requer uma investigação mais aprofundada. Nosso estudo confirma que o uso de iscas de algodão por longos períodos em combinação com abordagens de sequenciamento de alto rendimento pode ser apropriado para estudar a diversidade de fungos residentes nos lagos da Antártica.

REFERÊNCIAS

- ABDAL-AZIZ, S.A.A. et al. Molecular identification of a novel inulinolytic fungus isolated from and grown on tubers of *Helianthus tuberosus* and statistical screening of medium components. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 12, p. 3245-3254, 2012.
- ABDEL-RAHEEM, A.M.; ALI, E.H. Lignocellulolytic enzyme production by aquatic hyphomycetes species isolated from the Nile's delta region. **Mycopathologia**, v. 157, n. 3, p. 277-286, 2004.
- ABYZOV, S. et al. 2004. Biological investigations of the Antarctic ice sheet: review, problems and prospects. **Polar Biosci.** 17:106–116.
- AKBARI, S. et al. Biosurfactants—a new frontier for social and environmental safety: a mini review. **Biotechnology Research and Innovation**, v. 2, n. 1, p. 81-90, 2018.
- ALI, S.; SHAHZADI, H. Nutritional optimizations for improved exo-inulinase production from *Aspergillus oryzae* for high-fructose syrup preparations. **Int J Curr Microbiol App Sci**, v. 4, n. 5, p. 618-631, 2015.
- ALIAS, S.A. et al. Diversity of microfungi in ornithogenic soils from Beaufort Island, continental Antarctic. **Czech Polar Reports**, v. 3, n. 2, p. 144-156, 2013.
- ALIMARDANI-THEUIL, P. et al. Yeasts: An attractive source of pectinases—From gene expression to potential applications: A review. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 8, p. 1525-1537, 2011.
- ALISTE, A.J. et al. Radiation effects on agar, alginates and carrageenan to be used as food additives. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 57, n. 3-6, p. 305-308, 2000.
- ALVES, I.M.S. et al. The diversity, distribution, and pathogenic potential of cultivable fungi present in rocks from the South Shetlands archipelago, Maritime Antarctica. **Extremophiles**, v. 23, n. 3, p. 327-336, 2019.
- ANDERSON, J.L.; MARVANOVÁ, L. Broad geographical and ecological diversity from similar genomic toolkits in the ascomycete genus *Tetracladium*. **bioRxiv**, 2020.
- ANDERSON, J.L.; SHEARER, C.A. Population genetics of the aquatic fungus *Tetracladium marchalianum* over space and time. **PLoS One**, v. 6, n. 1, p. e15908, 2011.
- ARANDA, C. et al. Fungal invertase expression in solid-state fermentation. **Food Technology & Biotechnology**, v. 44, n. 2, 2006.

- ARENZ, B.E. et al. Fungal diversity in soils and historic wood from the Ross Sea Region of Antarctica. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 38, n. 10, p. 3057-3064, 2006.
- ARMISEN, R.; GAIATAS, F. Agar. In: Handbook of hydrocolloids. **Woodhead Publishing**, p. 82-107. 2009.
- ASTHER, M. et al. Feruloyl esterase from *Aspergillus niger*. **Process Biochemistry**, [S.L.], v. 38, n. 5, p. 685-691, dez. Elsevier BV. 2002.
- BALAN, S.S. et al. Production of gelatinase enzyme from *Bacillus* spp isolated from the sediment sample of Porto Novo Coastal sites. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, n. 3, p. S1811-S1816, 2012.
- BARAHONA, S. et al. Identification and characterization of yeasts isolated from sedimentary rocks of Union Glacier at the Antarctica. **Extremophiles**, v. 20, n. 4, p. 479-491, 2016.
- BARGAGLI, R. Environmental contamination in Antarctic ecosystems. **Science of the total environment**, v. 400, n. 1-3, p. 212-226, 2008.
- BARKER, P. F.; BURRELL, J. The opening of Drake passage. **Marine geology**, v. 25, n. 1-3, p. 15-34, 1977.
- BÄRLOCHER, F. Research on aquatic hyphomycetes: historical background and overview. In: **The ecology of aquatic hyphomycetes**. Springer, Berlin, Heidelberg, p. 1-15. 1992.
- BATISTA, T.M. et al. Draft genome sequence of *Metschnikowia australis* strain UFMG-CM-Y6158, an extremophile marine yeast endemic to Antarctica. **Genome Announcements**, v. 5, n. 20, 2017.
- BAUBLIS, J.A. et al. Diversity of micro-fungi in an Antarctic dry valley. **Journal of Basic Microbiology**, v. 31, n. 1, p. 1-12, 1991.
- BHARDWAJ, G. et al. Biosurfactants from fungi: a review. **J Pet Environ Biotechnol**, v. 4, n. 6, p. 1-6, 2013.
- BHARDWAJ, H. et al. Microbial population associated with plastic degradation. **Scientific reports**, v. 5, p. 272-274, 2012.
- BIAŁKOWSKA, A.M. et al. Genetic and biochemical characterization of yeasts isolated from Antarctic soil samples. **Polar Biology**, v. 40, n. 9, p. 1787-1803, 2017.

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.

BODOUR, A.A.; MILLER-MAIER, R.M. Application of a modified drop-collapse technique for surfactant quantitation and screening of biosurfactant-producing microorganisms. **Journal of Microbiological Methods**, v. 32, n. 3, p. 273-280, 1998.

BOKULICH, N.A. et al. Optimizing taxonomic classification of marker gene amplicon sequences. **PeerJ Preprints**, v. 6, p. e3208v2, 2018.

BOLYEN, E. et al. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. **Nature biotechnology**, v. 37, n. 8, p. 852-857, 2019.

BONNAUD, M. et al. Interaction of a food-grade cationic surfactant (lauric arginate) with food-grade biopolymers (pectin, carrageenan, xanthan, alginate, dextran, and chitosan). **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 58, n. 17, p. 9770-9777, 2010.

BORTOLAZZO, N.G. Isolamento e seleção de fungos celulolíticos para hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. 2011.

BRADNER, J.R. et al. The application of PCR for the isolation of a lipase gene from the genomic DNA of an Antarctic microfungus. **Current genetics**, v. 44, n. 4, p. 224-230, 2003.

BRANDÃO, L.R. et al. Diversity and biogeographical patterns of yeast communities in Antarctic, Patagonian and tropical lakes. **Fungal Ecology**, v. 28, p. 33-43, 2017.

BRASIL, M.E. Coleção explorando o ensino - Antártica. 2006.

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

BRIDGE, P.D.; SPOONER, B.M. Non-lichenized Antarctic fungi: transient visitors or members of a cryptic ecosystem? **Fungal Ecology**, v. 5, n. 4, p. 381-394, 2012.

BRIZZIO, S. et al. Extracellular enzymatic activities of basidiomycetous yeasts isolated from glacial and subglacial waters of northwest Patagonia (Argentina). **Canadian Journal of Microbiology**, v. 53, n. 4, p. 519-525, 2007.

- BRUNATI, M. et al. Diversity and pharmaceutical screening of fungi from benthic mats of Antarctic lakes. **Marine genomics**, v. 2, n. 1, p. 43-50, 2009.
- BRUNO, S. et al. Enzymes from marine polar regions and their biotechnological applications. **Marine drugs**, 17(10), 544. 2019.
- BUZZINI, P. et al. Extremophilic yeasts: the toughest yeasts around? **Yeast**, v. 35, n. 8, p. 487-497, 2018.
- BUZZINI, P. et al. Psychrophilic yeasts from worldwide glacial habitats: diversity, adaptation strategies and biotechnological potential. **FEMS microbiology ecology**, v. 82, n. 2, p. 217-241, 2012.
- BYUN, S.M.; NAHM, B.H. Production of fructose from Jerusalem artichoke by enzymatic hydrolysis. **Journal of Food Science**, v. 43, n. 6, p. 1871-1873, 1978.
- CALERO-RUEDA, O. et al. Production, isolation and characterization of a sterol esterase from *Ophiostoma piceae*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics**, v. 1599, n. 1-2, p. 28-35, 2002.
- CALLAHAN, B.J. et al. DADA2: high-resolution sample inference from Illumina amplicon data. **Nature methods**, v. 13, n. 7, p. 581-583, 2016.
- CAMARGO, F.P. et al. Characterization of biosurfactant from yeast using residual soybean oil under acidic conditions and their use in metal removal processes. **FEMS microbiology letters**, v. 365, n. 10, p. fny098, 2018.
- CAMPO, V.L. et al. Carrageenans: Biological properties, chemical modifications and structural analysis—A review. **Carbohydrate polymers**, v. 77, n. 2, p. 167-180, 2009.
- CAMPOS, R.A. et al. *Boophilus microplus* Infection by *Beauveria amorpha* and *Beauveria bassiana*: SEM Analysis and Regulation of Subtilisin-like Proteases and Chitinases. **Current Microbiology**, v. 50, n. 5, p. 257-261, 2005.
- CARRASCO, M. et al. Diversity and extracellular enzymatic activities of yeasts isolated from King George Island, the sub-Antarctic region. **BMC microbiology**, v. 12, n. 1, p. 251, 2012.
- CARRASCO, M. et al. Screening and characterization of amylase and cellulase activities in psychrotolerant yeasts. **BMC microbiology**, v. 16, n. 1, p. 1-9, 2016.

- CASTELLANI, A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 42, p. 225-226, 1939.
- CAVICCHIOLI, R. et al. Biotechnological uses of enzymes from psychrophiles. **Microbial biotechnology**, v. 4, n. 4, p. 449-460, 2011.
- CAVICCHIOLI, R.; TORTSEN, T. Extremophiles. **Encyclopedia of Microbiology Lederberg**. 2000.
- CHAUHAN, P.S.; SAXENA, A. Bacterial carrageenases: an overview of production and biotechnological applications. **3 Biotech**, v. 6, n. 2, p. 146, 2016.
- CHEN, S. et al. Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species. **PloS one**, v. 5, n. 1, p. e8613, 2010.
- CHEOK, C.Y. et al. Extraction and quantification of saponins: A review. **Food Research International**, v. 59, p. 16-40, 2014.
- CHERRY, J.R.; FIDANTSEF, A.L. Directed evolution of industrial enzymes: an update. **Current opinion in biotechnology**, v. 14, n. 4, p. 438-443, 2003.
- CHI, W-J. et al. Soon-Kwang. Agar degradation by microorganisms and agar-degrading enzymes. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 94, n. 4, p. 917-930, 2012.
- CHI, Z. et al. Inulinase-expressing microorganisms and applications of inulinases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 82, n. 2, p. 211-220, 2009.
- CHOUBANE, S. et al. *Bacillus* sp. R2 α -amylase production optimization: Pasta cooking water as medium of amylase production. **African Journal of Biotechnology**, v. 14, n. 47, p. 3184-3189, 2015.
- CHRISTAKOPOULOS, P. et al. Production of an esterase from *Fusarium oxysporum* catalysing transesterification reactions in organic solvents. **Process biochemistry**, v. 33, n. 7, p. 729-733, 1998.
- CHRYSSANTHOU, E. et al. Occurrence of yeasts in faecal samples from Antarctic and South American seabirds. **Mycoses**, v. 54, n. 6, p. e811-e815, 2011.
- CLARKE, A. et al. Evolution and diversity of the benthic fauna of the Southern Ocean continental shelf. **Antarctic Science**, v. 16, n. 4, p. 559, 2004.

- COLWELL, R.K. et al. Interpolating, extrapolating, and comparing incidence-based species accumulation curves. **Ecology**, v. 85, n. 10, p. 2717-2727, 2004.
- COMIN, A.N.; JUSTINO, F. Investigação Climatológica na Península Antártica e no Arquipélago das Shetland do Sul. **Anuário do Instituto de Geociências**, v. 40, n. 2, p. 74-81, 2017.
- CONNELL, L et al. Biodiversity and abundance of cultured microfungi from the permanently ice-covered Lake Fryxell, Antarctica. **Life**, v. 8, n. 3, p. 37, 2018.
- CONNELL, L. et al. Diversity of soil yeasts isolated from South Victoria Land, Antarctica. **Microbial Ecology**, v. 56, n. 3, p. 448-459, 2008.
- CRAIGIE, J.S. Cell walls. **Biology of the red algae**, p. 221-257, 1990.
- CROUS, P.W. et al. MycoBank: an online initiative to launch mycology into the 21st century. **Studies in mycology**, v. 50, n. 1, p. 19-22, 2004.
- D'ELIA, T. et al. Isolation of fungi from Lake Vostok accretion ice. **Mycologia**, v. 101, n. 6, p. 751-763, 2009.
- DA SILVA, T.H. et al. Diversity, distribution, and ecology of viable fungi in permafrost and active layer of Maritime Antarctica. **Extremophiles: Life Under Extreme Conditions**, 2020.
- DE CARVALHO, C.R. et al. Cultivable fungi associated with bryosphere of bipolar mosses *Polytrichastrum alpinum* and *Polytrichum juniperinum* in King George Island, South Shetland Islands, Maritime Antarctica. **Polar Biology**, v. 43, n. 5, p. 545-553, 2020.
- DE CARVALHO, C.R. et al. Fungi associated with plants and lichens of Antarctica. In: *Fungi of Antarctica*. **Springer, Cham**, p. 165-199. 2019.
- DE HOOG, G.S. et al. Evolution, taxonomy and ecology of the genus *Thelebolus* in Antarctica. **Studies in Mycology**, v. 51, p. 33, 2004.
- DE MENEZES, G.C.A. et al. *Antarctomyces pellizariae* sp. nov., a new, endemic, blue, snow resident psychrophilic ascomycete fungus from Antarctica. **Extremophiles**, v. 21, n. 2, p. 259-269, 2017.
- DE MENEZES, G.C.A. et al. Diversity, Distribution, and Ecology of Fungi in the Seasonal Snow of Antarctica. **Microorganisms**, v. 7, n. 10, p. 445, 2019a.

- DE MENEZES, G.C.A. et al. Fungi in glacial ice of Antarctica: diversity, distribution and bioprospecting of bioactive compounds. **Extremophiles**, p. 1-10, 2020.
- DE MENEZES, G.C.A. et al. Fungi in snow and glacial ice of Antarctica. In: Fungi of Antarctica. **Springer, Cham**. p. 127-146. 2019b.
- DE SOUSA, J.R.P. et al. Pathogenic potential of environmental resident fungi from ornithogenic soils of Antarctica. **Fungal biology**, v. 121, n. 12, p. 991-1000, 2017.
- DE SOUZA, L.M.D. et al. Assessment of fungal diversity present in lakes of Maritime Antarctica using DNA metabarcoding: a temporal microcosm experiment. **Extremophiles**, v. 25, n. 1, p. 77-84, 2021.
- DE VRIES, R.P.; VISSER, J. Regulation of the feruloyl esterase (faeA) gene from *Aspergillus niger*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 12, p. 5500-5503, 1999.
- DE VRIES, R.P.; VISSER, J.A.A.P. *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 65, n. 4, p. 497-522, 2001.
- DEINER, K. et al. Environmental DNA metabarcoding: Transforming how we survey animal and plant communities. **Molecular ecology**, v. 26, n. 21, p. 5872-5895, 2017.
- DERYCKE, D.G.; VANDAMME, E.J. Production and properties of *Aspergillus niger* inulinase. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology. Biotechnology**, v. 34, n. 1, p. 45-51, 1984.
- DÍAZ, A. et al. Genetic transformation of the filamentous fungus *Pseudogymnoascus verrucosus* of antarctic origin. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, 2019.
- DING, Z. et al. Richness and bioactivity of culturable soil fungi from the Fildes Peninsula, Antarctica. **Extremophiles**, v. 20, n. 4, p. 425-435, 2016.
- DUARTE, A.W.F. et al. Cold-adapted enzymes produced by fungi from terrestrial and marine Antarctic environments. **Critical reviews in biotechnology**, v. 38, n. 4, p. 600-619, 2018.
- DUARTE, A.W.F. et al. Liquid-liquid extraction of lipase produced by psychrotrophic yeast *Leucosporidium scottii* L117 using aqueous two-phase systems. **Separation and Purification Technology**, v. 156, p. 215-225, 2015.

- DUARTE, A.W.F. et al. Taxonomic assessment and enzymes production by yeasts isolated from marine and terrestrial Antarctic samples. **Extremophiles**, v. 17, n. 6, p. 1023-1035, 2013.
- DUARTE, A.W.F. et al. Yeasts from macroalgae and lichens that inhabit the South Shetland Islands, Antarctica. **Environmental microbiology reports**, v. 8, n. 5, p. 874-885, 2016.
- DURÁN, P. et al. Occurrence of soil fungi in Antarctic pristine environments. **Frontiers in bioengineering and biotechnology**, v. 7, p. 28, 2019.
- DYAL, S.D.; NARINE, S.S. Implications for the use of *Mortierella* fungi in the industrial production of essential fatty acids. **Food Research International**, v. 38, n. 4, p. 445-467, 2005.
- EDWARDS, K.R. et al. Toxicity comparison of biosurfactants and synthetic surfactants used in oil spill remediation to two estuarine species. **Marine Pollution Bulletin**, v. 46, n. 10, p. 1309-1316, 2003.
- EKL TJND, C.R. Antarctic fauna and some of its problems. In: Antarctica in the International Geophysical Year: Based on a Symposium on the Antarctic. **American Geophysical Union**, p. 117. 1956.
- ELLIS-EVANS, J.C. Fungi from maritime Antarctic freshwater environments. **British Antarctic Survey Bulletin**, v. 68, p. 37-45, 1985.
- ELLIS-EVANS, J.C. Microbial diversity and function in Antarctic freshwater ecosystems. **Biodiversity & Conservation**, v. 5, n. 11, p. 1395-1431, 1996.
- EL-SOUOD, S.M.A. et al. Partial purification of extracellular exo-inulinase from *Ulocladium atrum*. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 12, n. 1, p. 15-20, 2014.
- FAWZY, M.A. et al. Fungal agarase production in a cost-effective macroalgal based medium and enzymatic hydrolysis of the alkali extracted macroalgal biomass: an optimization study. **Waste and Biomass Valorization**, v. 11, n. 1, p. 255-264, 2020.
- FELLER, G.; GERDAY, C. Psychrophilic enzymes: hot topics in cold adaptation. **Nature reviews microbiology**, v. 1, n. 3, p. 200-208, 2003.
- FERNANDES, M.R.V.S. et al. *Penicillium expansum* SK16 as a novel inulinase-producing strain isolated from decomposed dahlia tubers. **Res J Biotechnol**, v. 7, p. 102-106, 2012.

- FERREIRA, E.M.S. et al. Taxonomy and richness of yeasts associated with angiosperms, bryophytes, and meltwater biofilms collected in the Antarctic Peninsula. **Extremophiles**, v. 23, n. 1, p. 151-159, 2019.
- FERREIRA, M.S.S. et al. Properties of a thermostable nonspecific fructofuranosidase produced by *Cladosporium cladosporioides* cells for hydrolysis of Jerusalem artichoke extract. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 31, n. 1, p. 1-9, 1991.
- FILLINGHAM, I.J. et al. A modular cinnamoyl ester hydrolase from the anaerobic fungus *Piromyces equi* acts synergistically with xylanase and is part of a multiprotein cellulose-binding cellulase–hemicellulase complex. **Biochemical journal**, v. 343, n. 1, p. 215-224, 1999.
- FISHER, R.A. et al. The relation between the number of species and the number of individuals in a random sample of an animal population. **The Journal of Animal Ecology**, p. 42-58, 1943.
- FIUZA, P.O. et al. Ingoldian fungi of Brazil: some new records and a review including a checklist and a key. **Phytotaxa**, v. 306, n. 3, p. 171-200, 2017.
- FLOCCO, C.G. et al. Antarctic soil microbial communities in a changing environment: their contributions to the sustainability of Antarctic ecosystems and the bioremediation of anthropogenic pollution. In: **The Ecological Role of Micro-organisms in the Antarctic Environment**. Springer, Cham, p. 133-161. 2019.
- FLORCZAK, T. et al. Purification, characterisation and expression in *Saccharomyces cerevisiae* of LipG7 an enantioselective, cold-adapted lipase from the Antarctic filamentous fungus *Geomyces* sp. P7 with unusual thermostability characteristics. **Enzyme and microbial technology**, v. 53, n. 1, p. 18-24, 2013.
- FLORES-GALLEGOS, A.C. et al. Inulinase production by a Mexican semi-desert xerophylic *Penicillium citrinum* strain under submerged culture. **Advance Journal of Food Science and Technology**, v. 4, n. 1, p. 46-50, 2012.
- FÖRSTER, H. Pectinesterases from *Phytophthora infestans*. In: **Methods in enzymology**. Academic Press, p. 355-361. 1988.
- FRANCELINO, M.R.; SCHAEFER, C.E. Glossário de Geomorfologia Glacial e Glaciologia, Aplicado à Antártica Marítima. In: SCHAEFER, C.E.G.R., FRANCELINO, M.R., SIMAS, F.N.B.;

- ALBUQUERQUE FILHO, M.R. **Ecosistemas Terrestres e Solos da Antártica Marítima**, 192p, 2004.
- FRENGOVA, G.I.; BESHKOVA, D.M. Carotenoids from *Rhodotorula* and *Phaffia*: yeasts of biotechnological importance. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 36, n. 2, p. 163, 2009.
- 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, n. 1, p. 1-174, 2004.
- FU, X.T.; KIM, S.M. Agarase: review of major sources, categories, purification method, enzyme characteristics and applications. **Marine drugs**, v. 8, n. 1, p. 200-218, 2010.
- FURBINO, L.E. et al. Diversity patterns, ecology and biological activities of fungal communities associated with the endemic macroalgae across the Antarctic Peninsula. **Microbial ecology**, v. 67, n. 4, p. 775-787, 2014.
- FURBINO, L.E. et al. Isolation of fungi associated with macroalgae from maritime Antarctica and their production of agarolytic and carrageenolytic activities. **Polar Biology**, v. 41, n. 3, p. 527-535, 2018.
- GAINVORS, A. et al. Detection of polygalacturonase, pectin-lyase and pectin-esterase activities in a *Saccharomyces cerevisiae* strain. **Yeast**, v. 10, n. 10, p. 1311-1319, 1994.
- GARSOUX, G. et al. Kinetic and structural optimization to catalysis at low temperatures in a psychrophilic cellulase from the Antarctic bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis*. **Biochemical Journal**, v. 384, n. 2, p. 247-253, 2004.
- GAUDIN, C. et al. CelE, a Multidomain Cellulase from *Clostridium cellulolyticum*: a Key Enzyme in the Cellulosome?. **Journal of bacteriology**, v. 182, n. 7, p. 1910-1915, 2000.
- GAWAS-SAKHALKAR, P.; SINGH, S.M. Fungal community associated with Arctic moss, *Tetraplodon mimoides* and its rhizosphere: bioprospecting for production of industrially useful enzymes. **Current Science**, p. 1701-1705, 2011.
- GERDAY, C. et al. Cold-adapted enzymes: from fundamentals to biotechnology. **Trends in biotechnology**, v. 18, n. 3, p. 103-107, 2000.

- GERDAY, C. et al. Psychrophilic enzymes: a thermodynamic challenge. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1342, n. 2, p. 119-131, 1997.
- GINER, C.R. et al. Environmental sequencing provides reasonable estimates of the relative abundance of specific picoeukaryotes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 82, n. 15, p. 4757-4766, 2016.
- GIULIANI, S. et al. Synthesis of pentylferulate by a feruloyl esterase from *Aspergillus niger* using water-in-oil microemulsions. **Biotechnology Letters**, v. 23, n. 4, p. 325-330, 2001.
- 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, n. 4, p. 1323-1330, 1995.
- GOCHEVA, Y.G. et al. Cell response of Antarctic and temperate strains of *Penicillium* spp. to different growth temperature. **Mycological research**, v. 110, n. 11, p. 1347-1354, 2006.
- GODINHO, V.M. et al. Diversity and bioprospecting of fungal communities associated with endemic and cold-adapted macroalgae in Antarctica. **The ISME journal**, v. 7, n. 7, p. 1434-1451, 2013.
- GODINHO, V.M. et al. Diversity and bioprospection of fungal community present in oligotrophic soil of continental Antarctica. **Extremophiles**, v. 19, n. 3, p. 585-596, 2015.
- GODINHO, V.M. et al. Diversity and distribution of hidden cultivable fungi associated with marine animals of Antarctica. **Fungal biology**, v. 123, n. 7, p. 507-516, 2019.
- GOMES, E.C.Q. et al. Cultivable fungi present in Antarctic soils: taxonomy, phylogeny, diversity, and bioprospecting of antiparasitic and herbicidal metabolites. **Extremophiles**, v. 22, n. 3, p. 381-393, 2018.
- GONÇALVES, V.N. et al. Antibacterial, antifungal and antiprotozoal activities of fungal communities present in different substrates from Antarctica. **Polar Biology**, v. 38, n. 8, p. 1143-1152, 2015.
- GONÇALVES, V.N. et al. Diversity and distribution of fungal communities in lakes of Antarctica. **FEMS microbiology ecology**, v. 82, n. 2, p. 459-471, 2012.
- GONÇALVES, V.N. et al. *Penicillium solitum*: a mesophilic, psychrotolerant fungus present in marine sediments from Antarctica. **Polar biology**, v. 36, n. 12, p. 1823-1831, 2013.

- GONÇALVES, V.N. et al. Taxonomy, phylogeny and ecology of cultivable fungi present in seawater gradients across the Northern Antarctica Peninsula. **Extremophiles**, v. 21, n. 6, p. 1005-1015, 2017b.
- GONÇALVES, V.N. et al. Antarctic rocks from continental Antarctica as source of potential human opportunistic fungi. **Extremophiles**, v. 21, n. 5, p. 851-860, 2017a.
- GOPINATH, S.C.B. et al. Biotechnological processes in microbial amylase production. **BioMed research international**, v. 2017, 2017.
- GOPINATH, S.C.B. et al. Extracellular enzymatic activity profiles in fungi isolated from oil-rich environments. **Mycoscience**, v. 46, n. 2, p. 119-126, 2005.
- GOTO, S. et al. A taxonomic study of Antarctic yeasts. **Mycologia**, v. 61, n. 4, p. 748-774, 1969.
- GRANT, S. et al. A phylogenetic analysis of Wadi el Natrun soda lake cellulase enrichment cultures and identification of cellulase genes from these cultures. **Extremophiles**, v. 8, n. 5, p. 421-429, 2004.
- GUIMARÃES, L.H.S. et al. Screening of filamentous fungi for production of enzymes of biotechnological interest. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, n. 4, p. 474-480, 2006.
- GUPTA, R. et al. Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. **Process biochemistry**, v. 38, n. 11, p. 1599-1616, 2003.
- HAIGH, S.D. A review of the interaction of surfactants with organic contaminants in soil. **Science of the Total Environment**, v. 185, n. 1-3, p. 161-170, 1996.
- HAINSWORTH, S. et al. Three-gene phylogeny of the genus *Arthroderma*: Basis for future taxonomic studies. **Medical Mycology**, v. 59, n. 4, p. 355-365, 2021.
- HAMMER, Ø. et al. PAST-palaeontological statistics, ver. 1.89. **Palaeontol. electron**, v. 4, n. 1, p. 1-9, 2001.
- HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S. L. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. **Mycologia**, v. 67, n. 3, p. 597-607, 1975.
- HE, F. et al. *Knufia aspidiotus* sp. nov., a new black yeast from scale insects. **Phytotaxa**, v. 153, n. 1, p. 39-50, 2013.

- HERING, D. et al. Implementation options for DNA-based identification into ecological status assessment under the European Water Framework Directive. **Water research**, v. 138, p. 192-205, 2018.
- HISANO, T. et al. Isolation and properties of a collagenase with caseinolytic activity from a *Pseudomonas* sp. **Journal of fermentation and bioengineering**, v. 68, n. 6, p. 399-403, 1989.
- HODGSON, D.A. Antarctic lakes//Encyclopedia of Lakes and Reservoirs/Bengtsson L., Herschy RW, **Fairbridge RW**. 2012.
- HOYOUX, A. et al. Cold-adapted β -galactosidase from the Antarctic psychrophile *Pseudoalteromonas haloplanktis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 4, p. 1529-1535, 2001.
- HUSSAIN, I. et al. A Review of the Microbiological Aspect of α -amylase Production. **International Journal of Agriculture & Biology**, v. 15, n. 5, 2013.
- IBRAR, M. et al. Fungi from the extremes of life: an untapped treasure for bioactive compounds. **Applied Microbiology and Biotechnology**, p. 1-25, 2020.
- IZAGUIRRE, I. et al. Algal communities of a geothermally heated lagoon on Deception Island (South Shetland Islands). **Polar Biology**, v. 29, n. 5, p. 364-371, 2006.
- JAVED, A.; QAZI, J.. Psychrophilic microbial enzymes implications in coming biotechnological processes. **American Scientific Research Journal for Engineering, Technology, and Sciences (ASRJETS)**, v. 23, n. 1, p. 103-120, 2016.
- JAYANI, R.S. et al. Microbial pectinolytic enzymes: a review. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 9, p. 2931-2944, 2005.
- JOSEPH, B. et al. Cold-active microbial lipases: a versatile tool for industrial applications. **Biotechnology and Molecular Biology Reviews**, v. 2, n. 2, p. 39-48, 2007.
- JUGE, N. et al. High-level production of recombinant *Aspergillus niger* cinnamoyl esterase (FAEA) in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **FEMS Yeast Research**, v. 1, n. 2, p. 127-132, 2001.
- KALIL, S.J. et al. Optimization of inulinase production by *Kluyveromyces marxianus* using factorial design. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 94, n. 3, p. 257-264, 2001.

- KAN, G. et al. Copper stress response in yeast *Rhodotorula mucilaginosa* AN 5 isolated from sea ice, Antarctic. **MicrobiologyOpen**, v. 8, n. 3, p. e00657, 2019.
- KAPPEN, L.. Lichens in the Antarctic region. **Antarctic microbiology**, p. 433-490, 1993.
- KARLING, J.S. *Tetracladium marchalianum* and its relation to *Asterothrix*, *Phycastrium*, and *Cerasterias*. **Mycologia**, v. 27, n. 5, p. 478-495, 2018.
- KASANA, R.C.; GULATI, A. Cellulases from psychrophilic microorganisms: a review. **Journal of basic microbiology**, v. 51, n. 6, p. 572-579, 2011.
- KAWANO, C.Y. et al. Comparative study of intracellular and extracellular pectinases produced by *Penicillium frequentans*. **Biotechnology and applied biochemistry**, v. 29, n. 2, p. 133-140, 1999.
- KAWAROE, M. et al. Potential marine fungi *Hypocreaceae* sp. as agarase enzyme to hydrolyze macroalgae *Gelidium latifolium* (Potensi Jamur *Hypocreaceae* sp. sebagai Enzim Agarase untuk menghidrolisis Makroalga *Gelidium latifolium*). **ILMU KELAUTAN: Indonesian Journal of Marine Sciences**, v. 20, n. 1, p. 45-51, 2015.
- KHADEMOLHOSSEINI, R. et al. Physicochemical characterization and optimization of glycolipid biosurfactant production by a native strain of *Pseudomonas aeruginosa* HAK01 and its performance evaluation for the MEOR process. **RSC advances**, v. 9, n. 14, p. 7932-7947, 2019.
- KIRK, P.M.; CANNON, P.F.; MINTER, D.W. et al. Dictionary of the Fungi, 10th edn. **CAB International**, Wallingford, 2011.
- KIRK, O. et al. Industrial enzyme applications. **Current opinion in biotechnology**, v. 13, n. 4, p. 345-351, 2002.
- KJØLLER, A.; STRUWE, S. Microfungi of decomposing red alder leaves and their substrate utilization. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 12, n. 4, p. 425-431, 1980.
- KJØLLER, A.H.; STRUWE, S. Fungal communities, succession, enzymes, and decomposition. **Enzymes in the Environment: activity, ecology and applications**, v. 1, p. 267-284, 2002.
- KNOX, J.S.; PATERSON, R.A. The occurrence and distribution of some aquatic phycomycetes on Ross Island and the dry valleys of Victoria Land, Antarctica. **Mycologia**, v. 65, n. 2, p. 373-387, 1973.

KOBAYASI, Y. **Mycological studies of the Alaskan Arctic**. 1967.

KOHLI, P.; GUPTA, R. Medical aspects of esterases: a mini review. **Int. J. Pharm. Pharm. Sci**, v. 8, p. 21-26, 2016.

KOSEKI, T. et al. An *Aspergillus awamori* acetylcysteine acetyltransferase: purification of the enzyme, and cloning and sequencing of the gene. **Biochemical journal**, v. 326, n. 2, p. 485-490, 1997.

KOUKOL, O. New species of *Chalara* occupying coniferous needles. **Fungal Diversity**, v. 49, n. 1, p. 75-91, 2011.

KRISHNAN, A. et al. Extracellular hydrolase enzyme production by soil fungi from King George Island, Antarctica. **Polar Biology**, v. 34, n. 10, p. 1535-1542, 2011.

KRISS, A.E. et al. Microbiological investigations of Lake Vanda (Antarctica). **Microbiology**, v. 45, n. 6, p. 917-922, 1976.

KROON, P.A. et al. A modular esterase from *Penicillium funiculosum* which releases ferulic acid from plant cell walls and binds crystalline cellulose contains a carbohydrate binding module. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, n. 23, p. 6740-6752, 2000.

KUEHN, K.A. Lentic and lotic habitats as templates for fungal communities: traits, adaptations, and their significance to litter decomposition within freshwater ecosystems. **Fungal Ecology**, v. 19, p. 135-154, 2016.

KUHAD, R.C. et al. Microbial cellulases and their industrial applications. **Enzyme research**, v. 2011, 2011.

KULSHRESTHA, S. et al. Invertase and its applications—a brief review. **Journal of pharmacy research**, v. 7, n. 9, p. 792-797, 2013.

KUMAR, C.G.; TAKAGI, H. Microbial alkaline proteases: from a bioindustrial viewpoint. **Biotechnology advances**, v. 17, n. 7, p. 561-594, 1999.

LACHANCE, M-A. et al. *Kodamaea kakaduensis* and *Candida tolerans*, two new ascomycetous yeast species from Australian Hibiscus flowers. **Canadian journal of microbiology**, v. 45, n. 2, p. 172-177, 1999.

LACHANCE, M-A. *Metschnikowia*: half tetrads, a regicide and the fountain of youth. **Yeast**, v. 33, n. 11, p. 563-574, 2016.

- LAFUENTE-CASTANEDA, C. et al. Inulinase production by *Penicillium citrinum* ESS in submerged and solid-state cultures. **American Journal of Agricultural and Biological Science**, 2012.
- LANGE, L. et al. Fungal Biotechnology: Unlocking the Full Potential of Fungi for a More Sustainable World. In: **Grand Challenges in Fungal Biotechnology**. Springer, Cham, p. 3-32. 2020.
- LEALEM, F.; GASHE, B. A. Amylase production by a Gram-positive bacterium isolated from fermenting tef (*Eragrostis tef*). **Journal of Applied bacteriology**, v. 77, n. 3, p. 348-352, 1994.
- LETCHER, P.M. et al. A new family and four new genera in *Rhizophydiales* (*Chytridiomycota*). **Mycologia**, v. 107, n. 4, p. 808-830, 2015.
- LIBKIND, D. et al. Constitutive and UV-inducible synthesis of photoprotective compounds (carotenoids and mycosporines) by freshwater yeasts. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 3, n. 3, p. 281-286, 2004.
- LIECKFELDT, E. et al. Rapid identification and differentiation of yeasts by DNA and PCR fingerprinting. **Journal of Basic Microbiology**, v. 33, n. 6, p. 413-425, 1993.
- LILIANA, Q.M. et al. Vulnerability of marine benthic algae to climate change in Potter. In: **Book of Abstracts**. p. 191. 2017.
- LINDSEY, B.I.; GLOVER, B.J. Ecological studies of spores of aquatic hyphomycetes in the Cringle Brook, Lincs. **Hydrobiologia**, v. 51, n. 3, p. 201-208, 1976.
- LOMOLINO, G. et al. Cell vitality and esterase activity of *Saccharomyces cerevisiae* is affected by increasing calcium concentration. **Agro Food Industry Hi Tech**, v. 14, n. 6, p. 32-36, 2003.
- LOPERENA, L. et al. Extracellular enzymes produced by microorganisms isolated from maritime Antarctica. **World journal of microbiology and biotechnology**, v. 28, n. 5, p. 2249-2256, 2012.
- LÓPEZ-LÓPEZ, O. et al. New extremophilic lipases and esterases from metagenomics. **Current Protein and Peptide Science**, v. 15, n. 5, p. 445-455, 2014.
- LÓPEZ-MOLINA, D. et al. Molecular properties and prebiotic effect of inulin obtained from artichoke (*Cynara scolymus* L.). **Phytochemistry**, v. 66, n. 12, p. 1476-1484, 2005.
- LOQUE, C.P. et al. Fungal community associated with marine macroalgae from Antarctica. **Polar Biology**, v. 33, n. 5, p. 641-648, 2010.

- MÄKINEN, P.L. et al. Purification and substrate specificity of a strongly hydrophobic extracellular metalloendopeptidase ("gelatinase") from *Streptococcus faecalis* (strain OG1-10). **Journal of Biological Chemistry**, v. 264, n. 6, p. 3325-3334, 1989.
- MAKINEN, P.L.; MAKINEN, K.K. The *Enterococcus faecalis* extracellular metalloendopeptidase (EC 3.4. 24.30; coccolysin) inactivates human endothelin at bonds involving hydrophobic amino acid residues. 1994.
- MALDONADO, M.C. et al. Purification and characterization of pectinesterase produced by a strain of *Aspergillus niger*. **Current Microbiology**, v. 28, n. 4, p. 193-196, 1994.
- MALDONADO, M.C.; DE SAAD, A.M.S. Production of pectinesterase and polygalacturonase by *Aspergillus niger* in submerged and solid state systems. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 20, n. 1, p. 34-38, 1998.
- MANSOURI, S. et al. *Penicillium subrubescens*, a new species efficiently producing inulinase. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 103, n. 6, p. 1343-1357, 2013.
- MARCHANT, R.; BANAT, I.M. Biosurfactants: a sustainable replacement for chemical surfactants? **Biotechnology letters**, v. 34, n. 9, p. 1597-1605, 2012.
- MARGESIN, R. Alpine microorganisms: useful tools for low-temperature bioremediation. **The Journal of Microbiology**, v. 45, n. 4, p. 281-285, 2007.
- MARGESIN, R. et al. Cold-loving microbes, plants, and animals—fundamental and applied aspects. **Naturwissenschaften**, v. 94, n. 2, p. 77-99, 2007b.
- MARGESIN, R. et al. *Rhodotorula psychrophila* sp. nov., *Rhodotorula psychrophenolica* sp. nov. and *Rhodotorula glacialis* sp. nov., novel psychrophilic basidiomycetous yeast species isolated from alpine environments. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 57, n. 9, p. 2179-2184, 2007a.
- MARGESIN, R.; FELLER, G. Biotechnological applications of psychrophiles. **Environmental technology**, v. 31, n. 8-9, p. 835-844, 2010.
- MARGESIN, R.; MITEVA, V. Diversity and ecology of psychrophilic microorganisms. **Research in microbiology**, v. 162, n. 3, p. 346-361, 2011.

- MARTINEZ, A. et al. Yeasts from sub-Antarctic region: biodiversity, enzymatic activities and their potential as oleaginous microorganisms. **Extremophiles**, v. 20, n. 5, p. 759-769, 2016.
- MARTORELL, M.M. et al. Antarctic yeasts as a source of enzymes for biotechnological applications. In: *Fungi of Antarctica*. Springer, Cham, p. 285-304. 2019a.
- MARTORELL, M.M. et al. Biodiversity and enzymes bioprospection of Antarctic filamentous fungi. **Antarctic Science**, v. 31, n. 1, p. 3-12, 2019b.
- MARTORELL, M.M. et al. Bioprospection of cold-adapted yeasts with biotechnological potential from Antarctica. **Journal of basic microbiology**, v. 57, n. 6, p. 504-516, 2017.
- MARTORELL, P. et al. Sequence-based identification of species belonging to the genus *Debaryomyces*. **FEMS Yeast Research**, v. 5, n. 12, p. 1157-1165, 2005.
- MATEI, G.M. et al. Invertase Production by Fungi, Characterization of Enzyme Activity and Kinetic Parameters. **Rev. Chim.(Bucharest)**, v. 68, p. 2205-2208, 2017.
- MCCANDLESS, E.L. Polysaccharides of the seaweeds. **The biology of seaweeds**, p. 559-588, 1981.
- MCINNES, S.J. A predatory fungus (*Hyphomycetes: Lecophagus*) attacking Rotifera and Tardigrada in maritime Antarctic lakes. **Polar Biology**, v. 26, n. 2, p. 79-82, 2003.
- MEDINGER, R. et al. Diversity in a hidden world: potential and limitation of next-generation sequencing for surveys of molecular diversity of eukaryotic microorganisms. **Molecular ecology**, v. 19, p. 32-40, 2010.
- MEHROTRA, R.S.; ANEJA, K.R. **An introduction to mycology**. New Age International, 1990.
- MELO, I.S. et al. Isolation and biological activities of an endophytic *Mortierella alpina* strain from the Antarctic moss *Schistidium antarctici*. **Extremophiles**, v. 18, n. 1, p. 15-23, 2014.
- MOHAMMED, S. et al. A gene encoding a new cold-active lipase from an Antarctic isolate of *Penicillium expansum*. **Current genetics**, v. 59, n. 3, p. 129-137, 2013.
- MONTEMARTINI, C.A. et al. Notes on *Thelebolus microsporus* isolated in Antarctica. **Mycotaxon**, v. 48, n. 1, p. 343-358, 1993.
- MOORE-LANDECKER, E. et al. **Fundamentals of the fungi**. Prentice Hall, 1996.

- NADEEM, H. et al. Microbial invertases: a review on kinetics, thermodynamics, physiochemical properties. **Process Biochemistry**, v. 50, n. 8, p. 1202-1210, 2015.
- NAGASHIMA, H. et al. Characterization and habitats of bacteria and yeasts isolated from Lake Vanda in Antarctica. In: **Proc. NIPR Symp. Polar Biol.** p. 190-200. 1990.
- NAKAMURA, T. et al. Continuous production of fructose syrups from inulin by immobilized inulinase from *Aspergillus niger* mutant 817. **Journal of fermentation and bioengineering**, v. 80, n. 2, p. 164-169, 1995.
- NASA. NASA-USGS Landsat 8 Satellite Pinpoints Coldest Spots on Earth. p. 13-364, 2013. Disponível em: < <https://www.nasa.gov/press/2013/december/nasa-usgs-landsat-8-satellite-pinpoints-coldest-spots-on-earth/#.WWjIaOlv82w> >. Acesso em 07/08/2019.
- NEWSHAM, K.K. et al. Discrete taxa of saprotrophic fungi respire different ages of carbon from Antarctic soils. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 1-10, 2018.
- NOVAK, H.R. et al. Characterisation of an l-haloacid dehalogenase from the marine psychrophile *Psychromonas ingrahamii* with potential industrial application. **Marine biotechnology**, v. 15, n. 6, p. 695-705, 2013.
- OGAKI, M.B. et al. Cultivable fungi present in deep-sea sediments of Antarctica: taxonomy, diversity, and bioprospecting of bioactive compounds. **Extremophiles**, v. 24, n. 2, p. 227-238, 2020a.
- OGAKI, M.B. et al. Diversity and bioprospecting of cultivable fungal assemblages in sediments of lakes in the Antarctic Peninsula. **Fungal Biology**, 2020c.
- OGAKI, M.B. et al. Diversity and ecology of fungal assemblages present in lakes of Antarctica. In: Fungi of Antarctica. **Springer, Cham**, p. 69-97. 2019a.
- OGAKI, M.B. et al. Diversity, ecology, and bioprospecting of culturable fungi in lakes impacted by anthropogenic activities in Maritime Antarctica. **Extremophiles**, p. 1-19, 2020b.
- OGAKI, M.B. et al. Marine fungi associated with Antarctic macroalgae. In: The ecological role of micro-organisms in the Antarctic environment. **Springer, Cham**, p. 239-255. 2019b.
- ÖNGEN-BAYSAL, G. et al. Production and properties of inulinase from *Aspergillus niger*. **Biotechnology letters**, v. 16, n. 3, p. 275-280, 1994.

ONOFRI, S. et al. Ecology and biology of microfungi from Antarctic rocks and soils. **Italian journal of Zoology**, v. 67, n. S1, p. 163-167, 2000.

PACWA-PŁOCINICZAK, M. et al. Environmental applications of biosurfactants: recent advances. **International journal of molecular sciences**, v. 12, n. 1, p. 633-654, 2011.

PAGE, K.A.; FLANNERY, M.K. Chytrid fungi associated with pollen decomposition in Crater Lake, Oregon. 2018.

PAIXÃO, S.M. et al. Screening of novel yeast inulinases and further application to bioprocesses. **New Biotechnology**, v. 30, n. 6, p. 598-606, 2013.

PALMER, M.; HATLEY, H. The role of surfactants in wastewater treatment: Impact, removal and future techniques: A critical review. **Water research**, v. 147, p. 60-72, 2018.

PANDA, T.; GOWRISHANKAR, B.S. Production and applications of esterases. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 67, n. 2, p. 160-169, 2005.

PANT, G. et al. Production, optimization and partial purification of protease from *Bacillus subtilis*. **Journal of Taibah University for Science**, v. 9, n. 1, p. 50-55, 2015.

PAREKH, S.; MARGARITIS, A. Inulinase (β -fructofuranosidase) production by *Kluyveromyces marxianus* in batch culture. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 22, n. 6, p. 446-448, 1985.

PARK, C.H. et al. Algal and fungal diversity in Antarctic lichens. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 62, n. 2, p. 196-205, 2015.

PAUL, D. Microorganisms and α -amylase: a concise review. **Inov J Life Sci**, v. 4, p. 1-5, 2016.

PEARCE, D.A. et al. Microorganisms in the atmosphere over Antarctica. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 69, n. 2, p. 143-157, 2009.

PERFUMO, A. et al. Going green and cold: biosurfactants from low-temperature environments to biotechnology applications. **Trends in biotechnology**, v. 36, n. 3, p. 277-289, 2018.

PHAFF, H.J.; DO CARMO-SOUSA, L. Four new species of yeast isolated from insect frass in bark of *Tsuga heterophylla* (Raf.) Sargent. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 28, n. 1, p. 193-207, 1962.

PISANO, M.A. et al. Gelatinase activity by marine fungi. **Applied microbiology**, v. 12, n. 6, p. 470-474, 1964.

- POGLAZOVA, M.N. et al. Microbiological characterization of the accreted ice of subglacial Lake Vostok, Antarctica. **Microbiology**, 70:723–730, 2001.
- POUTANEN, K. et al. Deacetylation of xylans by acetyl esterases of *Trichoderma reesei*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 33, n. 5, p. 506-510, 1990.
- POVEDA, G. et al. Cold-active pectinolytic activity produced by filamentous fungi associated with Antarctic marine sponges. **Biological research**, v. 51, n. 1, p. 28, 2018.
- PRABHAKAR, T. et al. Optimization of process parameters for the production of inulinase from *Aspergillus niger*. **Indian journal of pharmaceutical sciences**, v. 66, n. 6, p. 778, 2004.
- PRIDDLE, J.; HEYWOOD, R.B. Evolution of Antarctic lake ecosystems. **Biological journal of the Linnean Society**, v. 14, n. 1, p. 51-66, 1980.
- RAHMAN, P.K.S.M.; GAKPE, E. Production, characterisation and applications of biosurfactants- Review. **Biotechnology**, 2008.
- RAO, M.B. et al. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 62, n. 3, p. 597-635, 1998.
- RÉBLOVÁ, M. Novel evolutionary lineages revealed in the *Chaetothyriales* (Fungi) based on multigene phylogenetic analyses and comparison of ITS secondary structure. **PLoS One**, v. 8, n. 5, p. e63547, 2013.
- REHNER, S.A. et al. Phylogeny and systematics of the anamorphic, entomopathogenic genus *Beauveria*. **Mycologia**, v. 103, n. 5, p. 1055-1073, 2011.
- REIS, P. et al. Lipases at interfaces: a review. **Advances in colloid and interface science**, v. 147, p. 237-250, 2009.
- RICHARDSON, R.T. et al. Application of ITS2 metabarcoding to determine the provenance of pollen collected by honey bees in an agroecosystem. **Applications in Plant Sciences**, v. 3, n. 1, p. 1400066, 2015.
- RINTOUL, S.R. Antarctic circumpolar current. **Ocean currents**, p. 196-208, 2010.
- ROBINSON, C.H. Cold adaptation in Arctic and Antarctic fungi. **New phytologist**, v. 151, n. 2, p. 341-353, 2001.

- ROCHA, J.R. et al. Design and characterisation of an enzyme system for inulin hydrolysis. **Food Chemistry**, v. 95, n. 1, p. 77-82, 2006.
- ROGERS, S.O. et al. Ecology of subglacial Lake Vostok (Antarctica), based on metagenomic/metatranscriptomic analyses of accretion ice. **Biology**, v. 2, n. 2, p. 629-650, 2013.
- ROJAS-JIMENEZ, K. et al. Early diverging lineages within *Cryptomycota* and *Chytridiomycota* dominate the fungal communities in ice-covered lakes of the McMurdo Dry Valleys, Antarctica. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 1-11, 2017.
- ROMERO-GÓMEZ, S.J. et al. Invertase production by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state fermentation. **Biotechnology Letters**, v. 22, n. 15, p. 1255-1258, 2000.
- ROSA, L.H. (Ed.). Fungi of antarctica: Diversity, ecology and biotechnological applications. **Springer**, 2019a.
- ROSA, L.H. et al. DNA metabarcoding of fungal diversity in air and snow of Livingston Island, South Shetland Islands, Antarctica. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, p. 1-11, 2020d.
- ROSA, L.H. et al. DNA metabarcoding to assess the diversity of airborne fungi present over Keller Peninsula, King George Island, Antarctica. **Microbial Ecology**, p. 1-8, 2020c.
- ROSA, L.H. et al. DNA metabarcoding uncovers fungal diversity in soils of protected and non-protected areas on Deception Island, Antarctica. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, p. 1-9, 2020a.
- ROSA, L.H. et al. Endophytic fungi associated with the Antarctic grass *Deschampsia antarctica* Desv.(*Poaceae*). **Polar Biology**, v. 32, n. 2, p. 161-167, 2009.
- ROSA, L.H. et al. Endophytic fungi community associated with the dicotyledonous plant *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl.(*Caryophyllaceae*) in Antarctica. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 73, n. 1, p. 178-189, 2010.
- ROSA, L.H. et al. Fungi in Antarctica: diversity, ecology, effects of climate change, and bioprospection for bioactive compounds. In: Fungi of Antarctica. **Springer, Cham**. p. 1-17. 2019b.
- ROSA, L.H. et al. Opportunistic fungi found in fairy rings are present on different moss species in the Antarctic Peninsula. **Polar Biology**, v. 43, n. 5, p. 587-596, 2020b.
- RUISI, S. et al. Fungi in Antarctica. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 6, n. 1-3, p. 127-141, 2007.

RUSSELL, N.J. Antarctic microorganisms: coming in from the cold. **Culture**, v. 27, n. 965, p. e989, 2006.

SABER, W.I.A. et al. Optimization of fermentation conditions for the biosynthesis of inulinase by the new source; *Aspergillus tamarii* and hydrolysis of some inulin containing agro-wastes. **Biotechnology**, v. 8, n. 4, p. 425-433, 2009.

SABOTIČ, J.; KOS, J. Microbial and fungal protease inhibitors—current and potential applications. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 93, n. 4, p. 1351-1375, 2012.

SAJITH, S. et al. An overview on fungal cellulases with an industrial perspective. **J Nutr Food Sci**, v. 6, n. 1, p. 461, 2016.

SAMPAIO, J.P. *Rhodotorula* Harrison (1928). In: **The Yeasts**. Elsevier, p. 1873-1927. 2011.

SAMPAIO, J.P.; OBERWINKLER, F. *Cystobasidium* (Lagerheim) Neuhoff (1924). In: **The yeasts**. Elsevier. p. 1419-1422. 2011

SANTIAGO, I.F. et al. Endophytic symbiont yeasts associated with the Antarctic angiosperms *Deschampsia antarctica* and *Colobanthus quitensis*. **Polar Biology**, v. 40, n. 1, p. 177-183, 2017.

SANTIAGO, I.F. et al. Lichensphere: a protected natural microhabitat of the non-lichenised fungal communities living in extreme environments of Antarctica. **Extremophiles**, v. 19, n. 6, p. 1087-1097, 2015.

SANTOS, D.K.F. et al. Biosurfactants: multifunctional biomolecules of the 21st century. **International journal of molecular sciences**, v. 17, n. 3, p. 401, 2016.

SARANRAJ, P.; STELLA, D. Fungal amylase—a review. **Int J Microbiol Res**, v. 4, n. 2, p. 203-211, 2013.

SARMIENTO, F. et al. Cold and hot extremozymes: industrial relevance and current trends. **Frontiers in bioengineering and biotechnology**, v. 3, p. 148, 2015.

SAWANT, R.; NAGENDRAN, S. Protease: an enzyme with multiple industrial applications. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 3, n. 6, p. 568-579, 2014.

SAYALI, K.; et al. Microbial esterases: an overview. **Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci**, v. 2, p. 135-146, 2013.

- SEMENOVA, M.V. et al. Isolation and properties of pectinases from the fungus *Aspergillus japonicus*. **Biochemistry (Moscow)**, v. 68, n. 5, p. 559-569, 2003.
- SEMENOVA, M.V. et al. Use of a preparation from fungal pectin lyase in the food industry. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 42, n. 6, p. 598-602, 2006.
- SHAH, M. et al. Antibacterial polyketides from antarctica sponge-derived fungus *Penicillium* sp. HDN151272. **Marine drugs**, v. 18, n. 2, p. 71, 2020.
- SHARMA, N. et al. Microbial pectinase: sources, characterization and applications. **Reviews in environmental science and bio/technology**, v. 12, n. 1, p. 45-60, 2013.
- SHEN, D. et al. Significantly improved esterase activity of *Trichosporon brassicae* cells for ketoprofen resolution by 2-propanol treatment. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 18, n. 4-6, p. 219-224, 2002.
- SHENG, J. et al. Inulinase production by the marine yeast *Cryptococcus aureus* G7a and inulin hydrolysis by the crude inulinase. **Process Biochemistry**, v. 42, n. 5, p. 805-811, 2007.
- SHEVNINA, E.; KOURZENEVA, E. Thermal regime and components of water balance of lakes in Antarctica at the Fildes peninsula and the Larsemann Hills. **Tellus A: Dynamic Meteorology and Oceanography**, v. 69, n. 1, p. 1317202, 2017.
- SIDDIQUI, K.S.; CAVICCHIOLI, R. Cold-adapted enzymes. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 75, p. 403-433, 2006.
- SIKANDER, A. et al. Kinetics of invertase production by *Saccharomyces cerevisiae* in batch culture. **Pakistan Journal of Botany**, v. 39, n. 3, p. 907-912, 2007.
- SILVA, M.E.T. et al. Biosurfactant production of *Piper hispidum* endophytic fungi. **Journal of applied microbiology**, v. 130, n. 2, p. 561-569, 2021.
- SIMÕES, F.L. et al. Fungus-invertebrate interactions in Antarctica. In: *Fungi of Antarctica*. Springer, Cham, 2019. p. 201-219.
- SINGH, A.; HAYASHI, K. Microbial cellulases: protein architecture, molecular properties, and biosynthesis. In: **Advances in Applied Microbiology**. Academic Press. p. 1-44. 1995.
- SINGH, A.K.; MUKHOPADHYAY, M. Overview of fungal lipase: a review. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 166, n. 2, p. 486-520, 2012.

SINGH, R.S.; SINGH, R.P. Inulinases. In: **Current developments in biotechnology and bioengineering**. Elsevier, p. 423-446. 2017.

SOARES, I. A. et al. Identificação do potencial amilolítico de linhagens mutantes do fungo filamentosso *Aspergillus nidulans*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 3, p. 700-705, 2010.

SOLIS, M.J.L. et al. Marine-derived fungi from *Kappaphycus alvarezii* and *K. striatum* as potential causative agents of ice-ice disease in farmed seaweeds. **Botanica Marina**, v. 53, n. 6, p. 587-594, 2010.

SØRENSEN, S.O. et al. Pectin engineering: modification of potato pectin by in vivo expression of an endo-1, 4- β -D-galactanase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 13, p. 7639-7644, 2000.

SOUZA, P.M. et al. A biotechnology perspective of fungal proteases. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 2, p. 337-346, 2015.

SOUZA, P.M. et al. Application of microbial α -amylase in industry-A review. **Brazilian journal of microbiology**, v. 41, n. 4, p. 850-861, 2010.

SPERB, J.G.C. et al. ANÁLISE QUALITATIVA DA PRODUÇÃO DE LIPASES E BIOSSURFACTANTES POR FUNGOS ISOLADOS DE RESÍDUOS OLEOSOS. **Engevista**, v. 17, n. 3, p. 385-397, 2015.

SRIAMORNSAK, P. Chemistry of pectin and its pharmaceutical uses: A review. **Silpakorn University International Journal**, v. 3, n. 1-2, p. 206-228, 2003.

SRILAKSHMI, J. et al. Commercial potential of fungal protease: past, present and future prospects. **Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences**, v. 2, n. 4, p. 218-234, 2015.

STAFF, B.R. Global markets for enzymes in industrial applications. **BCC Research LLC**. 2018.

STANLEY, S.O.; ROSE, A.H. Bacteria and yeasts from lakes on Deception Island. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences**, v. 252, n. 777, p. 199-207, 1967.

STCHIGEL, A.M. et al. *Antarctomyces psychrotrophicus* gen. et sp. nov., a new ascomycete from Antarctica. **Mycological Research**, v. 105, n. 3, p. 377-382, 2001.

- SUBERKROPP, K. Fungal growth, production, and sporulation during leaf decomposition in two streams. **Applied and environmental microbiology**, v. 67, n. 11, p. 5063-5068, 2001.
- SUMMERBELL, R.C. The heterobasidiomycetous yeast genus *Leucosporidium* in an area of temperate climate. **Canadian Journal of Botany**, v. 61, n. 5, p. 1402-1410, 1983.
- SUNDARRAM, A.; MURTHY, T.P.K. α -amylase production and applications: a review. **Journal of Applied & Environmental Microbiology**, v. 2, n. 4, p. 166-175, 2014.
- TANAKA, H. et al. Invertase production by *Saccharomyces cerevisiae* protoplasts immobilized in strontium alginate gel beads. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 89, n. 5, p. 498-500, 2000.
- TASAR, O.C. et al. Utilization of Leek (*Allium ampeloprasum* var. *porrum*) for Inulinase Production. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 45, n. 6, p. 596-604, 2015.
- TEDERSOO, L. et al. High-level classification of the Fungi and a tool for evolutionary ecological analyses. **Fungal diversity**, v. 90, n. 1, p. 135-159, 2018.
- TENKANEN, M.; et al. An acetylglucosaminidase of *Aspergillus oryzae*; purification, characterization and role in the hydrolysis of O-acetyl-galactoglucosaminidase. **Journal of biotechnology**, v. 42, n. 3, p. 197-206, 1995.
- THOMAS-HALL, S.R. et al. Cold-adapted yeasts from Antarctica and the Italian Alps—description of three novel species: *Mrakia robertii* sp. nov., *Mrakia blollopis* sp. nov. and *Mrakiella niccombsii* sp. nov. **Extremophiles**, v. 14, n. 1, p. 47-59, 2010.
- TOLKER-NIELSEN, T.; MOLIN, S. Spatial organization of microbial biofilm communities. **Microbial ecology**, v. 40, n. 2, p. 75-84, 2000.
- TORRIANI, S. Debaryomyces. In: Handbook of Foodborne Diseases. **CRC Press**, p. 473-480. 2018.
- TOSI, S. et al. Fungi isolated from Antarctic mosses. **Polar Biology**, v. 25, n. 4, p. 262-268, 2002.
- TREICHEL, H. et al. A review on microbial lipases production. **Food and bioprocess technology**, v. 3, n. 2, p. 182-196, 2010.
- TRONCOSO, E. et al. Identification and characterization of yeasts isolated from the South Shetland Islands and the Antarctic Peninsula. **Polar Biology**, v. 40, n. 3, p. 649-658, 2017.

- TSUJI, M. et al. An application of wastewater treatment in a cold environment and stable lipase production of Antarctic basidiomycetous yeast *Mrakia blollopis*. **PLoS One**, v. 8, n. 3, p. e59376, 2013b.
- TSUJI, M. et al. Cold adaptation of fungi obtained from soil and lake sediment in the Skarvsnes ice-free area, Antarctica. **FEMS microbiology letters**, v. 346, n. 2, p. 121-130, 2013a.
- TSUJI, M.. Genetic diversity of yeasts from East Ongul Island, East Antarctica and their extracellular enzymes secretion. **Polar Biology**, v. 41, n. 2, p. 249-258, 2018.
- TURKIEWICZ, M. et al. Invertase and α -glucosidase production by the endemic Antarctic marine yeast *Leucosporidium antarcticum*. **Polish polar research**, p. 125-136, 2005.
- UMA, C. et al. Production, purification and characterization of invertase by *Aspergillus flavus* using fruit peel waste as substrate. **Adv Biol Res**, v. 4, n. 1, p. 31-36, 2010.
- VACA, I. et al. Cultivable psychrotolerant yeasts associated with Antarctic marine sponges. **World Journal of Microbiology and biotechnology**, v. 29, n. 1, p. 183-189, 2013.
- VARJANI, S.J.; UPASANI, V.N. Critical review on biosurfactant analysis, purification and characterization using rhamnolipid as a model biosurfactant. **Bioresource technology**, v. 232, p. 389-397, 2017.
- VAZ, A.B.M. et al. The diversity, extracellular enzymatic activities and photoprotective compounds of yeasts isolated in Antarctica. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, n. 3, p. 937-947, 2011.
- VENKATESHWAR, M. et al. Evaluation of nitrogenous media components by Plackett–Burman statistical design for β -d-fructofuranosidase production by *Saccharomyces* sp. strain GVT263. **Canadian journal of microbiology**, v. 55, n. 4, p. 405-409, 2009.
- VEY, A. et al. 12 Toxic Metabolites of Fungal Biocontrol Agents. **Fungi as biocontrol agents**, p. 311, 2001.
- VIJAYAKUMAR, S.; SARAVANAN, V. Biosurfactants-types, sources and applications. **Research Journal of Microbiology**, v. 10, n. 5, p. 181, 2015.
- VRANEŠIĆ, D. et al. Optimisation of inulinase production by *Kluyveromyces bulgaricus*. **Food technology and Biotechnology**, v. 40, n. 1, p. 67-73, 2002.

- WAGURI, O. et al. Isolation of microorganisms. **Dry Valley drilling project, bulletin**, n. 5, p. 111-117, 1975.
- WAGURI, O. Isolation of microorganisms from salt lakes in the Dry Valley, Antarctica, and their living environment. *Antarct. Rec.*, 57: 80-96. In: **Japanese with English abstract**. 1976.
- WEBER, A.A.T.; PAWLOWSKI, J. Can abundance of protists be inferred from sequence data: a case study of Foraminifera. **PloS one**, v. 8, n. 2, p. e56739, 2013.
- WEBSTER, N.S.; NEGRI, A.P. Site-specific variation in Antarctic marine biofilms established on artificial surfaces. **Environmental Microbiology**, v. 8, n. 7, p. 1177-1190, 2006.
- WHITE, T.J. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. **PCR protocols: a guide to methods and applications**, v. 18, n. 1, p. 315-322, 1990.
- WILLOUGHBY, L.G. Aquatic fungi from an Antarctic island and a tropical lake. 1971.
- WOOD, T.M. Properties of cellulolytic enzyme systems. 1985.
- WUCZKOWSKI, M. et al. Description of *Holtermanniella* gen. nov., including *Holtermanniella takashimae* sp. nov. and four new combinations, and proposal of the order *Holtermanniales* to accommodate tremellomycetous yeasts of the *Holtermannia* clade. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 61, n. 3, p. 680-689, 2011.
- WYNN-WILLIAMS, D.D. Ecological aspects of Antarctic microbiology. In: *Advances in microbial ecology*. Springer, Boston, MA. p. 71-146. 1990.
- YADAV, A.N. et al. Biodiversity of the genus *Penicillium* in different habitats. In: *New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering*. Elsevier, p. 3-18. 2018.
- YOUSSAR, L. et al. Characterization and phylogenetic analysis of the mitochondrial genome of *Glarea lozoyensis* indicates high diversity within the order Helotiales. **PLoS One**, v. 8, n. 9, p. e74792, 2013.
- YU, G. et al. Structural studies on κ -carrageenan derived oligosaccharides. **Carbohydrate Research**, v. 337, n. 5, p. 433-440, 2002.
- YURKOV, A.; POZO, M.I. Yeast community composition and structure. In: **Yeasts in natural ecosystems: Ecology**. Springer, Cham. p. 73-100. 2017.

ZAMBARE, V. et al. A novel extracellular protease from *Pseudomonas aeruginosa* MCM B-327: enzyme production and its partial characterization. **New biotechnology**, v. 28, n. 2, p. 173-181, 2011.

ZHANG, X. et al. Occurrence and diversity of marine yeasts in Antarctica environments. **Journal of Ocean University of China**, v. 11, n. 1, p. 70-74, 2012.

ZHANG, Y.-H.P. et al. Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies. **Biotechnology advances**, v. 24, n. 5, p. 452-481, 2006.

ZHU, B. et al. Insight into carrageenases: major review of sources, category, property, purification method, structure, and applications. **Critical reviews in biotechnology**, v. 38, n. 8, p. 1261-1276, 2018.

ZUCCONI, L. et al. Searching for eukaryotic life preserved in Antarctic permafrost. **Polar Biology**, v. 35, n. 5, p. 749-757, 2012.

ZÚÑIGA, C. et al. Phylogenetic diversity of *Peltigera* cyanolichens and their photobionts in Southern Chile and Antarctica. **Microbes and environments**, p. ME14156, 2015.

PRODUÇÃO ACADÊMICA

Resumos apresentados em eventos

- SOUZA, L.M.D.; MENEZES, G.C.A.; ROSA, C.A.; ROSA, L.H. Identificação de fungos presentes em biofilme de lago na Ilha Deception, Antártica. 2019. VI Simpósio de Microbiologia da UFMG, Belo Horizonte.
- SOUZA, L.M.D.; OGAKI, M.B.; ROSA, C.A.; ROSA, L.H. Identification of fungi present in a lake environment on King George Island, Antarctica. *Scientific Committee on Antarctic Research* (SCAR), 2020.
- SOUZA, L.M.D.; OGAKI, M.B.; MENEZES, G.C.A.; ROSA, C.A.; ROSA, L.H. Identification of fungi present in biofilm of Kroner Lake, Deception Island, Antarctica. *Scientific Committee on Antarctic Research* (SCAR), 2020.

Capítulo de livro

- SIMÕES, F.L., CONVEY, P., DRUMOND, L., DA COSTA COELHO, L. & ROSA, L.H. (2019). Fungus-invertebrate interactions in Antarctica. In *Fungi of Antarctica: Diversity, Ecology and Biotechnological Applications*, Luiz Henrique Rosa (Ed), (pp. 201-219). Springer, Cham.

Artigo publicado

- DE SOUZA, L.M., OGAKI, M.B., CÂMARA, P.E., PINTO, O.H., CONVEY, P., CARVALHO-SILVA, M., ROSA, C.A. & ROSA, L.H. (2021). Assessment of fungal diversity present in lakes of Maritime Antarctica using DNA metabarcoding: a temporal microcosm experiment. *Extremophiles*, 25, 77-84.

Artigo em colaboração

- CÂMARA, P.E., DE SOUZA, L.M., PINTO, O.H., CONVEY, P., AMORIM, E.T., CARVALHO-SILVA, M. & ROSA, L.H. (2021). Periphyton diversity in two different maritime Antarctic lakes assessed using metabarcoding. *Antarctic Science* (*In press*).

Co-orientação

- ELISA AMORIM AMÂNCIO TEIXEIRA. Detecção de enzimas de interesse industrial produzidas por fungos da Antártica. Trabalho de Conclusão de Curso em Andamento (Graduação em Abi – Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Minas Gerais.