

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-Graduação em Microbiologia

Thamar Holanda da Silva

**TAXONOMIA, DIVERSIDADE E ESTUDO DA VIRULÊNCIA DE FUNGOS
PROVENIENTES DO *PERMAFROST* DA ANTÁRTICA**

Belo Horizonte, MG

2020

Thamar Holanda da Silva

**TAXONOMIA, DIVERSIDADE E ESTUDO DA VIRULÊNCIA DE FUNGOS
PROVENIENTES DO *PERMAFROST* DA ANTÁRTICA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Ciências Biológicas (Microbiologia).

Orientador:

Prof. Dr. Luiz Henrique Rosa

Belo Horizonte

2020

Colaboradores:

Dr. Carlos Augusto Rosa

Departamento de Microbiologia/ICB, UFMG

Dr. Fábio Soares de Oliveira

Departamento de Geografia/UFMG

Carlos Ernesto Gonçalves Reynaud Schaefer

Departamento de Ciências do Solo, UFV

Dra. Susana Johann

Departamento de Microbiologia/ICB, UFMG

- 043 Silva, Thamar Holanda da.
Taxonomia, diversidade e estudo da virulência de fungos provenientes do permafrost da Antártica [manuscrito] / Thamar Holanda da Silva. – 2020.
193 f. : il. ; 29,5 cm.
Prof. Dr. Luiz Henrique Rosa.
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia.
1. Microbiologia. 2. Regiões Antárticas. 3. Pergelissolo. 4. Fungos /patogenicidade. I. Rosa, Luiz Henrique. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 579

ATA DE DEFESA



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

ATA DA DEFESA DE TESE DE **THAMAR HOLANDA DA SILVA**
Nº REGISTRO: 2016751252

Às 14:00 horas do dia 26 de novembro de 2020, reuniu-se, por via remota, a Comissão Examinadora composta pelos Drs. Susana Johann, Daniel de Assis Santos, Rachel Basques Caligiorne, Iara Furtado Santiago e o Prof. Luiz Henrique Rosa – Orientador, para julgar o trabalho final “Taxonomia, diversidade e estudo da virulência de fungos provenientes do *permafrost* da Antártica”, da aluna **Thamar Holanda da Silva**, requisito final para a obtenção do Grau de **DOUTOR EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Flávio Guimarães da Fonseca - Coordenador do Programa, 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. Belo Horizonte, 26 de novembro de 2020. O candidato tem 60 (sessenta) dias, a partir desta data, para entregar a versão final da tese ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da UFMG e requerer seu diploma.

Iara Furtado Santiago

Profa. Dra. Iara Furtado Santiago

Rachel Basques Caligiorne

Profa. Dra. Rachel Basques Caligiorne

Daniel de Assis Santos

Profa. Dr. Daniel de Assis Santos

Susana Johann

Profa. Dra. Susana Johann

Luiz Henrique Rosa

Prof. Dr. Luiz Henrique Rosa (Orientador)

Flávio Guimarães da Fonseca

Prof. Flávio Guimarães da Fonseca
Coordenador

Aos meus mestres e pais Martha e Elidio.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela sua graça em abundância sobre minha vida, me conduzindo até o presente em momento.

Aos meus pais Martha Holanda e Elídio Luiz, fundamento e base para que esta longa jornada de fato acontecesse, meu suporte diário. Aos meus avós, que intercedem incessantemente por minha vida, todos os dias. Aos meus irmãos Ângelo André e João Marcos que demonstram tanto carinho e orgulho pela minha caminhada. As minhas tias, tios, primas e primos Holandas espalhados por todo esse Brasil, que sempre me acolheram e torceram incondicionalmente por mim.

Ao meu esposo Leandro Alves, meu braço direito desde a graduação, que me acompanhou nessa jornada lado a lado, me amparando em cada noite de choro e cada manhã de alegria. Ouviu todas as minhas reclamações de PCRs errados e perrengues laboratoriais sem reclamar, me aconselhou em cada tomada de decisão e esteve comigo em cada uma delas.

Ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da UFMG, pela oportunidade e a CAPES pela bolsa de estudos.

Ao meu orientador Luiz pela oportunidade única em fazer parte desta equipe chamada Laboratório de Microbiologia Polar e Conexões Tropicais. Aqui, fiz amizades intensas e tenho certeza que duradouras. Obrigada a cada um por cada voto de confiança, por cada conselho, cada Jaeh ao fim de um longo dia de trabalho, cada convite para o bandeirão ou pra comer alguma porcária na cantina e esquecer dos problemas do laboratório por míseros 15 minutos.

Aos amigos também do Laboratório de Biologia e Biotecnologia que dividem não só o espaço físico, mas também uma jornada de vida.

A minha grande amiga desta jornada Mayara Ogaki, agradeço sua paciência em me ensinar tantas coisas, e até o último minuto de escrita dessa tese ter estado disposta a me ouvir, tirar dúvidas e estar de prontidão para o que der e vier. Sou eternamente grata pela sua amizade, sem você eu não teria chegado até aqui.

A minha companheira de casa Amanda Paixão por toda a companhia, cumplicidade e amizade diária durante os 3 primeiros e mais difíceis anos dessa jornada doutoral, além de toda sua família que sempre me colheram como parte dela.

As minhas grandes amigas Poly, Débora e Ester, e a todas as noites regadas a guacamole e Beyonce, que me faziam esquecer de todo problema acadêmico. Obrigada.

As minhas grandes amigas de graduação Luciana e Divina, que mesmo longe são apoio em todo e qualquer momento.

Aos meus amigos da Comunidade Horizonte que ouviram muitas das minhas petições, e oraram e se importaram comigo.

Ao Centro Comunitário Casa Luzeiro, que me permitiu estar em contato com o “ser humana”, me lembrando todos os dias o que são problemas reais, não me deixando a vida escapar pelos dedos.

A cada um que participou e trilhou comigo esta jornada, a minha sincera e eterna gratidão.

“A minha própria vida científica foi uma descida de dimensões altas para baixas, conduzidas pelo desejo de entender a vida. Fui de animais a células, de células a bactérias, de bactérias a moléculas...”

Albert Szent – Gyorgyi

RESUMO

A Antártica destaca-se dos demais continentes por sua singularidade de habitats, caracterizados principalmente por condições ambientais extremas como as baixas temperaturas e disponibilidade de água e nutrientes, os fortes ventos, os dinâmicos ciclos de congelamento e degelo e a alta incidência de radiação ultravioleta. Tais habitats são colonizados predominantemente por micro-organismos, os quais incluem táxons cosmopolitas tolerantes ao frio ou ainda os considerados endêmicos. Dentre os componentes do microbioma antártico estão os fungos, que por sua grande versatilidade metabólica, são capazes de sobreviver e/ou colonizar diferentes substratos. Na Antártica os solos permanentemente congelados, denominados *permafrost*, abrigam comunidades microbianas raras, que podem permanecer preservadas por milhares de anos. Com a intensificação das mudanças climáticas globais, principalmente no que se refere ao aumento da temperatura do planeta, uma das graves consequências pode ser o descongelamento em grandes parcelas do *permafrost* e, conseqüentemente, a liberação de organismos potencialmente ativos aprisionados neste ecossistema. Assim, a presente tese teve como objetivo caracterizar comunidades de fungos residentes no *permafrost* e sua camada ativa em diferentes ilhas do arquipélago Shetland do Sul, na Península Antártica, por métodos dependentes (com isolamento às temperaturas de 10, 25 e 37 °C com diferentes meios de cultivo) e independentes de cultivo, bem como avaliar o potencial de virulência *in vitro* de alguns dos fungos recuperados. Nas amostras obtidas nas ilhas Robert, Deception e Livingston, em temperaturas de 10 e 25 °C, foram obtidos 213 isolados de fungos cultiváveis de *permafrost* e 351 de camada ativa, classificados em 58 táxons, sendo 27 de *permafrost* e 31 de camada ativa. Os táxons *Bionectriaceae* spp., *Helotiales* spp., *Mortierellaceae* spp. e *Pseudeurotium* sp. foram dominantes na camada ativa, enquanto os gêneros *Oidiodendron*, *Penicillium* e *Pseudogymnoascus* foram mais abundantes em amostras de *permafrost*. Este foi primeiro relato de *Pseudogymnoascus* em *permafrost* antártico, e de grande importância devido à sua relação com espécies de *P. destructans*, causadora de grande mortalidade em morcegos na América do Norte. Os índices de diversidade entre as comunidades do *permafrost* e da camada ativa apresentaram diferenças em seus valores e dissimilaridade. Analisando apenas as amostras de *permafrost* das ilhas Robert, Livingston, Rei George e Deception, por meio de métodos independentes de cultivo (sequenciamento de nova geração – NGS), os filos mais abundantes detectados foram *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Chytridiomycota*, *Rozellomycota*, *Mucoromycota*, *Calcarisporiellomycota* e *Zoopagomycota*, respectivamente. Ao todo, 142 famílias e 201

gêneros de fungos foram detectados no *permafrost* da Antártica e 99 táxons pertenceram a níveis taxonômicos elevados, os quais podem representar novas espécies, ainda não contemplados nos bancos de dados utilizados. A comunidade de fungos não cultiváveis identificada no *permafrost* apresentou altos índices de diversidade, riqueza e dominância; entretanto, os índices variaram entre as ilhas e amostras analisadas, sendo Rei George (Thomas Point) a ilha com maior diversidade encontrada. Saprófitos foram o grupo mais comum detectado, enquanto patógenos de plantas e animais representaram a segunda maior proporção da diversidade de sequências fúngicas detectadas, enfatizando o risco de sua "liberação" no meio ambiente conforme o *permafrost* derrete com o aquecimento do clima. A fim de determinar se fungos recuperados no *permafrost* e camada ativa representam células ou propágulos viáveis com potencial patogênico, as amostras de Robert, Livingston, Rei George e Deception foram processadas e submetidas à incubação de 37 °C. Após o processamento foram obtidos 88 isolados fúngicos, classificados em 18 táxons, pertencentes aos gêneros *Alternaria*, *Aspergillus*, *Curvularia*, *Penicillium*, *Rhodotorula* e *Talaromyces*. Todos estes isolados foram avaliados *in vitro* quanto à capacidade de produzir enzimas extracelulares (fosfolipase e proteinase) que auxiliam processos de patogenicidade, bem como resistência a uma ampla variação de pH's e atividade hemolítica. Os fungos previamente reportados como oportunistas humanos *Aspergillus hiratsukae*, *Aspergillus thermomutatus* e *Rhodotorula* cf. *mucilaginososa* foram recuperados no *permafrost* antártico e capazes de crescer 45 e/ou 50 °C, possuindo atividade positiva para produção de fosfolipase, esterase, proteinase, atividade hemolítica e resistência a antifúngicos. Nossos resultados demonstram que o *permafrost* pode abrigar fungos viáveis e que estes contrastam com a camada ativa sobreposta. A Península Antártica é a principal região do planeta sob alto impacto das mudanças climáticas globais, conseqüentemente, seu *permafrost* pode estar sob ameaça de derretimento. Neste sentido, nossos resultados alertam sobre a influência das mudanças climáticas globais e a provável liberação de micro-organismos, com potencial patogênico para humanos e outros animais, de ecossistemas frios para outras partes do mundo.

Palavras-chave: Antártica. Permafrost. Fungos. Diversidade. Virulência.

ABSTRACT

Antarctica differs from the rest of the continents for its uniqueness of habitats, characterized mainly by extreme environmental conditions such as low temperature and availability of water and nutrients, strong winds, dynamic freezing and thawing cycles and a high incidence of ultraviolet radiation. Such habitats are colonized predominantly by microorganisms, which include cold-tolerant cosmopolitan taxa or even those considered endemic. Fungi are among the components of the Antarctic microbiome, and due to their differentiated metabolism, are able to survive and / or colonize different substrates. In Antarctica, permanently frozen soils, called permafrost, harbor rare microbial communities, which can remain preserved for thousands of years. With the intensification of global climate changes, especially with regard to the increase in the temperature of the planet, one of the serious consequences may be the thawing in large portions of permafrost and, consequently, the release of organisms trapped in this ecosystem. For this reason, this thesis aimed to characterize communities of fungi residing in permafrost and its active layer in different islands of the South Shetland archipelago, in the Antarctic Peninsula, by dependent and independent methods of cultivation, as well as to evaluate the potential of *in vitro* virulence of some of the recovered fungi. In the samples obtained in the Robert, Deception and Livingston islands, in temperatures of 10 and 25 °C, 213 isolates of cultivable permafrost fungi and 351 of active layer were obtained, classified in 58 taxa, being 27 of permafrost and 31 of active layer. The taxa *Bionectriaceae* spp., *Helotiales* spp., *Mortierellaceae* spp. and *Pseudeurotium* sp. were dominant in the active layer, while the genera *Oidiodendron*, *Penicillium* and *Pseudogymnoascus* were more abundant in permafrost samples. This was the first report of *Pseudogymnoascus* in Antarctic permafrost, and of great importance due to its relationship with species of *P. destructans*, which causes high mortality in bats in North America. In addition, there was a small difference in the rates of diversity between the permafrost and active layer communities, although with great dissimilarity. Analyzing only the permafrost samples from the Robert, Livingston, King George and Deception islands, using cultivation-independent methods (new generation sequencing-NGS), the most abundant phyla detected were *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Chytridiomycota*, *Rozellomycota*, *Mucoromycota*, *Calcarisporiellomycota* and *Zoopagomycota*, respectively. Altogether, 142 families and 201 genera of fungi were detected in the Antarctic permafrost and 99 taxa belonged to high taxonomic levels, which may represent new species, not yet included in the databases used. The community of non-cultivable fungi identified in permafrost showed high levels of diversity, richness and dominance; however, the rates varied between the islands and samples analyzed, with King

George (Thomas Point) being the island with the greatest diversity found. Saprophytes were the most common group detected, while plant and animal pathogens represented the second largest proportion of the diversity of detected fungal sequences, emphasizing the risk of their "release" into the environment as permafrost melts with climate warming. In order to determine whether fungi recovered in the permafrost and active layer represent viable cells or propagules with pathogenic potential, the samples from Robert, Livingston, King George and Deception were processed and subjected to a growth temperature of 37 ° C. After processing, 88 fungal isolates were obtained, classified into 18 taxa, belonging to the genera *Alternaria*, *Aspergillus*, *Curvularia*, *Penicillium*, *Rhodotorula* and *Talaromyces*. All of these isolates were evaluated for their ability to produce extracellular enzymes (phospholipase and proteinase) that assist processes of pathogenicity, as well as resistance to a wide range of pH's and hemolytic activity. The fungi previously reported as human opportunists *Aspergillus hiratsukae*, *Aspergillus thermomutatus* and *Rhodotorula* cf. *mucilaginosa* were recovered in the Antarctic permafrost and capable of growing at 45 and / or 50 °C, having positive activity for the production of phospholipase, esterase, proteinase, hemolytic activity and resistance to antifungals. Our results demonstrate that permafrost can harbor viable fungi and that these contrast with the overlapping active layer. The Antarctic Peninsula is the main region on the planet under high impact from global climate change, therefore, its permafrost may be under threat of melting. In this sense, our results warn about the influence of global climate changes and the probable release of microorganisms, with pathogenic potential for humans and other animals, from cold ecosystems to other parts of the world.

Keywords: Antarctic. Permafrost. Fungi. Diversity. Virulence.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Posição do continente Antártico em diferentes momentos desde a ruptura da Pangeia e Gondwana. Fonte: U.S. Geological Survey	17
Figura 2. Esquema proposto para as etapas envolvidas na emergência de <i>Candida auris</i> como patógeno humano [CASADEVALL et al. (2019b) com modificações].....	25
Figura 3. Mapa do arquipélago das ilhas Shetland do Sul na Antártica. A) Localização das Ilhas Shetlands do Sul; B) Localização das ilhas Rei George, Robert, Livingston e Deception - Península Antártica; C) Pontos de coleta na ilha Deception: Whalers Bay da direita e Crater Lake à esquerda; D) Pontos de coleta na ilha Rei George: Península Keller/Morro da Cruz a direita e Thomas Point/Arctowski a esquerda	32
Figura 4. Imagens de coleta das amostras de camada ativa e permafrost. (Fotos: Graciéle de Menezes e arquivo pessoal).....	33
Figura 5. Esquema do ensaio de susceptibilidade a anfotericina B, itraconazol e fluconazol por meio do teste de Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	45
Supplementary Figure 1. Maps of the South Shetland Islands where the samples were obtained. a = Robert, b = Livingston, and c = Deception islands. Red stars (c and d) are the specific sites where the permafrost and active layer were sampled	185
Supplementary Figure 2. Principal components analyses (PCA) of the physico-chemical characteristics and microbiological variables of soils in permafrost (P) and active layer (AL). a with all variables and b without K and P parameters	186

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação dos tipos de hemólise a partir da característica do halo (LUO et al., 2001)..... 43

Tabela 2. Classificação da atividade enzimática proteolítica e fosfolipídica (AOKI et al., 1990 com adaptações) 44

Supplementary Table 1. Frequency of fungal isolates obtained from active layer and permafrost of each islands sampled..... 181

Supplementary Table 2. Chemical properties of permafrost and active layer in soils from Deception, Livingston, and Robert islands..... 183

Supplementary Table 3. Diversity indices of fungal assemblages present in permafrost and active layer in different islands in the Antarctic Peninsula 184

LISTA DE ABREVIATURAS

% – por cento

UFC – unidade formadora de colônia

UFC g⁻¹ – unidade formadora de colônia por grama de solo

5 CTAB – Brometo de cetil trimetilamonio

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA – Ácido desoxirribonucléico

rRNA – Ácido ribonucleico ribossomal

dNTP – Desoxirribonucleotídeos fosfatados

10 EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético

mm – milímetro

cm – centímetro

µg mL⁻¹ – miligramas por mililitro

mg dm³ – miligrama por decímetro cúbico

15 cmolc dm³ – centimol de carga por decímetro cúbico

mL – mililitro

L – litros

ng – nanogramas

g – gramas

20 M – molar

mM – mili molar

mg mL⁻¹ – miligramas por mililitro

min – minutos

s – segundos

25 h – horas

rpm – rotações por minuto

°C - graus Celsius

pH – potencial Hidrogeniônico

v/v – volume por volume

SUMÁRIO

	1. INTRODUÇÃO.....	17
	1.1 Antártica.....	17
	1.2 Micro-organismos antárticos	18
5	1.3 <i>Permafrost</i> e micro-organismos residentes.....	19
	1.4 Fungos presentes no <i>permafrost</i>	22
	1.5 Aquecimento global, <i>permafrost</i> e fungos oportunistas	23
	2. RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA	29
	3. OBJETIVOS.....	31
10	3.1 Objetivo Geral.....	31
	3.2 Objetivos específicos	31
	4. MATERIAL E MÉTODOS.....	32
	4.1 Áreas de coleta.....	32
	4.2 Processamento das amostras e isolamento dos fungos	33
15	4.3 Identificação dos fungos cultiváveis.....	34
	4.3.1 Extração de DNA total dos isolados	34
	4.3.1.1 Fungos filamentosos	34
	4.3.1.2 Leveduras.....	35
	4.3.2 Amplificação utilizando o iniciador (GTG) ₅	35
20	4.3.3 Amplificação da região ITS	36
	4.3.4 Amplificação parcial do gene da β -tubulina	37
	4.3.5 Amplificação da RNA polimerase II	37
	4.3.6 Amplificação do domínio D1/D2	38
	4.3.7 Purificação dos amplicons	38
25	4.3.8 Reações de Sequenciamento e precipitação das amostras	39
	4.3.9 Análise computacional das sequências e análise filogenética	40
	4.4 Caracterização morfofisiológica dos isolados do gênero <i>Penicillium</i>	40
	4.5 Extração de DNA total e caracterização da comunidade de fungos por meio do sequenciamento de alta eficiência.....	41
30	4.6 Avaliação de diversidade da comunidade fúngica.....	41
	4.7 Avaliação de fatores de virulência <i>in vitro</i> de fungos presentes no <i>permafrost</i>	42
	4.7.1 Atividade hemolítica.....	42
	4.7.2 Crescimento em meio YM em diferentes faixas de pH	43
	4.7.3 Determinação da produção de enzimas hidrolíticas (fosfolipase e proteinase)	43
35	4.7.4 Teste de sensibilidade aos antifúngicos itraconazol, fluconazol e anfotericina B.....	44
	4.7.5 Ensaio de termotolerância.....	47

	4.7.6 Atividade de esterase	47
	4.7.7 Resistência ao congelamento a -80 °C	47
	4.8 Análise físico-química dos solos	48
	5. RESULTADOS	49
5	5.1 Capítulo 1: Antarctic Permafrost: An Unexplored Fungal Microhabitat at the Edge of Life.....	50
	5.2 Capítulo 2: Diversity, distribution, and ecology of viable fungi in permafrost and active layer of Maritime Antarctica.....	69
10	5.3 Capítulo 3: Diversity and ecology of fungi present in permafrost of South Shetland Archipelago, Antarctic Peninsula.	82
	5.4 Capítulo 4: Pathogenic potential of fungi recovered from permafrost and active layer from South Shetland Islands, Antarctica	130
	6. DISCUSSÃO INTEGRADA.....	163
	7. CONCLUSÕES.....	167
15	8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	168
	9. ANEXOS	181
	9.1 Material Suplementar do Capítulo 02	181
	9.2 Submissão do Capítulo 3 para a revista Scientific Reports	187
	9.3 Produção Acadêmica	188

1. INTRODUÇÃO

1.1 Antártica

No contexto da história e evolução geológica, a Antártica tem sua origem a partir de uma seção do supercontinente Gondwana, a qual estava conectado ao que hoje conhecemos por América do Sul, África, Índia e Austrália (CONVEY, 2007; TURNER, 2013) (**Figura 1**). Após sua separação, o que atualmente constitui o continente Antártico deslocou-se para o sul do planeta e se encontra isolada dos demais continentes por cerca de 120 milhões de anos (CONVEY, 2007). Mesmo após a separação, a glaciação na Antártica não foi imediata e evidências sugerem a ocorrência de mais de um processo de glaciação, deglaciação e re-glaciação (BARKER & THOMAS, 2004; BARKER et al., 2007).

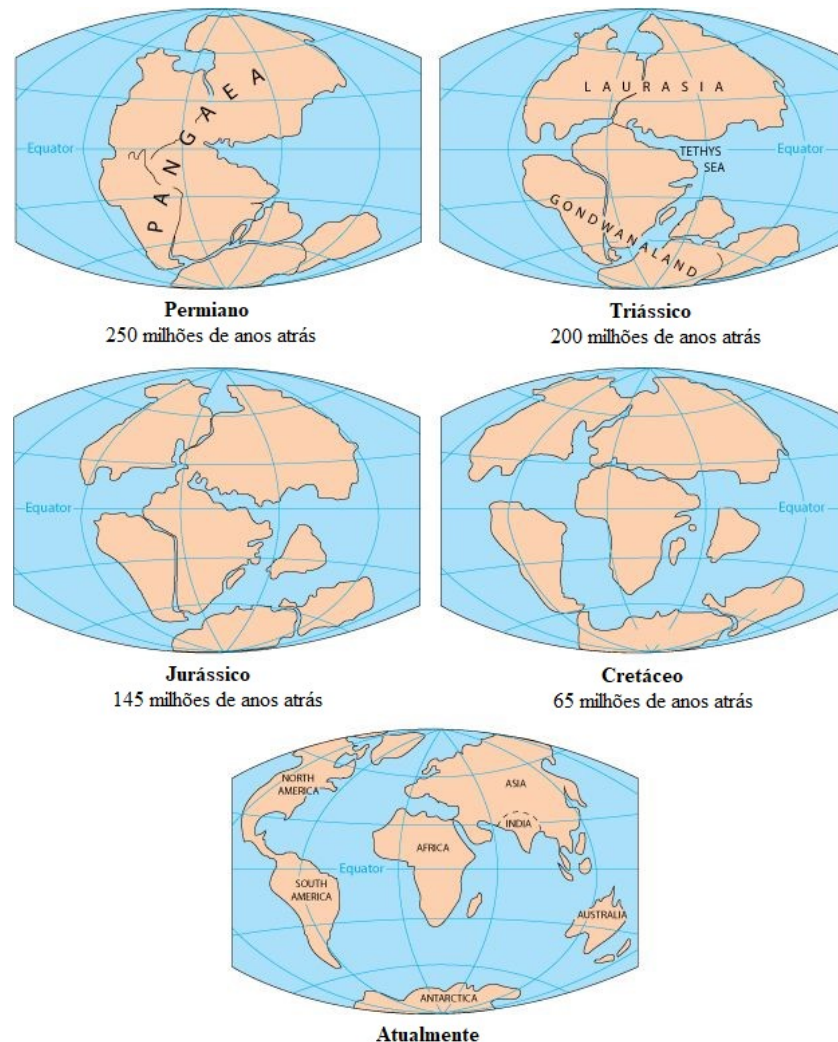


Figura 1. Posição do continente Antártico em diferentes momentos desde a ruptura da Pangeia e Gondwana. Fonte: U.S. Geological Survey (www.usgs.gov).

A Antártica possui cerca de 14 milhões de km² (TSUJI et al., 2013), onde aproximadamente 99,5% da área continental é coberta permanentemente por neve ou gelo, os

quais chegam a um volume total de 25,4 milhões de km³ (BARKER et al., 2007; CONVEY, 2007) e é dividida em três zonas biogeográficas: regiões sub-Antártica, Antártica Marítima e Antártica Continental. Contando com apenas duas estações (verão e inverno), a extensão do gelo na Antártica atinge o mínimo em fevereiro, durante o período do verão austral, e tem seu
5 volume aumentado cerca de cinco vezes durante o período de inverno austral (CONVEY, 2007; NASA, 2016).

Quanto à temperatura, a média na Antártica no inverno é de -34,4 °C; entretanto, a temperatura mais baixa já registrada foi de aproximadamente -94 °C e a mais alta atingiu a faixa dos 20 °C (NASA, 2008; SCAMBOS et al., 2018; WATTS, 2020). Contudo, as
10 condições extremas da Antártica não dizem respeito apenas às baixas temperaturas, mas também a baixa disponibilidade de água, frequentes ciclos de congelamento e descongelamento, baixa precipitação anual, fortes ventos, elevada sublimação e evaporação e alta incidência de luz solar, especialmente de radiação ultravioleta (RUISI et al., 2007). As características abióticas da Antártica são as principais responsáveis pelos padrões de
15 biodiversidade da região.

1.2 Micro-organismos antárticos

Os micro-organismos exercem papéis chave dentro da biosfera como colonizadores primários, sendo importantes componentes da biomassa e energia na base das teias
20 alimentares, reciclando macro e micro nutrientes, e como patógenos e simbioses (VINCENT, 2000). Portanto, a presença dos diferentes grupos microbianos é esperada e relatada nos variados ecossistemas antárticos, tais como solos, água marinha, lagos (superficiais e subglaciais), sedimentos de lagos, fontes termais, neve, gelo, plantas, invertebrados, entre outros (YARZÁBAL, 2016).

Os micro-organismos capazes de sobreviver, habitar e colonizar ambientes com condições extremas de temperatura, radiação, pressão, dessecação, salinidade, pH, oxigênio ou potencial redox, presentes na Antártica, são chamados de extremófilos (ROTHSCHILD & MANCINELLI, 2001; YARZÁBAL, 2016). Entre os micro-organismos extremófilos, aqueles adaptados aos ambientes frios são denominados psicrófilos, os quais podem ser obrigatórios,
25 quando exibem um crescimento ótimo a 15 °C, máxima de ≤ 20 °C e mínima de 0 °C ou menos, ou facultativos (psicrotolerantes), aqueles capazes de crescer a 0 °C, porém sua faixa ótima de crescimento está em torno de 20-30 °C (BUZZINI et al., 2012; BANERJEE et al., 2016). Temperaturas frias impõem grandes restrições à vida e, de fato, atributos como a

integridade celular, viscosidade da água, taxas de difusão do soluto, fluidez da membrana, cinética enzimática e interações macromoleculares são influenciadas negativamente por baixas temperaturas (D'AMICO et al., 2006; RODRÍGUES & TIEDJE 2008; YARZÁBAL, 2016). Micro-organismos psicrófilos possuem estratégias adaptativas para superar a influência
5 direta e indireta das baixas temperaturas (BUZZINI et al., 2012). As capacidades intrínsecas que permitem estes organismos sobreviverem nestes ambientes podem ser resultado de uma imensa acumulação de mutações dos extremófilos atuais ou mesmo de organismos primitivos que foram livremente adaptados a uma variedade de ambientes (MACELROY, 1974; JANSSEN & TAŞ, 2014).

10 Os micro-organismos presentes na Antártica já foram detectados em todos os habitats já explorados, como solos, gelo, neve, plantas, rochas, água e sedimentos de lagos, água e sedimentos marinhos (YARZÁBAL, 2016; ROSA, 2019). A grande variação de nichos presentes no continente faz com que diferentes técnicas sejam necessárias para os estudos de biodiversidade de micro-organismos da Antártica. A maioria dos estudos de fungos antárticos
15 tem sido realizada através de métodos dependentes de cultivo e os isolados obtidos têm sido foco de estudos taxonômicos e biotecnológicos (DUARTE et al., 2019; ROSA, 2019). Nos últimos anos técnicas independentes de cultivo têm sido exploradas nos como forma complementar o estudo de comunidades microbianas da Antártica (WOYKE et al., 2006; MARGESIN & COLLINS, 2019). Estudos demonstram um crescente interesse em estudar e
20 descrever a biodiversidade da Antártica, devido à percepção de que o próprio entendimento da diversidade biológica na Terra requer o avanço para as regiões polares (CONVEY et al., 2014; CHOWN et al., 2015; YARZÁBAL, 2016). No entanto, devido às condições inóspitas, isolamento geográfico e difícil acesso, o conhecimento da real diversidade e o uso biotecnológico dos micro-organismos antárticos permanece incompleto, quando comparados
25 com outras regiões polares, temperadas e tropicais do planeta (GONÇALVES et al., 2015).

1.3 *Permafrost* e micro-organismos residentes

De acordo com Willerslev et al. (2004), o *permafrost* é um componente da paisagem Antártica caracterizado como solos permanentemente congelados por pelo menos dois anos
30 consecutivos. O gelo compreende entre 20 a 70% do volume do *permafrost* e apenas 1–7% é composto por água descongelada, dependendo da temperatura e da textura do sedimento (e.g. proporção de areia, silte e argila) (WILLERSLEV et al., 2004; MARGESIN & COLLINS 2019). Embora, a priori, o continente pareça um ambiente pouco diverso, a Antártica possui ecossistemas complexos crípticos com propriedades únicas e diferentes substratos que servem

de micro habitats para vários grupos microbianos (ROSA, 2019). Entre os micro-habitats inexplorados, o *permafrost* parece representar um dos principais alvos para estudos de micro-organismos que se encontram no limite da vida (DA SILVA et al., 2019).

Apesar de ser um fenômeno estritamente térmico, como salientado por Steven et al. (2006), o *permafrost* pode apresentar diferentes propriedades ao longo de sua distribuição, como extensão, conteúdo de matéria orgânica, idade, textura do solo e teor de gelo (SHUR & JORGENSEN, 2007; JANSSON & TAŞ, 2014). As medições da temperatura do *permafrost* antártico são escassas, mas especificamente nas ilhas Shetland do Sul variam entre -0,4 a -1,8 °C (BOCKHEIM et al., 2013) e estima-se que 17 a 25% da área terrestre global possui *permafrost* subjacente (BOCKHEIM et al., 2013; JANSSON & TAŞ, 2014), dos quais 37% encontram-se na Antártica (GOORDIAL et al., 2017), ocupando cerca de 50 mil km² (VIEIRA et al., 2010).

Quanto à sua profundidade, o *permafrost* pode ser encontrado entre poucos centímetros até 1 km de profundidade (BOCKHEIM & HALL, 2002) e, geralmente, encontra-se coberto por uma camada de solo ativa (denominada camada ativa) exposta aos ciclos de congelamento e degelo sazonais e, por isso, considerada um ambiente instável (BOCKHEIM & HALL, 2002; SHUR & JORGENSEN, 2007; JANSSON & TAŞ, 2014; CZECHOWSKI et al., 2016). Abaixo da camada ativa, existe o *permafrost* propriamente dito, caracterizado como uma barreira física e biogeoquímica a processos externos (e.g. radiação ultravioleta), com seus horizontes subjacentes firmemente cimentados e constituídos por poros do solo muitas vezes totalmente preenchidos por gelo (GILICHINSKY et al., 2007).

Os *permafrost* mais antigos conhecidos até o momento foram datados de 3 milhões de anos (JANSSON & TAŞ, 2014). Na Antártica já foram datadas amostras de *permafrost* de até 170 mil anos (KOCHKINA et al., 2001). O contexto atmosférico e ecológico do período no qual o *permafrost* foi formado (atmosfera rica em CO₂, presença de vegetação e água), pode ter sido conservado por meio do congelamento nos períodos de glaciação, onde as células, propágulos dormentes, esporos e/ou material genéticos mais antigos da Terra podem revelar o passado dos nossos ecossistemas (WILLERSLEV et al., 2004). Adicionalmente, alguns estudos dão evidências que micro-organismos foram capazes de se adaptar e até mesmo permanecerem ativos no *permafrost*, tornando este substrato um nicho ecológico único para micro-organismos adaptados ao frio (JANSSON & TAŞ, 2014).

Para sobreviver no *permafrost*, os organismos devem ser capazes de suportar exposições prolongadas a temperaturas abaixo de zero ao longo de décadas, baixa concentração de água líquida e taxas extremamente baixas de transferência de nutrientes e metabólitos (STEVEN et

al., 2006; MARGESIN, 2008). A preservação de antigas comunidades de seres vivos viáveis no *permafrost* antártico levanta questões primordiais como os mecanismos de sobrevivência biológica como tolerância ao congelamento, baixa disponibilidade de água e nutrientes e capacidade de reparar danos no DNA *in situ* (GILICHINSKY et al., 2007). Segundo Hultman et al. (2015), é possível que alguns RNAs e proteínas tenham sido preservados por longos períodos no *permafrost*, ou ainda, que eles tenham sido mantidos em tecidos em um estado dormente. Embora imponha severas limitações a organismos que conhecemos, a biodiversidade encontrada no *permafrost* é relativamente alta, demonstrando não ser apenas um habitat congelado com micro-organismos sobreviventes, pois as comunidades microbianas presentes tendem a apresentar altas taxas de endemismo (CZECHOWSKI et al., 2016; ZUCCONI et al., 2012; KOCHKINA et al., 2014).

Os micro-organismos mais bem estudados no *permafrost* são as bactérias, seguidas pelos fungos (JANSSON & TAŞ, 2014). A relação de abundância fungos/bactérias no *permafrost* parece ser baixa, provavelmente devido à baixa atividade de água e quantidades limitantes de C e N, condições estas que restringem o crescimento e dispersão de fungos (DREESENS et al., 2014; GOORDIAL et al., 2017).

Estudos com bactérias foram os primeiros a demonstrar que estas eram capazes de manter atividade biológica neste meio (JANSSON & TAŞ 2014). Inicialmente era pensado que os fungos estivessem presentes apenas sob a forma de esporos, fragmentos de hifas e propágulos de resistência, não desempenhando atividades metabólicas (VOROBYOVA et al., 2001; GOORDIAL & WHYTE, 2014). Porém, um estudo recente de Messan et al. (2020) envolvendo o metaboloma destes ambientes mostrou que alguns metabólitos, como o composto antiviral Brefeldin-A, ativamente presentes nas amostras, pode estar associado a atividade de fungos como *Penicillium brefeldianum*. A produção do metabólito no ambiente de *permafrost* pode estar ligada a estratégias de antagonismo para a sobrevivência de diferentes micro-organismos, e após o aquecimento destes solos foi percebida uma diminuição da produção deste metabólito. Possíveis explicações para seu declínio após o degelo incluem que os micro-organismos que produzem esses metabólitos antagônicos foram mortos ou que eles não tinham mais a necessidade ecológica de produção para sobreviver.

Como discutido ao longo deste tópico, o *permafrost* é de fato um ambiente com muitos fatores extremos. Assim, as comunidades de organismos presentes neste ambiente devem ser capazes de resistir aos dois principais fatores limitantes para a vida: temperaturas extremamente baixas e baixa disponibilidade de água líquida, diferente do que conhecemos na Terra.

1.4 Fungos presentes no *permafrost*

A maior parte da biosfera terrestre é caracterizada por baixas temperaturas (<5 °C) e por isso é importante considerar o entendimento das atividades e adaptações dos microorganismos, bem como as interações ecológicas das comunidades microbianas ativas nestes habitats (ELSTER et al., 2017). A temperatura e disponibilidade de água são os fatores mais determinantes nos níveis de biomassa, diversidade e estrutura da comunidade de fungos em ambientes com baixa temperatura (JANSSON & TAŞ, 2014), enquanto a profundidade e idade do *permafrost* não mostram relação com a quantidade de fungos encontrados, pois as populações podem ser detectadas em qualquer porção da amostra, independente da profundidade ou idade dos sedimentos (OZERSKAYA et al., 2009).

Até o momento, poucos trabalhos foram desenvolvidos com o objetivo de identificar comunidades de fungos habitantes do *permafrost* da Antártica (KOCHKINA et al., 2001 e 2012; GILICHINSKY et al., 2007; ZUCCONI et al., 2012; GOORDIAL et al., 2016, 2017; DA SILVA et al., 2019; DA SILVA et al., 2020), os quais registram a presença dominante de fungos capazes de formar conídios como, por exemplo, espécies de *Aspergillus*, *Chrysosporium*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Pseudogymnoascus* e *Mortierella*, possivelmente em estado de dormência e permitindo-os um longo tempo de sobrevivência neste microhabitat (OZERSKAYA et al., 2009; SILVA et al., 2019, 2020). Até o início do presente trabalho a maior parte do nosso conhecimento sobre a micobiota de *permafrost* era proveniente de ecossistemas do Ártico. Ozerskaya et al. (2009) apresentaram 33 famílias e 77 espécies ocorrendo no *permafrost* Ártico a partir da compilação de registros de nove artigos publicados. Já para a Antártica, os trabalhos apresentavam 32 famílias registradas em apenas cinco artigos publicados, indicando que a diversidade fúngica de *permafrost* da Antártica poderia ser relativamente alta, mesmo numa situação de insuficiência amostral (DA SILVA et al., 2019). Com o presente trabalho foi possível elevar para 142 registros de famílias fúngicas encontradas em *permafrost* da Antártica (DA SILVA et al., 2020b).

Para sobreviverem sob condições de baixa temperatura, os fungos evoluíram em termos de estratégias diferenciais, tais como gerar esporos multicelulares, presença de melanina na parede celular, produção de crioprotetores (e.g. proteínas anticongelantes que reduzem a presença de cristais de gelo no citoplasma), elevação de trealose intracelular (protetora de stress no citosol), produção de poliols (e.g. glicerol e manitol que podem aumentar a concentração para manter a pressão de turgor), produção de ácidos graxos insaturados (proporcionando um aumento da fluidez da membrana) e síntese de enzimas que atuam a baixas temperaturas (e.g. lipases, poligalacturonase, amilase, fosfatase) (ROBINSON, 2001;

OZERSKAYA et al., 2009; BUZZINI et al., 2012). Assim, a adaptação a essas condições pode ter levado à evolução de enzimas com propriedades únicas (KOCHKINA et al., 2001). Contudo, o principal interesse em fungos da Antártica não está baseado apenas na vontade de revelar novos ou raros micro-organismos e encontrar novos metabólitos de interesse biotecnológico, mas também novas fronteiras do conhecimento como a obtenção de informações sobre a reserva da diversidade de micro-organismos deste continente, suas funções ecológicas em condições extremas e potencial de se tornarem patógenos oportunistas de humanos, animais e vegetais (KOCHKINA et al., 2014).

10 **1.5 Aquecimento global, *permafrost* e fungos oportunistas**

As alterações ambientais causadas pelas diferentes atividades antrópicas têm gerado prejuízos cada vez mais perceptíveis no planeta e, por isso, são foco de discussões mais frequentes nos últimos anos (JANSSON & HOFMOCKEL, 2019). A Antártica é considerada uma região de grande influência para o clima global e, até o momento, parece ser uma das regiões do planeta menos afetada por impactos antrópicos diretos (GUGLIELMIN & CANNONE, 2012). Contudo, a Antártica, principalmente a Península Antártica, representa uma região sensível às mudanças climáticas globais (MAXWELL & BARRIE, 1989; RAMOS et al., 2017) e, por isso, diversas alterações ambientais podem atingi-la direta e indiretamente, como o aumento da temperatura global causado pelas altas taxas de emissão de gases do efeito estufa (JANSSON & TAŞ, 2014). Adicionalmente, Fraser et al. (2018) já demonstraram que a Antártica não está mais biologicamente isolada dos outros continentes e que o aquecimento global tem o potencial de permitir o estabelecimento de diversas novas espécies que alterariam drasticamente a dinâmica do ecossistema, mesmo sem introduções antropogênicas.

Pesquisas sobre *permafrost* aumentaram nos últimos anos devido às preocupações emergentes sobre os impactos resultantes das mudanças climáticas nas regiões frias do planeta, que ocasionariam seu degelo (MARGESIN & COLLINS, 2019). Estimativas indicam que o aumento da temperatura tem o potencial de causar uma expansão substancial de até 25% das áreas sem gelo na Antártica até o final deste século (LEE et al., 2017). As variáveis físicas que mais podem impactar o *permafrost* são os estágios de degelo, diminuição da cobertura de neve, aumento da disponibilidade de nutrientes e alteração da disponibilidade de água no estado líquido (NIKRAD et al., 2016). Este aumento na disponibilidade de nutrientes, matéria orgânica e água no estado líquido, previamente congelados, podem promover

significativamente a atividade microbiana, levando à emissão subsequente de CO₂, N₂O e CH₄, criando em contrapartida um aumento da temperatura global (LULÁKOVÁ et al., 2019; BISKABORN et al., 2019; XUE et al., 2020).

O fim do estágio de dormência de diferentes fungos, o qual pode ser influenciado pelo aquecimento global em regiões frias, pode trazer à tona isolados potencialmente danosos à saúde humana, animal e vegetal. Embora ainda faltem evidências concretas em relação aos fungos, algo similar já foi relatado com o isolamento do vírus patogênico de eucarioto *Pithovirus sibericum* e da bactéria *Bacillus anthracis* a partir de *permafrost* siberiano com datação de 30 mil anos de idade (REVICH & PODOLNAYA, 2011; LEGENDRE et al., 2014). Tal constatação também nos sugere que possíveis fungos patogênicos possam estar presentes no *permafrost*, podendo ser liberados com seu eventual aquecimento.

É importante ressaltar que grande parte dos patógenos fúngicos humanos é de origem ambiental (BRUNKE et al., 2016). Estes fungos podem entrar em hospedeiros humanos ocasionalmente, muitas vezes acidentalmente, e causar doenças, pois encontram ali condições que se assemelham ao seu nicho de origem (BRUNKE et al., 2016). A patogenicidade desses fungos é resultado de adaptações evolutivas que lhe trouxeram benefícios como a termotolerância, a capacidade de competir por alimento com outros micro-organismos por meio de produção de substâncias antagonistas, suportar extremos de umidade e sobreviver à predação por organismos ameboides e pequenos animais como nematoides (CASADEVALL, 2007; GARCIA-SOLACHE & CASADEVALL, 2010; CASADEVALL et al., 2019a). De fato, a emergência de fungos ambientais capazes de causar doenças em humanos e animais tem sido observada com maior frequência nos últimos anos, como exemplificado a seguir. Vários patógenos fúngicos surgiram recentemente e são de grande preocupação para a conservação da vida selvagem, incluindo *Batrachochytrium dendrobatidis* e *Batrachochytrium salamandrivorans* (agentes da quitridiomíose anfíbia), *Ophidiomyces ophiodiicola* (agente da doença fúngica das serpentes), *Aspergillus sydowii* (infecção em corais), *Nosema* spp. (associado ao distúrbio do colapso em colônias de abelhas), *Pseudogymnoascus destructans* (síndrome do nariz branco em morcegos) e como patógenos humanos e da vida selvagem em regiões anteriormente não endêmicas, como por exemplo, a linhagem VGII virulenta emergente de *Cryptococcus gattii* no noroeste da América e *Cryptococcus neoformans* no sudeste da Ásia e de *Candida auris* (FISHER et al., 2012; ZUKAL et al., 2016; DREES et al., 2017; CASADEVALL et al., 2019; GRUPE & QUANDT, 2020).

Segundo Casadevall et al. (2019b), *C. auris* pode ter emergido como consequência das mudanças climáticas e propõe um modelo para a forma como isto pode ter ocorrido (**Figura 2**). Espécies de *Cryptococcus* e *Aspergillus*, originalmente ambientais, não apenas tem a capacidade de se tornarem patógenos como estão entre os quatro gêneros que juntos somam mais de 90% de todas as mortes relatadas por fungos, juntamente com *Candida* e *Pneumocystis* (BROWN et al., 2012; BRUNKE, 2016). Acredita-se que a sobrevivência e crescimento desses fungos no hospedeiro, bem como danos subsequentes, sejam mediados por fatores de virulência que os diferenciam daqueles não patogênicos (BRUNKE et al., 2016).

10

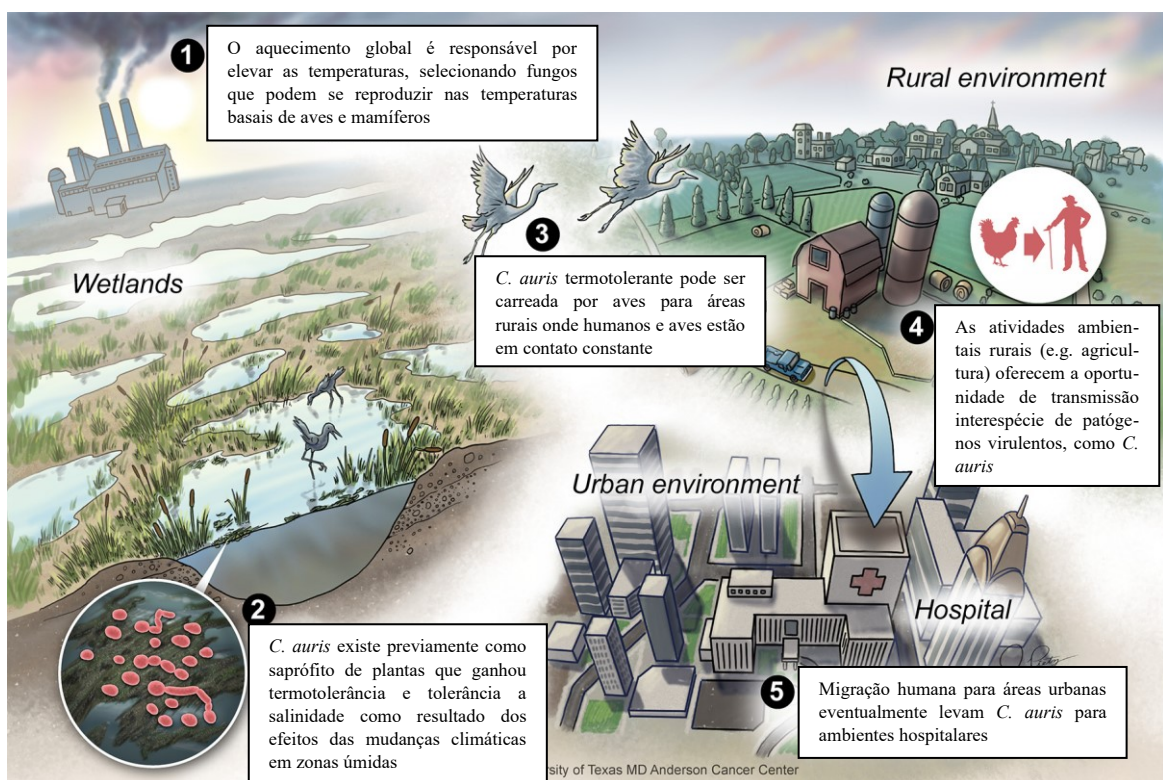


Figura 2. Esquema proposto para as etapas envolvidas na emergência de *Candida auris* como patógeno humano [CASADEVALL et al. (2019b) com modificações].

Uma definição clara dos fatores de virulência é complexa, já que muitas características apresentadas por micro-organismos patogênicos podem ter dupla função, tanto durante a patogênese quanto no ambiente ou durante as fases de seu crescimento (BRUNKE et al., 2016). Mesmo assim, é adotada a definição de virulência como a capacidade relativa de um micro-organismo causar danos a um hospedeiro (CASADEVALL & PIROFSKI, 2000), já os

fatores de virulência são as características exigidas para sobrevivência e crescimento neste ambiente específico (BRUNKE et al., 2016).

Dentre os principais fatores de virulência podemos destacar a termotolerância, que do ponto de vista da virulência fúngica em mamíferos pode ser definida como, a capacidade do
5 fungo crescer na faixa de 35 a 40 °C (ROBERT et al., 2015). Esta capacidade é então uma das primeiras barreiras que o fungo precisa “ultrapassar” para que exerça virulência no hospedeiro, por se tratar da faixa de temperatura corporal dos mamíferos (COONEY & KLEIN, 2008; GOSTINČAR et al., 2011; CASADEVALL et al., 2019b). A vasta maioria dos fungos é adaptada a temperaturas ambientais e assim não crescem bem na temperatura
10 corporal, tornando-se uma das razões a quais apenas poucas espécies são patogênicas para humanos. Porém, à medida que o clima esquenta nas diferentes regiões do planeta, alguns desses organismos, como *C. auris*, se adaptam às temperaturas mais altas e rompem a temperatura corporal protetora dos seres humanos (CASADEVALL et al., 2019b; HOFER, 2019).

Mudar o pH do ambiente também representa uma das estratégias que micro-organismos podem exercer para vencer a resposta imune do hospedeiro (VYLKOVA, 2017). Embora os valores de pH possam variar, de altamente ácido no estômago (pH <2) a levemente ácido na pele (6,5 <pH <4,5), neutro no sangue (pH 7,4) e básico em partes do intestino (<8,5), a capacidade de crescer em pH básico representa uma característica de fungos invasores de
20 tecidos profundos (TOMEI & KAUFFMAN, 2000; VYLKOVA, 2017). A adaptação dos fungos às variações de pH no hospedeiro é crítica para sua sobrevivência, assim, os patógenos fúngicos são capazes de modular ativamente o pH ambiental, seja neutralizando para suprimir as respostas imunes do hospedeiro, alcalinizando para modular sua virulência, ou acidificando o pH para facilitar sua penetração nas superfícies do hospedeiro e dificultar a resposta imune
25 (VYLKOVA, 2017).

Alguns metabólitos têm se mostrado capazes de contribuir com a patogenicidade de vários fungos como, por exemplo, a melanina (SCHARF et al., 2014), desempenhando um papel protetor na sobrevivência do agente patogênico à morte oxidativa e à radiação UV (ALLAEIBY et al., 2016). O fungo *Aspergillus fumigatus* produz melanina, principalmente
30 durante a conidiogênese e é responsável pela característica cor cinza-esverdeada dos esporos (PERRIN et al., 2007; SCHARF et al., 2014; FRISVAD & LARSEN, 2016). Esporos são comuns na natureza, com uma estimativa de que todo ser humano inala centenas de milhares de conídios por dia, representando uma questão importante, especialmente para pacientes que sofrem de um sistema imunológico debilitado, tornando *A. fumigatus* o mais importante

agente patogênico fúngico transmitido pelo ar em humanos (BRAKHAGE et al., 2010; SCHARF et al., 2014).

Outro bom exemplo de metabólitos secundários essenciais para a virulência de fungos são os sideróforos (SCHARF et al., 2014). O ferro é um nutriente indispensável para todos os organismos eucarióticos e embora seja altamente abundante na forma oxidada no ambiente, a disponibilidade dentro de um hospedeiro animal é extremamente baixa (SCHARF et al., 2014). Como resposta, os patógenos fúngicos possuem estratégias como a produção de sideróforos capazes de quelar ferro, permitindo que o fungo faça sua captação e assimilação dentro do hospedeiro (SCHARF et al., 2014; FURLANETO et al., 2018). Outra forma de captação de ferro é a partir da lise da hemoglobina (hemólise), mecanismo que libera os íons ferro para utilização pelo patógeno fúngico, como por exemplo, espécies do gênero *Aspergillus* (AKTAS & YIGIT, 2015; GHORBEL et al., 2019). Segundo Buxton (2005), por este mecanismo são classificadas três formas de hemólise celular:

- Alfa-hemólise (α): caracterizada por uma hemólise parcial/incompleta, associada com a redução da hemoglobina (Fe^{2+}) dos glóbulos vermelhos em meta-hemoglobina (Fe^{3+}) no meio ao redor da colônia, ocorrendo uma zona cinza-esverdeada no meio de cultura ao redor da colônia;
- Beta-hemólise (β): sinalizada pela lise completa das hemácias que rodeiam a colônia, ocorrendo uma zona transparente (zona de lise total) ao redor da colônia;
- Gama-hemólise (γ): é caracterizada pela ausência de hemólise. Cepas desses microorganismos não hemolíticos, ou d-hemolíticos, não causam modificação ao redor das colônias em meio ágar sangue.

A capacidade de produzir enzimas hidrolíticas extracelulares, como proteinases, fosfolipases e esterases, também constitui um importante fator de virulência em fungos (GHORBEL et al., 2019). Fosfolipídios e proteínas representam os principais constituintes químicos da membrana celular do hospedeiro e, portanto, enzimas capazes de hidrolisar essas classes químicas, como fosfolipases e proteinases, provavelmente, estão envolvidas nos processos de ruptura da membrana celular que ocorrem durante a invasão da célula de um hospedeiro (GHANNOUM, 2000). A produção de fosfolipases é um fator de virulência essencial em fungos patogênicos que incluem *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* e espécies de *Aspergillus* (GHANNOUM, 1998), sendo *C. albicans* também produtora de proteinases (BERNARDIS et al., 1990; NAGLIK et al., 2003). Uma vez ocorrido o contato do

fungo com o hospedeiro, as enzimas facilitam a aderência danificando ou degradando as membranas celulares e proteínas extracelulares permitindo a entrada do patógeno no hospedeiro (MOHANDAS & BALLAL, 2011; GHORBEL et al., 2019). O papel da esterase (ou monoacilglicerol lipase) em fungos capazes de causar micoses cutâneas e subcutâneas é provavelmente o de hidrolisar as gorduras subcutâneas e os resíduos de ácidos graxos usados como fonte de nutrientes pelo fungo invasor (PALMEIRA et al., 2010).

Outros dois fatores precisam ser mencionados: o diâmetro dos esporos, que quando pequenos (2–3 µm de diâmetro) podem adentrar os alvéolos pulmonares, produzindo infecções apenas pela própria inalação (TOMEI & KAUFFMAN, 2000; LATGÉ, 2001) e capacidade de produção de cápsula polissacarídica (característico de espécies de *Cryptococcus*) que atua inibindo a fagocitose e impedindo a ação do sistema imune do hospedeiro (FERREIRA-PAIM et al., 2012). É importante salientar que a capacidade de causar danos não é uma propriedade do micro-organismo sozinho, mas emerge da interação com um hospedeiro suscetível e um patógeno no quadro de dano-resposta (BRUNKE et al., 2016).

As doenças fúngicas são observadas principalmente em indivíduos com deficiência imunológica, que tiveram alteração na ecologia ou exposição a um inóculo elevado (CASADEVALL, 2007). Estima-se que, mesmo com uma riqueza fúngica de espécies tão grande, apenas 150 a 300 espécies são conhecidas por causarem doenças em humanos (TAYLOR et al., 2001) e essa relativa escassez de fungos patogênicos entre as milhões de espécies estimadas é uma prova da eficácia das defesas humanas (BLACKWELL, 2011).

A partir do exposto, o impacto global das rápidas mudanças climáticas torna os ambientes polares e alpinos alvos de preocupação para a ciência e sociedade, pois os impactos ecológicos resultantes dessas mudanças já estão sendo observados em nível de ecossistemas (ELSTER et al., 2017). Existe uma necessidade urgente de compreender melhor as repercussões dessas mudanças nos principais processos biogeoquímicos realizados pelos micro-organismos do solo e usar essas informações para melhores previsões dos impactos climáticos, projetando estratégias para combater o aquecimento e degradação do solo (JANSSON & HOFMOCKEL, 2019). De acordo com Nikrad et al. (2016), a paisagem dos ecossistemas congelados está mudando rapidamente e nosso conhecimento da atividade fúngica em solos congelados está avançando mais lentamente do que a mudança ambiental que está ocorrendo.

2. RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

A principal característica extrema da Antártica está relacionada com as baixas temperaturas. Entretanto, essa não é a única característica extrema que distingue a Antártica das demais regiões do planeta. Na Antártica, a baixa disponibilidade de água e nutrientes, fortes ventos, dinâmicos ciclos de congelamento e degelo e alta incidência de radiação ultravioleta também diferenciam o continente, tornando-o um dos mais extremos do planeta (COWAN & TOW, 2004; RUISI et al., 2007). Neste contexto, os micro-organismos (vírus, bactérias, cianobactérias, arqueias e fungos) residentes nos diferentes ecossistemas da Antártica podem ser representados por táxons cosmopolitas adaptados ao frio e também por aqueles endêmicos, os quais possuem vias metabólicas diferenciais necessárias as adaptações às condições extremas da região (RUISI et al., 2007).

Nos ecossistemas antárticos é comum a ocorrência dos solos permanentemente congelados, denominados *permafrost*, os quais vêm demonstrando serem capazes de abrigar importantes comunidades microbianas conservadas por até milhares de anos. Entre os micro-organismos residentes no *permafrost*, poucos estudos foram conduzidos sobre os fungos. Até o início do presente trabalho, apenas seis trabalhos haviam sido publicados com o intuito de investigar a comunidade de fungos de *permafrost* da Antártica (KOCHKINA et al., 2001; GILICHINSKY et al., 2007; KOCHKINA et al., 2012; ZUCCONI et al., 2012; GOORDIAL et al., 2016; GOORDIAL et al., 2017). Ainda assim, nenhum deles teve como alvo o *permafrost* presente nas ilhas Shetland do Sul na Antártica Marítima, região que mais vem sofrendo os efeitos do aquecimento global no planeta (LEE et al., 2017).

A importância de estudar os fungos de *permafrost* vai além de suas capacidades adaptativas e o que elas podem proporcionar. As diversas alterações ambientais globais podem atingir direta e indiretamente a Antártica, como o aumento da temperatura causado pelas altas taxas de emissão de gases do efeito estufa (JANSSON & TAŞ 2014). Uma das consequências mais diretas do aquecimento global sobre as calotas polares é o substancial derretimento das geleiras e também do *permafrost*, e com isso a possível liberação de micro-organismos ali aprisionados a milhares de anos. As taxas de aquecimento do *permafrost* da Antártica aumentaram cerca de $0,37 \pm 0,10$ °C apenas na última década (BISKABORN et al., 2019), colocando gradativamente este ecossistema polar em risco. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo a caracterização de fungos presentes em *permafrost* e camada ativa do solo de diferentes ilhas do Arquipélago Shetland do Sul, na Península Antártica, contribuindo com a ampliação da taxonomia, filogenia, diversidade, ecologia e biogeografia

de espécies pouco ou ainda não conhecidas, bem como avaliar o potencial de virulência *in vitro* de fungos residentes no *permafrost* antártico.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

5 Caracterizar a comunidade de fungos presentes em amostras de *permafrost* e camada ativa de diferentes regiões da Península Antártica e investigar táxons oportunistas com potencial patogênico para humanos.

3.2 Objetivos específicos

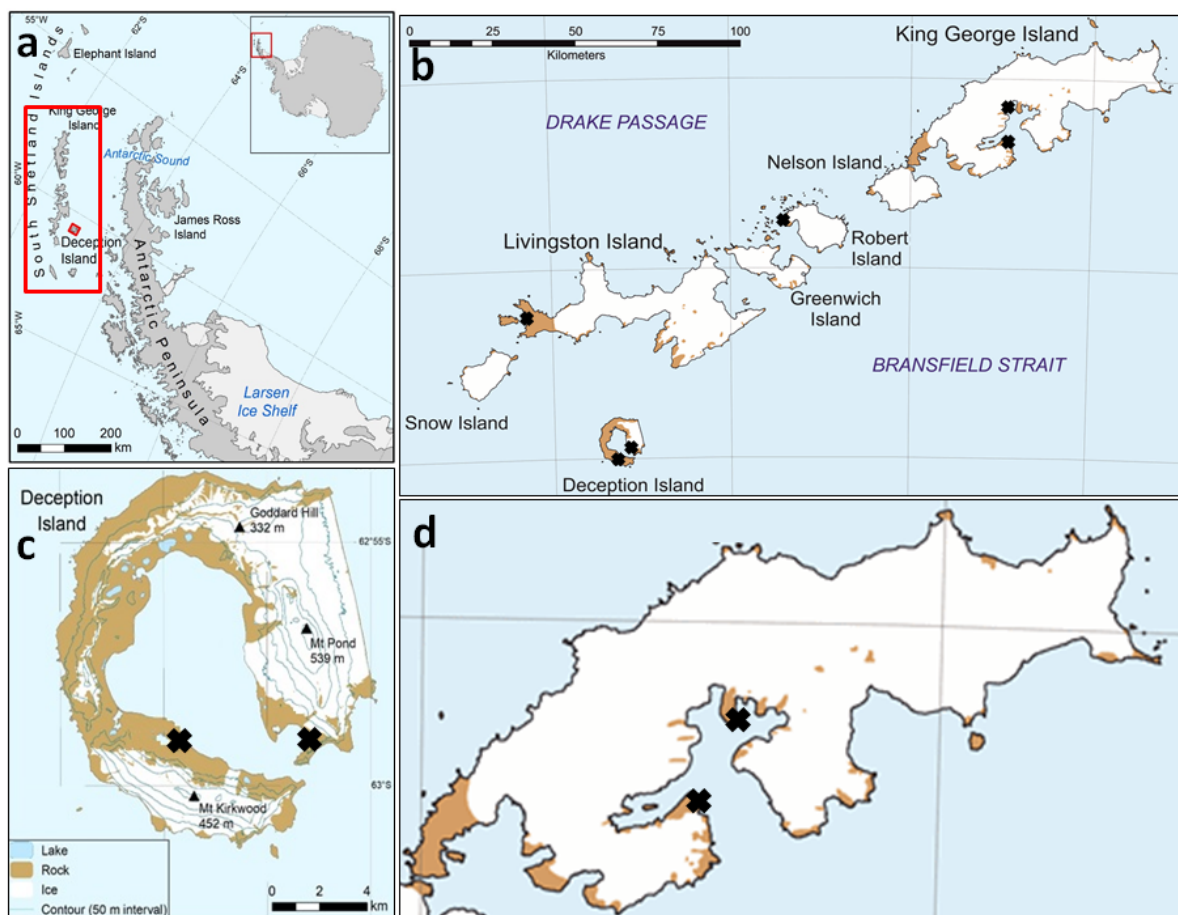
1. Caracterizar a comunidade de fungos do *permafrost* de diferentes ilhas da Península Antártica por meio de técnicas clássicas de cultivo;
- 10 2. Identificar todos os fungos cultiváveis obtidos por meio de taxonomia polifásica;
3. Contribuir para a preservação *ex situ* dos fungos obtidos por meio da montagem de uma coleção de culturas temática de fungos antárticos;
4. Caracterizar a comunidade de fungos do *permafrost* das ilhas da Península Antártica por meio do sequenciamento de nova geração (NGS) de forma independente de cultivo;
- 15 5. Caracterizar a diversidade e os aspectos ecológicos das comunidades de fungos detectadas;
6. Avaliar o potencial patogênico dos fungos cultiváveis obtidos por meio da detecção de fatores de virulência *in vitro*.

20

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Áreas de coleta

As amostras de *permafrost* foram obtidas em diferentes ilhas da Antártica durante as atividades da Operação Antártica XXXV e XXXVI no verão antártico de 2016-2017, 2017-2018, respectivamente. As ilhas alvo estão localizadas na Antártica Marítima (**Figura 3A e B**), sendo elas: Robert, Livingston, Deception (em dois pontos: Crater Lake e Whalers Bay) (**Figura 3C**) e Rei George (em dois pontos: Thomas Point/Arctowski e Península Keller/Morro da Cruz) (**Figura 3D**).



10

15

Figura 3. Mapa do arquipélago das ilhas Shetland do Sul na Antártica. A) Localização das Ilhas Shetlands do Sul; B) Localização das ilhas Rei George, Robert ($62^{\circ}37'S / 59^{\circ}70' W$), Livingston ($62^{\circ}11'476'' W / 57^{\circ}16'475''W$) e Deception - Península Antártica; C) Pontos de coleta na ilha Deception: Whalers Bay da direita ($60^{\circ}33'24.3'' W / 62^{\circ}58'40.1'' S$) e Crater Lake à esquerda ($60^{\circ}39'47.7'' W / 62^{\circ}58'52.8'' S$); D) Pontos de coleta na ilha Rei George: Península Keller/Morro da Cruz ($58^{\circ}23'658'' W / 62^{\circ} 04' 894'' S$) a direita e Thomas Point/Arctowski a esquerda ($58^{\circ}28'36.6'' W/ 62^{\circ}09'32.2'' S$).

A camada ativa do solo (solo superficial) foi removida com auxílio de piqueta até que fosse possível encontrar o permafrost (**Figura 4**), presente em profundidades entre 5 e 30 cm. O permafrost foi coletado com espátulas desinfestadas com álcool 70% e acondicionado em sacos plásticos tipo *WhirlPak* (Sigma-Aldric, EUA) previamente esterilizados. Para cada ponto de coleta cerca de 500 g de solo foram amostrados (tanto para camada ativa quanto para permafrost). Todas as amostras foram coletadas em duplicata. Após a coleta, as amostras foram mantidas a -20 °C até o processamento.



Figura 4. Imagens de coleta das amostras de camada ativa e *permafrost*. (Fotos: Graciéle de Menezes e arquivo pessoal).

4.2 Processamento das amostras e isolamento dos fungos

Para o isolamento dos fungos, 1 g de cada amostra foi adicionado em 9 mL de NaCl (0,85%) e 100 μ L da suspensão de uma diluição de 10^{-1} e de 10^{-2} foram inoculados nos meios Ágar Sabouraud (SAB) (Himedia, India), Meio mínimo (MM) (Peptona 0,025, glicose 0,5, K_2HPO_4 0,698, KH_2PO_4 , 0,544, $(NH_4)_2SO_4$ 0,1, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,11 e ágar 2 em g/L^{-1} ; Dichloran Glicerol Ágar (DG18) (Oxoid, EUA) e Dichloran Rosa de Bengala Ágar (DRBC) (Oxoid, EUA) contendo 100 $\mu g mL^{-1}$ de cloranfenicol (Sigma, EUA) e incubadas a 37 ± 2 °C (para as amostras de todas as ilhas e pontos), e 10 e 25 ± 2 °C (para as Ilhas Robert, Deception no ponto Crater Lake, e Livingston) por um período de até 60 dias. A densidade de cada táxon foi determinada a partir de suas unidades formadoras de colônias fúngicas (UFCs). Todos os fungos obtidos foram purificados em YM e depositados na forma de Castellani (CASTELLANI, 1967) e em criotubos a -80 °C na Coleção de Micro-organismos e Células da UFMG.

4.3 Identificação dos fungos cultiváveis

Todos os isolados fúngicos obtidos foram caracterizados e agrupados em morfotipos por similaridades macro-morfológicas de acordo com as seguintes características: cor da colônia (frente e verso), elevação da superfície, aspecto da borda, velocidade de crescimento e forma da colônia. O DNA total de um representante dos diferentes morfotipos foi extraído para agrupamento utilizando a técnica de microssatélite com o iniciador (GTG)₅.

4.3.1 Extração de DNA total dos isolados

4.3.1.1 Fungos filamentosos

O protocolo para a extração do DNA total de fungos filamentosos foi realizado segundo Rosa et al. (2009). Os fungos filamentosos foram crescidos por um período de 7 dias em meio Ágar Sabouraud (SAB) (Himedia, Índia). Fragmentos de micélio foram colocados em um tubo de 1,5 mL acrescidos de 400 µL de tampão de lise (Tris-HCl – trishidroximetilaminometano 0,05 M, EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético 0,005 M, NaCl 0,1 M e SDS –dodecil sulfato de sódio 1%) e deixado a – 20 °C por aproximadamente 30 minutos. Foram adicionadas três pérolas de aço inoxidável (3,175 mm de diâmetro) e o micélio foi triturado com auxílio de um disruptor de células Bullet BlenderTM 24 (Uniscience, EUA). Em seguida, foram adicionados 162 µL de CTAB (Tris 2M, NaCl 8,2%, EDTA 2M e CTAB 0,2%), seguido de homogeneização e incubação por 40 minutos a 65 °C. Posteriormente, foram acrescentados 570 µL da mistura clorofórmio/álcool isoamílico (24:1). Após a homogeneização, o tubo foi incubado por 30 minutos no congelador (-4 °C) e posteriormente centrifugados a 14.000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo de 1,5 mL, e acrescentado 10% do volume de uma solução de acetato de sódio 3M. O tubo foi vertido para homogeneização, incubado a 0 °C por 30 minutos e centrifugado a 14.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e, em seguida, adicionado 50% do volume de isopropanol (Merck) e após ser levemente homogeneizada, a amostra foi deixada por 30 min na bancada para precipitação do DNA. A amostra foi centrifugada a 14.000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante desprezado por inversão, seguido por homogeneização com 200 µL de etanol 70% (Merck) gelado. O sobrenadante foi descartado novamente por imersão, e o pelet lavado mais uma vez com 200 µL de etanol 70% (Merck) gelado e, por último, mais uma centrifugação de 14.000 rpm por 5 min, seguido de descarte do sobrenadante. A amostra foi seca por aproximadamente 60

minutos a 37 °C, ou *overnight*, e então, adicionados 50 µL de Tris-EDTA (Tris-HCl 0,01 M e EDTA 0,001 M). A amostra foi incubada a 65 °C por 60 minutos para hidratação do DNA. O produto obtido foi quantificado em espectrofotômetro a 260/280 nm (NanoDrop™ One Spectrophotometer *Thermo Scientific*™, EUA) e armazenado a -20 °C até utilização.

5

4.3.1.2 Leveduras

Para extração do DNA genômico total, as leveduras foram crescidas em ágar YM por 48 horas a 15 °C. Após o crescimento, as colônias foram ressuspensas em 100 µL de tampão de lise (Tris-HCl – trishidroximetilaminometano 0,05 M, EDTA - ácido etilenodiamino tetra-
10 acético 0,005 M, NaCl 0,1 M e SDS –dodecil sulfato de sódio 1%) em microtubos cônicos de polipropileno, livres de RNase e DNase (Axygen, US), de 0,6 mL e incubadas a 65 °C no banho seco por 30 minutos. Após este tempo, foram adicionados 200 µL de clorofórmio-álcool-isoamílico (24:1). Posteriormente os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 14.800 rpm, o sobrenadante foi retirado e transferido para outros tubos de 1,5 µL. Nestes
15 tubos foi adicionado isopropanol (Merck) v/v. Os tubos permaneceram em repouso por 15 minutos. Decorrido este tempo, foram centrifugados por 10 minutos a 14.000 rpm e o sobrenadante foi descartado por inversão. Foi adicionado em cada tubo 200 µL de etanol 70% a 4 °C e os mesmos foram centrifugados por 10 minutos. O etanol foi removido por inversão e os tubos foram secos *overnight*. Concluída esta etapa, o DNA resultante foi ressuspendido em
20 50 µL de tampão TE (Tris-HCL 10 mM, EDTA 1mM, pH 8). As amostras foram incubadas em banho-maria a 37 °C para hidratação do DNA. O produto obtido foi quantificado em espectrofotômetro a 260/280 nm (NanoDrop™ One Spectrophotometer *Thermo Scientific*™, EUA) e armazenado a -20 °C até a utilização.

25 4.3.2 Amplificação utilizando o iniciador (GTG)₅

O iniciador (GTG)₅ foi utilizado para amplificação de regiões de microssatélite, conforme descrito por Lieckfeldt et al. (1993). A PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) foi realizada para um volume final de 25 µL contendo de 1,0 a 5,0 µL de DNA (variando de acordo com a concentração do DNA, a qual deve estar entre 50-500 ng/µL), 2,0 µL do
30 iniciador (GTG)₅ 10 µmol (MWG Biotech), 2,5 µL de tampão de PCR 10X (Sinapse), 1,5 µL de MgCl₂ 25mM, 1,0 µL de dNTP 10 mM, 0,2 µL de *Taq* DNA polimerase 5U (Sinapse e o volume final completado com água esterilizada. As reações de PCR foram realizadas utilizando o termociclador PCR Mastercycler (Eppendorf). O programa consistiu de uma

desnaturação inicial a 94 °C por dois minutos, seguido por 40 ciclos de 45 segundos de desnaturação a 94 °C, 1 minuto de anelamento a 50 °C e 1 minuto de extensão a 72 °C, finalizando com uma extensão por 6 minutos a 72 °C. Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5%, em tampão TBE 0,5X (54 g de tris base, 27,5 g de ácido bórico, 20 mL de EDTA 0,5 M, pH 8,0) e submetidos a aproximadamente 90 minutos a 80 V. As bandas foram coradas com solução de GelRed™ (Biotium) e os géis visualizados sob luz ultravioleta e fotografados pelo sistema de foto-documentação de gel (Vilber Lourmat, França).

10 4.3.3 Amplificação da região ITS

A região do espaçador transcrito interno - ITS (*internal transcribed spacer*) é hoje adotada como o principal marcador para a identificação fúngica, devido a fatores como maior facilidade de amplificação por PCR, sucesso do sequenciamento e maior probabilidade de identificação bem-sucedida para a maior variedade de fungos (SCHOCH et al. 2012). Sendo assim, inicialmente esta foi a região sequenciada para todos os isolados fúngicos do presente trabalho.

Os iniciadores ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) e ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) foram utilizados para amplificação da região transcrita interna (ITS1-5.8S-ITS2) do gene do rRNA, conforme descrito por White et al. (1990). A PCR foi realizada em um volume final de 50 µL contendo de 1,0 a 5,0 µL de DNA (variando de acordo com a concentração do DNA, a qual deve estar entre 50-500 ng/µL), 1,0 µL de cada iniciador ITS1 e ITS4 a 10 pmol (MWG Biotech), 5,0 µL de tampão de PCR 10X (Sinapse), 2,0 µL de MgCl₂ 25 mM, 2,0 µL de dNTP 10 mM, 0,2 µL de *Taq* DNA polimerase 5U (Sinapse) e o volume final completado com água de injeção. As reações da PCR foram realizadas utilizando o termociclador PCR Mastercycler (Eppendorf). O programa consistiu de uma desnaturação inicial a 94 °C por cinco minutos em 30 ciclos, seguido por 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 minuto, um minuto de anelamento a 55 °C e um minuto de extensão a 72 °C, e uma extensão final por cinco minutos a 72 °C. Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1%, em tampão TBE 0,5X (54 g de tris base, 27,5 g de ácido bórico, 20 mL de EDTA 0,5M, pH 8,0), submetidas a 120 V durante aproximadamente 30 minutos. As bandas foram coradas com solução de GelRed™ (Biotium), e os géis visualizados sob luz ultravioleta e fotografados pelo sistema de foto-documentação de gel (Vilber Lourmat, França).

4.3.4 Amplificação parcial do gene da β -tubulina

As regiões codificadoras de proteínas dos genes geralmente são mais altamente conservadas em espécies relacionadas do que nas sequências de íntrons (GLASS & DONALDSON, 1995). O sequenciamento parcial do gene da β -tubulina possui um alto índice de polimorfismo, por isso no presente trabalho foi uma região escolhida para identificação de determinados táxons, como espécies do gênero *Aspergillus* (NASRI et al. 2015; GLASS & DONALDSON, 1995).

Os iniciadores BT2a (GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC) e BT2b (ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC) foram utilizados para amplificação parcial do gene da β -tubulina, conforme descrito por Glass & Donaldson (1995). A PCR foi realizada em um volume final de 50 μ L contendo de 1,0 a 5,0 μ L de DNA (variando de acordo com a concentração do DNA, a qual deve estar entre 50-500 ng/ μ L), 1,0 μ L de cada iniciador BT2a e BT2b 10 μ mol/ μ L (MWG Biotech), 5,0 μ L de tampão de PCR 10X (Sinapse), 2,0 μ L de MgCl₂ 25 mM, 2,0 μ L de dNTP 10 mM, 0,2 μ L de *Taq* DNA polimerase 5U (Sinapse) e o volume final completado com água de injeção. As reações de PCR foram realizadas utilizando o termociclador PCR Mastercycler (Eppendorf). O programa consistiu de uma desnaturação inicial a 94 °C por cinco minutos, seguido por 35 ciclos de um minuto de desnaturação a 94 °C, um minuto de anelamento a 59 °C e 90 segundos de extensão a 72 °C e uma extensão final por sete minutos a 72 °C. Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1%, em tampão TBE 0,5X (54 g de tris base, 27,5 g de ácido bórico, 20 ml de EDTA 0,5 M, pH 8,0) e submetidos durante 30 minutos a aproximadamente a 120 V. As bandas foram coradas com solução de GelRed™ (Biotium) e os géis visualizados sob luz ultravioleta e fotografados pelo sistema de foto-documentação de gel (VilberLourmat, França).

4.3.5 Amplificação da RNA polimerase II

Segundo Malkus et al. (2006) a RNA polimerase II (RPB2) é uma das três RNA polimerases nos eucariotos que catalisam a transcrição do RNA mensageiro, além disso, sugere-se que o gene seja de cópia única nos fungos, tornando-o amplamente utilizado para estudos taxonômicos e filogenéticos.

Para amplificação parcial da RNA polimerase II (RPB2) foram utilizados os iniciadores RBP2 5F (GAYGAYMGWGATCAYTTYGG) e RPB2 7R (CCCATRGCTTGYYTTRCCCAT) conforme descrito por Malkus et al. (2006). A PCR foi realizada em um volume final de 50 μ L contendo de 1,0 a 5,0 μ L de DNA (de modo que a reação contenha entre 50-500 ng/ μ L), 1,0 μ L de cada iniciador RBP2 5F e RPB2 7R a 10

pmol (Invitrogen), 5,0 µL de tampão de PCR 10X (Sinapse), 3,0 µL de MgCl₂ 25 mM, 2,0 µL de dNTP 10 mM, 0,2 µL de *Taq* DNA polimerase 5U (Sinapse) e o volume final completado com água de injeção. As reações de PCR foram realizadas utilizando o termociclador PCR Mastercycler (Eppendorf). O programa consistiu de uma desnaturação inicial a 94 °C por 3 minutos, seguido por 35 ciclos de 20 segundos de desnaturação a 94 °C, 55 segundos de anelamento a 55 °C e 1 minuto de extensão a 72 °C e uma extensão final por 10 minutos a 72 °C. Os amplicons foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1%, tampão TBE 0,5X, submetidas a aproximadamente 30 minutos a 120 V. As amostras foram coradas pela adição de GelRed™ (Biotium), visualizadas sob luz ultravioleta e fotografados pelo sistema de foto-documentação de gel (Vilber Lourmat, França).

4.3.6 Amplificação do domínio D1/D2

Um isolado de levedura de cada perfil molecular distinto foi selecionado e submetido ao sequenciamento da região D1/D2 da subunidade maior do gene do rRNA, para isto, na reação de PCR foram utilizados os iniciadores NL1 (5'–GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG–3') e NL4 (5'–GGTCCGTGTTTCAAG ACGG – 3') (WHITE et al., 1990; O'DONNELL 1993; KURTZMAN & ROBNETT 1998; LACHANCE et al., 1999). Os ensaios de PCR foram realizados utilizando-se 5 µL de tampão de PCR 10X (Sinapse), 2 µL de MgCl₂ 25 mM (Sinapse), 2 µL de dNTP 10mM, 1 µL dos iniciadores NL1 e NL4 a 10 pmol (Invitrogen, EUA) 0,2 µL de *Taq* DNA polimerase 5U (Sinapse) e 1 ou 2 µL de DNA (com isso a reação continha entre 50 e 300 ng de DNA). O volume final da reação foi completado com água de injeção, para 50 µL. A reação foi realizada em um termociclador PCR Mastercycler (Eppendorf) e apresentou as seguintes condições: desnaturação inicial a 95 °C por dois minutos, 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 uma extensão final a 72 °C por 10 minutos. Os amplicons foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,0%, em tampão TBE 0,5X, submetidos durante aproximadamente 30 minutos a 120 V. As amostras foram coradas pela adição GelRed™ (Biotium), visualizadas sob UV e fotografadas pelo sistema de foto-documentação de gel (Vilber Lourmat, France).

30

4.3.7 Purificação dos amplicons

Os amplicons gerados pela reação de PCR foram purificados utilizando EDTA. Ao produto de PCR com volume de 47 µL, foram adicionados 11,25 µL de EDTA 125 mM e 135

μL de etanol absoluto (Merck). Esta mistura foi submetida à centrifugação com rotação de 14.000 rpm durante 30 minutos. O sobrenadante foi descartado e para lavagem do precipitado foi adicionado 120 μL de etanol 70% e realizado homogeneização por inversão. Após centrifugação a 14.000 rpm por 15 minutos, o sobrenadante foi descartado novamente e o restante do etanol foi secado por 30 minutos a 37 °C ou *overnight*. O DNA então foi ressuscitado em 10 μL de água esterilizada. O produto obtido foi medido em NanoDrop™ One (Thermo Scientific™, EUA) para ser utilizado nas reações de sequenciamento.

4.3.8 Reações de Sequenciamento e precipitação das amostras

O sequenciamento foi realizado utilizando-se o kit de sequenciamento BigDyeTerminator v3.1 (AppliedBiosystem, USA) em combinação com o sistema de sequenciamento automatizado ABI 3730xl (AppliedBiosystem, USA). Para as reações de sequenciamento foram utilizados 10-20 ng do DNA purificado. A reação de PCR foi realizada em microplacas de 96 poços (Applied Biosystems, EUA) onde cada poço possuía um volume final de 10 μL contendo: 1 μL do tampão (presente no kit de sequenciamento), 1,0 μL do iniciador (5 pmol), 1 μL de Big Dye, 1 μL de DNA (concentração entre 10 e 20 ng) e completa-se o volume final com água de injeção. O programa consistiu de uma desnaturação inicial a 36 °C por um minuto, seguido por 36 ciclos de anelamento a 96 °C por 15 segundos, seguido por 15 segundos de extensão a 50 °C, e quatro minutos de extensão final a 60 °C.

Para precipitação das reações de sequenciamento, 1,0 μL de EDTA 125 mM, 1,0 μL de acetato de sódio 3M e 50 μL de etanol absoluto gelado (Merck) foram adicionados em cada um dos 96 poços. A placa foi submetida à agitação em vórtex e incubada por 20 minutos à temperatura ambiente.

Após período de incubação, a placa foi centrifugada por 45 minutos, 4.000 rpm a 4 °C. O sobrenadante foi descartado por inversão virando a placa sobre um papel absorvente. Em seguida, foram adicionados 100 μL de etanol 70% (Merck) gelado. A placa foi novamente centrifugada por 15 minutos, 4.000 rpm, 4 °C, e o sobrenadante então descartado. Para remoção do excesso de etanol, a placa foi invertida sobre um papel absorvente e submetida a um pulso até a centrífuga atingir 900 rpm. Em seguida, a placa foi mantida em repouso durante 20-40 minutos, para evaporação do etanol residual.

Em cada poço o DNA precipitado das amostras foi ressuscitado em 10 μL de formamida HI DI (Applied Biosystems, EUA). A placa foi então armazenada a 4 °C, protegida da luz, até injeção das amostras no sistema automatizado ABI 3730xl (Applied Biosystems, EUA).

4.3.9 Análise computacional das sequências e análise filogenética

As sequências de DNA foram analisadas quanto à qualidade do sequenciamento através da plataforma Asparagin da EMBRAPA. Este conjunto de programas analisa as sequências geradas pelo sequenciador e fornece a qualidade usando o pacote *Phred* (lê dados de rastreamento do sequenciador de DNA, atribui valores de qualidade às bases e grava os valores de qualidade nos arquivos de saída) usando uma interface do navegador da web (disponível em: <http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>). Apenas sequências com qualidade $\geq 20\%$ (valor do *Phred score*) e contendo ≥ 350 pares de bases foram analisadas. Após, foram comparadas com as sequências de espécies referência de fungos depositadas no GenBank pertencentes a coleções de culturas internacionais utilizando o programa BLASTn (*Basic Local Alignment Search Tool* – versão 2.215 do BLAST 2.0) disponível no portal NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>), desenvolvido pelo *National Center For Biotechnology*. Os fungos que apresentaram sequências com valor de $E = 0$, cobertura e identidade $\geq 99\%$, bem como proximidade quando analisadas filogeneticamente utilizando o programa MEGA 7 (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) (TAMURA et al., 2013) foram considerados como pertencentes à mesma espécie. Para fungos com sequências com valor de $E \neq 0$ e cobertura e identidade $\leq 98\%$, os mesmos foram identificados em nível de gênero ou níveis hierárquicos mais altos após a análise filogenética. Além disso, para alguns táxons o termo ‘cf.’ (latim for confer = comparado com) foi utilizado para indicar a espécie a qual se assemelha, mas apresenta pequenas diferenças com a espécie referência. Informações sobre os níveis hierárquicos utilizados na taxonomia dos fungos foram obtidos no MycoBank (<http://www.mycobank.org/>), Index Fungorum (<http://www.indexfungorum.org/>) e Kirk et al. (2008).

25 4.4 Caracterização morfofisiológica dos isolados do gênero *Penicillium*

Devido à dificuldade de obtenção de uma identificação em nível de espécie para isolados do gênero *Penicillium*, após as identificações por sequenciamento os isolados que ainda permaneceram com posição taxonômica indefinida foram submetidos a caracterização morfofisiológica segundo protocolos estabelecidos por Houbraken et al. (2012). Foram analisadas as cores da colônia, textura, cor do verso, esporulação e produção de pigmentos solúveis amarelos, bem como diâmetro da colônia em meio YES (extrato de levedura 4,0; sacarose 20,0; KH_2PO_4 1,0; MgSO_4 0,5; ágar 15,0 em g/L) e CYA (K_2HPO_4 1,0; concentrado de Czapek 10 mL; extrato de levedura 5,0; sacarose 30,0; ágar 15,0 em g/L) a 25 e 30 °C, respectivamente, por 14 dias.

4.5 Extração de DNA total e caracterização da comunidade de fungos por meio do sequenciamento de alta eficiência

A extração de DNA total da comunidade foi realizada em 1 g de *permafrost*, em triplicata para cada ponto coletado utilizando o kit comercial QIAGEN DNeasy PowerLyzer PowerSoil Kit, 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) e visualização em transluminador (Applied Biosystems).

O DNA extraído foi encaminhado para a empresa Macrogen Inc. (Coréia do Sul), o sequenciamento de amplicons da região ITS2 do gene do RNA ribossomal foi realizado através da plataforma Illumina MiSeq (Illumina Inc., EUA). O sequenciamento foi de 250 pb (paired-end), usando o MiSeq Reagent Kit v3 (ciclo 600) seguindo o protocolo do fabricante. Os amplicons foram gerados usando os primers universais ITS3 e ITS4 (DE BEECK et al. 2014).

Os arquivos fastq brutos foram filtrados usando o BBDuk versão 38.34 (BBMap - Bushnell B. - sourceforge.net/projects/bbmap/) para remover os adaptadores Illumina, artefatos Illumina, e a Biblioteca PhiX Control v3. A filtragem de *reads* de qualidade foi realizada usando Sickle versão 1.33 -q 30 -l 50 (JOSHI & SICKLE, 2011), sequências inferiores a 50 pb e pontuações *Phred* inferiores a 30 foram excluídas.

Para as análises das sequências de ITS obtidas foi utilizado o programa *Quantitative Insights Into Microbial Ecology Software* (QIIME2 versão 2019.10 (<https://qiime2.org/>)) (CAPORASO et al., 2012). O plug-in q2-dada2 foi usado para filtro de qualidade, de-replicação e remover quimeras (CALLAHAN et al., 2016). As sequências com similaridades maiores que 98,5% foram agrupadas em unidades denominadas sequências de amplicons variantes (*Amplicon Sequence Variants: ASVs*) e comparadas com o banco de dados referência para fungos UNITE (KÖLJALG et al., 2013; CALLAHAN et al., 2017).

4.6 Avaliação de diversidade da comunidade fúngica

A diversidade ecológica das comunidades de fungos cultiváveis foi determinada utilizando os índices de (a) Fisher- α (diversidade), (b) Margalef (riqueza) e (c) Simpson (dominância). O índice de diversidade de Fisher- α é adequado para frequências em que diferentes espécies ocorrem de forma aleatória onde, comumente, algumas espécies são tão raras que sua chance de inclusão é pequena (FISHER et al., 1943). O Índice de Margalef é

uma medida que estima a riqueza de espécies de uma comunidade com base na distribuição numérica dos indivíduos das diferentes espécies em função do número total de indivíduos existentes na amostra analisada. Já o índice de Simpson leva em conta o número de espécies presentes no local de coleta, bem como a abundância de cada espécie, estabelecendo a relação de dominância dentro das comunidades, através da probabilidade de dois indivíduos, selecionados ao acaso na amostra, pertencerem à mesma espécie. Assim, uma comunidade de espécies com maior diversidade terá uma menor dominância.

Para avaliar a similaridade entre as comunidades, bem como os locais amostrados, foram utilizados o índice de Bray-Curtis (B) e o coeficiente de Sorensen (QS). O índice de Bray-Curtis (B) varia de 0 a 1, sendo que 0 significa que as comunidades que não compartilham nenhuma espécie e 1 as que compartilham todas as espécies na mesma frequência. O coeficiente de Sorensen (QS) é representado pela fórmula: $QS = 2C/(A+B)$, onde A e B representam o número de espécies nas amostras A e B , respectivamente, e C o número de espécies compartilhadas pelas duas amostras. Uma curva de rarefação de espécies foi obtida utilizando o índice de Mao Tau, o qual interpola valores entre zero e o número de amostras analisadas e calcula a riqueza esperada e o intervalo de confiança (COLWELL et al., 2004). Todos os resultados foram obtidos com 95% de confiança e, os valores de *bootstrap* calculados a partir de 1.000 repetições. Todos os índices foram calculados utilizando o programa computacional PAST 20 1.90 (HAMMER et al., 2001).

4.7 Avaliação de fatores de virulência *in vitro* de fungos presentes no *permafrost*

4.7.1 Atividade hemolítica

Os fungos que apresentaram crescimento na temperatura de 37 °C foram inoculados em Ágar Sabouraud (SAB) (Himedia, Índia) suplementado com 7% de sangue de carneiro e cloranfenicol 200 µg/mL, a fim de verificar a capacidade hemolítica de acordo com Luo et al. (2001) com adaptações. Os inóculos foram crescidos e discos de 5 mm de crescimento fúngico e 10 µL da suspensão de leveduras foram inoculados nas placas.

As placas foram incubadas a 37 °C por 7 dias. O index hemolítico foi calculado de acordo com a fórmula [(diâmetro da colônia + diâmetro da hemólise) / diâmetro da colônia] (PRICE et al., 1982). O tipo de hemólise foi classificado a partir da característica do halo ao redor da colônia (Tabela 1). Como controle positivo foi utilizado o isolado de *Candida albicans* (ATCC 10231) e como controle negativo *Candida parapsilosis* (ATCC 22019) que não promove a formação de halo de hemólise.

Tabela 1. Classificação dos tipos de hemólise a partir da característica do halo (LUO et al., 2001).

Tipo de Hemólise	Presença de halo	Presença de hemólise
Gama-Hemólise (γ)	Ausente	Ausente
Alfa-Hemólise (α)	Esverdeado	Parcial
Beta-Hemólise (β)	Transparente	Total

5 4.7.2 Crescimento em meio YM em diferentes faixas de pH

Os fungos com crescimento a 37 °C foram submetidos a testes de tolerância em diferentes pHs de acordo com Alves et al. (2019), utilizando o meio de cultura YM com o pH ajustado: pH 4 (próximo ao pH vaginal), pH 7 (próximo ao pH do sangue humano) e pH 9 (próximo ao pH intestinal) (VYLKOVA et al., 2017; DAVIS et al. 2009). Os inóculos foram crescidos e discos de 5 mm de crescimento fúngico ou 10 μ L da suspensão de leveduras foram inoculados em placas com meio YM com o pH ajustado e incubadas a 37 °C por 7 dias. Os experimentos foram realizados em triplicata. Os resultados foram expressos pela presença ou ausência de crescimento.

15 4.7.3 Determinação da produção de enzimas hidrolíticas (fosfolipase e proteinase)

Os fungos que apresentaram crescimento nas temperaturas de 37 °C foram submetidos aos testes de produção das enzimas fosfolipase e proteinase. A produção de proteinases foi avaliada por meio da metodologia proposta por Aoki et al. (1990), enquanto que para fosfolipases foi utilizado o método em placa com gema de ovo, descrito por Price et al. (1982).

Para a produção da enzima proteinase os isolados foram inoculados em ágar ASB (11,7% de Yeast Carbon Base; 1% de extrato de levedura; 2% de albumina de soro bovino – ASB e 2% de ágar – pH 5) esterilizado por filtração, e incubados por 7 dias a 37 °C. A atividade da proteinase foi medida pelo tamanho do halo de opacidade da hidrólise de ASB, única fonte de nitrogênio do meio. A atividade enzimática proteolítica denominada Pz foi calculada baseada na proporção entre o diâmetro da colônia e diâmetro da zona de degradação do substrato, e classificadas como fortemente positivo, positivo, média ou fraca, como demonstrado na Tabela 2.

Tabela 2. Classificação da atividade enzimática proteolítica e fosfolipídica (AOKI et al., 1990 com adaptações).

Nível	Valores
Fortemente positiva	≤0,69
Forte	0,70-0,79
Média	0,80-0,89
Fraca	0,90-0,99

Para a detecção de fosfolipases os isolados fúngicos foram inoculados em um meio base (2% de glicose; 1% de peptona; 0,5% de extrato de levedura; 5,88% de cloreto de sódio; 0,055% de cloreto de cálcio e 2% de ágar) acrescido de emulsão de ovo a 50% em solução fisiológica, e incubados a 37 °C por 7 dias. O resultado é avaliado segundo a produção de uma zona opaca de precipitação ao redor da colônia, produzida pelas culturas positivas. A atividade enzimática descrita acima foi mensurada de acordo com a razão estabelecida pela proteinase (PRICE et al. 1982).

Apenas os isolados que possuíam relatos prévios na literatura como patógenos humanos foram selecionados para os testes a seguir:

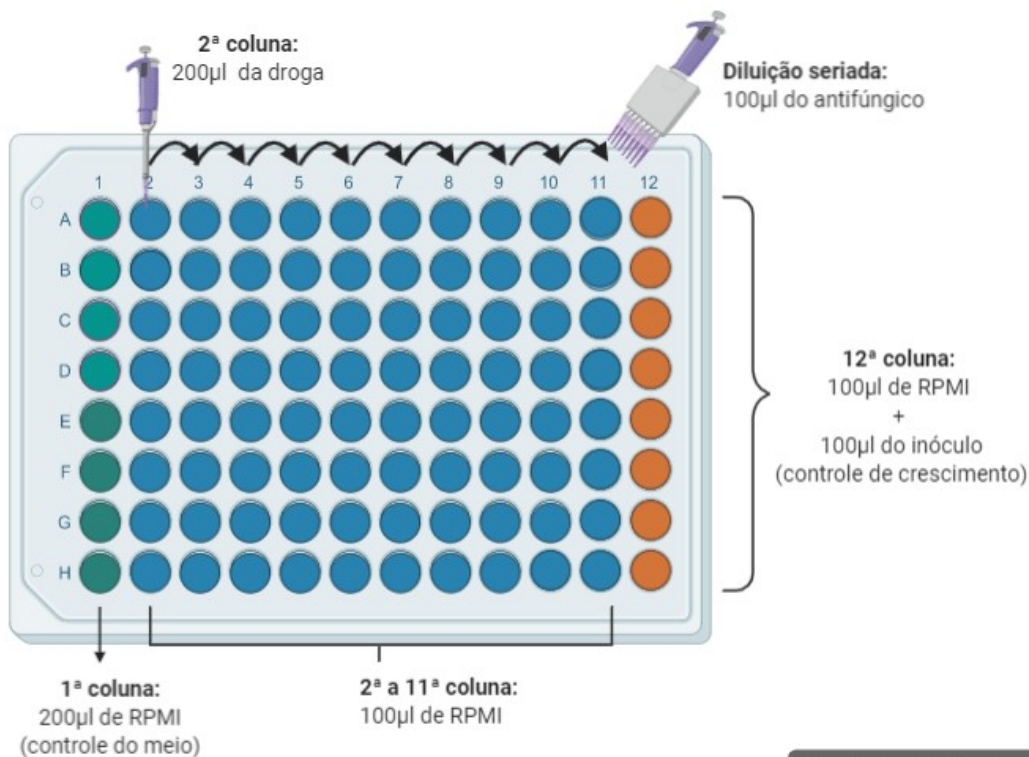
4.7.4 Teste de sensibilidade aos antifúngicos itraconazol, fluconazol e anfotericina B

Os isolados dos fungos filamentosos *Aspergillus thermomutatus* e *Aspergillus hiratsukae* e a levedura *Rhodotorula mucilaginosa* por já serem relatados como possíveis patógenos, foram testados quanto à sensibilidade aos antifúngicos anfotericina B, itraconazol e fluconazol (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA), por meio do teste de Concentração Inibitória Mínima (CIM). Os testes de CIM foram realizados seguindo orientações prescritas pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2008), de acordo com o protocolo M27 – A3, vol.28, nº14 para as leveduras, e o protocolo M38 – A2, vol.22, nº16 para os fungos filamentosos, com modificações. Os testes foram realizados em placas de microdiluição de 96 poços. Assim, os antifúngicos foram solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO), e as soluções estoque das drogas foram diluídas em meio RPMI-1640 (*Roswell Park Memorial Institute*) (com glutamina, sem bicarbonato e com indicador vermelho de fenol - *Sigma*, EUA) adicionado de MOPS 0,165 mol/L em concentrações 10 vezes à maior concentração testada. Durante todo o procedimento experimental a Anfotericina B foi protegida da luz devido a sua foto-sensibilidade.

Para os testes, a solução estoque foi diluída cinco vezes em RPMI para se conseguir uma concentração duas vezes a necessária e em seguida foram feitas as diluições. Na primeira

coluna foram adicionados 200 μL de RPMI para controle de esterilidade (poços A1–D1). Na segunda coluna foi adicionada a droga a ser testada já no dobro da concentração inicial, e sucessivamente da 3^a até a 11^a coluna foram adicionados 100 μL de RPMI e realizada a diluição seriada da droga a partir da segunda coluna. A 12^a coluna da placa foi utilizada para inóculo do controle de crescimento do micro-organismo, sendo adicionados 100 μL de RPMI e 100 μL do inóculo. Após a diluição seriada foi adicionado em cada poço (da 2^a a 11^a coluna) 100 μL do inóculo fúngico.

Ao final do experimento, após inoculação dos fungos a serem testados, o volume final de cada poço foi de 200 μL , de forma que tanto as concentrações dos antifúngicos quanto as concentrações dos inóculos caíam de 2X para 1X, atingindo assim os valores desejados. Dessa forma, a concentração das drogas variou de 8–0.015 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para anfotericina B, 64–0.125 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para fluconazol e 16–0.03 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para itraconazol (FERREIRA et al., 2013 com modificações). A **Figura 5** demonstra o esquema do ensaio de susceptibilidade, bem como a distribuição dos controles do teste.



15

Created in BioRender.com

Figura 5. Esquema do ensaio de susceptibilidade a anfotericina B, itraconazol e fluconazol por meio do teste de Concentração Inibitória Mínima (CIM).

Para o preparo do inóculo das leveduras, os isolados foram cultivados previamente em meio YM a 37 °C por 24 horas, colônias dos isolados foram suspensas em 5 mL de solução salina estéril 0,145 mol/L (8,5 g/L NaCl; salina a 0,85%). As suspensões resultantes foram agitadas em vórtex por 15 segundos e as densidades celulares, ajustadas com espectrofotômetro, acrescentando-se solução salina suficiente para obter a transmitância de 75-77 % a 530 nm equivalente de uma solução-padrão da escala de *McFarland* 0,5. Esse procedimento fornece as suspensões-padrão das leveduras contendo 1 a 5 x 10⁶ células/mL, que corresponde a 70% de transmitância. Estas suspensões foram diluídas 1:50 e depois 1:20 com o meio de cultura RPMI para se obter as densidades dos inóculos necessários para o teste duas vezes concentradas (de 1 x 10³ a 5 x 10³ células/mL).

Para o ensaio dos isolados de fungos filamentosos, os mesmos foram anteriormente crescidos em meio BDA a 37 °C por 7 dias, as colônias foram cobertas com 1 mL de solução salina (0,85 NaCl) esterilizada. A suspensão de esporos foi transferida para um tubo de ensaio esterilizado e após sedimentação, por decantação em repouso de 3 a 5 minutos a temperatura ambiente, o sobrenadante foi transferido para outro tubo de ensaio esterilizado e homogeneizado em vórtex por aproximadamente 15 segundos. As densidades das suspensões dos esporos de cada espécie fúngica, previamente observada em câmara de Neubauer, foram padronizadas em espectrofotômetro para 80 a 82% de transmitância a 530 nm, o que corresponde a 10⁶ esporos/mL.

As CIM foram determinadas pelas concentrações da droga que levaram a uma redução de 100% do crescimento dos fungos. Os valores de referência para os testes de sensibilidade *in vitro* (µg/mL) para as leveduras são os sugeridos para *Candida* spp. pelo CLSI - M27-A3 (2008), pois não existe testes padronizados para as espécies de leveduras pertencentes a outros gêneros. Para a interpretação dos testes com o itraconazol as leveduras com CIM ≤ 0,125 µg/mL foram consideradas suscetíveis, e resistentes com CIM ≥ 1 µg/mL. Para os ensaios com anfotericina B as leveduras com o CIM ≤ 0,25 µg/mL foram consideradas suscetíveis, e resistentes com CIM ≥ 1 µg/mL. No entanto, os valores de CIM para anfotericina B ainda não estão bem estabelecidos, mas quando se obtém um valor de CIM acima de 1 µg/mL para um isolado de *Candida* spp. é provável que o isolado seja resistente à anfotericina B.

A interpretação dos testes de suscetibilidade *in vitro* das espécies de fungos filamentosos não apresenta categorias bem definidas dispostas no protocolo M61, mas orientações gerais foram estabelecidas para ajudar com as análises dos dados, diante disso as CIM serão definidas pela redução de crescimento dos fungos filamentosos que variam de acordo com cada droga. A CIM da anfotericina B (FERREIRA et al., 2013) foi definida pelo

poço opticamente claro ou com ausência de crescimento. Para os azólicos, como o fluconazol, por apresentar um ponto final da reação menos definido, a CIM correspondeu ao poço que apresentou uma redução de aproximadamente 50% (metade ou mais) no crescimento, comparado com o controle. O itraconazol apresenta, geralmente, pontos finais definidos e a CIM pode ser lida com 100% da inibição da atividade metabólica. Os pontos de corte foram comparados aos utilizados para *Aspergillus fumigatus*, pois os fungos testados não possuem pontos de corte estabelecidos, mas pertencem também a seção Fumigati dentro do gênero *Aspergillus*.

Os fungos filamentosos que foram considerados suscetíveis apresentaram o $CIM \leq 2\mu$ g/mL para anfotericina B. Os valores de CIM podem variar de 0,03 a 16 μ g/mL, para itraconazol, porém os dados são insuficientes para definir uma CIM que indique resistência a esta droga. Ao contrário do fluconazol, que normalmente os fungos filamentosos são resistentes e a maioria dos CIMs são $>64 \mu$ g/mL.

15 4.7.5 Ensaio de termotolerância

Os isolados foram submetidos a altas temperaturas para simulação do estado febril, avaliando sua resistência. Os mesmos foram cultivados em meio YM e incubados a 40, 45 e 50 °C por 7 dias. A avaliação dos resultados foi realizada visualmente, analisando o grau de crescimento dos fungos.

20

4.7.6 Atividade de esterase

A produção de esterase foi realizada de acordo com Carrasco et al. (2012). Os isolados foram cultivados em meio composto por 1% de Peptona, 0,5% de NaCl, 0,4% de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ e 1% de Tween 80. A atividade da esterase foi evidenciada como um precipitado branco ao redor da colônia de fungos.

25

4.7.7 Resistência ao congelamento a -80 °C

Os isolados foram submetidos a -80 °C por 100 dias com os controles: 1) Fungos + glicerol a 15%; 2) Fungos + H_2O ; 3) Fungos + solução salina 0,85% e 4) apenas discos de fungos. Ao final do período, 03 discos de isolados foram inoculados em placas BDA e incubados a 37 °C por 7 dias para avaliação do crescimento.

30

4.8 Análise físico-química dos solos

A análise química foi realizada através de procedimentos internacionais recomendados por Embrapa (1997). O pH da água e da solução de KCl 1 mol L⁻¹ foi determinado pelo método potenciométrico em suspensão de solo: solução igual a 1: 2,5. O cálcio e o magnésio trocáveis foram extraídos com KCl 1 mol L⁻¹ em pH 7 e dosados por espectrofotômetro de absorção atômica. Potássio e sódio trocáveis foram extraídos com solução de HCl 0,05 mol L⁻¹ e H₂SO₄ 0,025 mol L⁻¹ (Mehlich 1), e posteriormente dosados por espectrofotômetro de emissão de chama. O alumínio trocável foi extraído com KCl 1 mol L⁻¹, determinado por titulação com NaOH 0,025 mol L⁻¹. A acidez extraível (H⁺ + AL³⁺) foi quantificada com acetato de cálcio 0,5 mol L⁻¹ ajustado para pH 7 e determinada por titulação com NaOH 0,06 mol L⁻¹. O fósforo foi extraído com Mehlich 1 e determinado por espectrofotômetro de absorção molecular (Colorimetria). O CHN total foi determinado por métodos de combustão a seco usando PerkinElmer 2400 Série II CHNS / O Elemental Analyzer (Culmo et al. 1989).

5. RESULTADOS

Os resultados dessa tese foram apresentados seguindo a norma alternativa, determinada pelo Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, em formato de capítulos como descrito abaixo:

- 5 • **Capítulo 1:** DA SILVA, Thamar Holanda et al. **Antarctic Permafrost: An Unexplored Fungal Microhabitat at the Edge of Life**. In: *Fungi of Antarctica*. Springer, Cham, p. 147-164, 2019. (https://doi.org/10.1007/978-3-030-18367-7_7);
- 10 • **Capítulo 2:** DA SILVA, Thamar Holanda et al. **Diversity, distribution, and ecology of viable fungi in permafrost and active layer of Maritime Antarctica**. *Extremophiles*, 2019. (<https://doi.org/10.1007/s00792-020-01176-y>);
- **Capítulo 3:** DA SILVA, Thamar Holanda et al. **“Diversity and ecology of fungi present in permafrost of South Shetland Archipelago, Antarctic Peninsula”**. Submetido em 30/10/2020 para revista *Scientific Reports*.
- 15 • **Capítulo 4:** DA SILVA, Thamar Holanda et al. **“Pathogenic potential of fungi recovered from permafrost and active layer from South Shetland Island, Antarctica”**. Em preparação.
- **Discussão integrada**
- **Conclusões**
- **Produção acadêmica.**

5.1 Capítulo 1: Antarctic Permafrost: An Unexplored Fungal Microhabitat at the Edge of Life

O presente capítulo teve como objetivo o levantamento bibliográfico sobre a diversidade fúngica de *permafrost* da Antártica, de forma a criar uma lista de espécies já relatadas para este ambiente, pois apenas o Ártico continha uma lista com este objetivo.

Embora tenham sido reportados apenas cinco artigos, foi possível o levantamento de uma lista contendo cerca de 4 filos e 32 famílias, que compreendem 70 espécies, indicando que a diversidade de fungos no *permafrost* da Antártica é possivelmente ainda maior, apesar da insuficiência amostral para abranger toda sua extensão.

Apesar dos poucos dados publicados sobre fungos que habitam o *permafrost* antártico, foi possível inferir que este ambiente é moderadamente rico em fungos viáveis. As espécies relatadas nas antigas amostras de *permafrost* destacam a certeza da evolução de estratégias adaptativas específicas para esses fungos sobreviverem em estado de congelamento permanente. Mais pesquisas são necessárias para monitorar o derretimento do *permafrost* na Antártica e para ampliar nosso conhecimento sobre a diversidade de fungos presentes em tais ambientes, com a intenção de avançar nosso entendimento de sua ecologia, estrutura da comunidade, potencial biotecnológico e agentes de papel de doenças oportunistas em plantas e animais.

Chapter 7

Antarctic Permafrost: An Unexplored Fungal Microhabitat at the Edge of Life



Thamar Holanda da Silva, Débora Amorim Saraiva Silva, André Thomazini, Carlos Ernesto Gonçalves Reynaud Schaefer, and Luiz Henrique Rosa

7.1 Permafrost Environment and Landforms

Permafrost is defined as ground material that has been below 0 °C for 2 or more consecutive years of monitoring and is found primarily in the Arctic and Antarctic regions as well as in high mountainous (alpine) regions, of which the Qinghai-Tibet Plateau, Andes, and Scandinavian Alps are key examples (Bockheim 2015). Perennially frozen permafrost is frequently overlain by a seasonally thawed active layer, whose depth is dependent on air temperatures, moisture content, vegetation coverage, and the snow cover (Michel et al. 2006; Simas et al. 2007; Michel et al. 2012; Moura et al. 2012; Thomazini et al. 2016). The active layer is exposed to freeze-thaw cycles and is, therefore, considered an unstable environment (Bockheim and Hall 2002; Shur and Jorgenson 2007; Jansson and Taş 2014; Czechowski et al. 2016). Permafrost can be hundreds of metres thick (e.g. over 500 m thick in Siberia), while the active layers can range from a few centimetres to several metres in depth (Tarnocai 1980). The Antarctic permafrost may approach 1000 m in thickness (Bockheim and Hall 2002). A transition zone may exist between the permafrost and the active layer, which acts as a temperature buffer and fluctuates between being seasonally frozen and perennially frozen over decadal time scales (Schuur et al. 2015) (Fig. 7.1).

T. H. da Silva (✉) · D. A. S. Silva · L. H. Rosa
Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

A. Thomazini
Departamento de Ciências Agrárias, Universidade Federal de São João Del Rei, Sete Lagoas, Minas Gerais, Brazil

C. E. G. R. Schaefer
Departamento de Solos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brazil

© Springer Nature Switzerland AG 2019
L. H. Rosa (ed.), *Fungi of Antarctica*,
https://doi.org/10.1007/978-3-030-18367-7_7

147

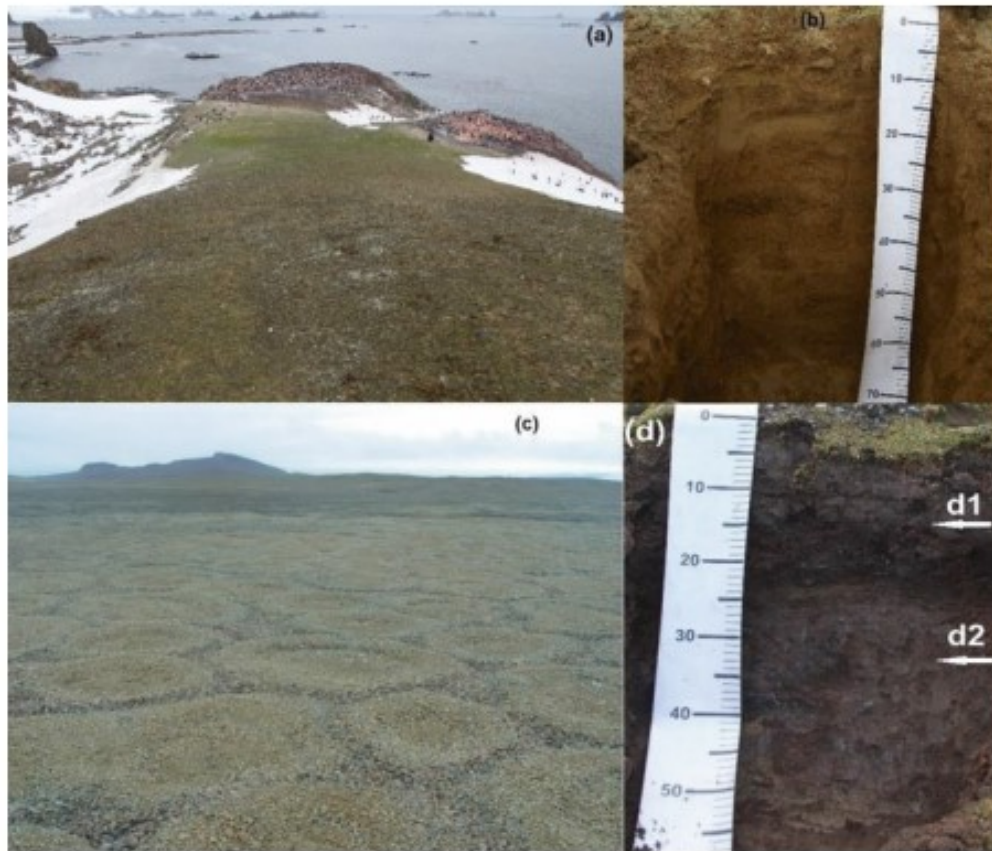


Fig. 7.1 Photographs depicting microbial habitats and permafrost occurrence in Antarctica. (a) Former and active penguin rookeries as well as the role of vegetation providing secondary metabolic materials for microbial metabolism at these sites; (b) a deep nutrient-rich ornithogenic soil profile formed by intense microbial activity, representing an important hot spot for microorganisms; (c) patterned ground indicating permafrost occurrence; and (d) a soil profile showing the active layer (d1) and the permafrost table starting at approximately 25 cm depth (d2). (Photos Credits: A Thomazini)

As a component of the Antarctic landscape, the permafrost ice comprises 92–97% of the total water volume, depending on temperature and sediment texture (e.g. proportion of sand, silt, and clay) (Willerslev et al. 2004). Although it is a strictly thermal phenomena (Steven et al. 2006), permafrost can exhibit differences in its organic matter content, age, soil texture, and ice content throughout its distribution (Shur and Jorgenson 2007; Jansson and Taş 2014). It is estimated that 25% of terrestrial area is covered by permafrost (Jansson and Taş 2014), of which 37% can be found in Antarctica (Goordial et al. 2017), occupying an area of 49,800 km² (Fig. 7.2) (Vieira et al. 2010). Underneath the active layer, there is a “permafrost table” (which is permafrost per se) - a physical and biogeochemical barrier to external processes (e.g. ultraviolet radiation) with the underlying horizons firmly cemented by pores, usually filled with ice (Gilichinsky et al. 2007).

Permafrost-affected soils are spatially heterogeneous, especially because of varying frost heave, frost sorting, and mostly frost churning processes that disrupt

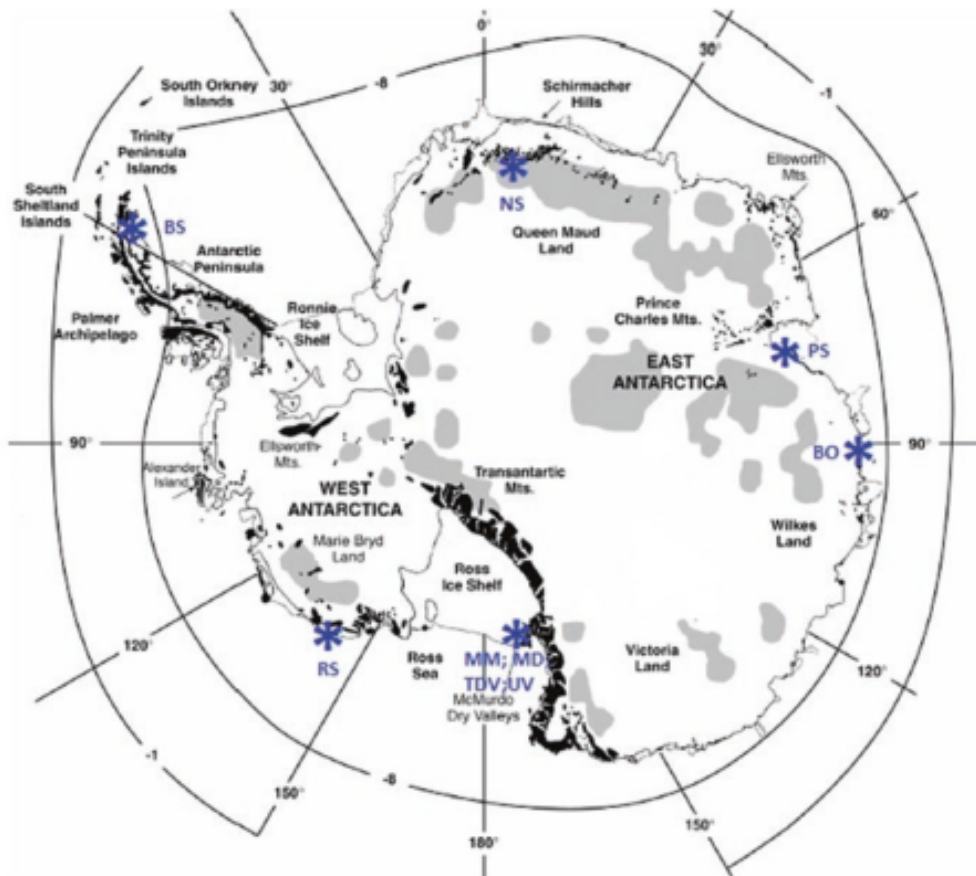


Fig. 7.2 Distribution of permafrost in continental Antarctica. Areas free of ice with probable presence of permafrost are depicted in black. The blue dots represent sampling sites from the published articles reviewed in this chapter. BO Banger Oasis, BS Bellingshausen Station, MD Mayers Dry Valley, MM Mac Murdo Dry Valleys, NS Novolazarevskaya Station, PS Progress Station, RS Russkaya Station, TDV Taylor dry Valleys, UV University Valley. (Map adapted from Bockheim and Hall 2002)

and mix different soil horizons and layers. These processes can facilitate the mixing of organic carbon from the surface into deeper layers (Simas et al. 2007). Arctic permafrost-affected soils contain large stores of frozen organic carbon; in contrast, lower organic matter accumulation is the prevalent feature of Antarctic soils and permafrost. This is attributed to several advances and retreats of vegetation and organic matter deposition during glacial/interglacial periods. Organic matter accumulated during warmer periods subsequently becomes frozen during the glacial age (Zimov et al. 2006; Vonk et al. 2013).

Despite the lower organic carbon content, some Antarctic soils have well-preserved organic carbon readily available for biological degradation (Simas et al. 2007; Michel et al. 2012). Therefore, ornithogenic soils may be highly susceptible to permafrost degradation under climate change. Although Antarctic permafrost is much less studied than its Arctic counterpart, Antarctic soils and permafrost represent a more extreme environment because of the combination of freezing

temperatures, aridity, and low organic matter content. However, little is known about the microbial communities in Antarctic permafrost.

The landforms associated with permafrost soils have typical periglacial or paraglacial features (Francelino et al. 2011), such as ice-wedges, taliks, cryopegs, massive ground ice, frost boils, thermokarst depressions, uplift marine terraces, biogenic landforms, organic accumulations, and broken soil horizons, each providing a unique habitat for microbial growth.

Ice-wedge polygons are formed when the frozen ground contracts and cracks during the winter months, splitting it into polygonal blocks (Kerfoot 1972). During the spring, these cracks are filled with melt water, which may freeze again and forms ice wedges. As the temperature rises, the inner ground between the cracks expands and elevates, forming the polygon centre (Kerfoot 1972). The ice wedges are overlain with active layer soil, creating the polygon trough (Schuur et al. 2015). The ice wedges grow over subsequent years of freeze and thaw cycles, resulting in a high-centred polygon surrounded by lower troughs.

Taliks are unfrozen masses of ground soil found within the permafrost, most commonly under wetlands because of the ability of water to transfer heat. Cryopegs are supercooled groundwater brine lenses that remain liquid even under negative temperatures because of their high salinity (Gilichinsky et al. 2003). Permafrost-affected soils may have a marked seasonal variation of soluble nutrients (nitrogen, phosphorus, calcium, magnesium, and potassium), based on the variations of these nutrients in the active layer, forming gradients. As meltwater is produced at the surface, nutrients are solubilized and can leach and move along the thermal gradient, enriching the top frozen permafrost layer (Tarnocai et al. 2009). This results in the upper layer of permafrost becoming a sink of soluble materials and nutrients, especially organic carbon, during permafrost formation, and a source of nutrients and organic carbon (especially by CO₂ losses) during permafrost degradation (Thomazini et al. 2016).

7.2 Microbial Communities in the Antarctic Permafrost

Although the Antarctic environment is considered to have little diversity, Antarctica has complex ecosystems with unique properties and different substrates that can harbour microhabitats and several microbial groups. Among these unexplored microhabitats, permafrost represents a unique habitat to study microorganisms that are on the edge of life.

The oldest known permafrost sample dates back three million years (Jansson and Taş 2014). In Antarctica, permafrost samples dating back to 170,000 years have been obtained (Kochkina et al. 2001). The atmospheric and ecological context of the period in which the permafrost was formed (e.g. atmosphere rich in CO₂, presence of vegetation and water, and others) could be preserved through freezing during the glaciation periods. In this manner, living beings inhabiting a particular location were possibly preserved in ice, and although the plants and animals trapped during

this glacial transition no longer exist, evidence suggests that many microorganisms were able to adapt and even remain active (Jansson and Taş 2014).

Antarctic permafrost temperatures are rarely measured and vary from -18 to -27 °C (Vorobyova et al. 1997). Owing to the constant low temperatures of permafrost, this substrate might contain cells, dormant propagules, spores and/or genetic material that are possibly the oldest on Earth, which may reveal important information about our ecosystems from the past (Willerslev et al. 2004). Thus, permafrost represents a unique ecological niche for microorganisms adapted to cold conditions (Jansson and Taş 2014).

Permafrost is, therefore, an extreme environment for microorganisms, especially those endemic to the region. Microorganisms inhabiting permafrost must be able to survive long exposures to temperatures below zero degrees on geological time scales, low liquid water levels and extremely low nutrient and metabolite transfer rates (Steven et al. 2006). Owing to its extreme characteristics as an environment, the microbial communities present in permafrost tend to present high rates of endemism (Czechowski et al. 2016).

Despite its extreme conditions, permafrost is considered as a microbial habitat, and even though it imposes several limitations to known organisms, the biodiversity in permafrost is relatively high, showing that it is not merely a frozen habitat with surviving microorganisms (Zucconi et al. 2012; Kochkina et al. 2014). Bacteria and fungi are the most commonly studied microorganisms in permafrost. Some bacteria have been reported to sustain biological activity in permafrost (Jansson and Taş 2014). In contrast, fungi are present in the form of spores (Vorobyova et al. 2001), hyphal fragments and resistant propagules in permafrost, without any apparent metabolic activity. The ratio of abundance between fungi and bacteria in permafrost appears to be low, probably because of low water activity, low carbon and nitrogen content, and conditions that restrict the growth and dispersion of fungi (Dreesens et al. 2014; Goordial et al. 2017). The depth and age of permafrost do not appear to have an influence on the fungal concentration in the sample, since fungal populations are microfocals and can be detected in any portion of the sample, regardless of depth or age of the sediments (Ozerskaya et al. 2009).

Permafrost is indeed an extreme environment. Therefore, the living communities present in this environment should be able to overcome two main limiting factors to life as we know it on Earth: extremely low temperatures and low liquid water content. Studies on the diversity of fungi inhabiting the deep permafrost layer have been conducted at both poles; however, only the list of species found in the Arctic permafrost has been documented thus far (Ozerskaya et al. 2009).

7.3 Fungi in Antarctic Permafrost

Few studies have aimed to identify fungal communities inhabiting the Antarctic permafrost (Kochkina et al. 2001, 2012; Gilichinsky et al. 2007; Zucconi et al. 2012; Goordial et al. 2016, 2017). Most of our current knowledge regarding

permafrost fungi is based on the research on Arctic permafrost. In a review article, Ozerskaya et al. (2009) reported that 33 families and 77 species of fungi are present in the Arctic permafrost, compiled from those listed in nine published articles.

Taking into consideration the data compiled in these earlier studies, the current work presents the list of fungi reported in the Antarctic permafrost and also describes the spatial distribution of this information throughout the continent (Table 7.1). The nomenclature found in the MycoBank database (<http://www.mycobank.org/>) was followed. In total, 70 species of fungi, distributed among 32 families and 4 phyla, were found in the Antarctic permafrost.

The 32 families listed here have been reported in only five published articles regarding Antarctic permafrost, indicating that the fungal diversity in the Antarctic permafrost is possibly even higher, despite insufficient sampling. The most diverse fungi found in the Antarctic permafrost are fungi that form conidia (e.g. *Aspergillus* spp., *Chrysosporium* spp., *Cladosporium* spp. and *Penicillium* spp.), possibly representing a dormant state in these taxa, which allows them the longest period of survival in this microhabitat (Ozerskaya et al. 2009). Among the 22 fungal species reported, the number of species belonging to the genus *Penicillium* was the highest, reported in four out of nine study locations; in contrast, only four species of *Cladosporium* were reported, but they were found in eight out of the nine study locations. The genera *Cordyceps* and *Akanthomyces*, isolated from Antarctic permafrost, can also be added to the list of Antarctic fungi proposed by Bridge and Spooner (2012).

Most of the reported species belonged to the *Aspergillaceae* family, represented by species of the genera *Penicillium* and *Aspergillus/Eurotium*. Since the discovery of penicillin by Alexander Fleming in 1928, the genus *Penicillium* has been extensively studied. This genus is ubiquitous and is present in the different substrates and environments of Antarctica (Gomes et al. 2018). In general, the genus *Penicillium* is considered highly important in the medical field because of its ability to produce several biologically active substances and even synthesize mycotoxins and other allergens (Zhelifonova et al. 2009). However, very few *Penicillium* spp. found in Antarctica have been chemically investigated with regard to this potential (Gomes et al. 2018).

The genus *Cladosporium* was also widely distributed among permafrost samples. These fungi cause several diseases in plants and animals, resulting in serious environmental damages (Bensch et al. 2012). The *Cladosporium* spp. isolated from permafrost samples included *Cladosporium sphaerospermum*, a potent human pathogen (de Hoog et al. 2000; Yano et al. 2003); *Cladosporium antarcticum*, derived from the Antarctic lichen *Caloplaca regalis* (Schubert et al. 2007), showing that the Antarctic ecosystems can reveal new and undiscovered endemic species; *Cladosporium herbarum* (reported in four of the nine study locations), a common fungi found worldwide (Schubert et al. 2007), was considered as the most widely distributed fungal species in the Antarctic permafrost. *Cladosporium herbarum* causes leaf spots on plants with commercial interest (Barbosa et al. 2001) and can also cause opportunistic mycosis in immunosuppressed patients (Dreborg et al. 1986; Malling et al. 1986).

Table 7.1 List of fungal species reported from samples of Antarctic permafrost

Taxa	Region	Deep range (cm)	Sediment age (years)	Method	Reference
<i>Ascomycota</i>					
<i>Aspergillaceae</i>					
<i>Aspergillus</i> sp.	TDV, MM	*	170.000	Cultivable	Kochkina et al. (2001), Gilichinsky et al. (2007)
<i>Aspergillus sydowii</i>	MM, BS	320–330	7486 ± 40	Cultivable	Gilichinsky et al. (2007), Kochkina et al. (2012)
<i>A. versicolor</i>	MM	*	*	Cultivable	Kochkina et al. (2012)
<i>Eurotium amstelodami</i>	MM	340	*	Cultivable	Zucconi et al. (2012)
<i>Penicillium aurantiogriseu</i>	MM	*	*	Cultivable	Gilichinsky et al. (2007)
<i>P. brevicompactum</i>	BS	500–520	7490 ± 40	Cultivable	Kochkina et al. (2012)
<i>P. chrysogenum</i>	BS, OS, BO, MM	100–625	705–7495 ± 40	Cultivable	Kochkina et al. (2012), Zucconi et al. (2012)
<i>P. citrinum</i>	MM	*	*	Cultivable	Kochkina et al. (2012)
<i>P. commune</i>	MM	*	*	Cultivable	Kochkina et al. (2012)
<i>P. expansum</i>	OS, MM	60–316	> 50.000	Cultivable	Kochkina et al. (2012), Zucconi et al. (2012)
<i>P. funiculosum</i>	MM	*	*	Cultivable	Kochkina et al. (2012)
<i>P. glabrum</i>	MM	342	*	Cultivable	Zucconi et al. (2012), Kochkina et al. (2012)
<i>P. glandicola</i>	MM	*	*	Cultivable	Kochkina et al. (2012)
<i>P. implicatum</i>	MM	*	*	Cultivable	Kochkina et al. (2012)
<i>P. jensenii</i>	MM	*	*	Cultivable	Kochkina et al. (2012)
<i>P. miczynskii</i>	MM	*	*	Cultivable	Kochkina et al. (2012)
<i>P. minioluteum</i>	MM	*	*	Cultivable	Kochkina et al. (2012)
<i>P. politans</i>	MM	233–343	*	Cultivable	Zucconi et al. (2012)
<i>P. purpurogenum</i>	MM	*	*	Cultivable	Kochkina et al. (2012)
<i>P. rugulosum</i>	MM	*	*	Cultivable	Gilichinsky et al. (2007)
<i>Penicillium</i> sp.	MD, MM	234–344	30.000	Cultivable	Kochkina et al. (2001), Zucconi et al. (2012), Gilichinsky et al. (2007)

(continued)

Table 7.1 (continued)

Taxa	Region	Deep range (cm)	Sediment age (years)	Method	Reference
<i>P. variabile</i>	BS	500–625	7492 ± 40	Cultivable	Kochkina et al. (2012)
<i>P. verrucosum</i>	MM	*	*	Cultivable	Gilichinsky et al. (2007)
<i>P. viridicatum</i>	MM	*	*	Cultivable	Kochkina et al. (2012)
<i>P. waksmanii</i>	BS	615–625	7497 ± 40	Cultivable	Kochkina et al. (2012)
Apiosporaceae					
<i>Arthrinium</i> sp.	MD	*	30.000	Cultivable	Kochkina et al. (2001)
<i>Arthrinium arundinis</i>	MM	*	*	Cultivable	Gilichinsky et al. (2007)
Chaetomiaceae					
<i>Chaetomium</i>	MD	*	30.000	Cultivable	Kochkina et al. (2001)
Cladosporiaceae					
<i>Cladosporium</i> sp.	MD, TDV	*	30.000–170.000	Cultivable	Kochkina et al. (2001)
<i>Cladosporium antarcticum</i>	BO	115–125	705 ± 110	Cultivable	Kochkina et al. (2012)
<i>C. cladosporioides</i>	MM, RS	20–337	*	Cultivable	Gilichinsky et al. (2007), Kochkina et al. (2012), Zucconi et al. (2012)
<i>C. herbarum</i>	MM, BO, RS, NS,	15,338	705–> 50.000	Cultivable	Gilichinsky et al. (2007), Kochkina et al. (2012), Zucconi et al. (2012)
<i>C. sphaerospermum</i>	BS	615–625	7494 ± 40	Cultivable	Kochkina et al. (2012)
Clavicipitaceae					
<i>Cordyceps bassiana</i>	MM	316	*	Cultivable	Zucconi et al. (2012)
Cordycipitaceae					
<i>Akanthomyces lecanii</i>	MM	*	*	Cultivable	Kochkina et al. (2012)
<i>A. muscarius</i>	BS	500–520	7489 ± 40	Cultivable	Kochkina et al. (2012)
<i>Engyodontium album</i>	MM	233	*	Cultivable	Zucconi et al. (2012)
Dematiaceae					
<i>Dematiaceae</i> sp.	MD, TDV	*	30.000–170.000	Cultivable	Kochkina et al. (2001)
Diaporthaceae					

<i>Diaporthe helianthi</i>	UI	*	*	*	Uncultivable	Kochkina et al. (2012)
Didymellaceae						
<i>Juxtiphoma eupyrena</i>	BO	115–125	705 ± 110		Cultivable	Kochkina et al. (2012)
<i>Phoma leveillei</i>	MM	*	*		Cultivable	Gilichinsky et al. (2007)
Dipodascaceae						
<i>Dipodascus</i> sp.	TDV	*	170.000		Cultivable	Kochkina et al. (2001)
<i>Geotrichum candidum</i>	MM	*	*		Cultivable	Gilichinsky et al. (2007)
Dothioraceae						
<i>Aureobasidium pullulans</i> var. <i>pullulans</i>	RS, MM, PS	115–336	*		Cultivable	Kochkina et al. (2012), Zuccconi et al. (2012)
Herpotrichiellaceae						
<i>Exophiala</i> sp.	RS	115–120	*		Cultivable	Kochkina et al. (2012)
Hypocreaceae						
<i>Gliocladium</i> sp.	RS	115–120	*		Cultivable	Kochkina et al. (2012)
<i>Trichoderma harzianum</i>	BS	500–520	7493 ± 40		Cultivable	Kochkina et al. (2012)
Incertae sedis						
<i>Chaetophoma</i> sp.	BO	115–125	705 ± 110		Cultivable	Kochkina et al. (2012)
Microascaceae						
<i>Wardomyces anomalus</i>	MM	*	*		Cultivable	Gilichinsky et al. (2007)
Morchellaceae						
<i>Imaia gigantea</i>	UI	*	*		Uncultivable	Kochkina et al. (2012)
Myxotrichaceae						
<i>Oidiodeudron</i> sp.	MM, TDV	*	170.000		Cultivable	Gilichinsky et al. (2007)
Nectriaceae						
<i>Fusarium oxysporum</i>	MM	*	*		Cultivable	Kochkina et al. (2012)
<i>Fusarium</i> sp.	TDV	*	170.000		Cultivable	Kochkina et al. (2001)
Onygenaceae						
<i>Chrysosporium europae</i>	BS	320–330	7487 ± 40		Cultivable	Kochkina et al. (2012)

(continued)

Table 7.1 (continued)

Taxa	Region	Deep range (cm)	Sediment age (years)	Method	Reference
<i>Xerochrysum xerophilum</i>	MM	*	*	Cultivable	Gilichinsky et al. (2007)
Orbiliaceae					
<i>Dwayaangam calodena</i>	UI	*	*	Uncultivable	Kochkina et al. (2012)
Plectosphaerellaceae					
<i>Vérticillium</i> sp.	MM	*	*	Cultivable	Gilichinsky et al. (2007)
<i>Metapochonia suchlasporia</i>	MM	*	*	Cultivable	Gilichinsky et al. (2007)
Pleosporaceae					
<i>Alternaria alternata</i>	MM	316–335	*	Cultivable	Zucconi et al. (2012)
<i>Ulocladium botrytis</i>	MM	*	*	Cultivable	Gilichinsky et al. (2007)
Ramalinaceae					
<i>Lecania brialmonitii</i>	UI	*	*	Uncultivable	Kochkina et al. (2012)
Roccellaceae					
<i>Rocella gracilis</i>	UI	*	*	Uncultivable	Kochkina et al. (2012)
Saccharomycetaceae					
<i>Candida albicans</i>	UI	*	*	Uncultivable	Kochkina et al. (2012)
<i>Pichia kluyveri</i>	UI	*	*	Uncultivable	Kochkina et al. (2012)
Undetermined					
<i>Ascochyta</i> sp.	RS	115–120	*	Cultivable	Kochkina et al. (2012)
<i>Ascomycota incertae sedis</i>	RS	115–140	*	Cultivable	Kochkina et al. (2012)
<i>Chaetothyriales</i>	UV	*	*	Cultivable	Goordial et al. (2016)
<i>Coelomycetes incertae sedis</i>	BO, OS	115–240	705 ± 110	Cultivable	Kochkina et al. (2012)
<i>Cryomyces</i> sp.	PS	230–240	*	Cultivable	Kochkina et al. (2012)
<i>Dothideomycetes</i>	UV, MM	5–55	*	Uncultivable	Goordial et al. (2016, 2017)
<i>Eurotiumycete</i>	UV, MM	12–30	*	Uncultivable	Goordial et al. (2016, 2017)
<i>Leotiomycetes</i>	UV, MM	0–22	*	Uncultivable	Goordial et al. (2016, 2017)
<i>Saccharomycetes</i>	UV	5–55	*	Uncultivable	Goordial et al. (2016)

<i>Sordariomycetes</i>	MM					Uncultivable	Goordial et al. (2017)
Basidiomycota							
Cortinariaceae							
<i>Cortinarius scarius</i> f. <i>phaeophyllus</i>	UI	*				Uncultivable	Kochkina et al. (2012)
Sporidiobolaceae							
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	MM	*				Cultivable	Gilichinsky et al. (2007)
<i>Rhodotorula</i> sp.	UV	37–42				Cultivable	Goordial et al. (2016)
<i>Sporidiobolus metaroseus</i>	MM	233				Cultivable	Zucconi et al. (2012)
Tremellaceae							
<i>Cryptococcus pseudotongus</i>	UI	*				Uncultivable	Kochkina et al. (2012)
<i>Filobasidium stepposum</i>	MM	339				Cultivable	Zucconi et al. (2012)
Undetermined							
<i>Basidiomycetes</i> sp.	MD, TDV, MM	*			30.000–170.000	Cultivable	Kochkina et al. (2001), Gilichinsky et al. (2007)
<i>Basidiomycota incertae sedis</i>	UV	0–5			*	Uncultivable	Goordial et al. (2016)
<i>Tremellomycetes</i>	UV, MM	0–22			*	Uncultivable	Goordial et al. (2016, 2017)
<i>Streptophyta</i>	MM	22			*	Uncultivable	Goordial et al. (2017)
Zygomycota							
Mortierellaceae							
<i>Mortierella</i> sp.	MM	*			*	Cultivable	Gilichinsky et al. (2007)
Mucoraceae							
<i>Rhizopus oryzae</i>	MM	316			*	Cultivable	Zucconi et al. (2012)
Undetermined phyla							
Mucedinaceae							
<i>Mucedinaceae</i> sp.	MD, TDV	*			30.000–170.000	Cultivable	Kochkina et al. 2001

Abbreviations: *BO* Banger Oasis, *BS* Bellingshausen Station, *MD* Mayers Dry Valley, *MM* Mac Murdo Dry Valleys, *NS* Novolazarevskaya Station, *PS* Progress Station, *RS* Russkaya Station, *TDV* Taylor dry Valleys, *UV* University Valley, * uninformed.

Species belonging to the genus *Oidiiodendron* were also isolated from different Antarctic substrates, such as marine macroalgae (Loque et al. 2010) and soils (Ding et al. 2016; Wentzel et al. 2018). The genus *Oidiiodendron* is considered medically important as it exhibits cytotoxic activity against lymphocytic leukaemia (Li et al. 2012) and synthesizes novel antibiotics for medicinal use (Andersen and Rasmussen 1984).

These studies demonstrate that data collection regarding fungal biodiversity in permafrost is important to discover fungal metabolites of potential value in the fields of medicine, environmental research and biotechnology, in general. Concomitantly, it is also important to consider fungal species with pathogenic potential against plants, animals and humans that have, thus far, remained “imprisoned” in the Antarctic permafrost. Owing to climate change and global warming, these pathogenic fungal species could get introduced into the temperate and tropical regions of the planet; therefore, researchers conducting studies in Antarctica must take precautionary measures to minimize the risk of transferring and introducing these species into other regions of the planet.

The preservation of microorganisms in permafrost depends on the original composition and density of the ancient microbial communities, the level of microbial adaptations to low temperatures and the protective properties of the environment (Kochkina et al. 2001). All these factors are related to the evolution of microbial communities since ancient times, the geological history of the sediments and the conditions for their transition to the state of being permanently frozen, instead of the age and depth of said sediments (Kochkina et al. 2001).

The biomass levels, diversity and structure of the fungal community in low-temperature environments are significantly affected by temperature and water availability (Jansson and Taş 2014). Thus, fungal adaptation to low temperatures might have led to the evolution of fungal enzymes with unique properties (Kochkina et al. 2001). Most of the terrestrial biosphere is characterized by low temperatures (< 5 °C), and therefore, it is important to understand and consider microbial activities and adaptations as well as the ecological interactions of microbial communities that are active in this habitat (Elster et al. 2017).

The preservation of viable communities that are trapped in the Antarctic permafrost leads to key questions regarding the biological surviving mechanisms, biogeochemical processes, life forms, metabolic state of microorganisms, and ability to repair in situ DNA damage (Gilichinsky et al. 2007). In studies employing different “omics” approaches to determine the metagenome present in the Antarctic permafrost, it was possible to observe that some RNAs and proteins were likely preserved for long periods of time in this frozen environment or, yet, that they were sustained in tissues that are surviving in a dormant state. In contrast, a few groups of microorganisms are able to actively express those genes, translating them into proteins, even in freezing temperature conditions (Hultman et al. 2015). Furthermore, studies have reported relatively high expressions of cold-shock proteins in these microorganisms, presumably for survival under freezing conditions (Hultman et al. 2015). In contrast, the concentration of transport proteins in these samples was low, presumably, in response to the low transcript transportation required in permafrost.

To survive under low-temperature conditions, fungi have developed different strategies, such as formation of multicellular spores, increased melanin concentration in the fungal cell wall, production of cryoprotectants (e.g. antifreeze proteins that reduce ice crystals present in the cytoplasm), increased intracellular trehalose concentration (to protect the cytosol from stress), production of polyols (glycerol and mannitol), production of unsaturated fatty acids (to provide increased membrane fluidity) and the synthesis of low temperature-functioning enzymes (lipases, polygalacturonase, amylase and phosphatase) (Robinson 2001; Ozerskaya et al. 2009; Buzzini et al. 2012). Isolation of novel or rare microorganisms, discovery of new metabolites and obtaining information regarding the microbial diversity in Antarctica have collectively generated interest in Antarctic fungi (Kochkina et al. 2014). In this context, it is essential to achieve better organization and dispersion of published data on Antarctic microorganisms. While some studies have published comprehensive data regarding the depth and age of the sediments, the species identified and the sampling sites have not been clearly correlated in these studies, making it difficult for readers to understand or even analyse the microbial diversity.

Despite insufficient sampling, Antarctic permafrost shows considerable richness in its fungal community, possessing an incredibly wide biotechnological potential as well as presenting concerns regarding its potential to harbour pathogenic agents that could cause diseases in plants and animals. When compared to other terrestrial ecosystems, even the ones found in Antarctica, the permafrost continues to be an extreme environment that remains unexplored with regard to its fungal communities, necessitating an increase in future scientific efforts to conduct further research in such a unique environment.

7.4 Role of Permafrost in Global Climatic Changes

Man-made environmental changes have been causing increasingly noticeable losses, making them the focus of greater discussions. Antarctica is considered a key area in relation to the global climate and, apparently, the least disturbed portion of the planet in the context of direct anthropological impacts (Guglielmin and Cannone 2012; Vieira et al. 2010), but at the same time, it is particularly important to global climate change (Maxwell and Barrie 1989; Ramos et al. 2017). However, several environmental changes can directly or indirectly affect Antarctica, such as the increase in global temperature caused by high rates of greenhouse gas emissions (Jansson and Taş 2014; Zhu et al. 2014; Thomazini et al. 2014, 2015, 2016). One of the most direct consequences of global warming on the polar ice caps is the substantial melting of glaciers and permafrost.

According to Guglielmin and Cannone (2012), the surface temperature on continental Antarctica has been showing a strong warming tendency since 1997 (the beginning of their temperature records), with an average increase of 0.31 °C annually. A direct consequence of this increase in temperature was the melting of permafrost (which has been showing a yearly increase in average temperature by 0.1 °C)

at the rate of 1 cm every year, which is inevitably converted into the active layer of the soil. Besides that, moreover, these environmental responses have a strong correlation with the increase in total solar radiation induced by the expansion of the holes in the ozone layer (Solomon 1999). Indeed, the current influx of UVA and UVB radiation is higher in the Antarctic continent than it is in any other part of the planet (Solomon 1999).

The potential effects of climate change in Antarctica could include altered thickness and moisture content in permafrost, increase in ice-free areas, changes in vegetation, soil alterations (Bockheim 1993) and even changes in the microbial population. Specifically, the physical variables influencing frozen soils include stages of defrosting, decrease in snow coverage, increase in nutrient availability and alterations in liquid water availability (Nikrad et al. 2016).

Several gases can be found inside the pores present in permafrost (such as oxygen, carbon dioxide, nitrogen and methane). The oxygen and nitrogen concentrations inside these pores are similar to those found in the atmosphere, while the concentrations of methane and carbon dioxide can be higher, which is directly linked to climate change (Steven et al. 2006). The defrosting of permafrost would result in the release of considerable amounts of carbon and nutrients, which can be used to speed microbial development (Jansson and Taş 2014) and promote microbial degradation of the cryo-acquired carbon, leading to the biogenic production of methane (Mondav et al. 2014). These processes, in turn, would create a positive feedback loop for climate change, speeding the process of defrosting even further (Mondav et al. 2014; Nikrad et al. 2016).

Based on laboratory data simulating the permafrost defrosting process, it was possible to observe the occurrence of rapid changes in microbial gene abundance and in the groups of metabolically active organisms (Mackelprang et al. 2011). For instance, with only 1 week of defrosting at 5 °C, the permafrost metagenome became more similar to the ones from the active layer samples compared to the ones from other permafrost samples and was even able to show the release of CO₂ and methane (Mackelprang et al. 2011). Moreover, increase in temperature and humidity increased microbial activity in other non-psychrophilic microorganisms (Nikrad et al. 2016), besides providing a better opportunity for exogenous microorganisms to develop. The possibility of community succession by non-indigenous microorganisms in this environment could lead to the extinction of highly specialized endemic fungi that are not very competitive (Selbmann et al. 2012).

The end of the dormant state in many fungi, mediated by global warming, may reveal some isolates that are potentially harmful to human, animal and plant health. Although there is a lack of empirical evidence regarding such pathogenic fungi, a similar *phenomenon* was reported when the eukaryotic pathogen virus *Pithovirus sibiricum* was isolated (Legendre et al. 2014) from the Siberian permafrost, dating back to 30,000 years. The global impact of rapid climate change makes the polar and alpine environments places of concern for Science and society, because of the ecological impacts resulting from these changes that have already been observed at the ecosystem level (Elster et al. 2017). The landscape of frozen ecosystems is rapidly changing, and unfortunately, our knowledge of fungal activity in frozen soils is advancing slower than the pace at which climate change is occurring (Nikrad et al. 2016).

7.5 Conclusion and Perspectives

Despite the limited published data on fungi inhabiting the Antarctic permafrost, it is possible to infer that the Antarctic permafrost is moderately rich in viable fungi. The fungal species found in the ancient permafrost samples highlight the certainty of the evolution of specific adaptive strategies for these fungi to survive under a permanent state of freezing. Concomitantly, it is possible to isolate fungal species with known pathogenic potential (such as *C. sphaerospermum*) as well as encounter species of considerable biotechnological interest (such as *Oidiodendron* spp.). Further research is necessary to monitor permafrost melting in Antarctica and to broaden our knowledge regarding the diversity of fungi present in such environments, with the intent to advance our understanding of its ecology, community structure and biotechnological potential and the role of agents of opportunistic diseases in plants and animals.

References

- Andersen NR, Rasmussen PR (1984) The constitution of clerocidin a new antibiotic isolated from *Oidiodendron truncatum*. *Tetrahedron Lett* 25:465–468
- Barbosa MAG, Rehn KG, Menezes M, Mariano RDLR (2001) Antagonism of *Trichoderma* species on *Cladosporium herbarum* and their enzymatic characterization. *Braz J of Microbiol* 32:98–104
- Bensch K, Braun U, Groenewald JZ, Crous PW (2012) The genus *Cladosporium*. *Stud in Mycol* 72:1–401
- Bockheim JG (1993) Global change and soil formation in the Antarctic region. Joint Russian-American seminar on cryopedology and global change. Russian Academy of Sciences, Russia, In, pp 181–202
- Bockheim JG (2015) *Cryopedology*. Springer, London, p 173
- Bockheim JG, Hall KJ (2002) Permafrost, active-layer dynamics and periglacial environments of continental Antarctica: periglacial and permafrost research in the Southern Hemisphere. *S Afr J Sci* 98:82–90
- Bridge PD, Spooner BM (2012) Non-lichenized Antarctic fungi: Transient visitors or members of a cryptic ecosystem? *Fungal Ecology* 5: 381–394
- Buzzini P, Branda E, Goretti M, Turchetti B (2012) Psychrophilic yeasts from worldwide glacial habitats: diversity, adaptation strategies and biotechnological potential. *FEMS Microbiol Ecol* 82:217–241
- Czechowski P, Clarke LJ, Breen J, Cooper A, Stevens MI (2016) Antarctic eukaryotic soil diversity of the Prince Charles Mountains revealed by high-throughput sequencing. *Soil Biol Biochem* 95:112–121
- De Hoog GS, Guarro J, Gene J, Figueras MJ (2000) *Atlas of clinical fungi*. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, pp 276–282
- Ding Z, Li L, Che Q, Li D, Gu Q, Zhu T (2016) Richness and bioactivity of culturable soil fungi from the Fildes Peninsula, Antarctica. *Extremophiles* 20:425–435
- Dreborg S, Agrell B, Foucard T, Kjellman NI, Koivikko A, Nillson S (1986) A double-blind, multicenter immunotherapy trial in children, using a purified and standardized *Cladosporium herbarum* preparation I. clinical results. *Allergy* 41:131–140

- Dreesens LL, Lee CK, Cary SC (2014) The distribution and identity of edaphic fungi in the McMurdo Dry Valleys. *Biol* 3:466–483
- Elster J, Margesin R, Wagner D, Häggblom M (2017) Polar and alpine microbiology—earth's cryobiosphere. *FEMS Microbiol Ecol* 93:1–3
- Francelino MR, Schaefer CEGR, Simas FNB, Filho EIF, Souza JLL, Costa LM (2011) Geomorphology and soils distribution under paraglacial conditions in an ice-free area of Admiralty Bay, King George Island, Antarctica. *Catena* 85:194–204
- Gilichinsky D, Rivkina E, Shcherbakova V, Laurinavichuis K, Tiedje J (2003) Supercooled water brines within permafrost—an unknown ecological niche for microorganisms: a model for astrobiology. *Astrobiology* 3:331–341
- Gilichinsky DA, Wilson GS, Friedmann EI, McKay CP, Sletten RS, Rivkina EM, Vishnivetskaya TA, Erokhina LG, Ivanushkina NE, Kochkina GA, Shcherbakova VA, Soina VS, Spirina EV, Vorobyova EA, Fyodorov-Davydov DG, Hallet B, Ozerskaya SM, Sorokovikov VA, Laurinavichyus KS, Shatilovich AV, Chanton JP, Ostroumov VE, Tiedje JM (2007) Microbial populations in Antarctic permafrost: biodiversity, state, age, and implication for astrobiology. *Astrobiology* 7:275–311
- Gomes EC, Godinho VM, Silva DA, de Paula MT, Vitoreli GA, Zani CL, Alves TMA, Junior PAS, Furta SMF, Barbosa EC, Oliveira JG, Oliveira FS, Carvalho CR, Ferreira MC, Rosa CA, Rosa LH (2018) Cultivable fungi present in Antarctic soils: taxonomy, phylogeny, diversity, and bioprospecting of antiparasitic and herbicidal metabolites. *Extremophiles* 22:381–393
- Goordial J, Davila A, Lacelle D, Pollard W, Marinova MM, Greer CW, DiRuggiero J, McKay CP, Whyte LG (2016) Nearing the cold-arid limits of microbial life in permafrost of an upper Dry Valley, Antarctica. *ISME J* 10:1613
- Goordial J, Davila A, Greer CW, Cannam R, DiRuggiero J, McKay CP, Whyte LG (2017) Comparative activity and functional ecology of permafrost soils and lithic niches in a hyper-arid polar desert. *Environ Microbiol* 19:443–458
- Guglielmin M, Cannone N (2012) A permafrost warming in a cooling Antarctica? *Clim Chang* 111:177–195
- Hultman J, Waldrop MP, Mackelprang R, David MM, McFarland J, Blazewicz SJ, Harden J, Turetsky MR, McGuire AD, Shah MB, VerBerkmoes NC, Lee LH, Mavrommatis K, Jansson JK (2015) Multi-omics of permafrost, active layer and thermokarst bog soil microbiomes. *Nature* 521:208
- Jansson JK, Taş N (2014) The microbial ecology of permafrost. *Nat Rev Microbiol* 12:414
- Kerfoot DE (1972) Thermal contraction cracks in an Arctic tundra environment. *Arctic* 25:142–150
- Kochkina GA, Ivanushkina NE, Karasev SG, Gavrish EY, Gurina LV, Evtushenko LI, Spirina EV, Vorob'eva EA, Gilichinskii DA, Ozerskaya SM (2001) Survival of micromycetes and actinobacteria under conditions of long-term natural cryopreservation. *Microbiology* 70:356–364
- Kochkina G, Ivanushkina N, Ozerskaya S, Chigineva N, Vasilenko O, Firsov S, Spirina E, Gilichinsky D (2012) Ancient fungi in Antarctic permafrost environments. *FEMS Microbiol Ecol* 82:501–509
- Kochkina GA, Ozerskaya SM, Ivanushkina NE, Chigineva NI, Vasilenko OV, Spirina EV, Gilichinskii DA (2014) Fungal diversity in the Antarctic active layer. *Microbiology* 83:94–101
- Legendre M, Bartoli J, Shmakova L, Jeudy S, Labadie K, Adrait A, Lescot M, Poirot O, Bertaux L, Bruley C, Couté Y, Rivkina E, Abergel C, Claverie J-M (2014) Thirty-thousand-year-old distant relative of giant icosahedral DNA viruses with a pandoravirus morphology. *Proc Natl Acad Sci* 111:4274–4279
- Li L, Li D, Luan Y, Gu Q, Zhu T (2012) Cytotoxic metabolites from the Antarctic psychrophilic fungus *Oidiodendron truncatum*. *J Nat Prod* 75:920–927
- Loque CP, Medeiros AO, Pellizzari FM, Oliveira EC, Rosa CA, Rosa LH (2010) Fungal community associated with marine macroalgae from Antarctica. *Polar Biol* 33:641–648
- Mackelprang R, Waldrop MP, DeAngelis KM, David MM, Chavarria KL, Blazewicz SJ, Jansson JK (2011) Metagenomic analysis of a permafrost microbial community reveals a rapid response to thaw. *Nature*, 480:368

- Malling HJ, Dreborg S, Weeke B (1986) Diagnosis and immunotherapy of mould allergy: V. clinical efficacy and side effects of immunotherapy with *Cladosporium herbarum*. *Allergy* 41:507–519
- Maxwell JB, Barrie LA (1989) Atmospheric and climatic change in the Arctic and Antarctic. *Ambio* 18:42–49
- Michel RFM, Schaefer CEGR, Dias L, Simas FNB, Benites V, Mendonca ES (2006) Ornithogenic gelysols (cryosols) from Maritime Antarctica: pedogenesis, vegetation and carbon studies. *Soil Sci Soc Am J* 70:1370–1376
- Michel RFM, Schaefer CEGR, Poelking EL, Simas FNB, Fernandes Filho EI, Bockheim JG (2012) Active layer temperature in two Cryosols from King George Island, Maritime Antarctica. *Geomorphology* 155:12–19
- Mondav R, Woodcroft BJ, Kim EH, McCalley CK, Hodgkins SB, Crill PM, Chanton J, Hurst GB, VerBerkmoes NC, Saleska SR, Hugenholtz P, Rich VI, Tyson GW (2014) Discovery of a novel methanogen prevalent in thawing permafrost. *Nat Commun* 5:3212
- Moura PA, Francelino MR, Schaefer CEGR, Simas FNB, Mendonça BAF (2012) Distribution and characterization of soils and landform relationships in Byers Peninsula, Livingston Island, Maritime Antarctica. *Geomorphology* 155–156:45–54
- Nikrad MP, Kerkhof LJ, Högglom MM (2016) The subzero microbiome: microbial activity in frozen and thawing soils. *FEMS Microbiol Ecol* 92:fiw081
- Ozerskaya S, Kochkina G, Ivanushkina N, Gilichinsky DA (2009) Fungi in permafrost. In: *Permafrost soils*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp 85–95
- Ramos M, Vieira G, de Pablo MA, Molina A, Abramov A, Goyanes G (2017) Recent shallowing of the thaw depth at Crater Lake, Deception Island, Antarctica (2006–2014). *Catena* 149:519–528
- Robinson CH (2001) Cold adaptation in Arctic and Antarctic fungi. *New Phytol* 151:341–353
- Schubert K, Groenewald JZ, Braun U, Dijksterhuis J, Starink M, Hill CF, Zalar P, de Hoog GS, Crous PW (2007) Biodiversity in the *Cladosporium herbarum* complex (Davidiellaceae, Capnodiales), with standardisation of methods for *Cladosporium* taxonomy and diagnostics. *Stud Mycol* 58:105–156
- Schuur E, McGuire A, Schädel C, Grosse G, Harden JW, Hayes DJ, Hugelius G, Koven CD, Kuhry P, Lawrence DM, Natali SM, Olefeldt D, Romanovsky VE, Schaefer K, Turetsky MR, Treat CC, Vonk JE (2015) Climate change and the permafrost carbon feedback. *Nature* 520:171–179
- Selbmann L, Isola D, Fenice M, Zucconi L, Sterflinger K, Onofri S (2012) Potential extinction of Antarctic endemic fungal species as a consequence of global warming. *Sci Total Environ* 438:127–134
- Shur YL, Jorgenson MT (2007) Patterns of permafrost formation and degradation in relation to climate and ecosystems. *Permafrost Periglac* 18:7–19
- Simas FNB, Schaefer CEGR, Albuquerque Filho MR, Francelino MR, Fernandes Filho EI, Costa LM (2007) Genesis, properties and classification of Cryosols from Admiralty Bay, Maritime Antarctica. *Geoderma* 144:116–122
- Solomon S (1999) Stratospheric ozone depletion: a review of concepts and history. *Rev Geophys* 37:275–316
- Steven B, Leveille R, Pollard WH, Whyte LG (2006) Microbial ecology and biodiversity in permafrost. *Extremophiles* 10:259–267
- Tarnocai C (1980) Summer temperatures of cryosolic soils in the north-central Keewatin, NWT. *Can J Soil Sci* 60:311–327
- Tarnocai C, Canadell JG, Schuur EAG, Kuhry P, Mazhitova G, Zimov S (2009) Soil organic carbon pools in the northern circumpolar permafrost region. *Global Biogeochem Cycles* 23
- Thomazini A, Teixeira DB, Turbay CVG, La Scala N, Schaefer CEGR, Mendonça ES (2014) Spatial variability of CO₂ emissions from newly exposed paraglacial soils at a glacier retreat zone on King George Island, Maritime Antarctica. *Permafrost Periglac* 25:233–242
- Thomazini A, Mendonça ES, Teixeira DB, ICC A, La Scala N, Canellas LP, Spokas KA, DMBP M, CVG T, RBA F, CEGR S (2015) CO₂ and N₂O emissions in a soil chronosequence at a glacier retreat zone in Maritime Antarctica. *Sci Total Environ* 521–522:336–345

- Thomazini A, Francelino MR, Pereira AB, Schünemann AL, Mendonça ES, Almeida PHA, Schaefer CEGR (2016) Science of the total environment geospatial variability of soil CO₂–C exchange in the main terrestrial ecosystems of Keller Peninsula, Maritime Antarctica. *Sci Total Environ* 562:802–811
- Vieira G, Bockheim J, Guglielmin M, Balks M, Abramov AA, Boelhouwers J, Cannone N, Ganzert L, Gilichinsky DA, Goryachkin S, López-Martínez J, Meiklejohn, Raffi R, Miguel Ramos SC, Serrano E, Simas F, Sletten R, Wagner D (2010) Thermal state of permafrost and active-layer monitoring in the Antarctic: advances during the international polar year 2007–2009. *Permafrost Periglac* 21:182–197
- Vonk JE, Mann PJ, Dowdy KL, Davydova A, Davydov SP, Zimoc N, Spencer RGM, Bulygina EB, Eglinton TI, Holmes RM (2013) Dissolved organic carbon loss from Yedoma permafrost amplified by ice wedge thaw. *Environ Res Lett* 8:035023
- Vorobyova E, Soina V, Gorlenko M, Minkovskaya N, Zalinova N, Mamukelashvili A, Gilichinsky D, Rivkina E, Vishnivetskaya T (1997) The deep cold biosphere: facts and hypothesis. *FEMS Microbiol Rev* 20:277–290
- Vorobyova E, Minkovsky N, Mamukelashvili A, Zvyagintsev D, Soina V, Polanskaya L, Gilichinsky D (2001) Micro-organisms and biomarkers in permafrost. In: *Permafrost response on economic development, environmental security and natural resources*. Springer, Dordrecht, pp 527–541
- Wentzel LCP, Inforsato FJ, Montoya QV, Rossin BG, Nascimento NR, Rodrigues A, Sette LD (2018) Fungi from Admiralty Bay (King George Island, Antarctica) soils and marine sediments. *Microb Ecol* 77:12–24
- Willerslev E, Hansen AJ, Poinar HN (2004) Isolation of nucleic acids and cultures from fossil ice and permafrost. *Trends Ecol Evol* 19:141–147
- Yano S, Koyabashi K, Kato K (2003) Intrabronchial lesion due to *Cladosporium sphaerospermum* in a healthy, non-asthmatic woman. *Mycoses* 46:330–332
- Zhelifonova VP, Antipova TV, Ozerskaya SM, Kochkina GA, Kozlovsky AG (2009) Secondary metabolites of *Penicillium* fungi isolated from permafrost deposits as chemotaxonomic markers. *Microbiology* 78:350–354
- Zhu R, Bao T, Wang Q, Xu H, Liu Y (2014) Summertime CO₂ fluxes and ecosystem respiration from marine animal colony tundra in maritime Antarctica. *Atmos Environ* 98:190–201
- Zimov SA, Schuur EA, Chapin III FS (2006) Permafrost and the global carbon budget. *Science* 312:1612–1613
- Zucconi L, Selbmann L, Buzzini P, Turchetti B, Guglielmin M, Frisvad JC, Onofri S (2012) Searching for eukaryotic life preserved in Antarctic permafrost. *Polar Biol* 35:749–757

5.2 Capítulo 2: Diversity, distribution, and ecology of viable fungi in permafrost and active layer of Maritime Antarctica.

O presente capítulo teve como objetivo a análise da diversidade de fungos cultiváveis presentes na camada ativa e no *permafrost* das ilhas Robert, Deception (Crater Lake) e Livingston, pertencentes ao arquipélago das Shetland do Sul – Antártica.

Através do uso de quatro meios de cultura (DRBC, Meio Mínimo, Sabouraud e DG18) e isolamento às temperaturas de 10 e 25 °C foram obtidos um total de 564 isolados fúngicos, sendo 213 provenientes de *permafrost*, e 351 de camada ativa. Quanto às temperaturas, 326 foram isolados a 10 °C e 238 a 25 °C. Todos os meios de cultura foram efetivos, entretanto, DG18 foi o meio com maior número de isolados obtidos, pois é um meio que seleciona microorganismos xerofílicos - característica predominante nos ambientes de *permafrost*.

Após a identificação, os isolados foram classificados em 58 taxa, sendo 27 do *permafrost* e 31 da camada ativa. A diversidade fúngica detectada foi moderada a alta, e composta por taxa cosmopolita, adaptados ao frio e endêmicos. As espécies compreendem papéis desde saprófitos, mutualistas e parasitárias. Nossos resultados demonstram que o *permafrost* abriga fungos viáveis em toda a Antártica Marítima e que eles contrastam com a camada ativa sobreposta. Foram detectados importantes taxa de fungos que representam potencial novas espécies, particularmente, aqueles geneticamente próximos a *Pseudogymnoascus destructans*, que podem causar a extinção de morcegos na América do Norte e na Eurásia. A detecção de fungos viáveis presos no *permafrost* merece mais estudos sobre a extensão de sua diversidade fúngica e sua capacidade de se expandir de *permafrost* a outros habitats na Antártica e em outros lugares.

O material suplementar deste artigo encontra-se no Anexo 10.1.



Diversity, distribution, and ecology of viable fungi in permafrost and active layer of Maritime Antarctica

Thamar Holanda da Silva¹ · Débora Amorim Saraiva Silva¹ · Fábio Soares de Oliveira² · Carlos Ernesto Gonçalves Reynaud Schaefer³ · Carlos Augusto Rosa · Luiz Henrique Rosa¹

Received: 18 March 2020 / Accepted: 27 April 2020 / Published online: 13 May 2020
 © Springer Japan KK, part of Springer Nature 2020

Abstract

We evaluated the diversity and distribution of viable fungi present in permafrost and active layers obtained from three islands of Maritime Antarctica. A total of 213 fungal isolates were recovered from the permafrost, and 351 from the active layer, which were identified in 58 taxa; 27 from permafrost and 31 from the active layer. *Oidiiodendron*, *Penicillium*, and *Pseudogymnoascus* taxa were the most abundant in permafrost. *Bionectriaceae*, *Helotiales*, *Mortierellaceae*, and *Pseudeurotium* were the most abundant in the active layer. Only five shared both substrates. The yeast *Mrakia blollopis* represented is the first reported on Antarctic permafrost. The fungal diversity detected was moderate to high, and composed of cosmopolitan, cold-adapted, and endemic taxa, reported as saprobic, mutualistic, and parasitic species. Our results demonstrate that permafrost shelters viable fungi across the Maritime Antarctica, and that they are contrasting to the overlying active layer. We detected important fungal taxa represented by potential new species, particularly, those genetically close to *Pseudogymnoascus destructans*, which can cause extinction of bats in North America and Eurasia. The detection of viable fungi trapped in permafrost deserves further studies on the extension of its fungal diversity and its capability to expand from permafrost to other habitats in Antarctica, and elsewhere.

Keywords Antarctica · Fungi · Diversity · Permafrost

Introduction

In recent years, the impact of global climate change over the different environments of Antarctica has increased, especially in the Maritime Antarctica and adjacent Peninsula. One of the most sensitive environments under the effect of global warming is permafrost (Guglielmin and Cannone

2012). Permafrost is a condition found in soils from cold environments, which remains continuously at temperatures below 0 °C for two or more consecutive years (Ping et al. 1998; Tarnocai et al. 2009). In contrast, the overlying layer found above the permafrost is called the active layer, which experiences dynamic cycles of freezing and thawing during winter and summer, and exerts influence on permafrost (WRB 2014). Antarctica has approximately 37% of the world's permafrost (French 2007), and for this reason, it has been the target of different geomicrobiological studies associated with the effects of global warming (Bockheim and Hall 2002; Adlam et al. 2010; Guglielmin and Cannone 2012; Schaefer et al. 2016; Potapowicz et al. 2019).

Although permafrost presents extreme characteristics, such as low water availability, long exposure to low temperatures, and extremely low rates of nutrient and metabolite transfer (Steven et al. 2006), it has been reported as an important microhabitat for extremophiles (Jansson and Taş 2014). Bacteria seem to represent the dominant microbial group reported to date in permafrost, perhaps due to their ability to metabolize the scarce nutrients of the permafrost

Communicated by A. Oren.

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s00792-020-01176-y>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Luiz Henrique Rosa
 lhrosa@icb.ufmg.br

¹ Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

² Departamento de Geografia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

³ Departamento de Solos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brazil

under low temperatures (Bakermans et al. 2003). However, fungi have also been detected in the permafrost, which may be found in the form of spores or other resistant structures (Vorobyova et al. 2001), allowing them to survive for long periods in a dormant state on the permafrost (Ozerskaya et al. 2009). Despite the importance of the potential melting processes of Antarctica permafrost, a few studies have been conducted to increase the knowledge of resident microbial communities. According to da Silva et al. (2019), a few mycological studies have been conducted until now, and approximately, only 70 fungal species have been registered in the Antarctic permafrost. In the present study, we evaluated and discussed the diversity, distribution, and ecology of viable fungi inhabiting the permafrost and active layer of different islands of Maritime Antarctica.

Materials and methods

Sampling areas and sample collecting

The permafrost and active layer samples were obtained during the field work in the Antarctic summer of 2016–2017 in sites at Robert, Livingston, and Deception islands, Maritime Antarctica (Suppl. Figure 1). The superficial soil was removed (approximately 10 cm depth) with the aid of an ice axe until it was possible to reach permafrost. The active layer (sampled from 1 to 30 cm above of permafrost) and permafrost (sampled from 5 to 30 cm deep and frozen) were collected using spatulas previously disinfested with 70% alcohol and conditioned in sterilized WhirlPak bag (Sigma-Aldrich, USA). To each site, collected 500 g of active layer and permafrost were sampled in duplicate. After collection, all samples were kept at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ until processing.

Sample processing and fungi isolation

To isolate fungi, 1 g of each sample was added into 9 mL of NaCl at 0.85% and 100 μL of a 10^{-1} dilution was inoculated in the following media Sabourad Agar (SAB) (Himedia, India), Minimal Media (MM) (Peptone 0.025%, glucose 0.5%, K_2HPO_4 0.698%, KH_2PO_4 0.544%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.11% and agar 2%; Dichloran Glycerol Agar (DG18) (Oxoid, EUA), and Dichloran Rose Bengal Agar (DRBC) (Oxoid, EUA) containing 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of chloramphenicol (Sigma, USA). They were incubated at 10 and $25 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ for a period of up to 60 days. The density of each species was determined from their colony forming unity (CFU). Representatives of each fungi morphotype obtained were purified using YM Agar (Glucose 1%, Yeast Extract 0.03%, Malt Extract 0.03%, Agar 2%, and Peptone 0.05%) and deposited in the form of Castellani (Castellani, 1967) and cryotubes at a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ into the Collection

of Microorganisms and Cells from Universidade Federal de Minas Gerais.

Fungi identification

The identification of fungi was made using different strategies for filamentous fungi and yeasts. The protocol for DNA extraction was described previously in Rosa et al. (2009). Amplification of the transcribed internal spacer (ITS-5.8S) region for filamentous fungi was performed according to Rosa et al. (2009), using primers ITS1 and ITS4. The yeasts were grouped and identified according to protocols established by Lachance et al. (1999). Yeast molecular identity was confirmed by sequencing the D1/D2 domains of the large subunit rRNA gene using the primers NL1 and NL4 (White et al. 1990; O'Donnell 1993; Kurtzman and Robnett 1998; Lachance et al. 1999). For certain genera that have high polymorphism index, were used partial amplification of the β -tubulin gene, with the primers BT2a and BT2b (Glass and Donaldson 1995), and ribosomal Polymerase II gene, and primers RPB2 5F and RPB2 7R (Malkus et al. 2006). Representative consensus sequences of the fungal taxa were deposited into the GenBank database (Table 1). To achieve species-rank identification based on ITS, β -tubulin, Polymerase II, and D1–D2, the consensus sequence was aligned with all sequences from related species retrieved from the NCBI (National Center for Biotechnology Information) GenBank database using BLASTn program (Basic Locus Search Alignment Tool) (Altschul et al. 1997). The information about fungal classification generally followed the dictionary Kirk et al. (2008), MycoBank (<https://www.mycobank.org>) and the Index Fungorum (<https://www.indexfungorum.org>).

Diversity and distribution analysis

To quantify species diversity, richness, and dominance, the indices Fisher's α , Margalef's, and Simpson's were used, respectively. The matrices of OTUs (Operational taxonomic units) abundances (calculated for each OTU from the fungal density of each site/sample) were used to perform the following multivariate analyses to estimate the similarities among fungal taxa from different soils points using the Sorensen (calculated with presence and absence parameters of the taxa) and Bray–Curtis coefficient (calculated with the presence and absence and abundance of the taxa). Species accumulation curves were obtained using Mao Tao index. The principal component analyses (PCA) calculations were carried among fungal diversity indices and the physico-chemical characteristics of the site/sample. All results were obtained with 95% confidence, and bootstrap values were calculated from 1000 replicates using the PAST software (Hammer et al. 2001) version 3. Venn diagrams were prepared according to Bardou et al. (2014) to illustrate the

Table 1 Molecular identification of fungi and yeast obtained from permafrost and Antarctic active layer

Island/substrate	UFMGCB	No of isolates	CFU g ⁻¹	Top BLAST search results (GenBank accession)	QC (%)	ID (%)	No of bp analyzed	Proposed taxa (GenBank accession number)
Robert	14100 ^a	1	> 300	<i>Pseudeurotium bakeri</i> (NR145345)	96	95	486	<i>Pseudeurotium</i> sp. 1 (MT227322)
Active layer	14157 ^a	40	111.65	<i>Pseudogymnoascus destructans</i> (NR111838)	98	98	527	<i>Pseudogymnoascus</i> cf. <i>destructans</i> (MT227330)
	14084 ^a	20	62.1	<i>Oidiodendron truncatum</i> (NR111036)	100	99	382	<i>O. truncatum</i> (MT227320)
	14104 ^a	1	40	<i>Mortierella fimbriocystis</i> (NR152949)	100	99	430	<i>M. fimbriocystis</i> (MT227324)
	14063 ^a	2	22.5	<i>Mortierella histoplasma-toides</i> (NR137062)	98	92	510	<i>Mortierella</i> sp. 1 (MT227316)
	14099 ^c	1	20	<i>Penicillium palitans</i> (KU904360)	100	100	588	<i>P. palitans</i> (MT348156)
	14103 ^a	5	14	<i>Mortierella schmuckeri</i> (NR111578)	100	97	460	<i>Mortierella</i> sp. 2 (MT227323)
	14083 ^a	1	10	<i>Glarea lozoyensis</i> (NR137138)	94	92	452	<i>Helotiales</i> sp. 1 (MT227319)
	14176 ^a	1	10	<i>Glarea lozoyensis</i> (NR137138)	98	90	475	<i>Helotiales</i> sp. 2 (MT227331)
	14089 ^a	1	10	<i>Mortierella histoplasma-toides</i> (NR137062)	87	94	507	<i>Mortierella</i> sp. 3 (MT227321)
	14065 ^a	2	1	<i>Mortierella parvispora</i> (NR077185)	97	95	545	<i>Mortierella</i> sp. 4 (MT227317)
Permafrost	14079 ^a	27	61	<i>Pseudogymnoascus destructans</i> (NR111838)	98	98	491	<i>Pseudogymnoascus</i> cf. <i>destructans</i> (MT227318)
	14121 ^a	1	55	<i>Mortierella histoplasma-toides</i> (NR137062)	96	93	434	<i>Mortierella</i> sp. 5 (MT227328)
	14194 ^a	11	22.9	<i>Oidiodendron truncatum</i> (NR111036)	97	99	472	<i>Oidiodendron</i> sp. 1 (MT227332)
	14113 ^a	2	10	<i>Glarea lozoyensis</i> (NR137138)	99	92	420	<i>Helotiales</i> sp. 3 (MT227325)
	14116 ^a	1	10	<i>Mortierella gamsii</i> (NR152954)	100	91	512	<i>Mortierella</i> sp. 6 (MT227326)
	14127 ^a	1	10	<i>Mortierella schmuckeri</i> (NR111578)	100	97	484	<i>Mortierella</i> sp. 7 (MT227329)
	14117 ^a	4	10	<i>Mortierella turficola</i> (NR111583)	100	99	484	<i>M. turficola</i> (MT227327)
	14330 ^a	1	100	<i>Glarea lozoyensis</i> (NR137138)	97	92	427	<i>Helotiales</i> sp. 4 (MT227337)
Active layer	14322 ^a	25	38.7	<i>Mortierella antarctica</i> (NR111580)	99	99	532	<i>M. antarctica</i> (MT227335)
	14362 ^a	8	37.5	<i>Mortierella parvispora</i> (NR077185)	99	95	507	<i>Mortierella</i> sp. 8 (MT227341)
	14305 ^a	17	29.1	<i>Pseudogymnoascus destructans</i> (NR111838)	100	99	439	<i>Pseudogymnoascus</i> cf. <i>destructans</i> (MT227333)
	14420 ^a	1	10	<i>Mortierella parvispora</i> (JX976076)	100	97	413	<i>Mortierella</i> sp. 9 (MT227344)
	14327 ^a	1	10	<i>Mortierella turficola</i> (NR111583)	99	97	428	<i>Mortierella</i> sp. 10 (MT227336)
	14401 ^a	2	10	<i>Oidiodendron truncatum</i> (NR111036)	97	99	436	<i>Oidiodendron</i> sp. 2 (MT227343)
Permafrost	14390 ^a	1	> 300	<i>Oidiodendron truncatum</i> (NR111036)	100	99	366	<i>O. truncatum</i> (MT227342)
	14414 ^b	4	100	<i>Aspergillus sydowii</i> (MG991347)	100	100	372	<i>Aspergillus sydowii</i> (MT2272981)

Table 1 (continued)

Island/substrate	UFMGCB	No of isolates	CFU g ⁻¹	Top BLAST search results (GenBank accession)	QC (%)	ID (%)	No of bp analyzed	Proposed taxa (GenBank accession number)
Livingston Active layer	14308 ^a	4	43.75	<i>Mortierella parvispora</i> (NR077185)	94	98	441	<i>Mortierella</i> sp. 11 (MT227334)
	14332 ^a	30	38.75	<i>Mortierella antarctica</i> (NR111580)	100	99	498	<i>M. antarctica</i> (MT227338)
	14359 ^a	11	34	<i>Pseudogymnoascus destructans</i> (EU884921)	98	98	443	<i>Pseudogymnoascus</i> cf. <i>destructans</i> (MT227339)
	14422 ^c	1	30	<i>Penicillium chrysogenum</i> (AY495981)	100	99	785	<i>Penicillium</i> cf. <i>chrysogenum</i> (MT348154)
	14361 ^a	1	10	<i>Paecilomyces lilacinus</i> (AY213665)	100	99	478	<i>Purpureocillium lilacinum</i> (MT227340)
	14423 ^c	1	100	<i>Penicillium rubens</i> (JF909926)	100	100	810	<i>Penicillium rubens</i> (MT348155)
	15964 ^a	5	> 300	<i>Lasionectria hilhorstii</i> (NR161154)	99	94	485	<i>Bionectriaceae</i> sp. (MT227350)
	15953 ^a	10	> 300	<i>Mortierella elongatula</i> (NR111582)	100	95	505	<i>Mortierellaceae</i> sp. 1 (MT227348)
	15930 ^a	10	79	<i>Pseudogymnoascus appendiculatus</i> (NR137875)	100	99	428	<i>Pseudogymnoascus appendiculatus</i> (MT227346)
	15975 ^a	3	70	<i>Hyphodiscus brevicollaris</i> (NR121471)	100	96	450	<i>Hyphodiscus</i> sp. (MT227351)
	16125 ^a	2	60	<i>Mortierella basiparvispora</i> (NR160139)	98	97	377	<i>Mortierella</i> sp. 12 (MT227366)
	15990 ^a	43	55.6	<i>Pseudogymnoascus appendiculatus</i> (NR137875)	99	99	406	<i>Pseudogymnoascus</i> cf. <i>appendiculatus</i> (MT227352)
	16108 ^a	27	43.8	<i>Pseudogymnoascus verrucosus</i> (NR111197)	100	98	460	<i>Pseudogymnoascus verrucosus</i> (MT227365)
	15957 ^a	10	42.8	<i>Pseudogymnoascus roseus</i> (MH858631)	99	99	426	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.1 (MT227349)
	16005 ^a	11	30	<i>Mortierella parvispora</i> (NR077185)	99	96	502	<i>Mortierellaceae</i> sp. 2 (MT227353)
	15995 ^c	5	30	<i>Penicillium tardochrysogenum</i> (MH865983)	100	100	683	<i>Penicillium tardochrysogenum</i> (MT348157)
	15927 ^a	23	30	<i>Pseudogymnoascus destructans</i> (NR111838)	100	98	483	<i>Pseudogymnoascus destructans</i> (MT227345)
	16011 ^a	3	27	<i>Mortierella schmuckeri</i> (NR111578)	97	97	507	<i>Mortierellaceae</i> sp. 3 (MT227354)
	Permafrost	1594 ^a	2	15	<i>Infundichalara microchona</i> (NR154074)	100	96	450
16041 ^c		1	> 300	<i>Penicillium chrysogenum</i> (JX996668)	100	99	603	<i>Penicillium</i> sp. 1 (MT348158)
16216 ^c		7	180	<i>Penicillium chrysogenum</i> (JX996668)	100	100	496	<i>Penicillium</i> sp. 2 (MT348159)
16203 ^a		9	101	<i>Pseudogymnoascus destructans</i> (NR111838)	99	98	491	<i>Pseudogymnoascus</i> cf. <i>destructans</i> (MT227368)
16063 ^a		1	100	<i>Infundichalara microchona</i> (NR154074)	100	96	451	<i>Infundichalara</i> sp. 2 (MT227360)
16067 ^a		1	100	<i>Mortierella gamsii</i> (NR152954)	98	96	566	<i>Mortierellaceae</i> sp. 6 (MT227361)
16033 ^a		3	71.7	<i>Acremonium bisseptum</i> (NR159609)	100	94	486	<i>Hypocreales</i> sp. 1 (MT227357)
16051 ^a		16	57	<i>Pseudogymnoascus destructans</i> (NR111838)	100	98	407	<i>Pseudogymnoascus</i> cf. <i>destructans</i> (MT227358)

Table 1 (continued)

Island/substrate	UFMGCB	No of isolates	CFU g ⁻¹	Top BLAST search results (GenBank accession)	QC (%)	ID (%)	No of bp analyzed	Proposed taxa (GenBank accession number)
	16028 ^a	5	51.5	<i>Mortierella parvispora</i> (NR077185)	100	96	503	<i>Mortierellaceae</i> sp. 5 (MT227355)
	16030 ^a	5	37	<i>Mortierella elongatula</i> (NR111582)	100	95	546	<i>Mortierellaceae</i> sp. 4 (MT227356)
	16069 ^a	4	25	<i>Pseudogymnoascus appendiculatus</i> (NR137875)	100	99	360	<i>Pseudogymnoascus appendiculatus</i> (MT227363)
	16205 ^a	1	10	<i>Hyphodiscus brevicollaris</i> (NR121471)	99	96	481	<i>Hyaloscyphaceae</i> sp. 1 (MT227370)
	16079 ^a	1	10	<i>Lasionectria hilhorstii</i> (NR161154)	96	95	465	<i>Bionectriaceae</i> sp. 2 (MT227364)
	16061 ^a	1	10	<i>Leohumicola minima</i> (NR121307)	99	97	401	<i>Leohumicola</i> sp. 1 (MT227359)
	16192 ^a	3	10	<i>Mortierella parvispora</i> (NR)	100	94	601	<i>Mortierella</i> sp. 13 (MT227367)
	16068 ^d	2	10	<i>Mrakia blollopis</i> (NG057710)	100	100	443	<i>Mrakia blollopis</i> (MT227362)
	16204 ^a	2	10	<i>Pseudogymnoascus appendiculatus</i> (NR137875)	100	98	469	<i>Pseudogymnoascus</i> sp. 2 (MT227369)

UFMGCB collection of microorganisms and cells from the Universidade Federal de Minas Gerais, CFU colony forming units, QC query cover, ID identity

^aTaxa submitted to phylogenetic analysis based on ITS1-5.8S-ITS2

^bTaxa submitted to phylogenetic analysis based on β -tubulina

^cTaxa submitted to phylogenetic analysis based on RNA polymerase 2

^dTaxa submitted to phylogenetic analysis based on NL1-NL4

comparison of fungal assemblages present in permafrost and active layer at different sites sampled.

Soil physicochemical analyses

Chemical analysis was performed through international procedures as recommended by EMBRAPA (1997). The pH on water and on KCl 1 mol L⁻¹ solution was determined by potentiometric method in soil suspension: solution equal to 1:2.5. The exchangeable calcium and magnesium were extracted with KCl 1 mol L⁻¹ in pH 7.0, and dosed by spectrophotometer of atomic absorption. Exchangeable potassium and sodium were extracted with a solution of HCl 0.05 mol L⁻¹ and H₂SO₄ 0.025 mol L⁻¹ (Mehlich 1), afterwards dosed by spectrophotometer of flame emission. Exchangeable aluminum was extracted with KCl 1 mol L⁻¹, determined by titration with NaOH 0.025 mol L⁻¹. Extractable acidity (H⁺ + AL³⁺) was quantified with calcium acetate 0.5 mol L⁻¹ adjusted to pH 7.0 and determined by titration with NaOH 0.06 mol L⁻¹. The phosphorus was extracted with Mehlich 1 and determined by a spectrophotometer of molecular absorption (Colorimetry). The total CHN was determined by dry combustion methods using PerkinElmer 2400 Series II CHNS/O Elemental Analyzer (Culmo et al. 1989).

Results

Diversity and distribution

Five hundred and sixty-four fungal isolates were obtained (Suppl. Table 1). Among them, 326 grew at 10 °C and 238 at 25 °C, and all the culture media used were effective for the isolation of fungi. However, the DG18 medium was able to obtain the highest number of isolates. The samples from Livingston Island presented the highest isolation frequency (52% of the total isolates), followed by Robert and Deception islands (24%). From the total fungal isolates, 351 were obtained from the active layer and 213 from permafrost, and 52 fungal taxa were identified (Table 1). From these, 15 taxa were identified at the species level, 23 at the genus, nine at the family, and five at the order levels. *Ascomycota* represented 60% of the total fungi recovered, followed by *Mortierellomycota* (37%) and *Basidiomycota* (1.6%). *Mrakia blollopis* was a unique yeast taxon obtained, which was recovered from the permafrost of Livingston Island. *Oidiodendron*, *Penicillium*, and *Pseudogymnoascus* were the most abundant taxa in permafrost samples. In contrast, *Bionectriaceae*, *Helotiales*, *Mortierellaceae*, and *Pseudeurotium* were abundant in the active layer. In addition, 40 taxa displayed sequences with low

similarities to sequences of known fungi deposited in the GenBank database and may represent new species.

Fungal distribution varied among the islands sampled. Eighteen taxa were found in Robert, 13 in Deception, and 27 in Livingston islands; none of the species was common to all the islands (Fig. 1a). However, at the genus level, *Mortierella*, *Pseudogymnoascus*, and *Penicillium* were common in the three islands. Most of the taxa found were exclusive to one type of substrate; 25 occurred only in the active layer and 22 in the permafrost. However, *Oidiiodendron truncatum*, *Mortierella antarctica*, *Pseudogymnoascus* sp. 2, *Penicillium chrysogenum*, and *Pseudogymnoascus appendiculatus* were found in either substrate (Fig. 1b), and no species from permafrost or active layer was common to all islands sampled (Fig. 1c).

Soil physicochemical and diversity analyses

Three types of soils were observed: (i) poorly developed and shallow volcanic soil without vegetation (Deception Island), (ii) moderately developed soil on andesite covered with moss carpet vegetation (Livingston Island), and (iii) mature ornithogenic soil on andesite, affected by incipient phosphatisation (Robert Island), all derived from the same rock (andesite). Chemical analysis showed increasing weathering and soil development from the Deception < Livingston < Robert islands. The latter displayed greater acidity (lower pH values) and greater nutrient availability [exchangeable bases Ca, Mg, and K, expressed by SB (sum of bases) and CEC (cation-exchangeable capacity) values], and increased aluminum saturation (m). Our results indicate no differences between the permafrost and active layer for most of the chemical properties analyzed (Suppl. Table 2). However, the different

soil developments represent a typical trend of soil formation and weathering for Maritime Antarctica (Simas et al. 2015).

The fungal diversity indices varied across the islands sampled (Suppl. Table 3). The assemblage of Livingston Island showed the highest diversity indices and densities, followed by the Robert and Deception islands, respectively. In addition, the diversity indices displayed a few differences between the permafrost and active layer. However, the Sorensen index between the permafrost and active layer showed a coefficient of 0.17 (17%), suggesting low similarity. Sorensen and Bray–Curtis indices (Fig. 2) also suggested that the fungal assemblages of the Livingston and Deception islands were more similar when compared with those of Robert Island, where ornithogenesis occurs. Additionally, the Mao Tao rarefaction curves (Fig. 3) reached an asymptote, suggesting that the sampling effort was sufficient to recover majority of the resident fungal assemblages. PCA analysis based on the soil characteristics and fungal diversity explained more than 99% of the data variation (Suppl. Fig. 2). The analysis showed that the samples grouped according to the island, and that samples were mainly grouped by the K and P levels, indicating that they may represent the major factors that affect the resident fungal diversity. The amounts of exchangeable K and available P were very different among the islands, and may be a key factor for the observed fungal composition (Suppl. Fig. 2a). Without P and K in the PCA analysis, saturation by Al becomes the main axis that affects fungal diversity (Suppl. Fig. 2b). Meanwhile, the variations between the active layer and permafrost among the islands did not cause changes, suggesting that the major differences were detected among islands, and not soils.

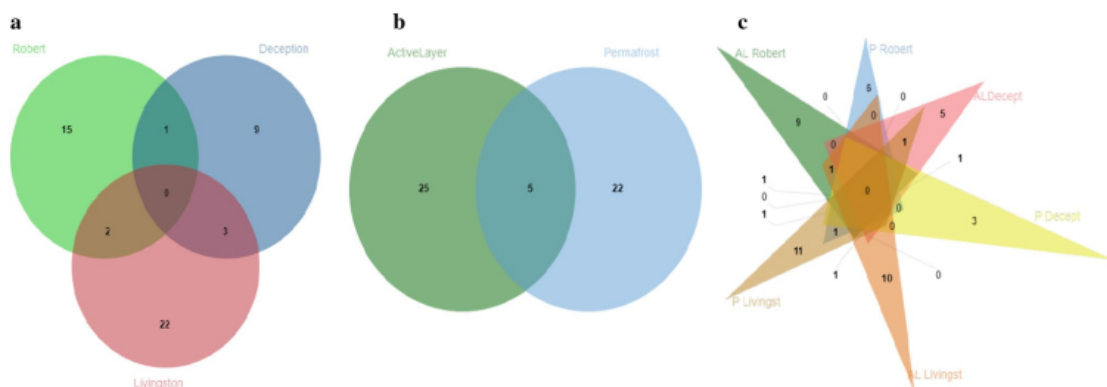


Fig. 1 Venn diagram similarities of the fungal taxa versus the different islands and substrates. **a** Comparison between islands, **b** between active layer and permafrost and independent of island, and **c** active

layer and permafrost among different islands. *P* permafrost, *AL* active layer, *Decept* Deception Island, *Livingst* Livingston Island

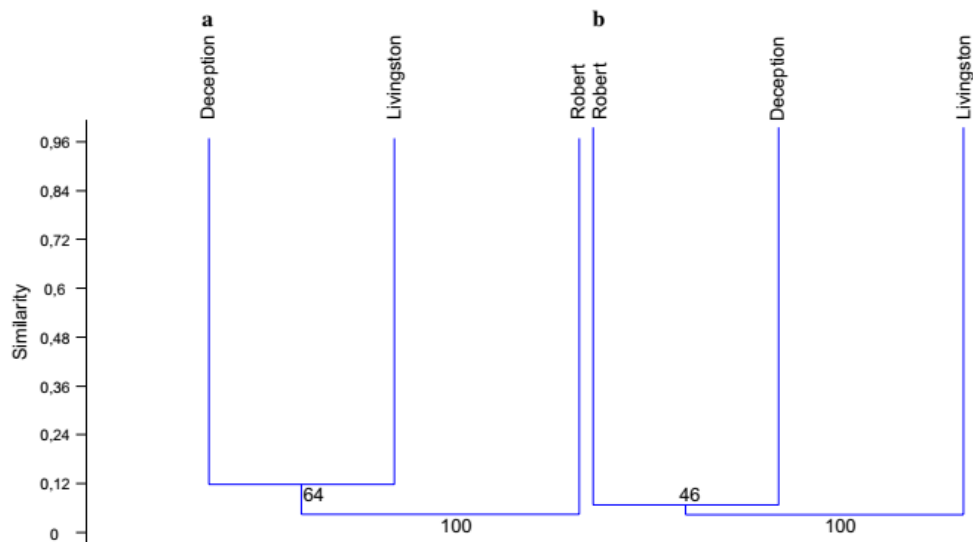
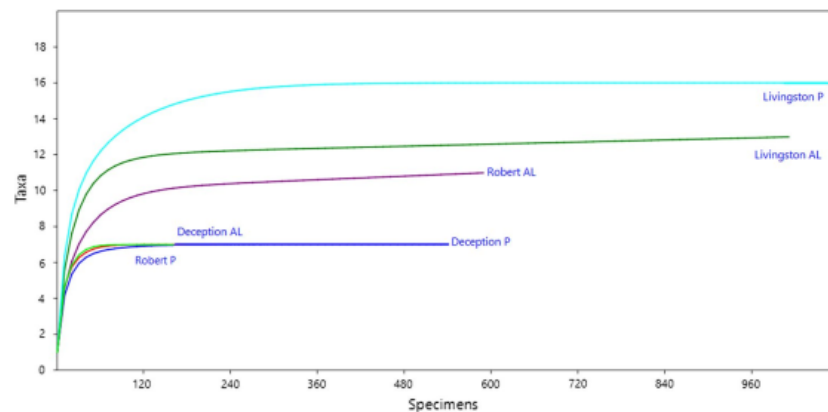


Fig. 2 Sorensen's (a) and Bray-Curtis (b) dendrograms showing similarity measures among the fungal assemblages present in permafrost and active layer from different islands of Antarctic Peninsula. The

results were obtained with 95% confidence and bootstrap values calculated from 1000 interactions

Fig. 3 Rarefaction curves for the fungi assemblages present in permafrost and active layer of different islands in the Antarctic Peninsula. *Livingston P* fungal assemblage from permafrost, *Livingston AL* fungal assemblage from active layer, *Robert P* fungal assemblage from permafrost, *Robert AL* fungal assemblage from active layer, *Deception P* fungal assemblage from permafrost, *Deception AL* fungal assemblage from active layer



Discussion

Diversity and distribution

Previous studies have reported fungi from 33 families, 44 genera, and 77 species in the Antarctic permafrost (Kochkina et al. 2001, 2012; Gilichinsky et al. 2007; Zucconi et al. 2012; Goordial et al. 2016, 2017). In our study, 27 fungal taxa were detected, and only *Oidiodendron* and *Mortierella* taxa, and *Aspergillus sydowii* were previously reported in the Antarctic permafrost. The dominant fungal group was anamorphic *Ascomycota*, which represents the

most common fungal phylum in Antarctica (Ruisi et al. 2007; Rosa et al. 2019). According to Ozerskaya et al. (2009), most of the fungal diversity registered on permafrost was formed by taxa capable of producing conidia, possibly representing a state of dormancy in these fungi, which allows them to survive for a long time in frozen soil.

In contrast, only *M. blollopis* was identified as *Basidiomycota*. This species was originally described from Antarctica soils (Thomas-Hall et al. 2010) and was also found in lake sediments (Tsuji et al. 2013). Species of *Mrakia* are described as cold-adapted yeasts living in different cold environments of the Arctic (Pathan et al. 2010; Singh and Singh 2012), Alpine (Thomas-Hall et al. 2010), and

Patagonian (de Garcia et al. 2007). In Antarctica, *Mrakia* species have already been reported in the soil and sediment of lakes (Di Menna 1966; Xin and Zhou 2007; Suji et al. 2013; Tsuji 2016; Gomes et al. 2018); however, our study is the first report on Antarctic permafrost. Habitats such as sediment lakes, snow, and water seem to be better conditions for the establishment and growth of yeast than the active layer and permafrost. Factors such as the availability of water and nutrients can influence this behavior. In the permafrost, the taxa *Oidiodendron truncatum*, *Penicillium* spp., and *P. destructans* displayed the highest densities. *Oidiodendron* species have been obtained from different substrates in the Antarctic, such as those associated with macroalgae *Adenocystis utricularis* (Loque et al. 2010), *Pyropia endiviifolia* (Furbino et al. 2014), freshwater (Gonçalves et al. 2012), soils (Li et al. 2012; Ding et al. 2016; Wentzel et al. 2019), and permafrost (Gilichinsky et al. 2007). *Penicillium* is one of the most common fungal groups in Antarctica, and found in soil, snow, ice, seawater, and marine sediments, freshwater and lake sediments, plants, and animals (Rosa et al. 2019). Additionally, the *Penicillium* genus is often found in different permafrost of the global cryosphere (Gilichinsky et al. 2007; Ozerskaya et al. 2009; Zucconi et al. 2012). *Pseudogymnoascus* has a wide global distribution, which has already been reported in temperate soils (Leushkin et al. 2015), Alpine (Rice and Currah 2006), Arctic (Semenova et al. 2015), and Antarctic regions (Arenz et al. 2011; Godinho et al. 2015; Gonçalves et al. 2015; Gomes et al. 2018). *P. destructans* (= *Geomyces destructans*), detected in the present study in the permafrost and active layer, is a pathogenic fungus that causes active infection in bat populations around the world, causing white-nose syndrome (Lorch et al. 2011). Taxonomic classification at the species level is a great challenge for this genus (Shuey et al. 2014). The diversity of *Pseudogymnoascus* seems to be higher than previously thought (Lorch et al. 2013; Minnis and Lindner 2013), and species found in Antarctica may represent new endemic species (Rosa et al. 2019).

In the active layer, the taxa *Pseudeurotium* sp. 1, *Helotiales* sp. 4, *Bionectriaceae* sp., and *Mortierellaceae* sp. 1 displayed the highest densities. In Antarctica, *Pseudeurotium* has already been reported in soils (Arenz and Blanchette 2009), freshwater (Gonçalves et al. 2012), and marine sponges (Henríquez et al. 2014), but its ecological function in this ecosystem remains unknown. *Helotiales* is among the most representative orders of fungi found in Antarctic soils, reaching 41–56% of the sequences (Newsham et al. 2018). In our study, the most closely related species to the *Helotiales* found in the Antarctic permafrost was *Glarea lozoyensis*, a genus with only one species described, which has the greatest ability to produce pneumocandin B₀, the precursor molecule for the synthesis of the antifungal drug caspofungin (CANCIDAS™) (Morrison 2006; Peláez et al. 2011). Due to

its low sequence similarities to known sequences deposited in the GenBank database, the *Helotiales* isolates found in the Antarctic permafrost might represent a new genus that is related to *Glarea*. *Mortierellaceae* includes taxa of the genera *Mortierella* that are frequently isolated from different substrates in Antarctica, such as permafrost (Gilichinsky 2007), macroalgae thalli (Godinho et al. 2013), floating wood in seawater (Edgington et al. 2014), mosses (Melo et al. 2014), rhizosphere of *D. antarctica* and *C. quitensis* (Gonçalves et al. 2015; Wentzel et al. 2019), soil (Gomes et al. 2018), and marine invertebrates (Godinho et al. 2019). Some species of *Mortierella* are capable of growing and forming spores at 0 °C (Onofri et al. 2004; Furbino et al. 2014), which justifies its presence in this mainly frozen environment.

Purpureocillium, *Infundichalara*, and *Leohumicola* genera, and the species *M. turficola*, *M. antarctica*, and *P. destructans* represent the first report on samples from Antarctic permafrost. In addition, 40 taxa found in the permafrost and active layer displayed low sequence identities with type species sequences of known fungi, especially those identified at the family level. However, further polyphasic taxonomy studies will be necessary to describe these potential new fungal species.

Soil physicochemical and fungal diversity analyses

Chemical analysis revealed an advanced development degree of permafrost and active layers on the Livingston and Robert islands, which may influence their diversity of fungal assemblages. In Livingston Island, we observed older soils on ice-free areas in comparison with the very recent and young soils of Deception Island, although both have been affected by cryoclasty and cryoturbation. In addition, longer exposure times, greater accumulation of meltwater, and apparent more morphodynamic stability of the landscape (less erosion) resulted in greater vegetation, organic matter inputs, and better conditions to support fungal life in permafrost and active layer. In contrast, Deception Island is characterized as a very young active layer and soil ecosystems, under an initial colonization process with little organic matter incorporation, which accounts for the low diversity indices of fungal assemblages. The permafrost and active layer of Robert Island shared chemical characteristics similar to those of Livingston Island; however, the influence of phosphatisation (by guano of marine birds) was only detected in the soil on Robert Island. Through this soil-forming process, in which animal droppings interact with geological substrates, decomposition of guano strongly acidifies the soil and promotes chemical reactions that accelerate rock weathering. Consequently, these processes clearly affect resident fungal diversity. In general, we observed a small difference in diversity indices among the fungal diversity of permafrost and active

layer, although with great dissimilarity, which may be justified by age and freezing stability that cause a few alterations in the permafrost chemical characteristics.

Conclusion

Despite the extreme conditions of the permafrost, it shelters viable fungi with moderate-to-rich diversity assemblages across islands of Maritime Antarctica. Some fungal taxa occurred at high densities and deserve further studies on their ability to survive in periglacial harsh environments. We detected fungal taxa represented by cosmopolitan, cold-adapted, and probably endemic taxa, which have been ecologically reported as saprobic, mutualistic, and parasitic species. In addition, in the fungal assemblages, we detected important fungal taxa represented by potential new species, particularly, those genetically close to *P. destructans*, an agent that is able to cause extinction of bats in North America and Eurasia, which has no available information on the virulence of its strains living in Antarctica provided. Finally, the Antarctic Peninsula represents the major area on Earth under the effects of global warming and climate changes. The detection of viable fungi, such as *P. destructans*, trapped in permafrost deserves further studies on the extension of fungal diversity and the capabilities of these fungi from permafrost to other habitats in and out of Antarctica.

Acknowledgements We acknowledge the financial support from CNPq PROANTAR 442258/2018-6, INCT Criosfera II, CAPES (88887.136384/2017-00 and 88887.314457/2019-00), CNPq, FAPEMIG, and FNDCT. This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior—Brasil (CAPES)—Finance Code 001.

References

- Adams BJ et al (2006) Diversity and distribution of Victoria land biota. *Soil Biol Biochem* 38:3003–3018. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2006.04.030>
- Adlam LS, Balks MR, Seybold CA, Campbell DI (2010) Temporal and spatial variation in active layer depth in the McMurdo sound region, Antarctica. *Antarct Sci* 22(1):45–52. <https://doi.org/10.1017/S0954102009990460>
- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang JH, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucl Acids Res* 25:3389–3402
- Andersen NR, Rasmussen PR (1984) The constitution of clerocidin a new antibiotic isolated from *Oidiiodendron truncatum*. *Tetrahedron Lett* 25:465–468. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(00\)99912-X](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)99912-X)
- Arenz BE, Blanchette RA (2009) Investigations of fungal diversity in wooden structures and soils at historic sites on the Antarctic Peninsula. *Can J Microbiol* 55:46–56
- Arenz BE, Held BW, Jurgens JA, Blanchette RA (2011) Fungal colonization of exotic substrates in Antarctica. *Fungal Divers* 49:13–22. <https://doi.org/10.1007/s13225-010-0079-4>
- Bakermans C, Tsapin AI, Souza-Egipsy V, Gilichinsky DA, Nealson KH (2003) Reproduction and metabolism at – 10 °C of bacteria isolated from Siberian permafrost. *Environ Microbiol* 5:321–326. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2003.00419.x>
- Bardou P, Mariette J, Escudie F et al (2014) Jvonn: an interactive Venn diagram viewer. *BMC Bioinform* 15:293. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-15-293>
- Biskaborn BK et al (2019) Permafrost is warming at a global scale. *Nat Commun* 10:264. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-08240-4>
- Bockheim JG, Hall KJ (2002) Permafrost, active-layer dynamics and periglacial environments of continental Antarctica. *S Afr J Sci* 98:82–90
- Bridge PD, Newsham KK (2009) Soil fungal community composition at Mars Oasis, a southern maritime Antarctic site, assessed by PCR amplification and cloning. *Fungal Ecol* 2:66–74. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2008.10.008>
- Buzzini P, Turk M, Perini L, Turchetti B, Gunde-Cimerman N (2017) Yeasts in polar and subpolar habitats. In: Buzzini P, Lachance MA, Yurkov A (eds) *Yeasts in natural ecosystems: diversity*. Springer, Berlin, pp 331–365 https://doi.org/10.1007/978-3-319-62683-3_11
- Castella A (1967) Maintenance and cultivation of common pathogenic fungi of man in sterile distilled water. Further researches. *J Trop Med Hyg* 70:181
- Colwell RK, Mao CX, Chang J (2004) Interpolating, extrapolating, and comparing incidence-based species accumulation curves. *Ecology* 85:2717–2727. <https://doi.org/10.1890/03-0557>
- Culmo RF, Swanson KJ, Brennan WP (1989) Application of the PE 2400 CHN and PE 2410 N for soils. Perkin-Elmer Publication EAN30, Norwalk
- da Silva TH, Silva DAS, Thomazini A, Schaefer CEGR, Rosa LH (2019) antarctic permafrost: an unexplored fungal microhabitat at the edge of life. In: Rosa LH (ed) *Fungi of Antarctica*, 1st edn. Springer, Cham, pp 147–164 https://doi.org/10.1007/978-3-030-18367-7_7
- De García V, Brizzio S, Libkind D, Buzzini P, Broock MV (2007) Biodiversity of cold-adapted yeasts from glacial meltwater rivers in Patagonia Argentina. *FEMS Microbiol Ecol* 59:331–341. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2006.00239.x>
- Del Frate G, Caretta G (1990) Fungi isolated from Antarctic material. *Polar Biol* 11:1–7. <https://doi.org/10.1007/BF00236515>
- di Menna ME (1966) Yeasts in Antarctic soils. *Antonie Van Leeuwenhoek* 32:29–38. <https://doi.org/10.1007/BF02097443>
- Ding Z, Li L, Che Q, Li D, Gu Q, Zhu T (2016) Richness and bioactivity of culturable soil fungi from the Fildes Peninsula, Antarctica. *Extremophiles* 20:425–435. <https://doi.org/10.1007/s00792-016-0833-y>
- Edgington S, Thompson E, Moore D, Hughes KA, Bridge P (2014) Investigating the insecticidal potential of *Geomyces* (Myxotrichaceae: Helotiales) and *Mortierella* (Mortierellaceae: Mortierellales) isolated from Antarctica. *Springer Plus* 3:289. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-3-289>
- EMBRAPA, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (1997) Centro Nacional de Pesquisa de Solos. Manual métodos de análise de solo, Rio de Janeiro, p 212
- French HM (2007) *The periglacial environment*, 3rd edn. John Wiley and Sons, West Sussex, p 458
- Furbino et al (2014) Diversity patterns, ecology and biological activities of fungal communities associated with the endemic macroalgae across the Antarctic Peninsula. *Microb Ecol* 67:775–787. <https://doi.org/10.1007/s00248-014-0374-9>

- Gilichinsky DA et al (2007) Microbial populations in Antarctic permafrost: biodiversity, state, age, and implication for astrobiology. *Astrobiology* 7:275–311. <https://doi.org/10.1089/ast.2006.0012>
- Glass NL, Donaldson GC (1995) Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Appl Environ Microbiol* 61:1323–1330
- Godinho VM, Furbino LE, Santiago IF, Pellizzari FM, Yokoya N, Pupo D, Alves TMA, Junior PAS, Romanha AJ, Zani CL, Cantrell C, Rosa CA, Rosa LH (2013) Diversity and bioprospecting of fungal communities associated with endemic and cold-adapted macroalgae in Antarctica. *ISME J* 7:1434–1451. <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.77>
- Godinho VM, Gonçalves VN, Santiago IF, Figueredo HM, Vitoreli GA, Schaefer CE, Barbosa EC, Oliveira JG, Alves TM, Zani CL, Junior PA, Murta SM, Romanha AJ, Kroon EG, Cantrell CL, Wedge DE, Duke SO, Ali A, Rosa CA, Rosa LH (2015) Diversity and bioprospecting of fungal community present in oligotrophic soil of continental Antarctica. *Extremophiles* 19:585–596. <https://doi.org/10.1007/s00792-015-0741-6>
- Godinho VM, de Paula MTR, Silva DAS, Paresque K, Martins AP, Colepicolo P, Rosa CA, Rosa LH (2019) Diversity and distribution of cryptic cultivable fungi associated with marine animals of Antarctica. *Fungal Biol* 123:507–516. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2019.05.001>
- Gomes ECQ, Godinho VM, Silva DAS, De Paula MTR, Vitoreli GA, Zani CL et al (2018) Cultivable fungi present in Antarctic soils: taxonomy, phylogeny, diversity, and bioprospecting of antiparasitic and herbicidal metabolites. *Extremophiles* 22:381–393. <https://doi.org/10.1007/s00792-018-1003-1>
- Gonçalves VN, Vaz AB, Rosa CA, Rosa LH (2012) Diversity and distribution of fungal communities in lakes of Antarctica. *FEMS Microbiol Ecol* 82:459–471. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2012.01424.x>
- Gonçalves VN, Carvalho CR, Johann S, Mendes G, Alves TMA, Zani CL, Junior PAS, Murta SM, Romanha AJ, Cantrell CL, Rosa CA, Rosa LH (2015) Antibacterial, antifungal and anti-protozoal activities of fungal communities present in different substrates from Antarctica. *Polar Biol* 38:1143–1152. <https://doi.org/10.1007/s00300-015-1672-5>
- Goordial J, Davila A, Lacelle D et al (2016) Nearing the cold-arid limits of microbial life in permafrost of an upper dry valley, Antarctica. *ISME J* 10:1613–1624. <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.239>
- Goordial J, Davila A, Greer CW, Cannam R, DiRuggiero J, McKay CP, Whyte LG (2017) Comparative activity and functional ecology of permafrost soils and lithic niches in a hyper-arid polar desert. *Environ Microb* 19:443–458. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13353>
- Guglielmin M, Cannone N (2012) A permafrost warming in a cooling Antarctica? *Clim Change* 111:177–195. <https://doi.org/10.1007/s10584-011-0137-2>
- Hammer Ø, Harper DAT, Ryan PD (2001) PAST—palaeontological statistics, ver. 1.89. *Palaeontol Electron* 4:1–9
- Hayes MA (2012) The *Geomyces* fungi: ecology and distribution. *Bioscience* 62:819–823. <https://doi.org/10.1525/bio.2012.62.9.7>
- Henríquez M, Vergara K, Norambuena J, Beiza A, Maza F, Ubilla P, Araya I, Chávez R, SanMartín A, Darias J, Darias MJ, Vaca I (2014) Diversity of cultivable fungi associated with Antarctic marine sponges and screening for their antimicrobial, antitumoral and antioxidant potential. *World J Microbiol Biotechnol* 30:65–76. <https://doi.org/10.1007/s11274-013-1418-x>
- Houbraken J, Frisvad JC, Seifert KA, Overby DP, Tuthill DM, Valdez JG, Samson RA (2012) New penicillin-producing *Penicillium* species and an overview of section *Chrysogena*. *Persoonia* 29:78–100. <https://doi.org/10.3767/003158512X660571>
- Jansson JK, Taş N (2014) The microbial ecology of permafrost. *Nat Rev Microbiol* 12:414–425. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3262>
- Kirk PM, Cannon PF, Minter DW, Stalpers JA (2008) *Dictionary of the Fungi*. CAB International, Wallingford
- Kochkina GA et al (2001) Survival of micromycetes and actinobacteria under conditions of long-term natural cryopreservation. *Microbiology* 70:356–364. <https://doi.org/10.1023/A:1010419831245>
- Kochkina G, Ivanushkina N, Ozerskaya S, Chigineva N, Vasilenko O, Firsov S, Gilichinsky D (2012) Ancient fungi in Antarctic permafrost environments. *FEMS Microbiol Ecol* 82:501–509. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2012.01442.x>
- Kurtzman CP, Robnett CJ (1998) Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie Van Leeuwenhoek* 73:331–371. <https://doi.org/10.1023/A:1001761008817>
- Lachance MA, Bowles JM, Starmer WT, Barker JSF (1999) *Kodamaea kakaduensis* and *Candida tolerans* two new yeast species from Australian Hibiscus flowers. *Can J Microbiol* 45:172–177
- Leushkin EV et al (2015) Comparative genome analysis of *Pseudogymnoascus* spp. reveals primarily clonal evolution with small genome fragments exchanged between lineages. *BMC Genomics* 16:400. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1570-9>
- Li L, Li D, Luan Y, Gu Q, Zhu T (2012) Cytotoxic metabolites from the antarctic psychrophilic fungus *Oidiodendron truncatum*. *J Nat Prod* 75:920–927. <https://doi.org/10.1021/np3000443>
- Loque CP, Medeiros AO, Pellizzari FM, Oliveira EC, Rosa CA, Rosa LH (2010) Fungal community associated with marine macroalgae from Antarctica. *Polar Biol* 33:641–648. <https://doi.org/10.1007/s00300-009-0740-0>
- Lorch JM, Meteyer CU, Behr JM, Boyles JG, Cryan PM, Hicks AC, Ballmann NA, Coleman JTH, Redell DN, Reeder DM, Blehert DS (2011) Experimental infection of bats with *Geomyces destructans* causes white-nose syndrome. *Nature* 480:376–378
- Lorch JM, Lindner DL, Gargas A, Muller LK, Minnis AM, Blehert DS (2013) A culture-based survey of fungi in soil from bat hibernacula in the eastern United States and its implications for detection of *Geomyces destructans*, the causal agent of bat white-nose syndrome. *Mycologia* 105:237–252. <https://doi.org/10.3852/12-207>
- Madariaga-Mazón A, González-Andrade M, González MDC, Glenn AE, Cerda-García-Rojas CM, Mata R (2013) Absolute configuration of acremoxanthone C, a potent calmodulin inhibitor from *Purpureocillium lilacinum*. *J Nat Prod* 76:1454–1460. <https://doi.org/10.1021/np4002477>
- Malkus A et al (2006) RNA polymerase II gene (RPB2) encoding the second largest protein subunit in *Phaeosphaeria nodorum* and *P. avenaria*. *Mycol Res* 110:1152–1164. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2006.07.015>
- Melo IS, Santos SN, Rosa LH, Parma MM, Silva LJ, Queiroz SC, Pellizzari VH (2014) Isolation and biological activities of an endophytic *Mortierella alpina* strain from the Antarctic moss *Schistidium antarctici*. *Extremophiles* 18:15–23. <https://doi.org/10.1007/s00792-013-0588-7>
- Minnis AM, Lindner DL (2013) Phylogenetic evaluation of *Geomyces* and allies reveals no close relatives of *Pseudogymnoascus destructans*, comb. nov., in bat hibernacula of eastern North America. *Fungal Biol* 117:638–649. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2013.07.001>
- Morrison VA (2006) Echinocandin antifungals: review and update. *Expert Rev Anti-Infect Ther* 4:325–342. <https://doi.org/10.1586/14787210.4.2.325>
- Newsham KK, Garnett MH, Robinson CH, Cox F (2018) Discrete taxa of saprotrophic fungi respire different ages of carbon from Antarctic soils. *Sci Rep* 8:7866. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25877-9>

- Nikrad MP, Kerkhof LJ, Häggblom MM (2016) The subzero microbiome: microbial activity in frozen and thawing soils. *FEMS Microbiol Ecol* 92:fw081. <https://doi.org/10.1093/femsec/fw081>
- O'Donnell K (1993) *Fusarium* and its near relatives. In: Reynolds DR, Taylor JW (eds) *The fungal holomorph: mitotic, meiotic and pleomorphic speciation in fungal systematics*. CAB International, Wallingford, pp 225–233
- Onofri S, Selbmann L, Zucconi L, Pagano S (2004) Antarctic microfungi as models for exobiology. *Planet Space Sci* 52:229–237. <https://doi.org/10.1016/j.pss.2003.08.019>
- Ozerskaya S, Kochkina G, Ivanushkina N, Gilichinsky DA (2009) Fungi in permafrost. In: Margesin R (ed) *Permafrost soils*. Springer, Berlin, pp 85–95 https://doi.org/10.1007/978-3-540-69371-0_7
- Pathan AAK, Bhadra B, Begum Z, Shivaji S (2010) Diversity of yeasts from puddles in the vicinity of Midre Lovénbreen glacier, Arctic and bioprospecting for enzymes and fatty acids. *Curr Microbiol* 60:307–314. <https://doi.org/10.1007/s00284-009-9543-3>
- Peláez F et al (2011) Phylogeny and intercontinental distribution of the pneumocandin-producing anamorphic fungus *Glarea lozoyensis*. *Mycology* 2:1–17. <https://doi.org/10.1080/21501203.2010.544334>
- Perdomo H, Cano J, Gené J, García D, Hernández M, Guarro J (2013) Polyphasic analysis of *Purpureocillium lilacinum* isolates from different origins and proposal of the new species *Purpureocillium lavenderulum*. *Mycologia* 105:151–161. <https://doi.org/10.3852/11-190>
- Ping CL, Bockheim JG, Kimble JM, Michaelson GJ, Walker DA (1998) Characteristics of cryogenic soils along a latitudinal transect in arctic Alaska. *J Geophys Res* 103:2891–2892. <https://doi.org/10.1029/98JD02024>
- Potapowicz J, Szumińska D, Szopińska M, Polkowska Ż (2019) The influence of global climate change on the environmental fate of anthropogenic pollution released from the permafrost. Part I. Case study of Antarctica. *Sci Total Environ* 651:1534–1548. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.09.168>
- Rice AV, Currah RS (2006) Two new species of *Pseudogymnoascus* with *Geomyces* anamorphs and their phylogenetic relationship with *Gymnostellatospora*. *Mycologia* 98:307–318. <https://doi.org/10.1080/15572536.2006.11832703>
- Rosa LH, Vaz AB, Caligiorne RB, Campolina S, Rosa CA (2009) Endophytic fungi associated with the Antarctic grass *Deschampsia antarctica* Desv. (Poaceae). *Polar Biol* 32:161–167. <https://doi.org/10.1007/s00300-008-0515-z>
- Rosa LH et al (2019) Fungi in Antarctica: diversity, ecology, effects of climate change, and bioprospection for bioactive compounds. In: Rosa LH (ed) *Fungi of Antarctica*. Springer, Cham, pp 1–17 https://doi.org/10.1007/978-3-030-18367-7_1
- Ruisi S, Barreca D, Selbmann L, Zucconi L, Onofri S (2007) Fungi in Antarctica. *Rev Environ Sci Bio* 6:127–141. <https://doi.org/10.1007/s11157-006-9107-y>
- Schaefer CEGR, Pereira TTC, Almeida ICC, Michel RFM, Correa GR, Figueiredo LPS, Ker JC (2016) Penguin activity modify the thermal regime of active layer in Antarctica: a case study from Hope Bay. *CATENA* 149:582–591. <https://doi.org/10.1016/j.catena.2016.07.021>
- Semenova TA, Morgado LN, Welker JM, Walker MD, Smets E, Geml J (2015) Long-term experimental warming alters community composition of ascomycetes in Alaskan moist and dry Arctic tundra. *Mol Ecol* 24:424–437. <https://doi.org/10.1111/mec.13045>
- Shuey MM, Drees KP, Lindner DL, Keim P, Foster JT (2014) Highly sensitive quantitative PCR for the detection and differentiation of *Pseudogymnoascus destructans* and other *Pseudogymnoascus* species. *Appl Environ Microbiol* 80:1726–1731. <https://doi.org/10.1128/AEM.02897-13>
- Simas FN, Schaefer CE, Michel RF, Francelino MR, Bockheim JG (2015) Soils of the South Orkney and South Shetland Islands, Antarctica. In: Bockheim JG (ed) *The soils of Antarctica*. Springer, Cham, Switzerland, pp 227–273 https://doi.org/10.1007/978-3-319-05497-1_13
- Singh P, Singh SM (2012) Characterization of yeast and filamentous fungi isolated from cryoconite holes of Svalbard, Arctic. *Polar Biol* 35:575–583. <https://doi.org/10.1007/s00300-011-1103-1>
- Steven B, Leveille R, Pollard WH, Whyte LG (2006) Microbial ecology and biodiversity in permafrost. *Extremophiles* 10:259–267. <https://doi.org/10.1007/s00792-006-0506-3>
- Suji M, Fujiu S, Xiao N, Hanada Y, Kudoh S, Kondo H, Tsuda S, Hoshino T (2013) Cold adaptation of fungi obtained from soil and lake sediment in the Skarvsnes ice-free area, Antarctica. *FEMS Microbiol Lett* 346:121–130. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12217>
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S (2013) MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 30:2725–2729. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>
- Tarnocai C, Canadell JG, Schuur EAG, Kuhry P, Mazhitova G, Zimov SA (2009) Soil organic carbon pools in the northern circumpolar permafrost region. *Glob Biogeochem* 23:GB2023. <https://doi.org/10.1029/2008GB003327>
- Thomas-Hall SR, Turchetti B, Buzzini P, Branda E, Boekhout T, Theelen B, Watson K (2010) Cold-adapted yeasts from Antarctica and the Italian Alps—description of three novel species: *Mrakia robertii* sp. nov., *Mrakia blollopis* sp. nov. and *Mrakiella niccombisii* sp. nov. *Extremophiles* 14:47–59. <https://doi.org/10.1007/s00792-009-0286-7>
- Tsuji M (2016) Cold-stress responses in the Antarctic basidiomycetous yeast *Mrakia blollopis*. *R Soc Open Sci* 3:160106. <https://doi.org/10.1098/rsos.160106>
- Tsuji M, Yokota Y, Shimohara K, Kudoh S, Hoshino T (2013) An application of wastewater treatment in a cold environment and stable lipase production of Antarctic basidiomycetous yeast *Mrakia blollopis*. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059376>
- Vaca I, Chávez R (2019) Bioactive compounds produced by Antarctic filamentous fungi. In: Rosa L (ed) *Fungi of Antarctica*. Springer, Cham, pp 265–283 https://doi.org/10.1007/978-3-030-18367-7_12
- Vieira G et al (2010) Thermal state of permafrost and active-layer monitoring in the Antarctic: advances during the international polar year 2007–2009. *Permafrost Periglac* 21:182–197. <https://doi.org/10.1002/ppp.685>
- Vorobyova E, Minkovsky N, Mamukelashvili A, Zvyagintsev D, Soina V, Polanskaya L, Gilichinsky D (2001) Micro-organisms and biomarkers in permafrost. In: Paepe R, Melnikov VP, Van Overloop E, Gorokhov VD (eds) *Permafrost response on economic development, environmental security and natural resources*. Springer, Dordrecht, pp 527–541 https://doi.org/10.1007/978-94-010-0684-2_36
- Wentzel LCP, Inforsato FJ, Montoya QV, Rossin BG, Nascimento NR, Rodrigues A, Sette LD (2019) Fungi from admiralty bay (King George Island, Antarctica) soils and marine sediments. *Microb Ecol* 77:12–24. <https://doi.org/10.1007/s00248-018-1217-x>
- White TJ, Bruns T, Lee SJWT, Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds) *PCR protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press, New York, pp 315–322
- WRB World Reference Base for Soil Resources (2014) International soil classification system for naming soils and creating legends for soil maps. FAO, Rome

- Xin MX, Zhou PJ (2007) *Mrakia psychrophila* sp. nov., a new species isolated from Antarctic soil. *J Zhejiang Univ Sci B* 8:260–265. <https://doi.org/10.1631/jzus.2007.B0260>
- Yurkov AM, Sannino C, Turchetti B (2019) *Mrakia fibulata* sp. Nov., a psychrotolerant yeast from temperate and cold habitats. *Antonie Van Leeuwenhoek*. <https://doi.org/10.1007/s10482-019-01359-4>
- Zucconi L, Selbmann L, Buzzini P, Turchetti B, Guglielmin M, Frisvad JC, Onofri S (2012) Searching for eukaryotic life preserved

in Antarctic permafrost. *Polar Biol* 35:749–757. <https://doi.org/10.1007/s00300-011-1119-6>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

5.3 Capítulo 3: Diversity and ecology of fungi present in permafrost of South Shetland Archipelago, Antarctic Peninsula.

O presente capítulo teve como objetivo a análise da diversidade fúngica de *permafrost* através de métodos independentes de cultivo e inferir suas funções ecológicas. As ilhas alvo foram Robert, Deception (em Crater Lake e Whalers Bay), Rei George (Thomas Point e Península Keller) e Livingston, todas pertencentes às ilhas Shetland do Sul – Antártica.

Através do uso de DNA metabarcoding da região ITS2 foram recuperadas um total de 1.003,637 *reads* de DNA fúngico, sendo que 319.912 foram classificadas apenas em altos níveis taxonômicos (Reino, Filo, Classe, Ordem ou Família). O uso de metabarcoding levou à detecção de representantes de 391 ASVs fúngicas compreendidas em 201 gêneros. Em ordem de classificação de abundância foram encontrados os filos *Ascomycota*, *Mortierellomycota*, *Basidiomycota*, *Chytridiomycota*, *Rozellomycota*, *Mucoromycota*, *Calcarisporiellomycota* e *Zoopagomycota*.

O uso de uma abordagem de metabarcoding revelou a presença de DNA de uma complexa assembléia de fungos no *permafrost* das Ilhas Shetland do Sul, incluindo táxons com uma gama de funções ecológicas, entre as quais vários fungos patogênicos de animais, humanos e plantas. Mais estudos são necessários para determinar se os táxons identificados estão presentes na forma de células viáveis ou propágulos e que podem ser liberados do derretimento do *permafrost* para outros habitats da Antártica e potencialmente dispersos de forma mais ampla.

**Diversity and ecology of fungi present in permafrost of South Shetland Archipelago,
Antarctic Peninsula**

(Submetido em 30/10/2020 na revista *Scientific Reports*)

5 Thamar Holanda da Silva¹, Paulo EAS Câmara², Otávio Henrique Bezerra Pinto³, Micheline
Carvalho-Silva², Fábio Soares Oliveira⁴, Peter Convey⁵, Carlos Augusto Rosa¹ and Luiz
Henrique Rosa^{1*}

¹Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil

10 ²Departamento de Botânica, Universidade de Brasília, Brasília, Brasil

³Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasília, Brasil

⁴Departamento de Geografia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

⁵British Antarctic Survey, NERC, High Cross, Madingley Road, Cambridge CB3 0ET, United
Kingdom

15

*Corresponding author

Laboratório de Microbiologia Polar e Conexões Tropicais, Departamento de Microbiologia,
Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG,
P. O. Box 486, CEP 31270-901. Tel.: +55-31-3409 2749; Fax: +55-31-3409 2730, Brazil. E-

20 mail: lhrosa@icb.ufmg.br

Abstract

We assess the fungal diversity present in permafrost from different islands in the South Shetland Islands archipelago, maritime Antarctic, using next generation sequencing (NGS).

We detected 1,003,637 fungal DNA reads representing, in rank abundance order, the phyla

5 *Ascomycota*, *Mortierellomycota*, *Basidiomycota*, *Chytridiomycota*, *Rozellomycota*,

Mucoromycota, *Calcarisporiellomycota* and *Zoopagomycota*. Ten taxa were dominant these

being, in order of abundance, *Pseudogymnoascus appendiculatus*, *Penicillium* sp.,

Pseudogymnoascus roseus, *Penicillium herquei*, *Curvularia luneta*, *Leotiomyces* sp.,

Mortierella sp. 1, *Mortierella fimbricystis*, Fungal sp. 1 and Fungal sp. 2. A further 38 taxa

10 had intermediate abundance and 345 were classified as rare. The total fungal community

detected in the permafrost showed high indices of diversity, richness and dominance, although

these varied between the sampling locations. The use of a metabarcoding approach revealed

the presence of DNA of a complex fungal assemblage in the permafrost of the South Shetland

Islands including taxa with a range of ecological functions amongst which were multiple

15 animal, human and plant pathogenic fungi. Further studies are required to determine whether

the taxa identified are present in the form of viable cells or propagules and which might be

released from melting permafrost to other Antarctica habitats and potentially dispersed more

widely.

20 **Keywords:** Antarctica; climate change; fungi; frozen soil; metabarcoding

Introduction

Faced with the threat of global climatic changes and associated impacts, biodiversity studies are a priority in Antarctica¹. The Antarctic Peninsula is a critical region of the planet experiencing the effects of warming, and was one of the three fastest warming areas globally in the latter half of the Twentieth Century²⁻⁵. Research focusing on the taxonomy, diversity and ecology of different organisms carried out in the Antarctic Peninsula region has provided important insights into the effects of different environmental drivers and of change processes on biodiversity^{6,7}. Permafrost is a key cold environment habitat impacted by the effects of climate changes. Permafrost is defined as substrate that remains continuously below 0°C for two years⁸. Permafrost is widespread in ice-free areas of the continental and maritime Antarctic, including in the South Shetland and South Orkney Islands, but not on the sub-Antarctic islands⁹. It is considered extremely sensitive to climate change. Between the years 2007 and 2016 an increase of 0.37 ± 0.10 °C was observed in the temperature of permafrost across the entire continent¹⁰. Globally, the large majority of permafrost in the polar regions is found in the Arctic, where it is recognized that permafrost thaw will release considerable reserves of stored carbon as well as the biological activation of the resident microbial community, generating a strong positive feedback further amplifying global climate change^{10,11}.

However, despite recognition of the existence and importance of microbial communities in polar permafrost, knowledge about diversity of permafrost mycobiota remains limited¹²⁻¹⁵. Margesin and Collins (2019)¹ state that improved understanding of the diversity and ecology of microbial permafrost communities is required to supply essential information on how to respond to and mitigate against the impacts of climatic changes on cold ecosystems.

The few existing studies that have addressed the fungal diversity present in Antarctic permafrost have applied both culture-dependent and culture-independent methods. Studies

using culture-dependent techniques^{12-13,15-19} documented species representing the phyla *Ascomycota*, *Basidiomycota* and *Mortierellomycota*. Culture-independent studies applying rDNA pyrosequencing analyses are limited to the three reports of¹⁷⁻¹⁹, which detected taxa of the phyla *Ascomycota* and *Basidiomycota*. With this background, the aims of the current study were to characterize the diversity of the fungal assemblages present in permafrost samples obtained from six locations in the South Shetland Islands, maritime Antarctic using a DNA metabarcoding approach and to infer potential ecological functions.

Methods

10 *Study area and sampling*

Permafrost samples were collected from the Keller Peninsula (close to Ferraz Brazilian Antarctic station) and Point Thomas (close to Henryk Arctowski Polish Antarctic station) on King George Island, Robert Island, Livingston Island, and Crater Lake and Whalers Bay on Deception Island (Figure 1). To collect the samples, approximately 10-30 cm of superficial soil was removed until the permafrost was reached. Using sterilized spatulas, duplicate samples of approximately 500 g of permafrost were collected and sealed in sterilized Whirl-Pak bags (Sigma-Aldrich, USA). These were frozen at -20 °C soon after collection, remaining frozen until processing in sterilized conditions in the laboratories of the Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.

20

Permafrost physical and chemical parameters

Chemical analyses were performed using internationally-recognized procedures as recommended by EMBRAPA (1997)²⁰ and da Silva et al. 2020¹⁵. Exchangeable aluminum

was extracted using 1M KCl and determined by titration with 0.025M NaOH. Extractable acidity ($H^{++} Al^{3+}$) was quantified with 0.5M calcium acetate adjusted to pH 7 and determined by titration with 0.06M NaOH. The phosphorus was extracted with Mehlich 1 and determined by a spectrophotometer of molecular absorption (Colorimetry). Total CHN was determined by dry combustion using a PerkinElmer 2400 Series II CHNS/O Elemental Analyzer²¹.

DNA extraction, data analyses and fungal identification

Total DNA was extracted from environmental samples using the QIAGEN DNeasy PowerLyzer PowerSoil Kit, following the manufacturer's instructions. Extracted DNA was used as template for generating PCR-amplicons. The internal transcribed spacer 2 (ITS2) of the nuclear ribosomal DNA was used as a DNA barcode for molecular species identification²²⁻²³. PCR-amplicons were generated using the universal primers ITS3 and ITS4²⁴ and were sequenced by high-throughput sequencing at Macrogen Inc. (South Korea) on an Illumina MiSeq sequencer (3x300 bp), using the MiSeq Reagent Kit v3 (600-cycle) following the manufacturer's protocol.

Raw fastq files were filtered using BBDuk version 38.34 (BBMap – Bushnell B. – sourceforge.net/projects/bbmap/) to remove Illumina adapters, known Illumina artefacts, and the PhiX Control v3 Library. Quality read filtering was carried out using Sickle version 1.33 - q 30 -l 50²⁵, to trim 3' or 5' ends with low Phred quality score. Sequences shorter than 50 bp were also discarded. The remaining sequences were imported to QIIME2 version 2019 for bioinformatics analyses²⁶. The qiime2-dada2 plugin is a complete pipeline that was used for filtering, dereplication, turn paired-end fastq files into merged, and remove chimeras²⁷. Taxonomic assignments were determined for amplicon sequence variants (ASVs) using the

qiime2-feature-classifier²⁸, classify-sklearn against the UNITE fungal ITS database version 8.2²⁹ trained with Naive Bayes classifier and a confidence threshold of 98.5%.

Many factors, including extraction, PCR and primer bias, can affect the number of reads obtained³⁰, and thus lead to misinterpretation of absolute abundance (Weber and Pawlowski, 5 2013). However, Giner et al. (2016)³¹ concluded that such biases did not affect the proportionality between reads and cell abundance, implying that more reads are linked with higher abundance³²⁻³³. Therefore, for comparative purposes we used the number of reads as a proxy for relative abundance. Fungal classification followed Kirk et al. (2011)³⁴, Tedersoo et al. (2018)³⁵, MycoBank (<http://www.mycobank.org>) and the Index Fungorum 10 (<http://www.indexfungorum.org>).

Diversity, richness, evenness, distribution and ecological analysis

The relative abundances of the amplicon sequence variants (ASVs) were used to quantify the taxa present in the permafrost samples. Fungal ASVs with relative abundance > 10% were 15 considered dominant, ASVs between 10% and 1% as intermediate and those with < 1% as minor (rare) components³⁶. To quantify species diversity, richness and dominance the indices (i) Fisher's α , (ii) Margalef's and (iii) Simpson's were used, respectively. The PCA was performed through the FactomineR package in R (Lê et al. 2008). The Mao Tao index was used to obtain species accumulation curves. Bootstrap values were calculated from 1,000 20 iterations and were obtained with 95% confidence. The program PAST (version 3.26) was used to calculate all ecological indices³⁷. Bray-Curtis dissimilarities were calculated using the mctoolsr package³⁸ in R and to plot ordinations (NMDS). A Venn diagram was prepared as described by Bardou et al. (2014)³⁹ to illustrate the comparison of fungal assemblages present in the different sampling locations. Functional assignments of the fungal ASVs were made

using FunGuild⁴⁰. For genera that are known to include species from multiple functional guilds (e.g. *Aspergillus*, *Candida*, *Mortierella*), all the guilds were included.

Results

5 *Taxonomy and diversity*

We detected 1,003,637 fungal DNA reads, belonging to 391 ASVs representing in rank order of abundance the phyla *Ascomycota*, *Mortierellomycota*, *Basidiomycota*, *Chytridiomycota*, *Rozellomycota*, *Mucoromycota*, *Calcarisporiellomycota* and *Zoopagomycota* (Figure 2). Ten taxa were classified as dominant, including in order of abundance *Pseudogymnoascus*
 10 *appendiculatus*, *Penicillium* sp., *Pseudogymnoascus roseus*, *Penicillium herquei*, *Curvularia luneta*, *Leotiomyces* sp., *Mortierella* sp. 1, *Mortierella fimbricystis*, Fungal sp. 1 and Fungal sp. 2. A further 38 taxa were classified as intermediate abundance and the remaining 345 as rare. Ninety-nine ASVs (319,912 DNA reads) could only be assigned to higher taxonomic
 15 levels (kingdom, phylum, class, order, family) and may represent taxa not currently included in the sequence databases used, or be new species and/or new records for Antarctica.

Fungal diversity and ecology

The rarefaction curves of the assemblages present at each individual sampling site and of all sites combined reached asymptote (Figure 3), indicating that the data provided a good
 20 description of the sequence diversity present. The fungal assemblages detected showed high indices of diversity (Fisher's α), richness (Margalef) and dominance (Simpson), with values varying between the sites sampled (Table 1). The highest diversity indices were obtained at Point Thomas (King George Island), followed by Robert Island, Livingston Island, Whalers

Bay and Crater Lake (Deception Island) and the Keller Peninsula (King George Island). PCA analysis based on Fisher's α (diversity index) and soil physico-chemical characteristics explained more than 92% of the data variation (Figure 4). The analysis showed that the samples grouped according to the island, and that samples were mainly grouped by the pH, K, m, P and Al^{3+} levels, indicating that they might represent the major factors that affect the resident fungal diversity. The amounts of exchangeable K and available P were very different among the islands and might be a key factor for the observed fungal composition.

Non-metric Multidimensional Scaling (NMDS) ordination based on the Bray-Curtis model (Figure 5) indicated that the assemblages detected differed between the sampling sites. Of the total of 391 fungal ASVs detected, only *Curvularia lunata*, *Torula hollandica*, *Penicillium herquei*, *Pseudogymnoascus appendiculatus*, *P. roseus*, *Microdochium lycopodium*, *Malassezia globosa*, *M. restricta*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Mrakia frigida*, *Mortierella fimbriocystis* and *M. parvispora* (12 ASVs and 3% of the total community) were present at all the sampling sites (Figure 6).

A total of 255 fungal ASVs identified at generic and specific levels received guild assignments using FunGuild. A majority were assigned as saprophytic, followed by animal and plant pathogens and symbionts (Figure 7). Representatives of a total of 13 guilds were detected (undefined saprophytes, animal pathogen, plant pathogen, wood saprophyte, endophyte, soil saprophyte, lichenized, litter saprophyte, fungal parasite, lichen parasite, ectomycorrhizal, dung saprophyte and endosymbiont).

Discussion

The diversity of fungi present in Antarctic permafrost is poorly characterized, although fungi from 32 families of *Ascomycota*, *Basidiomycota* and *Mortierellomycota* have been reported in

the culture-dependent and culture-independent studies performed to date¹⁴. Permafrost is a vulnerable habitat in the context of ongoing climate changes, which potentially lead to melting and the release and resumption of activity of contained biota^{1,12,15, 41-42}.

Two culture-based studies of permafrost in the Victoria Land Dry Valleys¹²⁻¹³ reported the presence of 26 and 15 taxa. In the maritime Antarctic, da Silva et al. (2020)¹⁵ reported 27 cultivable fungal taxa in the same permafrost samples from Robert, Livingston and Deception Islands as examined here.

The current study, which added additional sampling sites on King George and Deception Islands to those reported by da Silva et al. (2020)¹⁵, set out to improve knowledge of the fungal diversity potentially present in maritime Antarctic permafrost through using a metabarcoding approach. We detected a considerably greater fungal ASV diversity community in comparison with the cultivable diversity reported by da Silva et al. (2020)¹⁵. The use of metabarcoding led to the detection of representatives of 201 genera including 391 distinct ASVs. In addition to the phyla reported by da Silva et al. (2020)¹⁵ (*Ascomycota*, *Basidiomycota* and *Mortierellomycota*), representatives of *Chytridiomycota*, *Rozellomycota*, *Mucoromycota*, *Calcarisporiellomycota* and *Zoopagomycota* were also detected. *Pseudogymnoascus*, *Mortierella*, *Penicillium* and *Curvularia* were the most abundant genera detected, in common with the studies of Gilichinsky et al. (2007)¹², Zucconi et al. (2012)¹³ and da Silva et al. (2020)¹⁵. Metabarcoding allowed the classification other fungal taxa as dominant, intermediate or minority components of the assemblages present.

The genera *Pseudogymnoascus* (syn. *Geomyces*) and *Mortierella* are known to include psychrotolerant taxa with widespread occurrence in Arctic, alpine, temperate and Antarctic ecosystems (Rosa et al. 2019). In the maritime Antarctic, representatives of both general have been reported from terrestrial and marine environments including soils⁴³⁻⁴⁴, freshwaters and lake sediments⁴⁵⁻⁴⁶, associated with plants⁴⁷⁻⁴⁹, macroalgae⁵⁰⁻⁵¹ and marine invertebrates⁵². In

contrast to date, there have been few reports of representatives of the genus *Curvularia* in Antarctica, limited to those of Gonçalves et al. (2015)⁵³ from lake sediments, Alves et al. (2019)⁴⁴ from endolithic habitats and Rosa et al. (2020b)⁵⁴ from soils on Deception Island.

The metabarcoding approach revealed the presence of DNA of a number of further taxa that are not commonly reported in Antarctic studies. These included representatives of *Chytridiomycota* (*Powellomyces* sp., *Protrudomyces lateralis*, *Paranomyces uniporus*, *Lobulomyces angularis*, *Clydaea vesicular*), *Rozellomycota* (*Paramicrosporidium saccamoebae*), *Calcarisporiellomycota* (*Calcarisporiella* sp.) and *Zoopagomycota* (*Syncephalis* sp.). Members of the chytrid genus *Powellomyces* have been a focus of physiological studies, ultrastructural comparisons and taxonomic evaluations due their capabilities to parasite green algae⁵⁵. *Paramicrosporidium saccamoebae* is an an intranuclear parasite of amoebae and a focus of genetic studies as a model of fungal evolution and parasitism⁵⁶.

15 *Ecological profile*

Fungi perform many different ecological roles, ranging across saprophytes, mutualists, symbionts and parasites, while many taxa can display more than one trophic strategy⁵⁷. One of the most important ecological roles of Antarctic fungi is the degradation of organic matter at low temperature, releasing carbon, nitrogen and other elements to other organisms⁵⁸.

20 Saprophytes were the single most common trophic guild detected in the current study. Plant and animal pathogens represented the second largest proportion of the ASV diversity detected. This finding emphasizes the potential risk of their ‘release’ into the environment as permafrost melts under climate warming^{10,15,42}. Schütte et al. (2019)⁵⁹ reported an increase in the relative abundance of putative fungal pathogens after the permafrost thaw.

Sequences of taxa representing genera important in ecological, medical, agricultural and biotechnological processes were detected, including those of ubiquitous cosmopolitan (*Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicillium*), psychrotolerant (*Thelebolus*, *Mrakia*), decomposers (*Neobulgaria*, *Tetracladium*), opportunistic human and animal (*Aspergillus*, *Biatriospora*, *Candida*, *Cladophialophora*, *Hortaea*, *Malassezia*, *Pyrenochaeta*, *Rhodotorula*) and plant pathogens (*Alternaria*, *Chalara*, *Fusarium*, *Gibberella*, *Leptosphaeria*, *Nigrospora*, *Phaeosphaeria*), entomopathogenic (*Pochonia*, *Beauveria*), plant symbiont (*Rhizoscyphus*, *Oidiodendron*) and lichen symbiont (*Psoroma*, *Staurothele*, *Verrucaria*). Amongst the sequences of taxa detected in low quantity were the endemic fungus *Extremus antarcticus*, halotolerant species *Cladosporium halotolerans* and *C. velox*, fermentative yeasts *Candida apicola*, *Dekkera anomala*, *Hanseniaspora uvarum* and *Scheffersomyces amazonenses*, and *Tolypocladium album*, a species known to produce bioactive compounds.

Conclusions

Metabarcoding analyses revealed the presence of a diverse range of fungal DNA in permafrost samples from the South Shetland Islands. The sequences assigned represented taxa with multiple ecological roles. As metabarcoding detects environmental DNA it does not provide any confirmation of viability, and further studies will be required to isolate these fungi in culture or to confirm whether key taxa detected of, for instance, animal, human and plant pathogenic fungi are viable if released due to permafrost melting.

Acknowledgements

This study received financial support from CNPq, PROANTAR, FAPEMIG, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES), INCT Criosfera 2. P.

Convey is supported by NERC core funding to the British Antarctic Survey's 'Biodiversity, Evolution and Adaptation' Team.

Author contributions

5 THS, LHR, PEASC conceived the study. THS performed DNA extraction from permafrost. FSO analyzed the physic-chemical characteristics of the permafrost. THS, LHR, PEASC, OHBP, FSO, PC, MCS, CAR analyzed the results and wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

10 Competing interests

The authors declare no competing interests.

References

1. Margesin, R., & Collins, T. Microbial ecology of the cryosphere (glacial and permafrost
15 habitats): current knowledge. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, **103**, 2537-2549 (2019).
2. Turner, J. *et al.* Antarctic Climate Change and the Environment - An Update. *Polar Rec.* **50**, 237-259 (2014).
3. Lee, J. R. *et al.* Climate change drives expansion of Antarctic ice-free habitat. *Nature.* **547**, 49-54 (2017).
- 20 4. Fraser, C.I. *et al.* Antarctica's ecological isolation will be broken by storm-driven dispersal and warming. *Nature Clim. Change.* **8**, 704–708 (2018).

5. Potapowicz, J. *et al.* The influence of global climate change on the environmental fate of anthropogenic pollution released from the permafrost: part I. Case study of Antarctica. *Sci. Total Environ.* **651**, 1534-1548 (2019).
6. Convey, P. *et al.* The spatial structure of Antarctic biodiversity. *Ecol. Monogr.* **84**, 203-
5 244 (2014).
7. Convey, P. & Peck, L. S. Antarctic environmental change and biological responses. *Sci. Adv.* **5**, eaaz0888 (2019).
8. Harris, S.A. *The permafrost environment.* (ed. Harris, S. A.) 276 (Kent, 1986).
9. Biskaborn, B. K. *et al.* Permafrost is warming at a global scale. *Nat. Commun.* **10**, 1-11
10 (2019).
10. Xue, Y., Jonassen, I., Øvreås, L., & Taş, N. Metagenome-assembled genome distribution and key functionality highlight importance of aerobic metabolism in Svalbard permafrost. *FEMS Microbiol. Ecol.* **96**, fiae057 (2020).
11. Gilichinsky, D. A. *et al.* Microbial populations in Antarctic permafrost: biodiversity, state,
15 age, and implication for astrobiology. *Astrobiology.* **7**, 275-311 (2007).
12. Zucconi, L. *et al.* Searching for eukaryotic life preserved in Antarctic permafrost. *Polar Biol.* **35**, 749-757 (2012).
13. da Silva, T. H., Silva, D. A. S., Thomazini, A., Schaefer, C. E. G. R. & Rosa, L. H..
Antarctic Permafrost: An Unexplored Fungal Microhabitat at the Edge of Life, in: Rosa,
20 L.H. (Eds.) *Fungi of Antarctica: Diversity, Ecology and Biotechnological Applications*,
Springer, Switzerland, pp. 147-164(2019).
14. da Silva, T. H. *et al.* Diversity, distribution, and ecology of viable fungi in permafrost and active layer of Maritime Antarctica. *Extremophiles.* **24**, 565–576 (2020).
15. Kochkina, G. A. *et al.* Survival of micromycetes and actinobacteria under conditions of
25 long-term natural cryopreservation. *Microbiology.* **70**, 356-364. (2001).

16. Kochkina, G. *et al.* Ancient fungi in Antarctic permafrost environments. *FEMS Microbiol. Ecol.* **82**, 501-509 (2012).
17. Goordial, J. *et al.* Nearing the cold-arid limits of microbial life in permafrost of an upper dry valley, Antarctica. *ISME J.* **10**, 1613-1624 (2016).
- 5 18. Goordial, J. *et al.* Comparative activity and functional ecology of permafrost soils and lithic niches in a hyper-arid polar desert. *Environ. Microbiol.* **19**, 443-458 (2017).
19. EMBRAPA, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. Manual métodos de análise de solo, Rio de Janeiro, p 212, (1997).
20. Culmo R. F., Swanson K. J., Brennan W.P. Application of the PE 2400 CHN and PE 2410
10 N for soils in: *Perkin-Elmer Publication EAN30*, Norwalk (1989)
21. Chen, S. *et al.* Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species. *PloS ONE.* **5**, e8613 (2010).
22. Richardson, R. T. *et al.* Application of ITS2 metabarcoding to determine the provenance of pollen collected by honey bees in an agroecosystem. *Appl. Plant. Sci.* **3**, 1400066
15 (2015).
23. White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, in: Innis, M A.(Eds.) *PCR protocols: a guide to methods and applications.* **18**, 315-322 (1990).
24. Joshi, N. A., Fass, J. N. Sickle: A sliding-window, adaptive, quality-based trimming tool
20 for FastQ files (Version 1.33) [Software]. <https://github.com/najoshi/sickle> (2011)
25. Bolyen, E. *et al.*. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nat. Biotechnol.* **37**, 852-857 (2019).
26. Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A. Holmes SP. DADA2: high-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat. Methods.*
25 **13**, 581–583 (2016).

27. Bokulich, N. A. *et al.* Optimizing taxonomic classification of marker-gene amplicon sequences with QIIME 2's q2-feature-classifier plugin. *Microbiome*. **6**, 90 (2018).
28. Abarenkov K. *et al.* UNITE QIIME release for eukaryotes. Version 04.02.2020. UNITE Community. <https://doi.org/10.15156/BIO/786387> (2020).
- 5 29. Medinger, R. *et al.* Diversity in a hidden world: potential and limitation of next-generation sequencing for surveys of molecular diversity of eukaryotic microorganisms. *Mol Ecol*. **19**, 32-40 (2010).
30. Giner, C. R. *et al.* Environmental sequencing provides reasonable estimates of the relative abundance of specific picoeukaryotes. *Appl. Environ. Microb.* **82**, 4757-4766 (2016).
- 10 31. Deiner, K. *et al.* Environmental DNA metabarcoding: Transforming how we survey animal and plant communities. *Mol. Ecol.* **26**, 5872-5895 (2017).
32. Hering, D. *et al.* Implementation options for DNA-based identification into ecological status assessment under the European Water Framework Directive. *Water Res.* **138**, 192-205 (2018).
- 15 33. Kirk, P.M., Cannon, P.F., Minter, D.W., Stalpers, J.A. Dictionary of the Fungi, 10th ed.; CAB International: Wallingford, UK, (2011).
34. Tedersoo, L. *et al.* High-level classification of the Fungi and a tool for evolutionary ecological analyses. *Fungal Divers.* **90**, 135-159 (2018).
35. Rosa, L. H. *et al.* DNA metabarcoding to assess the diversity of airborne fungi present in
20 air over Keller Peninsula, King George Island, Antarctica. *Microb. Ecol. In press*, 2020.
36. Hammer, Ø, Harper, D. A. T, Ryan, P. D. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Paleontol Electron.* **4**, 1-9 (2001).
37. Leff, J. W. mctoolsr: microbial community data analysis tools.
<http://github.com/leffj/mctoolsr> (2016).

38. Bardou, P., Mariette, J., Escudié, F., Djemiel, C. & Klopp, C. Jvonn: an interactive Venn diagram viewer. *BMC bioinformatics*. **15**, 1-7 (2014).
39. Nguyen, N. H. *et al.* FUNGuild: an open annotation tool for parsing fungal community datasets by ecological guild. *Fungal Ecol.* **20**, 241-248 (2016).
- 5 40. Guglielmin, M., Fratte, M. D., Nicoletta Cannone, N. Permafrost warming and vegetation changes in continental Antarctica. *Environ. Res. Lett.* **9**, 045001 (2014).
41. Lulakova, P., Perez Mon, C., Šantrůčková, H., Růthi, J. & Frey, B. W. High-Alpine Permafrost and Active-Layer Soil Microbiomes Differ in Their Response to Elevated Temperatures. *Front Microbiol.* **10**, 668 (2019).
- 10 42. Gomes, E. C. *et al.* Cultivable fungi present in Antarctic soils: taxonomy, phylogeny, diversity, and bioprospecting of antiparasitic and herbicidal metabolites. *Extremophiles*. **22**, 381-393 (2018).
43. Alves, I. M., Gonçalves, V. N., Oliveira, F. S., Schaefer, C. E., Rosa, C. A. & Rosa, L. H. The diversity, distribution, and pathogenic potential of cultivable fungi present in rocks
15 from the South Shetlands archipelago, Maritime Antarctica. *Extremophiles*. **23**, 327-336 (2019).
44. Gonçalves, V. N., Vaz, A. B., Rosa, C. A., Rosa, L. H. Diversity and distribution of fungal communities in lakes of Antarctica. *FEMS Microbiol Ecol.* **82**:459-471(2012).
45. Ogaki, M. B. *et al.* Diversity and bioprospecting of cultivable fungal assemblages in
20 sediments of lakes in the Antarctic Peninsula. *Fungal Biol.* **124**, 601-611 (2020).
46. Rosa, L. H., Vaz, A. B., Caligiorne, R. B., Campolina, S., & Rosa, C. A.. Endophytic fungi associated with the Antarctic grass *Deschampsia antarctica* Desv.(Poaceae). *Polar Biol.* **32**, 161-167 (2009).

47. Rosa, L. H., Almeida Vieira, M. D. L., Santiago, I. F. & Rosa, C. A. Endophytic fungi community associated with the dicotyledonous plant *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl.(Caryophyllaceae) in Antarctica. *FEMS Microbiol. Ecol.* **73**, 178-189 (2010).
48. Rosa, L. H. *et al.* Opportunistic fungal assemblages present on fairy rings spread on
5 different moss species in the Antarctic Peninsula. *Polar Biol.* **43**, 587-596, 2020.
49. Godinho, V. M. *et al.* Diversity and bioprospecting of fungal communities associated with endemic and cold-adapted macroalgae in Antarctica. *ISME J.* **7**, 1434-1451 (2013).
50. Furbino, L. E. *et al.* Diversity patterns, ecology and biological activities of fungal communities associated with the endemic macroalgae across the Antarctic Peninsula.
10 *Microb. Ecol.* **67**, 775-787 (2014).
51. Godinho, V. M. *et al.* Diversity and distribution of cryptic cultivable fungi associated with marine animals of Antarctica. *Fungal Biol.* **123**, 507-516 (2019).
52. Gonçalves, V. N. *et al.* Antibacterial, antifungal and antiprotozoal activities of fungal communities present in different substrates from Antarctica. *Polar Biol.* **38**, 1143-1152
15 (2015).
53. Rosa, L.H. *et al.* DNA metabarcoding high-throughput sequencing uncovers cryptic fungal diversity in soils of protected and non-protected areas on Deception Island, Antarctica. *Scientific Rep.* In press, 2020.
54. Longcore, J. E., Barr, D. J. & Desaulniers, N. *Powellomyces*, a new genus in the
20 *Spizellomycetales*. *Can. J. Botany.* **73**, 1385-1390 (1995).
55. Quandt, C. A. *et al.* The genome of an intranuclear parasite, *Paramicrosporidium saccamoebae*, reveals alternative adaptations to obligate intracellular parasitism. *Elife.* **6**, e29594 (2017).
56. Nilsson, R. H. *et al.* Mycobiome diversity: high-throughput sequencing and identification
25 of fungi. *Nat. Rev. Microbiol.* **17**, 95-109 (2019).

57. Rosa, L.H. *et al.* Fungi in Antarctica: Diversity, Ecology, Effects of Climate Change, and Bioprospection for Bioactive Compounds, in: Rosa, L.H. (Eds.), *Fungi of Antarctica: Diversity, Ecology and Biotechnological Applications*, Springer, Switzerland, pp. 1-18, (2019).
- 5 58. Schütte, U. M. E. *et al.* Effect of permafrost thaw on plant and soil fungal community in a boreal forest: does fungal community change mediate plant productivity response? *J. Ecol.* **107**, 1737–1752 (2019).

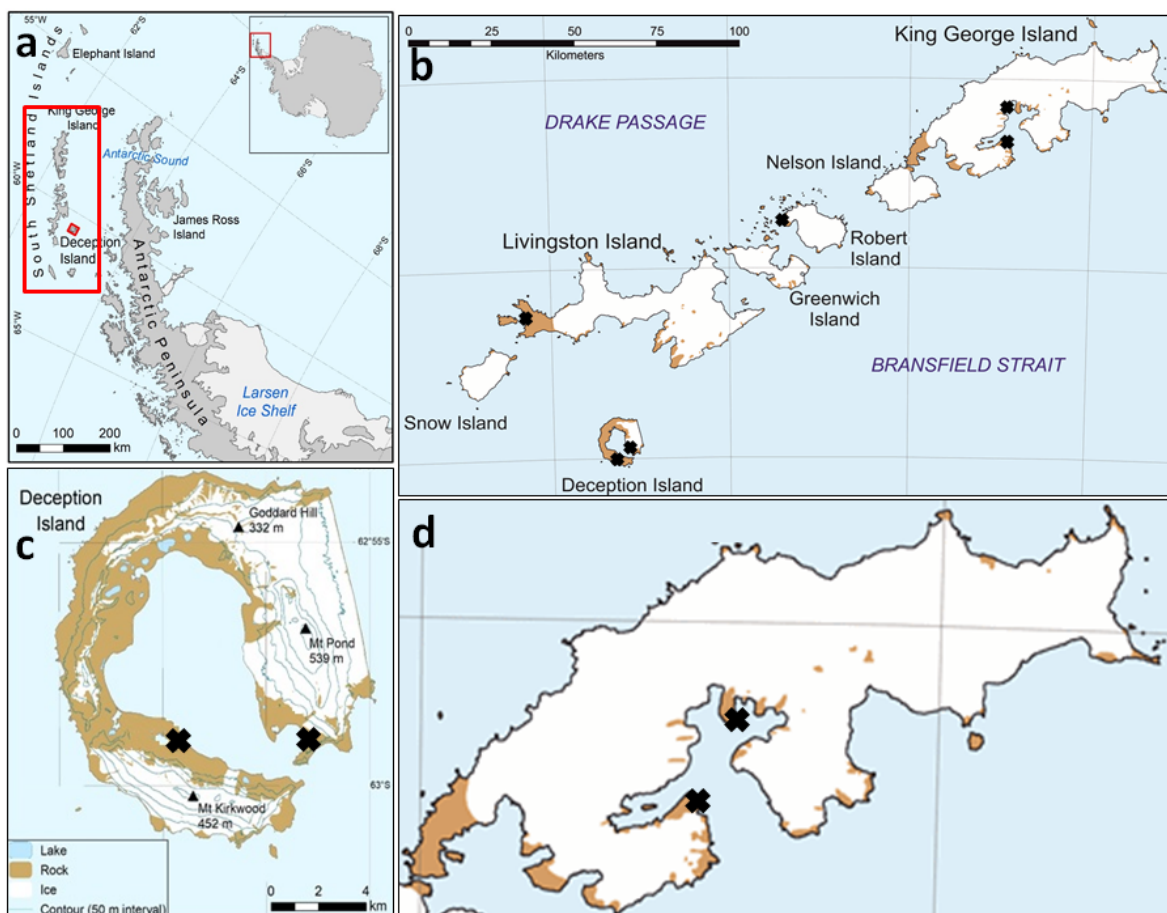


Figure 1. Maps of **a)** South Shetland Islands, maritime Antarctic, indicating sites where samples were obtained. **b)** Deception, Livingston, Robert and King George Islands. Black crosses indicate the sampling locations. **c)** Deception Island with Whalers Bay sampling location on the right and Crater Lake on the left. **d)** King George Island, with the Keller Peninsula on the right and Point Thomas on the left.

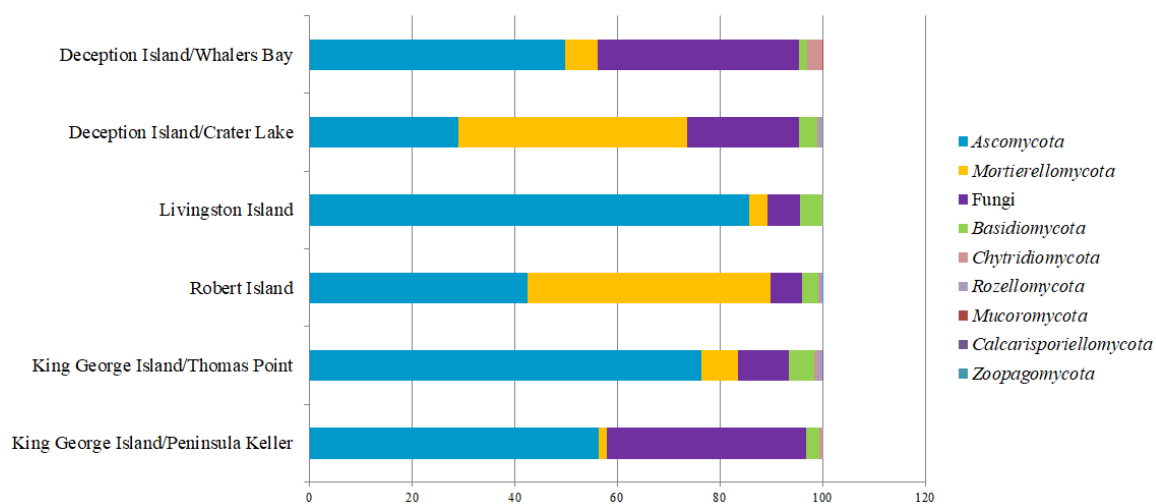


Figure 2. Relative abundance of fungal amplicon sequence variants (ASVs) at phylum level present in the permafrost sampled in different islands of the South Shetland Island archipelago, maritime Antarctic.

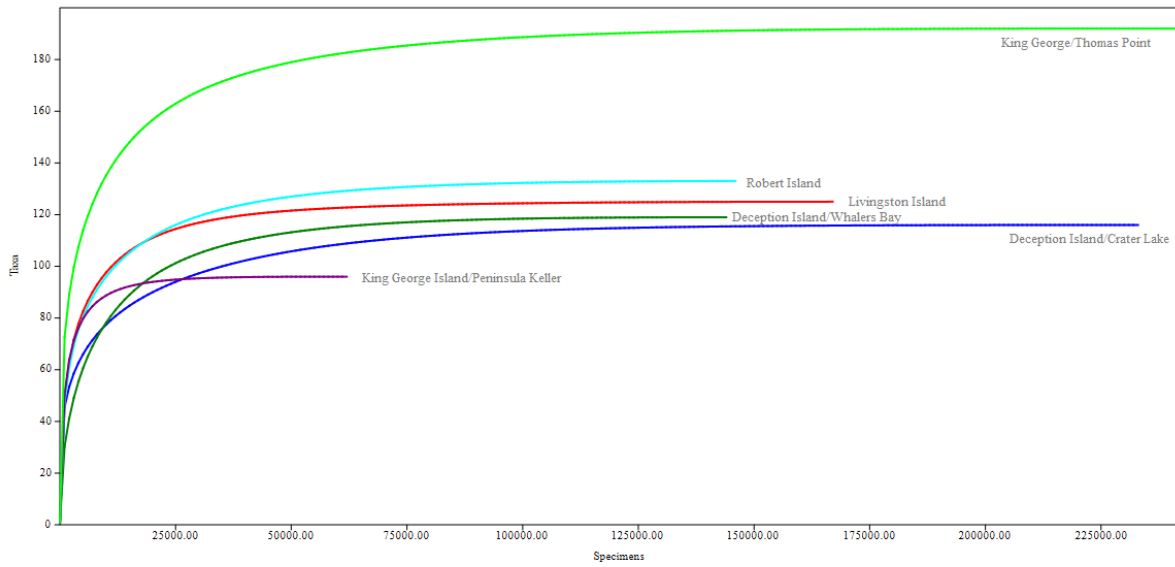


Figure 3. Fungal sequence assemblage rarefaction curves for the different permafrost samples.

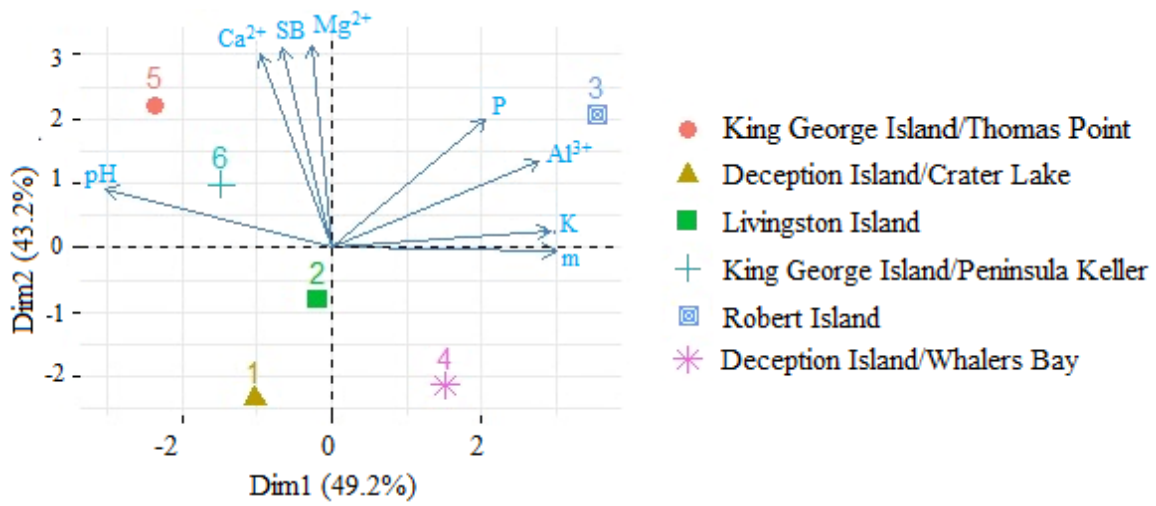


Figure 4. Principal coordinates analysis plots with the differences of the fungal community composition among the permafrost sampled in different islands of Antarctic Peninsula.

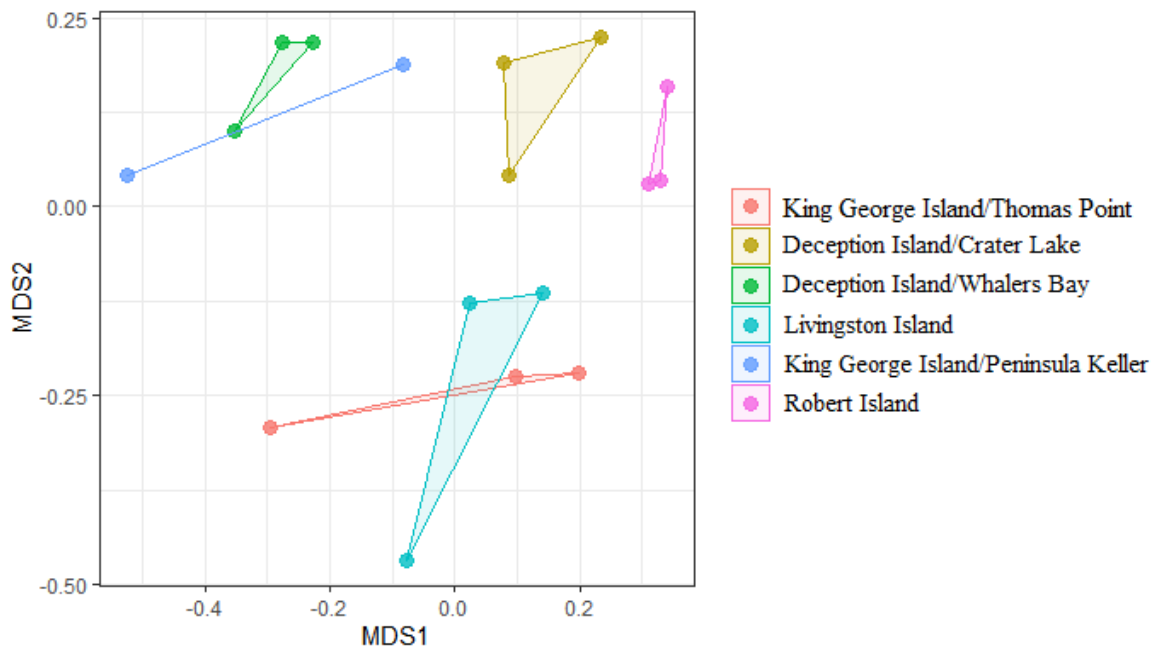


Figure 5. Non-metric Multidimensional Scaling (NMDS) ordination based on Bray-Curtis distance showing differences in fungal sequence assemblage composition between the six sampling sites.

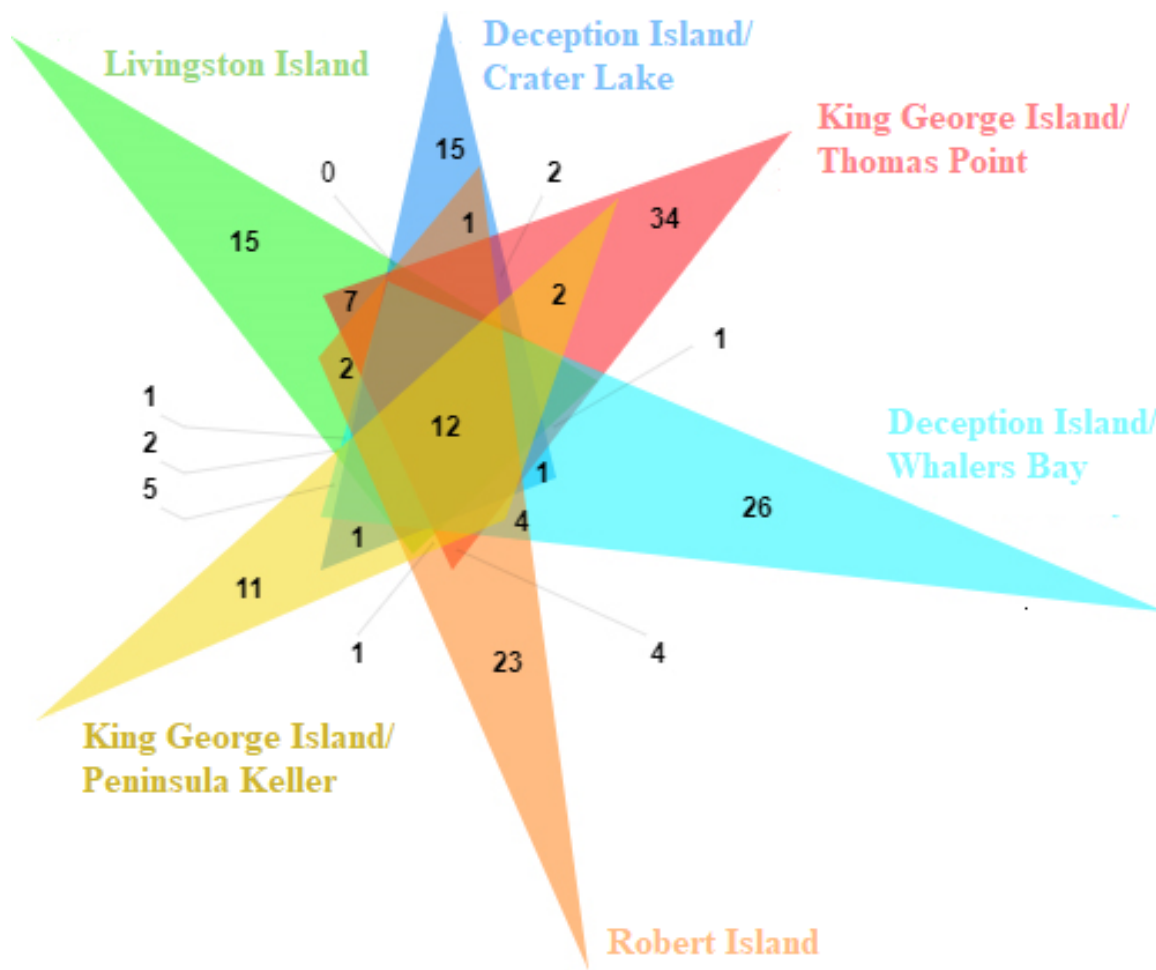


Figure 6. Venn diagram showing similarity across the fungal sequence assemblages obtained from the six permafrost sampling sites in the South Shetland Islands, maritime Antarctic.

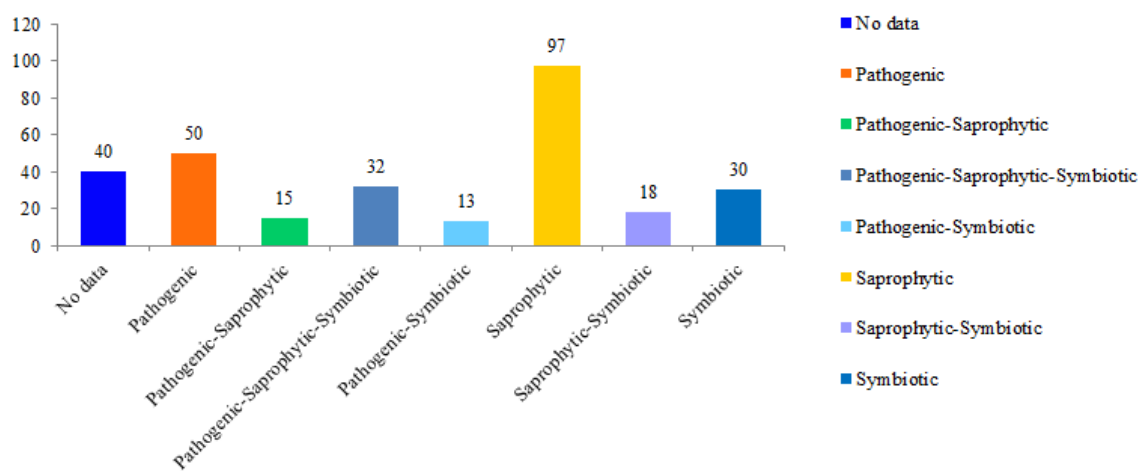


Figure 7. Trophic modes of fungal amplicon sequence variants detected in permafrost samples from the South Shetland Islands, maritime Antarctic.

Table 1. Numbers of amplicon sequence variants, ecological diversity indices and physico-chemical parameters of the fungal sequence assemblages and permafrost soils at the different sampling locations in the South Shetland Islands, maritime Antarctic.

Diversity indexes/permafrost physico-chemical characteristics	King George Island				Deception Island		Total
	Peninsula Keller	Thomas Point	Robert Island	Livingston Island	Crater Lake	Whalers Bay	
Number of ASVs	95	191	132	124	115	118	391
Number of DNA reads	63,255	243,924	147,873	168,660	234,175	145,750	1,003,637
Fisher α	11	20.34	14.3	13	11.6	12.6	38.5
Margalef	8.5	15.32	11	10.22	9.2	9.8	28.22
Simpson	0.8	0.9	0.7	0.8	0.81	0.8	0.9
pH (mg/dm ³)	6.6	7.4	5.17	6	6.3	5.4	-
Phosphorus (P) (mg/dm ³)	137.6	50.6	239.2	26.2	20.6	62.9	-
K (Potassium) (mg/dm ³)	66	102	228	161	95	170	-
Ca ²⁺ (cmol _c dm ³)	9.33	15.38	9.14	4.53	1.27	1.29	-
Mg ²⁺ (cmol _c dm ³)	6.74	8.49	7.59	4.52	0.62	0.87	-
Al ³⁺ (cmol _c dm ³)	0	0	4.39	0.39	0	0.6	-
SB (sum of bases) (cmol _c dm ³)	16.24	24.13	17.31	9.46	2.13	2.59	-

m (aluminum saturation) (%)	0	0	20.2	4	0	18.8	-
-----------------------------	---	---	------	---	---	------	---

ASVs = amplicon sequence variants. - =no data.

Supplementary Table 1. Relative abundance of fungal amplicon sequence variants (ASVs) present in permafrost sampled in South Shetland Islands, maritime Antarctic

Phylum	Fungal ASV (taxa)	King George Island		Robert Island	Livingston Island	Deception Island	
		Keller Peninsula	Thomas Point			Crater Lake	Whalers Bay
<i>Ascomycota</i>	<i>Pseudogymnoascus appendiculatus</i>	0.130	12.427	32.155	34.259	1.514	0.021
	<i>Penicillium</i> sp.	16.859	17.930	0.452	6.846	2.941	6.955
	<i>Pseudogymnoascus roseus</i>	1.481	21.778	0.746	2.022	1.033	6.360
	<i>Penicillium herquei</i>	15.208	0.003	0.987	0.007	0.003	15.442
	<i>Curvularia lunata</i>	0.071	0.508	0.003	27.963	0.163	0.003
	<i>Leotiomyces</i> sp.	0.092	0.105	0.201	0.863	0.019	11.334
	<i>Microdochium lycopodium</i>	3.971	0.010	0.102	0.033	0.022	5.316
	<i>Didymosphaeriaceae</i> sp.	0.000	5.026	0.009	3.971	0.393	0.004
	<i>Chaetothyriales</i> sp. 1	0.000	0.032	0.024	0.007	7.478	0.000
	<i>Cladosporium</i> sp.	2.817	0.694	0.053	1.616	0.275	1.278
	<i>Helotiales</i> sp.2	0.756	3.716	0.049	0.012	0.416	0.000
	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	2.030	0.339	0.000	0.000	0.053	1.839
	<i>Arthoniomycetes</i> sp.	3.785	0.007	0.015	0.000	0.018	0.060
	<i>Pseudeurotium hygrophilum</i>	3.728	0.000	0.000	0.000	0.000	0.012

<i>Chaetothyriales</i> sp. 2	0.027	0.364	0.006	0.012	2.938	0.000
<i>Ascomycota</i> sp. 1	0.688	1.140	0.151	0.113	0.871	0.004
<i>Herpotrichiellaceae</i> sp. 1	0.000	0.000	0.128	0.000	2.771	0.000
<i>Helotiales</i> sp. 1	0.022	0.271	2.015	0.010	0.001	0.000
<i>Phaeosphaeria</i> sp.	0.000	0.180	0.000	1.938	0.064	0.000
<i>Rhizoscyphus</i> sp.	0.000	0.050	1.570	0.008	0.477	0.000
<i>Thelebolus globosus</i>	0.022	0.995	0.000	0.762	0.140	0.050
<i>Verrucaria</i> sp.	0.000	1.201	0.037	0.109	0.505	0.000
<i>Psoroma tenue</i>	0.000	0.006	0.000	0.000	1.776	0.000
<i>Cosmospora</i> sp.	1.300	0.000	0.083	0.000	0.000	0.362
<i>Aspergillus</i> sp.	0.030	0.136	0.003	1.188	0.146	0.005
<i>Tetracladiums</i> sp. 2	0.000	0.768	0.000	0.588	0.036	0.000
<i>Verrucariaceae</i> sp.	0.000	1.194	0.000	0.132	0.000	0.000
<i>Oidiodendron truncatum</i>	0.000	0.006	1.148	0.000	0.012	0.062
<i>Lecanorales</i> sp.	0.163	0.023	0.056	0.000	0.883	0.003
<i>Verrucaria nodosa</i>	0.000	0.000	0.000	0.000	1.119	0.000
<i>Leptosphaeria</i> sp.	0.000	1.029	0.000	0.000	0.000	0.000
<i>Leotiomyces</i> sp.	0.212	0.009	0.680	0.021	0.000	0.000
<i>Pleosporales</i> sp.	0.000	0.858	0.000	0.000	0.000	0.000
<i>Chalara pseudoaffinis</i>	0.000	0.022	0.413	0.144	0.275	0.000

<i>Torula hollandica</i>	0.447	0.089	0.016	0.203	0.013	0.010
<i>Verrucariales</i> sp.	0.000	0.000	0.000	0.000	0.752	0.000
<i>Lecidea cancriformis</i>	0.409	0.000	0.014	0.001	0.265	0.000
<i>Verrucaria alpicola</i>	0.006	0.108	0.000	0.076	0.489	0.000
<i>Diaporthales</i> sp.	0.000	0.427	0.000	0.245	0.003	0.000
<i>Neobulgaria</i> sp.	0.000	0.562	0.000	0.000	0.000	0.000
<i>Cladophialophora humicola</i>	0.000	0.054	0.124	0.086	0.242	0.000
<i>Hyphodiscus</i> sp.	0.000	0.351	0.000	0.138	0.015	0.000
<i>Pseudopithomyces</i> sp.	0.000	0.011	0.000	0.478	0.012	0.000
<i>Tetracladium marchalianum</i>	0.014	0.432	0.007	0.000	0.000	0.013
<i>Staurothele areolata</i>	0.000	0.417	0.000	0.000	0.000	0.000
<i>Herpotrichia juniperi</i>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.399	0.000
<i>Bipolaris</i> sp.	0.000	0.025	0.000	0.351	0.003	0.004
<i>Crocicreas</i> sp.	0.017	0.000	0.297	0.050	0.018	0.000
<i>Didymellaceae</i> sp.	0.084	0.032	0.000	0.206	0.029	0.000
<i>Hypocreales</i> sp. 2	0.000	0.308	0.000	0.005	0.003	0.018
<i>Xylariales</i> sp. 2	0.272	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
<i>Pleosporaceae</i> sp.	0.000	0.230	0.000	0.000	0.000	0.000
<i>Trichoderma</i> sp.	0.206	0.003	0.000	0.000	0.000	0.012
<i>Onygenales</i> sp. 1	0.000	0.216	0.000	0.000	0.000	0.000

<i>Verrucaria margacea</i>	0.000	0.044	0.000	0.167	0.000	0.000
<i>Aspergillus alabamensis</i>	0.147	0.000	0.001	0.000	0.000	0.056
<i>Xylaria apiculata</i>	0.000	0.039	0.000	0.154	0.010	0.000
<i>Saccharomyces</i> sp.	0.117	0.000	0.008	0.012	0.003	0.061
<i>Ascomycota</i> sp. 2	0.000	0.179	0.000	0.000	0.003	0.000
<i>Leptosphaeria sclerotioides</i>	0.000	0.171	0.007	0.000	0.000	0.000
<i>Periconia byssoides</i>	0.000	0.012	0.000	0.142	0.017	0.000
<i>Lecanora chlorophaeodes</i>	0.000	0.169	0.000	0.000	0.000	0.000
<i>Pseudeurotiaceae</i> sp. 1	0.000	0.051	0.000	0.000	0.000	0.110
<i>Aspergillus flavus</i>	0.139	0.000	0.001	0.000	0.000	0.016
<i>Candida</i> sp.	0.000	0.143	0.000	0.000	0.005	0.000
<i>Candida etchellsii</i>	0.145	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
<i>Scheffersomyces amazonensis</i>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.144	0.000
<i>Porpidia</i> sp.	0.000	0.140	0.000	0.000	0.000	0.000
<i>Debaryomyces</i> sp.	0.022	0.010	0.000	0.051	0.003	0.052
<i>Ophiosphaerella</i> sp.	0.000	0.136	0.000	0.000	0.000	0.000
<i>Helotiaceae</i> sp.	0.000	0.019	0.114	0.000	0.000	0.000
<i>Teloschistaceae</i> sp. 2	0.000	0.132	0.000	0.000	0.000	0.000
<i>Cladosporium halotolerans</i>	0.112	0.000	0.000	0.005	0.007	0.005
<i>Colletotrichum</i> sp.	0.000	0.015	0.000	0.055	0.043	0.001

<i>Lecanicillium</i> sp.	0.000	0.000	0.107	0.000	0.004	0.000
<i>Diatrypaceae</i> sp. 1	0.101	0.000	0.000	0.005	0.000	0.000
<i>Articulospora</i> sp.	0.000	0.014	0.000	0.085	0.000	0.000
<i>Sugiyamaella americana</i>	0.035	0.019	0.000	0.031	0.000	0.012
<i>Nectriaceae</i> sp. 1	0.016	0.002	0.000	0.065	0.002	0.012
<i>Psoroma</i> sp.	0.000	0.000	0.000	0.090	0.000	0.000
<i>Lecanoromycetes</i> sp. 1	0.000	0.082	0.000	0.007	0.000	0.000
<i>Trimmatothelopsis smaragdula</i>	0.000	0.001	0.085	0.000	0.002	0.000
<i>Helotiales</i> sp.	0.000	0.086	0.000	0.000	0.000	0.000
<i>Pseudeurotium</i> sp. 2	0.000	0.084	0.000	0.000	0.000	0.000
<i>Onygenales</i> sp. 2	0.084	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
<i>Xylariaceae</i> sp.	0.084	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
<i>Herpotrichiellaceae</i> sp. 2	0.000	0.007	0.066	0.000	0.000	0.000
<i>Fusarium</i> sp.	0.000	0.000	0.000	0.014	0.059	0.000
<i>Geomyces</i> sp.	0.000	0.070	0.000	0.000	0.000	0.000
<i>Nigrospora oryzae</i>	0.068	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
<i>Catenulifera</i> sp.	0.000	0.000	0.065	0.000	0.000	0.000
<i>Curvularia</i> sp.	0.051	0.000	0.000	0.012	0.000	0.000
<i>Teloschistaceae</i> sp. 1	0.000	0.061	0.000	0.000	0.000	0.000
<i>Chalara</i> sp.	0.000	0.000	0.057	0.000	0.000	0.000

<i>Aspergillus gracilis</i>	0.000	0.005	0.000	0.024	0.000	0.000
<i>Xenopolyscytalum pinea</i>	0.000	0.000	0.007	0.020	0.000	0.000
<i>Mycosphaerellaceae</i> sp.	0.027	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
<i>Polysporina subfuscescens</i>	0.000	0.001	0.024	0.000	0.000	0.000
<i>Rhizoplaca</i> sp.	0.025	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
<i>Dothideomycetes</i> sp.	0.000	0.000	0.000	0.025	0.000	0.000
<i>Uwebraunia</i> sp.	0.024	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	0.000	0.010	0.000	0.014	0.000	0.000
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.023
<i>Hypocreales</i> sp. 1	0.000	0.000	0.005	0.016	0.001	0.000
<i>Phaeomoniellales</i> sp.	0.000	0.000	0.000	0.022	0.000	0.000
<i>Parmeliaceae</i> sp.	0.000	0.022	0.000	0.000	0.000	0.000
<i>Bryoglossum gracile</i>	0.000	0.000	0.022	0.000	0.000	0.000
<i>Candida apicola</i>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.021
<i>Humicola grisea</i>	0.000	0.021	0.000	0.000	0.000	0.000
<i>Paraconiothyrium</i> sp.	0.000	0.000	0.008	0.007	0.000	0.005
<i>Hortaea werneckii</i>	0.017	0.000	0.000	0.003	0.000	0.000
<i>Chrysosporium vallenarensense</i>	0.000	0.000	0.000	0.020	0.000	0.000
<i>Microscypha</i> sp.	0.000	0.000	0.020	0.000	0.000	0.000
<i>Pseudeurotium</i> sp. 1	0.000	0.016	0.003	0.000	0.000	0.000

<i>Cladophialophora</i> sp. 1	0.000	0.019	0.000	0.000	0.000	0.000
<i>Biatriospora mackinnonii</i>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.018	0.000
<i>Xylaria hypoxylon</i>	0.016	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002
<i>Cadophora melinii</i>	0.000	0.016	0.000	0.000	0.000	0.000
<i>Dothiorella</i> sp.	0.000	0.000	0.016	0.000	0.000	0.000
<i>Penicillium citrinum</i>	0.011	0.000	0.000	0.000	0.000	0.005
<i>Pochonia bulbilosa</i>	0.000	0.016	0.000	0.000	0.000	0.000
<i>Saccharomycetales</i> sp.	0.000	0.002	0.000	0.011	0.001	0.000
<i>Ophiocordycipitaceae</i> sp.	0.000	0.008	0.003	0.000	0.003	0.000
<i>Capnodiales</i> sp.	0.000	0.008	0.000	0.005	0.000	0.000
<i>Buellia russa</i>	0.000	0.009	0.004	0.000	0.000	0.000
<i>Oidiodendron</i> sp.	0.000	0.012	0.000	0.000	0.000	0.000
<i>Tolypocladium</i> sp.	0.000	0.005	0.007	0.000	0.000	0.000
<i>Microdochium</i> sp.	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.012
<i>Musicillium theobromae</i>	0.000	0.000	0.003	0.000	0.000	0.009
<i>Fusarium oxysporum</i>	0.000	0.000	0.011	0.000	0.000	0.000
Nectriaceae sp. 2	0.000	0.000	0.000	0.000	0.003	0.009
<i>Sugiyamaella</i> sp.	0.000	0.005	0.000	0.007	0.000	0.000
<i>Candida inconspicua</i>	0.000	0.000	0.000	0.011	0.000	0.000
<i>Rhinocladiella</i> sp. 1	0.000	0.007	0.000	0.004	0.000	0.000

<i>Lecanora</i> sp.	0.000	0.011	0.000	0.000	0.000	0.000
<i>Issatchenkia</i> sp.	0.011	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
<i>Beauveria amorphia</i>	0.000	0.005	0.000	0.007	0.000	0.000
<i>Setophaeosphaeria badalingensis</i>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.011
<i>Xylariales</i> sp. 1	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.011
<i>Paraphoma fimeti</i>	0.000	0.011	0.000	0.000	0.000	0.000
<i>Oleoguttula mirabilis</i>	0.000	0.000	0.010	0.000	0.000	0.000
<i>Periconia</i> sp.	0.000	0.000	0.000	0.010	0.000	0.000
<i>Aspicilia virginea</i>	0.000	0.010	0.000	0.000	0.000	0.000
<i>Alternaria</i> sp.	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.010
<i>Candida bokatorum</i>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.010
<i>Sclerotiniaceae</i> sp.	0.009	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
<i>Microdochium tainanense</i>	0.009	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
<i>Rachicladosporium</i> sp.	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.009
<i>Ainoa mooreana</i>	0.000	0.000	0.000	0.009	0.000	0.000
<i>Talaromyces</i> sp.	0.000	0.000	0.000	0.002	0.000	0.007
<i>Candida palmioleophila</i>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.008
<i>Gibberella tricincta</i>	0.000	0.008	0.000	0.000	0.000	0.000
<i>Zygothiala cryptogama</i>	0.006	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001
<i>Cladosporium velox</i>	0.000	0.000	0.007	0.000	0.000	0.000

<i>Letendraea helminthicola</i>	0.000	0.000	0.000	0.007	0.000	0.000
<i>Tetracladiums</i> sp. 1	0.000	0.007	0.000	0.000	0.000	0.000
<i>Coniochaeta</i> sp.	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.007
<i>Extremus antarcticus</i>	0.000	0.007	0.000	0.000	0.000	0.000
<i>Pseudoteratosphaeria ohnowa</i>	0.000	0.000	0.000	0.007	0.000	0.000
<i>Aspicilia simoensis</i>	0.000	0.000	0.000	0.007	0.000	0.000
<i>Strelitziana</i> sp.	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.006
<i>Talaromyces sayulitensis</i>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.006
Caliciaceae sp.	0.000	0.000	0.006	0.000	0.000	0.000
<i>Cheilymenia</i> sp.	0.000	0.000	0.006	0.000	0.000	0.000
<i>Sordariomycetes</i> sp.	0.000	0.002	0.004	0.000	0.000	0.000
<i>Mycosphaerella etlingerae</i>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.005
<i>Gyoerffyella entomobryoides</i>	0.000	0.000	0.005	0.000	0.000	0.000
<i>Dactylellina arcuata</i>	0.000	0.000	0.005	0.000	0.000	0.000
<i>Placopsis contortuplicata</i>	0.000	0.000	0.000	0.005	0.000	0.000
<i>Thozetella cristata</i>	0.000	0.000	0.000	0.005	0.000	0.000
<i>Cadophora luteo-olivacea</i>	0.000	0.005	0.000	0.000	0.000	0.000
<i>Alternaria alternata</i>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.005
<i>Sugiyamaella paludigena</i>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.005
<i>Periconia pseudodigitata</i>	0.005	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

<i>Pezoloma ericae</i>	0.000	0.000	0.005	0.000	0.000	0.000
<i>Dekkera anomala</i>	0.000	0.000	0.005	0.000	0.000	0.000
<i>Aspergillus westerdijkiae</i>	0.000	0.005	0.000	0.000	0.000	0.000
<i>Tolypocladium album</i>	0.000	0.000	0.000	0.004	0.000	0.000
<i>Annulohypoxylon stygium</i>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.004
<i>Scleroconidioma sphagnicola</i>	0.000	0.004	0.000	0.000	0.000	0.000
<i>Saccharomycetales</i> sp.	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.003
<i>Blastobotrys parvus</i>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.003
<i>Myxotrichaceae</i> sp.	0.000	0.003	0.000	0.000	0.000	0.000
<i>Debaryomyces hansenii</i>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.003	0.000
<i>Candida parapsilosis</i>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.003	0.000
<i>Pseudeurotiaceae</i> sp. 2	0.000	0.000	0.000	0.003	0.000	0.000
<i>Trichobotrys effusa</i>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.003
<i>Candida atmosphaerica</i>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.003
<i>Starmerella meliponinorum</i>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.003
<i>Lecanoromycetes</i> sp. 2	0.000	0.000	0.003	0.000	0.000	0.000
<i>Candida quercitrusa</i>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.003	0.000
<i>Saccharomycopsis crataegensis</i>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.003	0.000
<i>Phylliscum demangeonii</i>	0.000	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000
<i>Candida albicans</i>	0.000	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000

<i>Wallrothiella subiculosa</i>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002
<i>Acremonium</i> sp. 1	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002
<i>Mycosphaerella nawae</i>	0.000	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000
<i>Aureobasidium pullulans</i>	0.000	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000
<i>Byssochlamys spectabilis</i>	0.000	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000
<i>Talaromyces atroroseus</i>	0.000	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000
<i>Candelariaceae</i> sp.	0.000	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000
<i>Megasporaceae</i> sp.	0.000	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000
<i>Chalara piceae-abietis</i>	0.000	0.000	0.002	0.000	0.000	0.000
<i>Sporothrix</i> sp.	0.000	0.000	0.000	0.002	0.000	0.000
<i>Debaryomycetaceae</i> sp.	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002	0.000
<i>Candida zeylanoides</i>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002	0.000
<i>Glomerellaceae</i> sp.	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002	0.000
<i>Venturia</i> sp.	0.000	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000
<i>Knufia peltigerae</i>	0.000	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000
<i>Chaetomiaceae</i> sp.	0.000	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000
<i>Diatrypaceae</i> sp. 2	0.000	0.000	0.001	0.000	0.000	0.000
<i>Arthoniales</i> sp.	0.000	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000
<i>Schwanniomyces</i> sp.	0.000	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000
<i>Leptogium</i> sp.	0.000	0.000	0.000	0.001	0.000	0.000

<i>Basidiomycota</i>	<i>Malassezia restricta</i>	0.321	2.124	0.014	0.361	0.313	0.090
	<i>Agaricomycetes</i> sp.	0.190	0.004	0.076	0.056	1.955	0.041
	<i>Microbotryomycetes</i> sp.	0.000	0.151	0.440	0.778	0.040	0.057
	<i>Goffeauzyma</i> sp.	0.000	0.086	0.000	1.191	0.027	0.000
	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	0.264	0.472	0.009	0.100	0.168	0.086
	<i>Microbotryomycetes</i> sp.	0.321	0.165	0.504	0.075	0.005	0.003
	<i>Leucosporidiaceae</i> sp.	0.000	0.342	0.004	0.598	0.003	0.000
	<i>Basidiomycota</i> sp.	0.043	0.005	0.043	0.000	0.000	0.765
	<i>Leucosporidiales</i> sp. 2	0.000	0.009	0.553	0.062	0.018	0.152
	<i>Mrakia frigida</i>	0.025	0.075	0.296	0.360	0.016	0.010
	<i>Rhodotorula</i> sp. 1	0.058	0.000	0.065	0.000	0.558	0.000
	<i>Malasseziales</i> sp.	0.182	0.000	0.000	0.050	0.205	0.099
	<i>Holtermanniella takashimae</i>	0.000	0.449	0.000	0.009	0.000	0.000
	<i>Malassezia</i> sp. 1	0.021	0.360	0.007	0.000	0.000	0.000
	<i>Leucosporidiella creatinivora</i>	0.000	0.279	0.000	0.036	0.000	0.000
	<i>Arrhenia</i> sp.	0.000	0.008	0.154	0.113	0.000	0.000
	<i>Agaricomycetes</i> sp.	0.100	0.009	0.088	0.002	0.034	0.039
	<i>Malassezia globosa</i>	0.123	0.004	0.003	0.021	0.070	0.014
	<i>Leucosporidiales</i> sp. 1	0.019	0.022	0.044	0.086	0.004	0.000
	<i>Auriculariales</i> sp.	0.044	0.000	0.000	0.000	0.122	0.000

<i>Coprinellus</i> sp.	0.138	0.014	0.000	0.000	0.000	0.000
<i>Mastigobasidium</i> sp.	0.000	0.002	0.130	0.011	0.000	0.000
<i>Schizophyllum commune</i>	0.100	0.002	0.009	0.008	0.000	0.020
<i>Omphalina rivulicola</i>	0.000	0.000	0.137	0.000	0.000	0.000
<i>Cystobasidium pinicola</i>	0.000	0.015	0.000	0.118	0.002	0.000
<i>Pucciniomyces</i> sp.	0.000	0.046	0.037	0.000	0.000	0.043
<i>Funalia floccosa</i>	0.093	0.000	0.016	0.000	0.000	0.000
<i>Sistotrema coronilla</i>	0.104	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
<i>Tremella</i> sp.	0.000	0.000	0.099	0.000	0.000	0.000
<i>Irpex hacksungii</i>	0.089	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
<i>Xenasmataceae</i> sp.	0.087	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
<i>Wallemia</i> sp.	0.000	0.006	0.000	0.065	0.014	0.000
<i>Psathyrella</i> sp.	0.000	0.067	0.000	0.014	0.000	0.000
<i>Glaciozyma martinii</i>	0.000	0.003	0.000	0.000	0.000	0.065
<i>Omphalina</i> sp.	0.000	0.000	0.060	0.000	0.007	0.000
<i>Vishniacozyma victoriae</i>	0.000	0.032	0.009	0.015	0.002	0.003
<i>Trechispora</i> sp. 1	0.060	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
<i>Tremellomyces</i> sp. 1	0.000	0.000	0.043	0.016	0.000	0.000
<i>Tremellomyces</i> sp. 2	0.000	0.000	0.056	0.000	0.000	0.000
<i>Phanerochaete tuberculata</i>	0.055	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

<i>Schizopora flavipora</i>	0.000	0.000	0.000	0.015	0.000	0.040
<i>Postia pelliculosa</i>	0.000	0.023	0.028	0.000	0.000	0.000
<i>Vishniacozyma taibaiensis</i>	0.032	0.000	0.000	0.000	0.000	0.015
<i>Glaciozyma antarctica</i>	0.000	0.000	0.006	0.000	0.000	0.036
<i>Cortinariaceae</i> sp. 2	0.013	0.023	0.000	0.000	0.000	0.000
<i>Exidiaceae</i> sp.	0.033	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
<i>Peniophora</i> sp. 1	0.032	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
<i>Trichosporon asahii</i>	0.000	0.000	0.000	0.031	0.000	0.000
<i>Lycoperdon ericaeum</i>	0.000	0.029	0.000	0.000	0.000	0.000
<i>Trametes marianna</i>	0.028	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
<i>Cortinarius</i> sp.	0.000	0.014	0.000	0.005	0.007	0.000
<i>Galerina</i> sp.	0.000	0.000	0.025	0.000	0.000	0.000
<i>Postia dissecta</i>	0.016	0.008	0.000	0.000	0.000	0.000
<i>Tremellales</i> sp.	0.000	0.000	0.022	0.000	0.000	0.000
<i>Agaricales</i> sp.	0.000	0.003	0.000	0.000	0.012	0.006
<i>Polyporales</i> sp.	0.000	0.000	0.000	0.011	0.000	0.008
<i>Goffeauzyma gastrica</i>	0.000	0.000	0.018	0.000	0.000	0.000
<i>Phanerochaete sordida</i>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.004	0.012
<i>Meruliaceae</i> sp.	0.000	0.000	0.000	0.000	0.004	0.012
<i>Dentipellicula taiwaniana</i>	0.016	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

<i>Chryzomaceae</i> sp.	0.000	0.000	0.016	0.000	0.000	0.000
<i>Leucosporidium</i> sp.	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.014
<i>Sakaguchia lamellibrachiae</i>	0.000	0.013	0.000	0.000	0.000	0.000
<i>Trichosporon</i> sp.	0.000	0.000	0.009	0.000	0.004	0.000
<i>Pseudolagarobasidium belizense</i>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.012
<i>Phanerochaetaceae</i> sp.	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.012
<i>Resinicium confertum</i>	0.000	0.000	0.011	0.000	0.000	0.000
<i>Symptodiomyopsis paphiopedili</i>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.011
<i>Leucosporidiella muscorum</i>	0.000	0.000	0.000	0.010	0.000	0.000
<i>Lycoperdaceae</i> sp.	0.000	0.010	0.000	0.000	0.000	0.000
<i>Henningsomyces puber</i>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.010
<i>Quambalaria cyanescens</i>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.010
Cortinariaceae sp. 1	0.000	0.007	0.000	0.000	0.003	0.000
Polyporales sp.	0.009	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
<i>Hannaella zeae</i>	0.000	0.000	0.009	0.000	0.000	0.000
<i>Hyphodontia radula</i>	0.000	0.009	0.000	0.000	0.000	0.000
<i>Fistulina hepatica</i>	0.000	0.009	0.000	0.000	0.000	0.000
<i>Pholiota</i> sp.	0.000	0.009	0.000	0.000	0.000	0.000
<i>Ceriporia alachuana</i>	0.000	0.000	0.008	0.000	0.000	0.000
<i>Solicoccozyma terricola</i>	0.000	0.000	0.008	0.000	0.000	0.000

<i>Dioszegia fristingensis</i>	0.000	0.000	0.008	0.000	0.000	0.000
<i>Athelia arachnoidea</i>	0.000	0.000	0.000	0.008	0.000	0.000
<i>Mycoacia aurea</i>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.008
<i>Filobasidium magnum</i>	0.000	0.000	0.000	0.007	0.000	0.000
<i>Stereum</i> sp.	0.000	0.007	0.000	0.000	0.000	0.000
<i>Bovista</i> sp.	0.000	0.007	0.000	0.000	0.000	0.000
<i>Apiotrichum gamsii</i>	0.000	0.000	0.000	0.007	0.000	0.000
<i>Phlebiporia bubalina</i>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.006	0.000
<i>Steccherinum tenue</i>	0.006	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
<i>Phlebia</i> sp. 1	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.006
<i>Phlebiopsis</i> sp.	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.006
<i>Meira argovae</i>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.006
<i>Pholiota gallica</i>	0.000	0.006	0.000	0.000	0.000	0.000
<i>Coprinopsis acuminata</i>	0.000	0.006	0.000	0.000	0.000	0.000
<i>Malassezia japonica</i>	0.000	0.001	0.000	0.002	0.003	0.000
<i>Peniophora</i> sp. 2	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.005
<i>Mycoacia</i> sp.	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.005
<i>Cryptococcus</i> sp.	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.005
<i>Peniophora laxitexta</i>	0.000	0.000	0.002	0.000	0.000	0.003
<i>Erythrobasidium hasegawianum</i>	0.000	0.000	0.000	0.005	0.000	0.000

	<i>Ganoderma australe</i>	0.000	0.000	0.002	0.000	0.000	0.000
	<i>Rigidoporus</i> sp.	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002	0.000
	<i>Trametes hirsuta</i>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001
	<i>Serendipita</i> sp.	0.000	0.000	0.001	0.000	0.000	0.000
	<i>Cystobasidiomycetes</i> sp.	0.000	0.000	0.001	0.000	0.000	0.000
	<i>Ceratobasidium</i> sp.	0.000	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000
	<i>Byssomerulius corium</i>	0.000	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000
	<i>Chionosphaeraceae</i> ap.	0.000	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000
<i>Mortierellomycota</i>	<i>Mortierella</i> sp. 1	0.005	0.477	38.549	0.116	35.882	0.000
	<i>Mortierella fimbriocystis</i>	1.405	3.987	5.815	1.107	1.968	0.331
	<i>Mortierella parvispora</i>	0.144	0.586	2.053	2.166	1.857	0.010
	Mortierellaceae sp.	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	5.888
	<i>Mortierella antarctica</i>	0.000	0.608	0.000	0.088	4.588	0.010
	<i>Mortierella</i> sp.2	0.000	0.287	0.643	0.000	0.375	0.090
	<i>Mortierella alpina</i>	0.000	0.533	0.085	0.000	0.000	0.003
	<i>Mortierella gamsii</i>	0.000	0.351	0.000	0.023	0.000	0.000
	<i>Mortierella sclerotiella</i>	0.000	0.253	0.000	0.000	0.000	0.000
	<i>Mortierella amoeboidea</i>	0.000	0.000	0.119	0.059	0.000	0.000
	<i>Mortierella elongatula</i>	0.000	0.155	0.000	0.000	0.000	0.000
	<i>Mortierella hyalina</i>	0.000	0.000	0.132	0.000	0.000	0.000

	<i>Mortierella turficola</i>	0.000	0.000	0.003	0.000	0.012	0.000
<i>Chytridiomycota</i>	<i>Chytridiomycota</i> sp.	0.411	0.248	0.236	0.022	0.066	2.901
	<i>Spizellomycetales</i> sp.	0.000	0.208	0.000	0.000	0.000	0.000
	<i>Powellomyces</i> sp.	0.000	0.087	0.000	0.000	0.018	0.000
	<i>Paranamyces uniporus</i>	0.093	0.000	0.000	0.000	0.003	0.000
	<i>Protrudomyces lateralis</i>	0.016	0.059	0.000	0.000	0.000	0.000
	<i>Chytridiomycota</i> sp.	0.000	0.000	0.034	0.000	0.000	0.012
	<i>Lobulomyces angularis</i>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.025
	<i>Clydaea vesicula</i>	0.000	0.000	0.007	0.000	0.000	0.004
<i>Rozellomycota</i>	<i>Rozellomycota</i> sp. 2	0.063	1.045	0.475	0.096	0.890	0.003
	<i>Paramicrosporidium saccamoebae</i>	0.000	0.000	0.092	0.000	0.000	0.000
	<i>Rozellomycota</i> sp. 1	0.000	0.000	0.000	0.000	0.007	0.000
<i>Mucoromycota</i>	<i>Mucor fusiformis</i>	0.000	0.000	0.020	0.000	0.000	0.000
	<i>Rhizopus arrhizus</i>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.005
<i>Calcarisporiellomycota</i>	<i>Calcarisporiella</i> sp.	0.000	0.012	0.000	0.000	0.000	0.000
<i>Zoopagomycota</i>	<i>Syncephalis</i> sp.	0.000	0.000	0.005	0.000	0.000	0.000
Fungi	Fungal sp. 1	36.119	8.567	4.647	3.965	18.449	28.696
	Fungal sp. 2	2.798	1.264	1.632	2.372	3.279	10.465

*ASVs = amplicon sequence variants. In gray the dominant fungal taxa detected.

5.4 Capítulo 4: Pathogenic potential of fungi recovered from permafrost and active layer from South Shetland Islands, Antarctica

O presente capítulo teve como objetivo o isolamento de fungos cultiváveis presentes na camada ativa e no *permafrost* das ilhas Rei George (Thomas Point e Keller Península), Robert, Deception (Crater Lake e Whalers Bay) e Livingston, no arquipélago das Shetland do Sul – Antártica).

Através do uso de quatro meios de cultura (DRBC, Meio Mínimo, Sabouraud e DG18) e isolamento à temperaturas de 37 °C foram obtidos um total de 88 isolados fúngicos, sendo 42 provenientes de *permafrost*, e 46 de camada ativa. Os isolados foram classificados em 15 taxa.

Todos os fungos obtidos foram testados quanto a capacidade de produção das enzimas fosfolipase e proteinase e capacidade hemolítica, bem como crescimento em diferentes faixas de pH (4, 7 e 9). Apenas os fungos que são conhecidos como fungos oportunistas humanos foram selecionados para testes de tolerância térmica e ensaios antifúngicos.

Aspergillus hiratsukae, *Aspergillus thermomutatus* e *Rhodotorula mucilaginosa*, conhecidos fungos oportunistas humanos, foram detectados no *permafrost* antártico, apresentando capacidade de crescimento a 45 e / ou 50 °C. Além disso, *A. thermomutatus*, *A. hiratsukae* e *R. mucilaginosa* exibiram resistência antifúngica e/ou suscetibilidade. Nosso estudo mostrou que o *permafrost* antártico abriga fungos viáveis com crescimento a 37 ° C, incluindo *R. mucilaginosa* e espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* que demonstram capacidade de virulência *in vitro*. A Península Antártica é a principal região do planeta sob alto impacto das mudanças climáticas globais, conseqüentemente, o *permafrost* da Península Antártica pode estar sob ameaça de derretimento. Nossos resultados alertam para estudos futuros sobre a influência das mudanças climáticas globais sob o *permafrost* da Antártica e de diferentes ambientes frios para caracterizar fungos e outros micro-organismos com potencial patogênico para humanos e animais, que podem ser liberados desses ecossistemas frios para outras partes do mundo.

Pathogenic potential of fungi recovered from permafrost and active layer from South Shetland Islands, Antarctica

Thamar Holanda da Silva, Eldon Carlos Queres Gomes, Aline Dias Valério, Susana Johann,
5 Carlos Augusto Rosa and Luiz Henrique Rosa*

Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Minas Gerais, MG, Brasil

*Corresponding author. Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Minas
10 Gerais, Belo Horizonte, MG, CEP 31270-901. Tel.: +55-31-3409 2749; Fax: +55-31-3409
2730, Brazil. E-mail: lhrosa@icb.ufmg.br

Abstract

In the current study, we recovered the fungi able to growth at 37 °C living in the permafrost
15 and active layer sampled in South Shetland Island, Antarctica. All fungi obtained were
screened in enzymatic and range of pH's, and fungi that are known like human opportunistic
fungi were screened in thermotolerance, and antifungal assays to detect the virulence
potential. A total of 88 fungal isolates were obtained, which were identified as 18 taxa
belonged to genera *Alternaria*, *Aspergillus*, *Curvularia*, *Penicillium*, *Rhodotorula* and
20 *Talaromyces*. *Penicillium* taxa showed a broad distribution in all the islands. *Aspergillus*
hiratsukae, *Aspergillus thermomutatus* and *Rhodotorula mucilaginoso*, known human
opportunistic fungi, were detected in the Antarctic permafrost, which displayed capability to
grow at 37, 45 and/or 50 °C, phospholipase, esterase, proteinase and hemolytic activities. In

addition, *A. thermomutatus*, *A. hiratsukae* and *R. mucilaginoso* displayed antifungal resistance and/or susceptibility. Our study showed that the Antarctic permafrost shelter viable fungi capable growth at 37 °C, including *R. mucilaginoso* and species of *Aspergillus* and *Penicillium* that demonstrate *in vitro* virulence capabilities. Antarctic Peninsula is the major region of the planet under high impact of the global climate changes, consequently, the permafrost of Antarctic Peninsula may be under melting threaten. Our results turn on an alert for furthers studies about the influence of global climate changes under the permafrost Antarctica and those of different cold environments to characterize fungi and other microbes with pathogenic potential to human and animals, which might be release from these cold ecosystems to other parts of the world.

Keywords: Antarctica, climate changes, pathogenicity

Introduction

Antarctic Peninsula apparently represents the most important region of the planet under effects of the global climate changes (Maxwell and Barrie 1989; Ramos et al. 2017) and, consequently, the same effects under the resident life forms (Guglielmin and Cannone 2012). The climate changes caused by high greenhouse gases rates bring direct consequences in the different ecosystems of Antarctic Peninsula, such as glaciers and permafrost melting effects. Permafrost is defined as ground (lithosphere: soil, sediment, rock), that keeps your temperatures ≤ 0 °C and has remained frozen for at least two consecutive years (Margesin and Collins 2019). It covers nearly one quarter of Earth's terrestrial surface and Antarctica shelter 37% of the world's permafrost (French 1996; Xue et al 2020). Due your constants low

temperatures (between -18 to -27 °C) (Vorobyova et al. 1997), viable microbes are preserved for centuries years in permafrost.

In general, Antarctic ecosystems represent important source of different fungal species represented mainly by those of the phyla *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Mortierellomycota* and

5 *Mucoromycota* with different ecological and biotechnological importance (Rosa et al. 2019).

In addition, to survive in the polyextremophiles environments of Antarctica fungi display some capabilities such as the ability to form multicellular spores, presence of melanin in the cell wall, production of cryoprotectors, synthesis of enzymes that act at low temperatures, among other characteristics (Robinson 2001; Ozerkaya et al. 2009; Buzzini et al. 2012).

10 The global climate changes effects under the polar and alpine regions have been call attention due the impact over the resident life forms (Elster et al. 2017). The discovery of *Bacillus anthracis* presence in Artic thawing permafrost (Revich and Podolnaya 2011) and two new viruses (*Pithovirus sibericum* and *Mollivirus sibericum*) retain their infectivity in prehistorically permafrost layers (Legendre et al. 2015), introduce a new perspective about the

15 importance of know the microbial diversity in this habitat.

In the natural environment like those of Antarctica, the fungal dormancy stage may be broken by the temperature increase (Casadevall et al. 2019), as for example by the effect of the global warming in the region, and may release potentially harmful to human, animal and plant health. The temperature increase effect in these untouched regions may lead to selection of

20 fungal species and/or strains thermally tolerant such as the example of reports already known of the emergency of pathogens like *Candida auris* and *Batrachomyces dendrobatidis* that were connected directly to climatic changes (Hof et al. 2011; Casadevall et al. 2019). In fact, many human fungal pathogens have environmental origin, which occasionally enter in contact with human hosts, often accidentally, and cause different diseases, due their set of

characteristics that serve as virulence factors, differentiating them from harmless microorganisms (Casadevall, 2007; Bliska and Casadevall, 2009; Brunke et al. 2016).

According to Nikrad et al. (2016), the landscape of frozen ecosystems are changing quickly and, unfortunately, our knowledge of ecology and dispersion of the resident microorganisms, including fungi, is in the beginning. As Antarctic permafrost is under impact of the climate changes and the few knowledge of its resident fungal community is scarce, including which those taxa may present pathogenic potential for humans and animals, in the current study we characterized the viable fungi living in permafrost of different sites at the Antarctic Peninsula and their potential virulence *in vitro* for human and animals.

10

Material and Methods

Sampling areas and collecting

The samples of soils (from permafrost and active layer) were obtained during work in the Antarctic summer of 2017-2018 in sites at Robert, Livingston, King George (Thomas Point and Keller Peninsula), and Deception (Crater Lake and Whalers Bay) islands, Maritime Antarctica (**Fig. 1**). Approximately 10 cm of superficial soil was removed using an ice axe to reach active layer (found at 1-30 cm above permafrost) and permafrost (5 to 30 cm depths). Was used spatulas previously disinfested with alcohol (70%), and samples were conditioned in sterilized Whirl-Pak bag (Sigma-Aldrich, USA). In duplicate, to each collected site, 500 g of each substrate (active layer or permafrost) were sampled and kept at -20 °C until processing.

20

Fungi isolation

For fungal isolation, 9 mL of NaCl at 0.85% with 1 g of each sample was mixed and 100 μ L of a 10^{-1} dilution was inoculated in the following media: Minimal Media (MM) (Peptone, 0.025%, glucose 0.5%, K_2HPO_4 0.698%, KH_2PO_4 , 0.544%, $(NH_4)_2SO_4$ 0.1%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.11% and agar 2%); Dichloran Rose Bengal Agar (DRBC) (Oxoid, EUA), Sabouraud Agar (SAB) (Himedia, India) and, Dichloran Glycerol Agar (DG18) (Oxoid, EUA), containing 100 μ g mL^{-1} of chloramphenicol (Sigma, USA). They were incubated at 37 ± 2 °C for a period of up to 30 days. The colony forming unity (CFU) were used for determinate the density of each specie. YM Agar (Glucose 1%, Yeast Extract 0.03%, Malt Extract 0.03%, Agar 2%, and Peptone 0.05 %) was used for purification of representatives isolates of each fungi morphotype obtained and were deposited in the form of Castellani (Castellani, 1967) and criotubes at a -80 °C into the Collection of Microorganisms and Cells from Universidade Federal de Minas Gerais under the code UFMGCB.

Fungi identification

Fungi identification was performed using different protocols for filamentous fungi and yeasts. DNA extraction and the amplification of the transcribed internal spacer (ITS-5.8S) region, using primers ITS1 and ITS4, for filamentous fungi, was described in Rosa et al. (2009). Molecular identities for yeasts were confirmed by sequencing the D1/D2 domains of the large subunit rRNA gene using the primers NL1 and NL4, and region sequencing was performed (White et al. 1990; O'Donnell 1993; Kurtzman and Robnett 1998; Lachance et al. 1999). In some cases, genera that have high polymorphism index, had a partial amplification of the β -tubulin gene, with the primers BT2a and BT2b (Glass and Donaldson 1995), and ribosomal Polymerase II gene, with primers RPB2 5F and RPB2 7R (Malkus et al. 2006). Sequences of each fungal taxa were deposited into GenBank database. All the sequences were compared with sequences retrieved from the NCBI (National Center for Biotechnology Information)

GenBank database using BLASTn program (Basic Locus Search Alignment Tool) (Altschul et al. 1997). The taxonomic information about fungal classification followed the MycoBank (<http://www.mycobank.org>) and the Index Fungorum (<http://www.indexfungorum.org>).

5 *Inoculum standardization for the in vitro pathogenic potential assays*

The filamentous fungi were grown at 7 days on potato dextrose agar (PDA, Himedia/India) and discs of 5 mm diameter were used as inoculum. Yeasts were grown in YM media for 48 h, and the transmittance of the medium was determined in a spectrophotometer at 530 nm.

The inoculum used in the experiment showed 75-77% transmittance, which is equivalent to
10 $0.5-5 \times 10^6$ CFU mL⁻¹. For the assays, 10 µL of the standardized suspension was inoculated.

pH tolerance

The protocol established by Davis (2009) was used to available the pH tolerance of the fungi recovered from Antarctic permafrost. All fungi were grown in Petri dishes with YM agar
15 adjusted to simulate pH's of the human body: pH 4 (vaginal pH), pH 7 (tissue and blood pH), and pH 9 (intestinal pH) at 37 °C for 7 days. The experiment was conducted in triplicate for detect presence or absence of growth.

Production of hydrolytic enzymes (proteinase and phospholipase detection)

The assay of phospholipase and proteinase production was performed with all fungi obtained.
20 The production of hydrolytic enzymes follow protocols established by Price et al. (1982) and Aoki et al (1990), for phospholipase and proteinase respectively. For the phospholipase activity the medium consisted of sodium chloride (5.88%), calcium chloride (0.05%) and Sabouraud agar (2%). The medium was autoclaved, cooled down to approximately 40 °C and

addicted egg yolk emulsion at a final concentration of 4%. The plates were incubated at 37 °C for 7 days. The precipitation halo around colonies indicated phospholipase production. *Candida albicans* ATCC 10231 was used as the positive control and experiment was performed in triplicate.

- 5 For the proteinase activity, the fungal activity were inoculated on bovine serum albumin (BSA) plate's methods (1.17% yeast carbon base, 0.1% yeast extract, 0.2% bovine serum albumin, 2% agar and pH 5) and incubated for 7 days at 37 °C, and the result was measured through the production of halo on the medium. The halo measurement was used to calculate the Proteolytic enzymatic activity (Pz), based on the ratio between the diameter of the colony
10 and of the degradation zone of the substrate. Herewith, the degradation zone was classified as very strong (Pz ≤0.69), strong (Pz between 0.70 and 0.79), normal (Pz between 0.80 and 0.89), weak (Pz between 0.90-0.99) or negative (Pz = 1).

Hemolytic activity

- 15 All the fungal were inoculated on Sabouraud dextrose agar supplemented with sheep blood (7%) and 200 µg mL⁻¹ chloramphenicol, to verify hemolytic capacity according to Luo et al. (2001) with modifications. The evidence of hemolysin in the medium is indicated by the presence of clear hemolysis and considered as a positive result (Donohue et al. 2006; Batool et al 2013; Ghorbel et al. 2019).

20

Only the isolates of *A. hiratsukae* (UFMGCB 17442), *A. thermomutatus* (UFMGCB 17415) and *R. mucilaginoso* (UFMGCB 17473 and UFMGCB 17448) were submitted at the next assays.

Thermotolerance survival assay

The isolates were subjected to high temperatures for simulation of feverish state. The isolates were grown in YM media and incubate at 40, 45 and 50 °C for 7 days. The evaluation of the results was carried out visually, analyzing the degree of growth of the fungi.

Esterase activity

The esterase production was performed according to Carrasco et al. (2012). The isolates were grown in medium composed of 1% bacto peptone, 0.5% NaCl, 0.4% CaCl₂ 2H₂O, and 1% Tween 80. Esterase activity was evidenced as a white precipitate around the fungal colony.

Antifungal susceptibility testing

The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) protocol was performed using microtiter plates. The methodology used followed the CLSI guidelines in the M-27-A3 protocol (CLSI, 2008). The antifungals fluconazole, itraconazole and amphotericin B were diluted to prepare the stock solution in dimethyl sulfoxide (DMSO; Sigma Aldrich, St. Louis, USA).

Fluconazole was tested in the range 64-0.125 µg mL⁻¹, while itraconazole was used in the final concentration range of 16-0.03 µg mL⁻¹ and amphotericin 8-0.015 µg mL⁻¹. The RPMI medium with 0.165 mol L⁻¹ MOPS was the culture medium used in the test. The plates were incubated at 37 °C and visual reading was performed in 24 and 48 hours. The well in which the wells were 80% inhibition was observed and for amphotericin B the MIC (Minimum Inhibitory Concentration) was evaluated in the well with 100% inhibition. Antifungal

susceptibility testing was repeated at least three times on different days. The breakpoints for interpretation of MICs for antifungal agents were made using data from CLSI.

Resistance to freeze at -80 °C

5 The isolates were submitted at -80 °C for to 100 days with the controls: 1) fungi + glycerol 15 %; 2) Fungi + H₂O; 3) Fungi + saline solution 0.85 % and 4) only discs of fungi. At the end of the time, 03 discs of isolates were replaced in to BDA plates and incubated at 37 °C for 7 days.

10 **Results**

Fungi taxonomy and distribution

Eighty-eight fungal isolates were obtained from the permafrost and active layer sampled in Livingston, King George, and Deception (only Whalers Bay) islands. The samples of Robert and Deception (Crater Lake region) islands were absent of fungal growth. Fungi were
15 classified in 15 taxa belonged to the genera *Alternaria*, *Aspergillus*, *Curvularia*, *Penicillium*, *Rhodotorula*, and *Talaromyces*, and one integrant of family *Montagnula chromolaenicola*. All them, were able to grow at 37 °C (**Table 1**). Samples from King George Island (Thomas Point) displayed the highest frequency of fungal isolation (24 isolates).

Rhodotorula mucilaginosa was the unique yeast recovered, which was obtained in active layer
20 and permafrost of Deception (Walers Bay) and King George (Thomas Point) islands.

Penicillium was the taxa most widely distributed genera along the Antarctic islands and substrates (active layer and permafrost) (**Suppl. Fig. 1**). *Curvularia*, *Montagnula chromolaenicola* and *Talaromyces* were found only in Deception Island (Whalers Bay),

Alternaria only in King George (Thomas Point), and *Aspergillus* was common between the two sites of King George Island (Keller Peninsula and Thomas Point). The genera *Penicillium*, *Rhodotorula* and *Aspergillus* were common between active layer and permafrost. However, *Curvularia* and *Alternaria* occurred only in active layer, and *Montagnula* and

5 *Talaromyces* only in permafrost.

In vitro pathogenicity characteristics, thermotolerance resistance

The **Table 2** shows the results of *in vitro* pathogenic assays. Excepting by *Penicillium tardochrysogenum* UFMGCB 16223, which did not grow in pH 4, all fungi assayed grew in

10 the pH 4, 7 and 9 (**Suppl. Fig. 2**). Different isolates of *R. mucilaginosa* ranged about their phospholipase activities. Among them, *R. mucilaginosa* UFMGCB 17448 and 17473 displayed positive production of phospholipase (**Suppl. Fig. 3**). Different *Penicillium* isolates and *R. mucilaginosa* UFMGCB 17436 displayed strong proteinase activities. For hemolytic

15 activity, all positive fungi were classified as partial hemolysis (α -hemolysis) and represented by different isolated of *Alternaria* sp., *Penicillium* species and *R. mucilaginosa*.

Only fungi identified as already reported as human opportunist (*R. mucilaginosa* and *Aspergillus* spp.) were screened about thermal tolerance, esterase activity, antifungal susceptibility assays and resistance to freeze. All *R. mucilaginosa* isolates were able to grow at high temperatures 40, 45, and 50 °C and *Aspergillus* species grew only up to 45 °C. In the

20 esterase assay, both isolates of *R. mucilaginosa* and *A. hiratsukae* were positive. *Aspergillus thermomutatus*, *A. hiratsukae* and *R. mucilaginosa* isolates displayed resistance to fluconazole and itraconazole. In addition, all *R. mucilaginosa* isolates showed resistance for amphotericin B. All isolates tested were capable of grow at -80 °C after 100 days at -80°C in all the controls used.

The **Table 3** shows the results of Resistance to freeze, termotolerance, esterase and antifungal susceptibility of *Rhodotorula* and *Aspergillus*.

Discussion

5 *Fungi taxonomy and distribution*

The fast melting of untouched polar environments in the last decades, like those where occur permafrost, can have different impacts on resident life forms, including the microbial communities. Although fungal communities require up to years to respond to warming changes, the heating of permafrost offer opportunities for allochthonous species (increasing
10 the degree of competition) to growth, colonize and disperse into new habitats (Lulakova et al. 2019).

Our study focused at the first time the selective diversity of mesophilic and thermophiles cultivable fungi present in permafrost of Antarctic Peninsula, where we reported for the first time, *Curvularia* sp., *Talaromyces* sp., *A. thermomutatus* and *A. hiratsukae*. In addition,
15 species of *Rhodotorula mucilaginosa*, *Alternaria* sp., *Penicillium* sp., *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium rubens* and *Pleosporales* sp. also were detected. All of them able to growth at 37 °C. According to Casadevall et al. (2019), the advance in the thermal barrier of mammals (capability to growth at 37 °C) is the first step for invasive fungal infections.

Among the most common human fungal diseases are those related to *Aspergillus* and
20 *Rhodotorula* species. *Rhodotorula* (*Basidiomycota*) is cosmopolitan yeast usually found in air, soil, freshwater and seawater, and as contaminant of food (Tomsikova 2002; Wirth and Goldani 2012). In Antarctica, *R. mucilaginosa* represents one of the most fungi isolated, and already reported in marine (Vaz et al. 2011; Conell et al. 2018) and terrestrial habitats

(Kochkina et al. 2012; Godinho et al. 2013; Gonçalves et al. 2017; Alves et al. 2019; Sousa et al. 2017; Ferreira et al. 2019; Gomes et al. 2019).

Aspergillus and *Penicillium* genera (*Ascomycota*) include species with worldwide distribution; many of them are saprobes fungi commonly found in soil. Both genera have several species with environmental, biotechnological, and human medicine importance (Tsang et al. 2018) and the capability to survive and colonize in extreme environments, including those with low temperatures (Houbraken et al. 2014). In Antarctica, *Aspergillus* and *Penicillium* species already reported in different terrestrial and marine habitats and substrates; however, they are found mainly in Antarctic soils (Rosa et al. 2019).

10

In vitro pathogenicity characteristics

Potential pathogenic fungi already were characterized in untouched environments such as soils and rocks (Brunke et al. 2016; Gonçalves et al. 2017; Alves et al. 2019). In addition, according to Casadevall et al. (2019), new records of emergent fungal diseases show that widening of the geographical range of innately thermotolerant pathogenic fungi and the acquisition of virulence characteristics in non-pathogenic thermotolerant environmental fungi may shape the 21st century as an era of expansion of fungal diseases for the biota in all planet's.

According to Lee et al. (2017), until the end of this century there may be a 25% increase in ice-free areas and those areas containing permafrost will be affected. Consequently, the temperature increase in Antarctic Peninsula can affect the resident microbial community structures in the region. It is possible that permafrost melting will release trapped organic matter, gases and, consequently, lead to the activation of the microorganisms trapped there (Nikrad et al. 2016; Lulakova et al. 2019; da Silva et al. 2019).

20

After *in vitro* different assays for potential virulence factors, the *R. mucilaginosa*, *Aspergillus* and *Penicillium* taxa displayed different physiological virulence factors. *Rhodotorula mucilaginosa* is the most prevalent species within the genus and recognized in the last two decades as an emerging pathogen, especially in immunocompromised patients (Maeder et al. 2003; Thomson et al. 2017). *Rhodotorula mucilaginosa* isolates recovered from seasonal Antarctic snow showed resistance to fluconazole (de Menezes et al. 2019), an important discovery, since many tourists and researchers have a habit of use melting snow for drink and bath, which could lead to a process of direct contamination.

Aspergillus species are saprobes fungi commonly found in soil worldwide. However, some species are able to cause fatal diseases in humans, domestic and wild animals as agents, in addition to allergic responses to inhaled conidia (Seyedmousavi et al. 2015). *Aspergillus hiratsukae* (= *Neosartorya hiratsukae*) and *A. thermomutatus* (= *Neosartorya pseudofischeri*) are among the *Aspergillus* species in Fumigati section recognized as pathogenic (Frisvad and Larsen 2016). Both species have reports for aspergillosis, peritonitis and others diseases (Guarro et al. 2002; Järv et al. 2004; Alcazar-Fuoli et al. 2008; Ghebremedhin et al. 2009; Koutroutsos et al. 2010). In addition, recent studies showed that *Aspergillus* is connected to fungal co-infection in COVID-19 patients (Alanio et al. 2020; Koehler et al. 2020; Mortezaee et al. 2020). Despite of *Penicillium* ecological role in natural processes, although rare, some species are opportunistic human pathogens able to cause invasive diseases. *Penicillium chrysogenum* was related as causal agent of cerebral disease, intestinal invasion and invasive pulmonary mycosis mainly in patient immunocompromised (Lyrtatzopoulos et al. 2002; Barcus et al. 2005; Geltner et al. 2013; Avilés-Robles et al 2016).

Conclusion

Our study showed that the Antarctic permafrost shelter viable fungi capable growth at 37 °C, the first evaluated criteria to detect if a fungus might cause human and animal opportunistic mycoses. In addition, *R. mucilaginosa* and species of *Aspergillus* and *Penicillium* alive in the Antarctic permafrost demonstrate *in vitro* virulence capabilities. It is known that Antarctic Peninsula is the major region of the planet under high impact of the global climate changes, consequently, the permafrost of Antarctic Peninsula may be under melting threaten. For this reason, our results turn on an alert for furthers studies about the influence of global climate changes under the permafrost Antarctica and those of different cold environments to characterize fungi and other microbes with pathogenic potential to human and animals, which might be release from these cold ecosystems to other parts of the world.

Acknowledgements

We acknowledge the financial support from CNPq PROANTAR 442258/2018-6, INCT Criosfera II, CAPES (88887.136384/2017-00 and 88887.314457/2019-00), CNPq, FAPEMIG, and FNDCT. This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001.

Figures and Tables

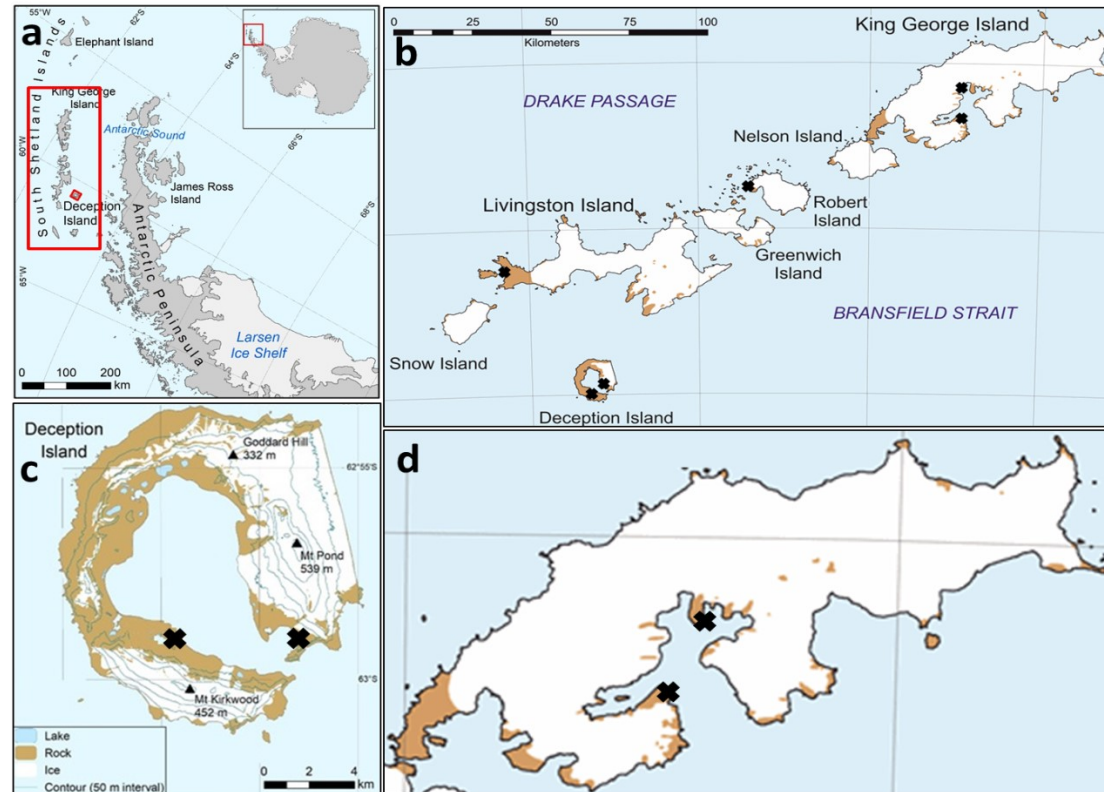


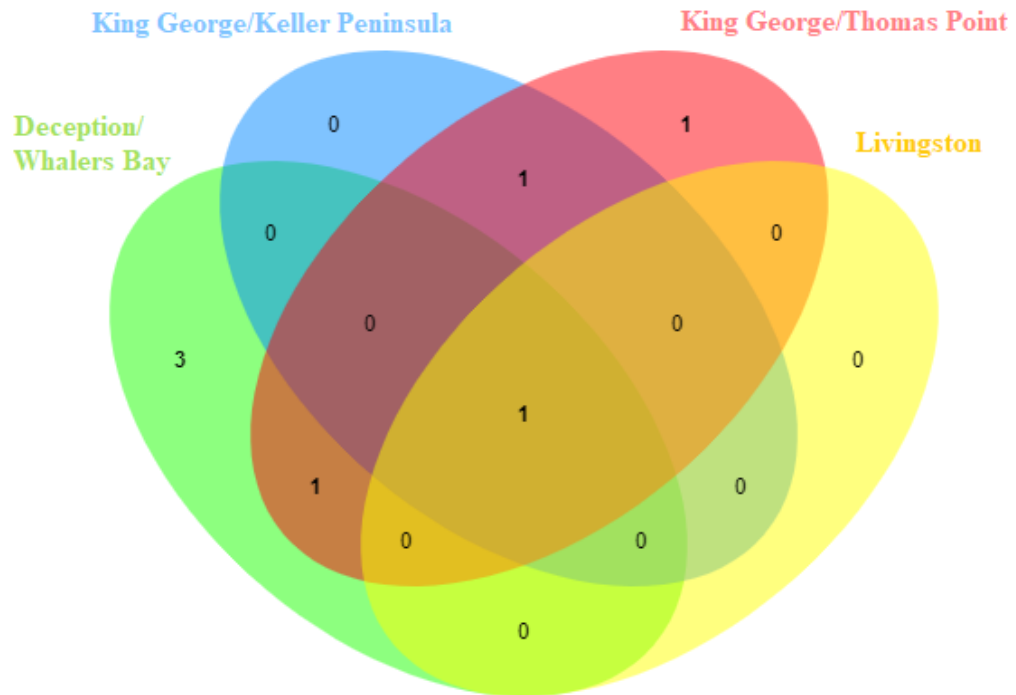
Figure 01. Maps of the South Shetland Islands in Maritime Antarctica where the samples were obtained. **a** = South Shetland Islands; **b** = Location of King George, Robert ($62^{\circ}37'S / 59^{\circ}70' W$), Livingston ($62^{\circ}11'476'' W / 57^{\circ}16'475''S$) and Deception Islands; **c** = Deception Whalers Bay ($60^{\circ}33'24.3'' W / 62^{\circ}58'40.1'' S$) and Crater Lake ($60^{\circ}39'47.7'' W / 62^{\circ}58'52.8'' S$); **d** = King George/ Keller Peninsula ($58^{\circ}23'658'' W / 62^{\circ}04' 894'' S$) and Thomas Point ($58^{\circ}28'36.6'' W / 62^{\circ}09'32.2'' S$).

Table 1. Identification of fungi obtained at 37 °C from permafrost and Antarctic active layer of South Shetland Island, Antarctica.

^aUFMGCB = Collection of microorganisms and cells from the Universidade Federal de Minas Gerais. ^bCFU = colony forming units. Taxa submitted to phylogenetic analysis based on ^cITS1-5.8S-ITS2, ^d β -tubulina, ^erRNA polymerase 2, ^fD1/D2, ^gQuery cover (%). ^hIdentity (%).

Island/Substrate	UFMGCB ^a	N° of isolates	Density (CFU ^b g ⁻¹)	Top BLAST search results (GenBank accession number)	QC ^g (%)	ID ^h (%)	N° of bp analyzed	Proposed taxa (GenBank accession number)	
Deception (Whalers Bay)	17455 ^c	1	100	<i>Curvularia lunata</i> (NR138223)	100	100	395	<i>Curvularia</i> sp. (MW131303)	
	Active Layer	17457 ^c	4	>300	<i>Penicillium chrysogenum</i> (NR077145)	100	100	417	<i>Penicillium</i> cf. <i>chrysogenum</i> (MW165332)
Permafrost	17461 ^f	1	>300	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (NG055716)	100	100	396	<i>Rhodotorula</i> cf. <i>mucilaginosa</i> (MW177719)	
	17477 ^c	2	10	<i>Montagnula chromolaenicola</i> (NR168866)	100	100	391	<i>Montagnula chromolaenicola</i> (MW131304)	
	17480 ^c	6	>300	<i>Penicillium chrysogenum</i> (JX996668)	100	100	650	<i>Penicillium</i> sp. 1 (MW177713)	
	17475 ^c	1	25	<i>Penicillium chrysogenum</i> (JX996668)	100	99	865	<i>Penicillium</i> sp. 2 (MW177712)	
	17478 ^c	1	110	<i>Talaromyces atroseus</i> (NR137815)	95	100	457	<i>Talaromyces</i> sp. (MW131305)	
	17473 ^f	1	>300	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (NG055716)	100	99	424	<i>Rhodotorula</i> cf. <i>mucilaginosa</i> (MW165461)	
King George (Keller Peninsula)	17408 ^c	9	83.3	<i>Neosartorya pseudofischeri</i> (EF669734)	100	100	697	<i>Aspergillus thermomutatus</i> (MW177715)	
	Active Layer	17410 ^c	6	41.6	<i>Penicillium chrysogenum</i> (NR077145)	100	100	463	<i>Penicillium</i> sp. (MW165331)
Permafrost	17415 ^c	1	10	<i>Neosartorya pseudofischeri</i> (EF669734)	100	100	468	<i>Aspergillus thermomutatus</i> (MW177714)	
King George (Thomas Point)	17431 ^c	1	10	<i>Alternaria sorghi</i> (NR160246)	100	99	400	<i>Alternaria</i> sp. (MW131306)	
	Active Layer	17434 ^c	11	91.8	<i>Penicillium chrysogenum</i> (NR077145)	100	100	427	<i>Penicillium</i> cf. <i>chrysogenum</i> (MW165333)
	17428 ^c	4	107.5	<i>Penicillium rubens</i> (JF909926)	100	100	658	<i>Penicillium rubens</i> (MW177717)	
	17436 ^f	1	20	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (NG055716)	100	100	334	<i>Rhodotorula</i> cf. <i>mucilaginosa</i> (MW177720)	

Island/Substrate	UFMGCB ^a	N° of isolates	Density (CFU ^b g ⁻¹)	Top BLAST search results (GenBank accession number)	QC ^g (%)	ID ^h (%)	N° of bp analyzed	Proposed taxa (GenBank accession number)
Permafrost	17442 ^d	1	>300	<i>Aspergillus hiratsukae</i> (NR131310)	100	100	482	<i>Aspergillus hiratsukae</i> (MW139282)
	17445 ^e	5	>300	<i>Penicillium chrysogenum</i> (JX996668)	100	99	629	<i>Penicillium</i> sp. 3 (MW177716)
	17452 ^e	1	>300	<i>Penicillium chrysogenum</i> (JF909937)	100	99	672	<i>Penicillium chrysogenum</i> (MW177718)
	17448 ^f	1	>300	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (NG055716)	100	100	305	<i>Rhodotorula</i> cf. <i>mucilaginosa</i> (MW177721)
Livingston								
Active Layer	16227 ^c	2	90	<i>Penicillium tardochrysogenum</i> (MH865983)	100	100	460	<i>Penicillium</i> cf. <i>tardochrysogenum</i> (MW165334)
Permafrost	16225 ^c	7	>300	<i>Penicillium tardochrysogenum</i> (MH865983)	100	100	465	<i>Penicillium</i> cf. <i>tardochrysogenum</i> (MW165335)



Supplementary Figure 1. Venn's diagram of fungal genera recovered from the permafrost and active layer sampled in the different islands of South Shetland Island, Antarctica.

Table 2. *In vitro* virulence assays of fungi recovered from Antarctic permafrost and active layer.

Island/site	Taxa	Substrate	UFMGCB	pH			(Pz1)	(Pz2)	(Hi)	HC
				pH4	pH7	pH9				
Deception Island (Whalers Bay)	<i>Penicillium</i> sp. 1	AL	17456	+	+	+	NA	0.17	0.45	Partial – α
	<i>Penicillium</i> sp. 1	AL	17465	+	+	+	NA	0.20	0.35	Partial – α
	<i>Penicillium</i> sp. 1	AL	17457	+	+	+	NA	0.18	0.32	Partial – α
	<i>Penicillium</i> sp. 1	AL	17464	+	+	+	NA	0.17	0.37	Partial – α
	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	AL	17461	+	+	+	1	1	0.54	Partial – α
	<i>Penicillium</i> sp. 2	P	17469	+	+	+	NA	0.26	0.38	Partial – α
	<i>Penicillium</i> sp. 2	P	17470	+	+	+	NA	0.26	0.38	Partial – α
	<i>Penicillium</i> sp. 2	P	17471	+	+	+	NA	0.24	0.26	Partial – α
	<i>Penicillium</i> sp. 2	P	17479	+	+	+	NA	0.27	0.38	Partial – α
	<i>Penicillium</i> sp. 2	P	17480	+	+	+	NA	0.22	0.30	Partial – α
	<i>Penicillium</i> sp. 2	P	17481	+	+	+	NA	0.21	0.31	Partial – α
	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	P	17473	+	+	+	0.60	1	0.61	Partial – α
King George Island (Keller Peninsula)	<i>Aspergillus thermomutatus</i>	AL	17401	+	+	+	NA	NA	-	-
	<i>A. thermomutatus</i>	AL	17402	+	+	+	NA	NA	-	-
	<i>A. thermomutatus</i>	AL	17403	+	+	+	NA	NA	-	-
	<i>A. thermomutatus</i>	AL	17408	+	+	+	NA	NA	-	-
	<i>A. thermomutatus</i>	AL	17399	+	+	+	NA	NA	-	-
	<i>A. thermomutatus</i>	AL	17411	+	+	+	NA	NA	-	-
	<i>Penicillium</i> sp. 3	AL	17396	+	+	+	NA	1	0.85	Partial – α
	<i>Penicillium</i> sp. 3	AL	17397	+	+	+	NA	1	0.53	Partial – α
	<i>Penicillium</i> sp. 3	AL	17398	+	+	+	NA	1	-	-
	<i>A. thermomutatus</i>	P	17415	+	+	+	NA	NA	-	-
<i>Rhodotorula</i> sp.	P	17417	+	+	+	0.53	1	0.45	Partial – α	
George Island (Thom)	<i>Alternaria</i> sp.	AL	17431	+	+	+	NA	1	0.89	Partial – α
	<i>Penicillium</i> cf. <i>chrysogenum</i>	AL	17418	+	+	+	NA	0.21	0.41	Partial – α

Island/site	Taxa	Substrate	UFMGCB	pH			(Pz1)	(Pz2)	(Hi)	HC
				pH4	pH7	pH9				
vin gst on Isl	<i>Penicillium cf. chrysogenum</i>	AL	17424	+	+	+	NA	0.25	0.58	Partial – α
	<i>Penicillium cf. chrysogenum</i>	AL	17425	+	+	+	NA	0.33	0.47	Partial – α
	<i>Penicillium cf. chrysogenum</i>	AL	17433	+	+	+	NA	0.34	0.50	Partial – α
	<i>Penicillium cf. chrysogenum</i>	AL	17434	+	+	+	NA	0.16	0.27	Partial – α
	<i>Penicillium cf. chrysogenum</i>	AL	17435	+	+	+	NA	0.26	0.46	Partial – α
	<i>Penicillium cf. chrysogenum</i>	AL	17438	+	+	+	NA	0.21	0.45	Partial – α
	<i>Penicillium cf. chrysogenum</i>	AL	17439	+	+	+	NA	0.25	0.45	Partial – α
	<i>Penicillium cf. chrysogenum</i>	AL	17441	+	+	+	NA	0.31	0.51	Partial – α
	<i>Rhodotorula</i> sp.	AL	17419	+	+	+	0.68	0.66	0.58	Partial – α
	<i>Rhodotorula</i> sp.	AL	17422	+	+	+	0.73	1	0.48	Partial – α
	<i>Rhodotorula</i> sp.	AL	17423	+	+	+	0.73	1	-	-
	<i>Rhodotorula</i> sp.	AL	17430	+	+	+	1	1	0.47	Partial – α
	<i>Penicillium rubens</i>	AL	17427	+	+	+	NA	0.13	0.27	Partial – α
	<i>Penicillium rubens</i>	AL	17428	+	+	+	NA	0.16	0.19	Partial – α
	<i>Penicillium rubens</i>	AL	17429	+	+	+	NA	0.26	0.59	Partial – α
	<i>Penicillium rubens</i>	AL	17437	+	+	+	NA	0.15	0.22	Partial – α
	<i>Rhodotorula cf. mucilaginos</i>	AL	17436	+	+	+	1	0.48	0.67	Partial – α
	<i>Aspergillus hiratsukae</i>	P	17442	+	+	+	NA	NA	NA	NA
	<i>Penicillium</i> sp. 3	P	17443	+	+	+	NA	NA	-	-
	<i>Penicillium</i> sp. 3	P	17445	+	+	+	NA	0.25	0.29	Partial – α
	<i>Penicillium</i> sp. 3	P	17446	+	+	+	NA	0.24	0.54	Partial – α
	<i>Penicillium</i> sp. 3	P	17447	+	+	+	NA	0.24	0.54	Partial – α
	<i>Penicillium chrysogenum</i>	P	17452	+	+	+	NA	0.32	0.62	Partial – α
	<i>Rhodotorula cf. mucilaginos</i>	P	17448	+	+	+	0.76	1	0.44	Partial – α
<i>Rhodotorula</i> sp.	P	17450	+	+	+	1	1	0.53	Partial – α	
<i>Rhodotorula</i> sp.	P	17451	+	+	+	1	1	0.45	Partial – α	
<i>Penicillium</i> sp.	AL	16228	+	+	+	NA	0.44	0.33	Partial – α	

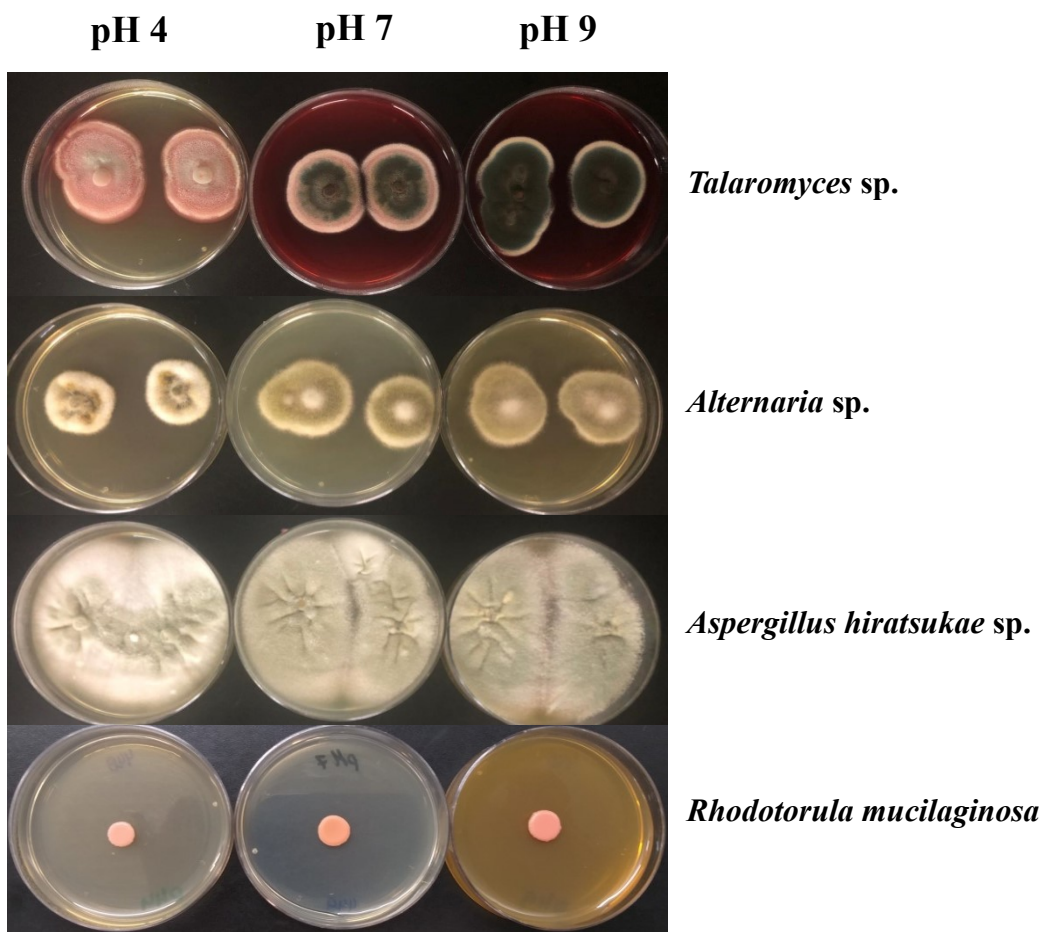
Island/site	Taxa	Substrate	UFMGCB	pH			(Pz1)	(Pz2)	(Hi)	HC
				pH4	pH7	pH9				
	<i>Penicillium cf. tardochrysogenum</i>	P	16220	+	+	+	NA	0.21	0.30	Partial – α
	<i>Penicillium cf. tardochrysogenum</i>	P	16221	+	+	+	NA	0.37	0.28	Partial – α
	<i>Penicillium cf. tardochrysogenum</i>	P	16222	+	+	+	NA	0.21	0.30	Partial – α
	<i>Penicillium cf. tardochrysogenum</i>	P	16223	-	+	+	NA	0.51	0.30	Partial – α
	<i>Penicillium cf. tardochrysogenum</i>	P	16224	+	+	+	NA	0.29	0.24	Partial – α
	<i>Penicillium cf. tardochrysogenum</i>	P	16225	+	+	+	NA	0.21	0.31	Partial – α

AL= Active Layer; P= permafrost; Pz1 (Phospholipase activity); Pz2 (Proteinase activity); Hi (Hemolytic index); HC (Hemolytic classification); (-) negative; (NA) not applicable; Pz: very strong (≤ 0.69), strong (between 0.70 and 0.79), normal (between 0.80 and 0.89), weak (Pz between 0.90–0.99) or negative (Pz=1).

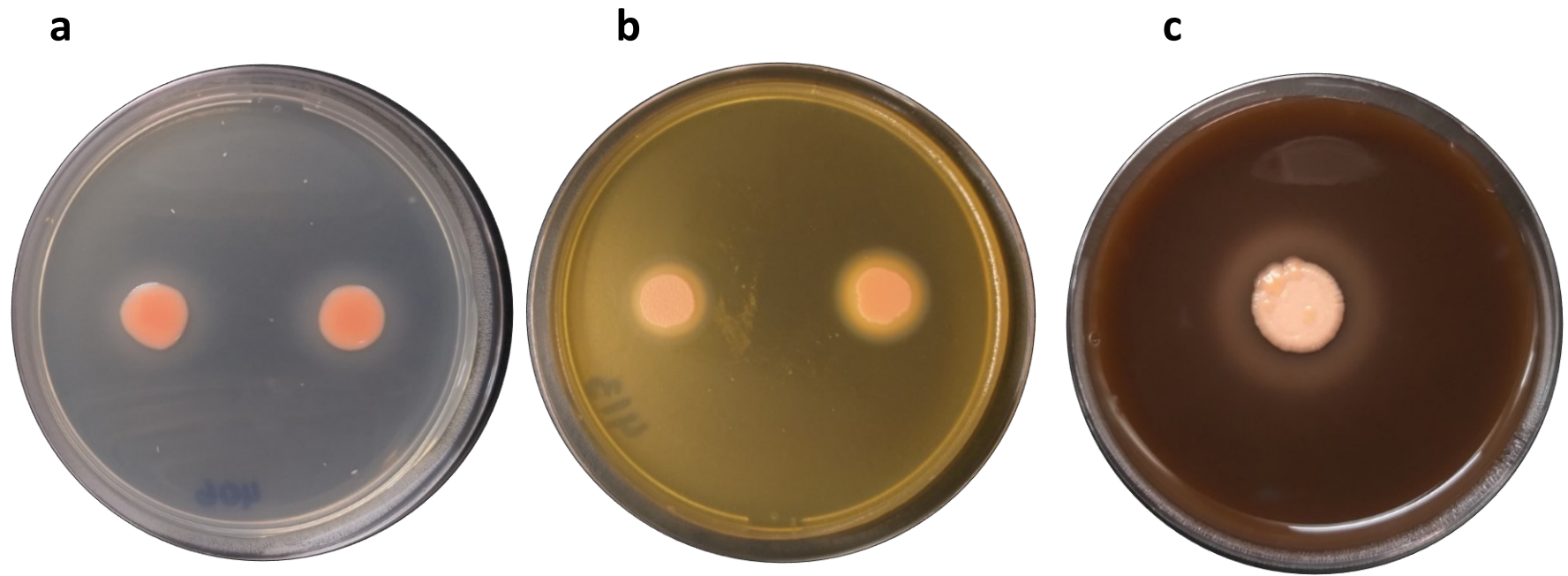
Table 3. Thermotolerance, esterase activity and antifungal susceptibility of *Rhodotorula* and *Aspergillus* taxa recovered from Antarctic permafrost.

Isolate	Resistance to freeze	Thermotolerance (°C)			Esterase (Pz)	MIC ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		
		40	45	50		AMB	FLC	ITC
<i>Aspergillus thermomutatus</i> UFMGCB 17415	++	++	+	-	NA	0.5	>64	>16
<i>Aspergillus hiratsukae</i> UFMGCB 17442	++	++	+	-	0.83	1	>64	>16
<i>Rhodotorula cf. mucilaginosa</i> UFMGCB 17448	++	++	++	+		0.5	>64	0.5
<i>Rhodotorula cf. mucilaginosa</i> UFMGCB 17473	++	++	++	+	0.54	0.5	>64	0.5

+ Intermediate Growth; ++ Robust Growth; - No Growth; NA: Not Applicable. PZ = 1 (negative)/PZ < 1 (positive)/PZ < 0.5 (strongly positive). MIC: Minimum Inhibitory Concentration AMB: amphotericin B; FLC: fluconazole; ITC: itraconazole



Supplementary Figure 2. Grown in yeast malt agar at 37 °C for 7 days in different pH.



Supplementary Figure 3. Enzymatic activities of *Rhodotorula mucilaginosa* isolates to a) proteinase, b) fosfolipase and c) hemolytic activity.

References

- Alanio, A., Delliere, S., Fodil, S., Bretagne, S., & Megarbane, B. (2020). High prevalence of putative invasive pulmonary aspergillosis in critically ill COVID-19 patients. medRxiv.
- Alcazar-Fuoli, L., Mellado, E., Alastruey-Izquierdo, A., Cuenca-Estrella, M., & Rodriguez-Tudela, J. L. (2008). *Aspergillus* section Fumigati: antifungal susceptibility patterns and sequence-based identification. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 52(4), 1244-1251.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., & Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic acids research*, 25(17), 3389-3402.
- Alves, I. M., Gonçalves, V. N., Oliveira, F. S., Schaefer, C. E., Rosa, C. A., & Rosa, L. H. (2019). The diversity, distribution, and pathogenic potential of cultivable fungi present in rocks from the South Shetlands archipelago, Maritime Antarctica. *Extremophiles*, 23(3), 327-336.
- Aoki, Shigeji et al. Comparative pathogenicity of a wild-type strain and respiratory mutants of *Candida albicans* in mice. *Zentralblatt für Bakteriologie*, v. 273, n. 3, p. 332-343, 1990.
- Avilés-Robles, M., Gómez-Ponce, C., Reséndiz-Sánchez, J., Rodríguez-Tovar, A. V., Ceballos-Bocanegra, A., & Martínez-Rivera, Á. (2016). Disseminated penicilliosis due to *Penicillium chrysogenum* in a pediatric patient with Henoch–Schönlein syndrome. *International Journal of Infectious Diseases*, 51, 78-80.
- Barcus, A. L., Burdette, S. D., & Herchline, T. E. (2005). Intestinal invasion and disseminated disease associated with *Penicillium chrysogenum*. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*, 4(1), 21.
- Batool Omran T, Farooq Ibrahim M, Abdulkareem Jasim H, Sumia Sami H. Purification of hemolysin from *Aspergillus fumigatus* and study its cytotoxic effect on normal cell line (REF) in vitro. *Egypt Acad J Biolog Sci* 2013;9:35–43. (2013)

Bliska, James B.; Casadevall, Arturo. Intracellular pathogenic bacteria and fungi—a case of convergent evolution?. *Nature Reviews Microbiology*, v. 7, n. 2, p. 165, 2009.

Brunke, Sascha et al. Virulence factors in fungal pathogens of man. *Current opinion in microbiology*, v. 32, p. 89-95, 2016.

- 5 Buzzini, Pietro 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.

Carrasco M, Rozas JM, Barahona S, Alcaíno J. Diversity and extracellular enzymatic activities of yeasts isolated from King George Island, the sub-Antarctic region. *BMC*

- 10 *Microbiol* (2012); 12:251.

Casadevall, Arturo. Determinants of virulence in the pathogenic fungi. *Fungal biology reviews*, v. 21, n. 4, p. 130-132, 2007.

Casadevall, Arturo; Kontoyiannis, Dimitrios P.; Robert, Vincent. On the emergence of *Candida auris*: climate change, azoles, swamps, and birds. *MBio*, v. 10, n. 4, p. e01397-19,

- 15 2019.

Castellanni A (1967) Maintenance and cultivation of common pathogenic fungi of man in sterile distilled water. Further Researches. *J Trop Med Hyg*, 70:181.

CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility test for yeasts. Approved Standard, Third

- 20 Edition. CLSI document M7-A3, v. 28, n. 14, 25p., 2008

Davis DA (2009) How human pathogenic fungi sense and adapt to pH: the link to virulence.

Curr Opin Microbiol 12:365–370. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2009.05.006>

de Menezes, G. C., Amorim, S. S., Gonçalves, V. N., Godinho, V. M., Simões, J. C., Rosa, C.

A., & Rosa, L. H. (2019). Diversity, Distribution, and Ecology of Fungi in the Seasonal Snow

- 25 of Antarctica. *Microorganisms*, 7(10), 445.

- Donohue M, Wei W, Wu J, Zawia NH, Hud N, De Jesus V, et al. Characterization of nigerlysin, hemolysin produced by *Aspergillus niger*, and effect on mouse neuronal cells in vitro. *Toxicology* 2006; 219:50–5.
- Elster, Josef et al. Polar and Alpine Microbiology—earth's cryobiosphere. *FEMS microbiology ecology*, v. 93, n. 1, 2017.
- Ferreira, E. M. S., de Sousa, F. M. P., Rosa, L. H., & Pimenta, R. S. (2019). Taxonomy and richness of yeasts associated with angiosperms, bryophytes, and meltwater biofilms collected in the Antarctic Peninsula. *Extremophiles*, 23(1), 151-159.
- French H.M. (1996). *The Periglacial Environment*, 2nd edn. Longmans, Essex.
- 10 Frisvad, J. C., & Larsen, T. O. (2016). Extrolites of *Aspergillus fumigatus* and other pathogenic species in *Aspergillus* section Fumigati. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1485.
- Geltner, C., Lass-Flörl, C., Bonatti, H., Müller, L., & Stelzmüller, I. (2013). Invasive pulmonary mycosis due to *Penicillium chrysogenum*: a new invasive pathogen. *Transplantation*, 95(4), e21-e23.
- 15 Ghebremedhin, B., Bluemel, A., Neumann, K. H., Koenig, B., & Koenig, W. (2009). Peritonitis due to *Neosartorya pseudofischeri* in an elderly patient undergoing peritoneal dialysis successfully treated with voriconazole. *Journal of medical microbiology*, 58(5), 678-682.
- Ghorbel, D., Hadrich, I., Neji, S., Trabelsi, H., Belaaj, H., Sellami, H., ... & Ayadi, A. (2019).
20 Detection of virulence factors and antifungal susceptibility of human and avian *Aspergillus flavus* isolates. *Journal de Mycologie Médicale*, 29(4), 292-302.
- Glass NL, Donaldson GC (1995) Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous Ascomycetes. *Appl Environ Microbiol* 61:1323-1330

- Godinho, V. M., Furbino, L. E., Santiago, I. F., Pellizzari, F. M., Yokoya, N. S., Pupo, D., Gomes, E. C. Q., Figueredo, H. M., de Oliveira, F. S., Schaefer, C. E. G. R., Michel, R. F., Rosa, C. A., & Rosa, L. H. (2019). Fungi Present in Soils of Antarctica. In *Fungi of Antarctica* (pp. 43-67). Springer, Cham.
- 5 Gonçalves, V. N., Oliveira, F. S., Carvalho, C. R., Schaefer, C. E., Rosa, C. A., & Rosa, L. H. (2017). Antarctic rocks from continental Antarctica as source of potential human opportunistic fungi. *Extremophiles*, 21(5), 851-860.
- Guarro, J., Kallas, E. G., Godoy, P., Karenina, A., Gené, J., Stchigel, A., & Colombo, A. L. (2002). Cerebral aspergillosis caused by *Neosartorya hiratsukae*, Brazil. *Emerging infectious*
- 10 *diseases*, 8(9), 989.
- Guglielmin, Mauro; Cannone, Nicoletta. A permafrost warming in a cooling Antarctica? *Climatic Change*, v. 111, n. 2, p. 177-195, 2012.
- Hof, C., Araújo, M. B., Jetz, W., & Rahbek, C. (2011). Additive threats from pathogens, climate and land-use change for global amphibian diversity. *Nature*, 480 (7378), 516-519.
- 15 Houbraken J, de Vries RP, Samson RA. Modern taxonomy of biotechnologically important *Aspergillus* and *Penicillium* species. In: Sariaslani S, Gadd GM (ed.) *Adv Appl Microbiol*. San Diego: Academic Press, 2014, 199-249.
- Järv, H., Lehtmaa, J., Summerbell, R. C., Hoekstra, E. S., Samson, R. A., & Naaber, P. (2004). Isolation of *Neosartorya pseudofischeri* from blood: first hint of pulmonary
- 20 aspergillosis. *Journal of clinical microbiology*, 42(2), 925-928.
- Kochkina, Galina et al. Ancient fungi in Antarctic permafrost environments. *FEMS microbiology ecology*, v. 82, n. 2, p. 501-509, 2012.
- Koehler, P., Cornely, O. A., Böttiger, B. W., Dusse, F., Eichenauer, D. A., Fuchs, F., Rybniker, J. (2020). COVID-19 Associated Pulmonary Aspergillosis. *Mycoses*.

- Koutroutsos K, Arabatzis M, Bougatsos G, Xanthaki A, Toutouza M, Velegraki A.
Neosartorya hiratsukae peritonitis through continuous ambulatory peritoneal dialysis. J Med Microbiol. 2010;59(Pt 7):862–5. doi:10.1099/jmm.0.019133-0
- Kurtzman CP and Robnett CJ (1998) Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. Antonie van Leeuwenhoek, 73: 331-371. <https://doi.org/10.1023/A:1001761008817>
- Lachance, M. A., Bowles, J. M., Starmer, W. T., & Barker, J. S. F. (1999). *Kodamaea kakaduensis* and *Candida tolerans*, two new ascomycetous yeast species from Australian Hibiscus flowers. Canadian journal of microbiology, 45(2), 172-177.
- 10 Lee, J. R., Raymond, B., Bracegirdle, T. J., Chades, I., Fuller, R. A., Shaw, J. D., & Terauds, A. (2017). Climate change drives expansion of Antarctic ice-free habitat. Nature, 547(7661), 49-54.
- Legendre, M., Lartigue, A., Bertaux, L., Jeudy, S., Bartoli, J., Lescot, M., ... & Shmakova, L. (2015). In-depth study of Mollivirus sibericum, a new 30,000-y-old giant virus infecting
 15 Acanthamoeba. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(38), E5327-E5335.
- Lulakova, P., Perez Mon, C., Šantrůčková, H., Růthi, J., & Frey, B. W. (2019). High-Alpine Permafrost and Active-Layer Soil Microbiomes Differ in Their Response to Elevated Temperatures. *Frontiers in microbiology*, 10, 668.
- Luo, Gang; Samaranayake, Lakshman P.; Yau, Joyce YY. *Candida* species exhibit
 20 differential in vitro hemolytic activities. *Journal of clinical microbiology*, v. 39, n. 8, p. 2971-2974, 2001.
- Lyratzopoulos, G., Ellis, M., Nerringer, R., & Denning, D. W. (2002). Invasive infection due to *Penicillium* species other than *P. marneffei*. *Journal of Infection*, 45(3), 184-195.
- Maeder, M. et al. Aortic homograft endocarditis caused by *Rhodotorula mucilaginosa*.
 25 *Infection*, v. 31, n. 3, p. 181-183, 2003.

Malkus A et al (2006) RNA polymerase II gene (RPB2) encoding the second largest protein subunit in *Phaeosphaeria nodorum* and *P. avenaria*. *Mycol Res* 110:1152-1164

<https://doi.org/10.1016/j.mycres.2006.07.015>.

Margesin, R., & Collins, T. (2019). Microbial ecology of the cryosphere (glacial and
5 permafrost habitats): current knowledge. *Applied microbiology and biotechnology*, 103(6),
2537-2549.

Maxwell, J. Barrie; Barrie, Leonard A. Atmospheric and climatic change in the Arctic and Antarctic. *Ambio*, p. 42-49, 1989.

Mortezaee, V., Asadi Shahi Saraee, S., Ghazanfari, M., Ashrafi Khozani, M., Maleki, M., &
10 Hedayati, M. T. (2020). Invasive Aspergillosis in COVID-19: A Review Study and
Recommendations for Diagnostic Approaches. *Journal of Mazandaran University of Medical
Sciences*, 30(184), 169-178.

Nikrad, M. P., Kerkhof, L. J., & Häggblom, M. M. (2016). The subzero microbiome:
microbial activity in frozen and thawing soils. *FEMS microbiology ecology*, 92(6), fiw081.

15 Price, Margaret F.; WILKINSON, Ian D.; GENTRY, Layne O. Plate method for detection of
phospholipase activity in *Candida albicans*. *Sabouraudia: Journal of Medical and Veterinary
Mycology*, v. 20, n. 1, p. 7-14, 1982.

Ramos, M. et al. Recent shallowing of the thaw depth at Crater Lake, Deception Island,
Antarctica (2006–2014). *Catena*, v. 149, p. 519-528, 2017.

20 Revich, B. A., & Podolnaya, M. A. (2011). Thawing of permafrost may disturb historic cattle
burial grounds in East Siberia. *Global health action*, 4(1), 8482.

Robinson, Clare H. Cold adaptation in Arctic and Antarctic fungi. *New phytologist*, v. 151, n.
2, p. 341-353, 2001.

Rosa, L. H. (Ed.). (2019). *Fungi of Antarctica: Diversity, Ecology and Biotechnological
25 Applications*. Springer.

- Rosa, LH, Vaz AB, Caligiorne RB, Campolina S, Rosa,CA (2009) Endophytic fungi associated with the Antarctic grass *Deschampsia antarctica* Desv.(Poaceae). *Polar Biol* 32:161-167. <https://doi.org/10.1007/s00300-008-0515-z>
- Seyedmousavi, S., Guillot, J., Arné, P., De Hoog, G. S., Mouton, J. W., Melchers, W. J., & Verweij, P. E. (2015). *Aspergillus* and aspergilloses in wild and domestic animals: a global health concern with parallels to human disease. *Medical Mycology*, 53(8), 765-797.
- Thomson, P., López-Fernández, L., Guarro, J., & Capilla, J. (2017). Virulence and antifungal therapy of murine disseminated infection by *Rhodotorula mucilaginosa*. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 89(1), 47-51.
- 10 Tomsikova, A. (2002). Risk of fungal infection from foods, particularly in immunocompromised patients. *Epidemiologie, mikrobiologie, imunologie: casopis Spolecnosti pro epidemiologii a mikrobiologii Ceske lekarske spolecnosti JE Purkyne*, 51(2), 78-81.
- Tsang CC, Tang J, Lau S, Woo P, 2018. Taxonomy and evolution of *Aspergillus*, *Penicillium* and *Talaromyces* in the omics era - Past, present and future. *Comput Struct Biotechnol J* 16:197-210.
- 15 Vaz AB, Rosa LH, Vieira ML, Garcia VD, Brandão LR, Teixeira LC, Rosa CA (2011) The diversity, extracellular enzymatic activities and photoprotective compounds of yeasts isolated in Antarctica. *Brazilian J Microbiol* 42:937–947
- 20 Vorobyova, E., Soina, V., Gorlenko, M., Minkovskaya, N., Zalinova, N., Mamukelashvili, A., ... & Vishnivetskaya, T. (1997). The deep cold biosphere: facts and hypothesis. *FEMS Microbiology Reviews*, 20(3-4), 277-290.
- White TJ, Bruns T, Lee SJWT, Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ

(eds) PCR protocols: a guide to methods and applications. Academic Press, New York, 18:315-322.

Wirth, F., & Goldani, L. Z. (2012). Epidemiology of *Rhodotorula*: an emerging pathogen. Interdisciplinary perspectives on infectious diseases, 2012.

- 5 Xue, Y., Jonassen, I., Øvreås, L., & Taş, N. (2020). Metagenome-assembled genome distribution and key functionality highlight importance of aerobic metabolism in Svalbard permafrost. FEMS Microbiology Ecology, 96(5), fiae057.

6. DISCUSSÃO INTEGRADA

Por ser um fenômeno estritamente térmico, a ocorrência do *permafrost* é condicionada ao congelamento do solo por anos consecutivos, diferente da sua camada sobreposta (a camada ativa), a qual todos os anos passa pelo processo de congelamento e descongelamento (COWAN & TOW, 2004; RUISI et al., 2007). O *permafrost* é comum em ambientes polares e estimativas apontam que 17-25% da área terrestre global possuem *permafrost* subjacente (BOCKHEIM et al., 2013; JANSSON & TAŞ, 2014). Mesmo com baixa disponibilidade de água, nutrientes e outros fatores considerados extremos a vida, diferentes comunidades microbianas estão presentes no *permafrost* (JANSSON & TAŞ, 2014).

No presente trabalho foi possível caracterizar a diversidade de fungos em *permafrost* de diferentes ilhas da Península Antártica. Como esperado, a maior parte da diversidade de fungos já registrada neste ambiente foi composta por táxons capazes de produzir conídios, possivelmente representando um estado de dormência destes fungos, que pode os permitir sobreviver por um longo tempo neste micro-habitat congelado (OZERSKAYA et al., 2009).

De forma geral, entre os isolados obtidos por técnicas dependentes de cultivo, a maior parte foi composta por fungos psicrófilos (isolados a 10 °C), mesófilos (isolados entre 25 e 37 °C) e termófilos (resistentes a ≥ 45 °C), respectivamente. Ao total foram identificados 27 táxons (entre os isolados a 10 e 25 °C) e apenas *Oidiodendron* sp., *Mortierella* sp. e *Aspergillus sydowii* já foram relatados para amostras de *permafrost* da Antártica nos trabalhos de Gilichinsky et al. (2007) e Kochkina et al. (2012).

Ascomycota foi o filo mais dominante (em ambas as técnicas utilizadas) e, de fato, parece se apresentar como o filo mais abundante na Antártica (RUISI et al. 2007; ROSA, 2019). Em contrapartida, apenas a levedura *Mrakia blollopis* (*Basidiomycota*) foi encontrada nos isolamentos a 10 e 25 °C, enquanto *Rhodotorula* cf. *mucilaginosa* foi a única isolada a 37 °C. Mesmo já relatadas em ambientes alpinos e polares, entre solos e sedimentos de lago (DI MENNA, 1966; XIN & ZHOU 2007; SUJI et al. 2013; TSUJI 2016; GOMES et al. 2018), este foi o primeiro relato de isolamento em *permafrost* de ambas leveduras. Provavelmente, habitats como sedimentos de lagos, neve e água oferecerem condições favoráveis para o estabelecimento e crescimento de leveduras em comparação com o *permafrost*, principalmente, devido à baixa disponibilidade de água e nutrientes neste ambiente (DA SILVA et al., 2020).

Os táxons *Oidiodendron truncatum*, *Penicillium* spp. e *Pseudogymnoascus destructans* foram detectados com as maiores densidades nas amostras de *permafrost*. Esses três táxons já foram relatados em diferentes substratos na Antártica como talos de líquens, gelo, solo, entre

outros (ROSA, 2019). *Pseudogymnoascus destructans* (= *Geomyces destructans*), detectado tanto no *permafrost* como em camada ativa, é um fungo patogênico que causa infecção ativa em populações de morcegos em todo o mundo, causando a síndrome do nariz branco (LORCH et al. 2013). Este é o primeiro relato da presença de *P. destructans* em amostras de *permafrost* e que reforça a necessidade de mais estudos para o conhecimento de fungos oportunistas presentes no *permafrost* antártico.

Por outro lado, as amostras de camada ativa apresentaram os táxons *Pseudeurotium* sp. 1, *Helotiales* sp. 4, *Bionectriaceae* sp. e *Mortierellaceae* sp. 1 com as maiores densidades, demonstrando claramente a diferença entre a estrutura da comunidade fúngica presente nestes substratos. Em nosso estudo, a espécie aparentemente mais próxima de *Helotiales* foi *Glarea lozoyensis*, gênero com apenas uma espécie descrita, a qual é reportada como produtora da pneumocandina B₀, molécula precursora do antifúngico caspofungina (CANCIDAS™) (MORRISON, 2006; PELÁEZ et al. 2011). Devido à sua baixa semelhança com sequências conhecidas depositadas no banco de dados do *GenBank*, os isolados de *Helotiales* encontrados podem representar um novo gênero relacionado a *Glarea*.

Entre todos os táxons encontrados, em ambas as técnicas empregadas, ressalta-se a abundância de diferentes espécies do gênero *Mortierella*. Os contínuos relatos de sua presença em diferentes habitats na Antártica mostram que este parece ser, além de regular, um gênero importante neste continente, o qual pode estar relacionado à ciclagem de nutrientes do solo (ROSA, 2019). Algumas espécies deste gênero já foram relatadas pela capacidade de crescer e formar esporos a 0 °C (ONOFRI et al. 2004; FURBINO et al. 2014), justificando sua presença em ambientes polares. De fato, as espécies do gênero *Mortierella* são amplamente distribuídas no solo (WERNER et al., 2016). *Mortierella parvispora*, por exemplo, é abundante na comunidade do solo e ocorre na forma de hifas (PENGRÁ et al., 1969), a qual também foi detectada neste trabalho, tanto no *permafrost* quanto na camada ativa amostrados.

Nas análises por meio de métodos independentes de cultivo foi possível detectar um elevado número de famílias e gêneros, muitos como primeiro registro para o *permafrost* antártico. Até então, apenas representantes dos filos *Ascomycota*, *Basidiomycota* e *Mortierellomycota* tinham sido relatados em amostras de *permafrost* antártico (DA SILVA et al., 2020). Já nesse estudo foi possível reportar a presença de táxons pertencentes à *Chytridiomycota*, *Rozellomycota*, *Calcarisporiellomycota* e *Zoopagomycota*. Os filos *Chytridiomycota* e *Rozellomycota* são considerados raros e até, o momento, pouco conhecidos na Antártica. Talvez sejam necessários métodos específicos para recuperá-los, como o uso de iscas para sua captura (ROSA et al., 2020). Nesse estudo foram detectados fungos

pertencentes a 110 famílias ainda não reportadas no *permafrost* antártico, além das 32 já descritas previamente (KOCHKINA et al., 2001; GILICHINSKY et al., 2007; KOCHKINA et al., 2012; ZUCCONI et al., 2012; GOORDIAL et al., 2016; GOORDIAL et al., 2017).

Além de analisarmos a composição e diversidade da comunidade em si, os níveis tróficos também foram observados. O reino fúngico compreende uma ampla gama de estratégias de vida que vão desde saprófitos, passando por mutualismo e parasitismo, embora muitos gêneros contenham mais de uma estratégia trófica (NILSSON et al. 2019). Como esperado para o solo, a maioria das ASVs estava ligada a fungos saprófitos. Estes têm um amplo conjunto de características funcionais frequentemente associadas a processos de ciclagem biogeoquímica, tornando-se os principais decompositores de C nos ecossistemas (TALBOT et al., 2015; CECI et al., 2019). Além disso, Newsham et al. (2018) mostraram que alguns táxons de fungos saprófitos (principalmente da ordem *Helotiales*) metabolizam carbono de diferentes idades que ocorrem nos solos antárticos, os quais podem ser responsáveis pela fixação do carbono mais antigo no solo.

Os patógenos (relacionados a processos patogênicos) obtêm carbono orgânico ao prejudicar as células hospedeiras e podem causar doenças em plantas e animais em todos os ecossistemas (TALBOT et al., 2015). Este é um resultado interessante porque mostra que grande parte dos fungos dessas comunidades pode ter relações ecológicas desarmoniosas com animais e plantas. Foi possível perceber que os patógenos de plantas e animais representam grande parte desta comunidade e são de grande importância devido ao papel que desempenham no controle de outros níveis tróficos no ecossistema (FODOR, 2011; WUTKOWSKA et al., 2019). A presença de táxons que são geralmente isolados de material vegetal e/ou aparecem como fitopatógenos (por exemplo, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Oidiodendron*, *Montagnula*) é concebível devido ao fato de que substratos vegetais ou seus derivados são crioprotetores naturais, o que lhes permite fornecer condições vantajosas aos micro-organismos quando os sedimentos congelam (OZERSKAYA et al. 2009).

Também foi possível o isolamento de fungos mesófilos a 37 °C, onde observamos a presença de táxons com potencial patogênico *in vitro* para mamíferos e humanos. Após diferentes ensaios *in vitro*, os isolados de *Rhodotorula* cf. *mucilaginosa*, *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp. apresentaram diferentes fatores de virulência. *Rhodotorula* cf. *mucilaginosa* é a espécie mais prevalente dentro do seu gênero e reconhecida nas últimas duas décadas como um patógeno emergente, especialmente em pacientes imunocomprometidos (MAEDER et al. 2003; THOMSON et al. 2017). Isolados de *R. mucilaginosa* recuperados de neve sazonal da Antártica mostraram resistência ao fluconazol (DE MENEZES et al. 2019), uma

descoberta importante, uma vez que muitos turistas e pesquisadores têm o hábito de usar neve derretida para beber e tomar banho, o que poderia levar a um processo de contaminação. No presente trabalho, além de resistência ao fluconazol estes isolados também apresentaram resistência ao itraconazol e anfotericina B.

- 5 As espécies de *Aspergillus* são fungos sapróbios comumente encontrados no solo em todo o mundo (GAMS, 2007). No entanto, algumas espécies são capazes de causar doenças fatais em humanos, animais domésticos e silvestres, além de respostas alérgicas aos conídios inalados (SEYEDMOUSAVI et al. 2015). *Aspergillus hiratsukae* (= *Neosartorya hiratsukae*) e *A. thermomutatus* (= *Neosartorya pseudofischeri*) estão entre as espécies de *Aspergillus* da
- 10 seção *Fumigati* que são reconhecidas como patogênicas (FRISVAD & LARSEN 2016). Ambas as espécies são relatadas por causarem aspergilose, peritonite e outras doenças (GUARRO et al. 2002; JÄRV et al. 2004; ALCAZAR-FUOLI et al. 2008; GHEBREMEDHIN et al. 2009; KOUTROUTSOS et al. 2010;). Além disso, estudos recentes
- 15 mostraram que *Aspergillus* está conectado à coinfeção fúngica em pacientes com COVID-19 (ALANIO et al. 2020; KOEHLER et al. 2020; MORTEZAEI et al. 2020).

7. CONCLUSÕES

- 5 » O *permafrost* e camada ativa Antártica são moderadamente ricos em fungos que estão viáveis ao longo das ilhas Shetland do Sul. Foi observada uma maior diferença de diversidade entre ilhas e não entre substratos;
- » As espécies encontradas vão desde táxons com potencial patogênico a espécies de interesse biotecnológico. São fungos cosmopolitas, adaptados ao frio e provavelmente endêmicos e lançam luz sobre as estratégias adaptativas para sobrevivência em ambientes congelados;
- 10 » O *permafrost* e a camada ativa da Antártica abrigam uma grande quantidade de possíveis novas espécies;
- » A detecção de fungos viáveis como *P. destructans* presos no *permafrost* merece maiores estudos da extensão da diversidade fúngica e as capacidades desses fungos de se dispersarem do *permafrost* para outros habitats da Antártica e fora dela.
- 15 » A análise de metabarcodes revelou a presença de uma diversa riqueza fúngica, compreendendo táxons com múltiplos papéis ecológicos como saprófitos, mutualistas e parasitas e que não foram detectados por técnicas de cultivo. Porém, mais estudos são necessários para confirmar se os patógenos detectados seriam viáveis em caso de derretimento do *permafrost*.
- 20 » O *permafrost* e camada ativa da Antártica abrigam fungos que possuem diversos fatores de virulência, além de apresentarem resistência a diferentes fármacos. Foram encontradas espécies de *R. mucilaginosa* e *Aspergillus* spp., as quais já possuem relatos por serem patógenos oportunistas. Maiores estudos da estrutura da comunidade fúngica presentes nestes ambiente são necessários, visto que as mudanças climáticas globais podem liberar estes organismos de seus habitats atuais para outros ecossistemas.
- 25

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKTAS, E.; YIGIT, N. Hemolytic activity of dermatophytes species isolated from clinical specimens. **Journal de Mycologie Medicale**, v. 25, n. 1, p. e25-e30, 2015.
- 5 ALANIO, Alexandre et al. High prevalence of putative invasive pulmonary aspergillosis in critically ill COVID-19 patients. medRxiv, 2020.
- ALCAZAR-FUOLI, Laura et al. *Aspergillus* section Fumigati: antifungal susceptibility patterns and sequence-based identification. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 52, n. 4, p. 1244-1251, 2008.
- 10 AL-LAAEIBY, Ayat et al. Targeted disruption of melanin biosynthesis genes in the human pathogenic fungus *Lomentospora prolificans* and its consequences for pathogen survival. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 4, p. 444, 2016.
- ALVES, Isabel MS et al. The diversity, distribution, and pathogenic potential of cultivable fungi present in rocks from the South Shetlands archipelago, Maritime Antarctica.
- 15 **Extremophiles**, v. 23, n. 3, p. 327-336, 2019.
- AOKI, Shigeji et al. Comparative pathogenicity of a wild-type strain and respiratory mutants of *Candida albicans* in mice. **Zentralblatt für Bakteriologie**, v. 273, n. 3, p. 332-343, 1990.
- BANERJEE, Rajarshi; HALDER, Arpita; NATTA, Ashima. Psychrophilic microorganisms: Habitats and exploitation potentials. **Europe Journal Biotechnology and Bioscience**, v. 4, p. 16-24, 2016.
- 20 BARKER, Peter F.; DIEKMANN, Bernhard; ESCUTIA, Carlota. Onset of Cenozoic Antarctic glaciation. **Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography**, v. 54, n. 21-22, p. 2293-2307, 2007.
- 25 BARKER, Peter F.; THOMAS, E. Origin, signature and palaeoclimatic influence of the Antarctic Circumpolar Current. **Earth-Science Reviews**, v. 66, n. 1-2, p. 143-162, 2004.
- BERNARDIS, Flavia De et al. Evidence for a role for secreted aspartate proteinase of *Candida albicans* in vulvovaginal candidiasis. **Journal of Infectious Diseases**, v. 161, n. 6, p. 1276-1283, 1990.
- 30 BILLS, Gerald F. et al. Reclassification of a pneumocandin-producing anamorph, *Glarea lozoyensis* gen. et sp. nov., previously identified as *Zalerion arboricola*. **Mycological Research**, v. 103, n. 2, p. 179-192, 1999.
- BISKABORN, Boris K. et al. Permafrost is warming at a global scale. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, p. 1-11, 2019.

- BLACKWELL, Meredith. The Fungi: 1, 2, 3... 5.1 million species?. **American Journal of Botany**, v. 98, n. 3, p. 426-438, 2011.
- BOCKHEIM, J. et al. Climate warming and permafrost dynamics in the Antarctic Peninsula region. **Global and Planetary Change**, v. 100, p. 215-223, 2013.
- 5 BOCKHEIM, James G.; HALL, Kevin J. Permafrost, active-layer dynamics and periglacial environments of continental Antarctica: periglacial and permafrost research in the Southern Hemisphere. **South African Journal of Science**, v. 98, n. 1-2, p. 82-90, 2002.
- BRAKHAGE, Axel A. et al. Interaction of phagocytes with filamentous fungi. **Current Opinion in Microbiology**, v. 13, n. 4, p. 409-415, 2010.
- 10 BROWN, Gordon D. et al. Hidden killers: human fungal infections. **Science Translational Medicine**, v. 4, n. 165, p. 165rv13-165rv13, 2012.
- BRUNKE, Sascha et al. Virulence factors in fungal pathogens of man. **Current Opinion in Microbiology**, v. 32, p. 89-95, 2016.
- BUXTON, Rebecca. Blood agar plates and hemolysis protocols. **American Society for**
- 15 **Microbiology**, 2005.
- BUZZINI, Pietro 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.
- CALLAHAN, Benjamin J. et al. DADA2: high-resolution sample inference from Illumina
- 20 amplicon data. **Nature Methods**, v. 13, n. 7, p. 581-583, 2016.
- CALLAHAN, Benjamin J.; MCMURDIE, Paul J.; HOLMES, Susan P. Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis. **The ISME Journal**, v. 11, n. 12, p. 2639-2643, 2017.
- CAPORASO, J. Gregory et al. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the
- 25 Illumina HiSeq and MiSeq platforms. **The ISME Journal**, v. 6, n. 8, p. 1621-1624, 2012.
- CARRASCO, Mario 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.
- CASADEVALL, Arturo et al. The ‘amoeboid predator-fungal animal virulence’ hypothesis.
- 30 **Journal of Fungi**, v. 5, n. 1, p. 10, 2019a.
- CASADEVALL, Arturo. Determinants of virulence in the pathogenic fungi. **Fungal Biology Reviews**, v. 21, n. 4, p. 130-132, 2007.

- CASADEVALL, Arturo; KONTOYIANNIS, Dimitrios P.; ROBERT, Vincent. On the emergence of *Candida auris*: climate change, azoles, swamps, and birds. **MBio**, v. 10, n. 4, p. e01397-19, 2019b.
- CASADEVALL, Arturo; PIROFSKI, Liise-anne. Host-pathogen interactions: basic concepts
5 of microbial commensalism, colonization, infection, and disease. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 12, p. 6511-6518, 2000.
- CASTELLANI, A. Maintenance and cultivation of common pathogenic fungi in distilled water. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 42, p. 181-184, 1967.
- 10 CECI, Andrea et al. Roles of saprotrophic fungi in biodegradation or transformation of organic and inorganic pollutants in co-contaminated sites. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 103, n. 1, p. 53-68, 2019.
- CHOWN, Steven L. et al. The changing form of Antarctic biodiversity. **Nature**, v. 522, n. 7557, p. 431-438, 2015.
- 15 COLWELL, Robert K.; MAO, Chang Xuan; CHANG, Jing. Interpolating, extrapolating, and comparing incidence-based species accumulation curves. **Ecology**, v. 85, n. 10, p. 2717-2727, 2004.
- CONVEY P. Biogeography In: Riffenburgh B. (Ed) **Encyclopledia of the Antarctic**. New York: Routledge Taylor & Francis Group, p. 156-160, 2007.
- 20 CONVEY, Peter et al. The spatial structure of Antarctic biodiversity. **Ecological Monographs**, v. 84, n. 2, p. 203-244, 2014.
- COONEY, Nicole M.; KLEIN, Bruce S. Fungal adaptation to the mammalian host: it is a new world, after all. **Current Opinion in Microbiology**, v. 11, n. 6, p. 511-516, 2008.
- COWAN, Don A.; TOW, Lemese Ah. Endangered antarctic environments. **Annual Review of Microbiology**, v. 58, p. 649-690, 2004.
- 25 CULMO RF, Swanson KJ, Brennan WP. Application of the PE 2400 CHN and PE 2410 N for soils. Perkin-Elmer Publication EAN30, Norwalk, 1989.
- CZECHOWSKI, Paul et al. Antarctic eukaryotic soil diversity of the Prince Charles Mountains revealed by high-throughput sequencing. **Soil Biology and Biochemistry**, v.
30 95, p. 112-121, 2016.
- DA SILVA, Tamar Holanda et al. Diversity and ecology of fungi present in permafrost of South Shetland Archipelago, Antarctic Peninsula. *In press*, 2020.

- DA SILVA, Thamar Holanda et al. Diversity, distribution, and ecology of viable fungi in permafrost and active layer of Maritime Antarctica. **Extremophiles**, v. 24, p. 565–576, 2019.
- 5 D'AMICO, Salvino et al. Psychrophilic microorganisms: challenges for life. **EMBO Reports**, v. 7, n. 4, p. 385-389, 2006.
- DAVIS, Dana A. How human pathogenic fungi sense and adapt to pH: the link to virulence. **Current Opinion in Microbiology**, v. 12, n. 4, p. 365-370, 2009.
- DE BEECK, Michiel Op et al. Comparison and validation of some ITS primer pairs useful for fungal metabarcoding studies. **PloS One**, v. 9, n. 6, p. e97629, 2014.
- 10 DE MENEZES, Graciéle CA et al. Diversity, Distribution, and Ecology of Fungi in the Seasonal Snow of Antarctica. **Microorganisms**, v. 7, n. 10, p. 445, 2019.
- DI MENNA, Margaret E. Yeasts in Antarctic soils. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 32, n. 1, p. 29-38, 1966.
- DREES, Kevin P. et al. Phylogenetics of a fungal invasion: origins and widespread dispersal
15 of white-nose syndrome. **MBio**, v. 8, n. 6, 2017.
- DREESSENS, Lisa L.; LEE, Charles K.; CARY, S. Craig. The distribution and identity of edaphic fungi in the McMurdo Dry Valleys. **Biology**, v. 3, n. 3, p. 466-483, 2014.
- DUARTE, Alysson; CENTURION, Victor; OLIVEIRA, Valéria. Uncultivated Fungi from Antarctica. In: **Fungi of Antarctica**. Springer, Cham, p. 19-41, 2019.
- 20 ELSTER, Josef et al. Polar and Alpine Microbiology—earth's cryobiosphere. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 93, n. 1, 2017.
- EMBRAPA, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. **Manual métodos de análise de solo**, Rio de Janeiro, p 212, 1997.
- FERREIRA, Gabriella Freitas et al. The role of oxidative and nitrosative bursts caused by
25 azoles and amphotericin B against the fungal pathogen *Cryptococcus gattii*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. 8, p. 1801-1811, 2013.
- FERREIRA-PAIM, Kennio et al. Antifungal susceptibility, enzymatic activity, PCR-fingerprinting and ITS sequencing of environmental *Cryptococcus laurentii* isolates from Uberaba, Minas Gerais, Brazil. **Mycopathologia**, v. 174, n. 1, p. 41-52, 2012.
- 30 FISHER, Matthew C. et al. Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. **Nature**, v. 484, n. 7393, p. 186-194, 2012.
- FODOR, Ecaterina. Ecological niche of plant pathogens. **Annals of Forest Research**, v. 54, n. 1, p. 3-21, 2011.

- FRĄC, Magdalena et al. Fungal biodiversity and their role in soil health. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 707, 2018.
- FRASER, Ceridwen I. et al. Antarctica's ecological isolation will be broken by storm-driven dispersal and warming. **Nature climate change**, v. 8, n. 8, p. 704-708, 2018.
- 5 FRISVAD, Jens C.; LARSEN, Thomas O. Extrolites of *Aspergillus fumigatus* and other pathogenic species in *Aspergillus* section Fumigati. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 1485, 2016.
- FURBINO, Laura E. et al. Diversity patterns, ecology and biological activities of fungal communities associated with the endemic macroalgae across the Antarctic Peninsula.
- 10 **Microbial ecology**, v. 67, n. 4, p. 775-787, 2014.
- FURLANETO, Márcia C. et al. How much do we know about hemolytic capability of pathogenic *Candida* species? **Folia Microbiologica**, v. 63, n. 4, p. 405-412, 2018.
- GAMS, Walter. Biodiversity of soil-inhabiting fungi. **Biodiversity and conservation**, v. 16, n. 1, p. 69-72, 2007.
- 15 GARCIA-SOLACHE, Monica A.; CASADEVALL, Arturo. Global warming will bring new fungal diseases for mammals. **MBio**, v. 1, n. 1, 2010.
- GHANNOUM, Mahmoud A. Extracellular phospholipases as universal virulence factor in pathogenic fungi. **Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi**, v. 39, n. 2, p. 55-59, 1998.
- GHANNOUM, Mahmoud A. Potential role of phospholipases in virulence and fungal
- 20 pathogenesis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 13, n. 1, p. 122-143, 2000.
- GHEBREMEDHIN, B. et al. Peritonitis due to *Neosartorya pseudofischeri* in an elderly patient undergoing peritoneal dialysis successfully treated with voriconazole. **Journal of medical microbiology**, v. 58, n. 5, p. 678-682, 2009.
- GHORBEL, D. et al. Detection of virulence factors and antifungal susceptibility of human
- 25 and avian *Aspergillus flavus* isolates. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 29, n. 4, p. 292-302, 2019.
- GILICHINSKY, D. A. et al. Microbial populations in Antarctic permafrost: biodiversity, state, age, and implication for astrobiology. **Astrobiology**, v. 7, n. 2, p. 275-311, 2007.
- GLASS, N. Louise; DONALDSON, Gary C. Development of primer sets designed for use
- 30 with the PCR to amplify conserved genes from filamentous Ascomycetes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 4, p. 1323-1330, 1995.
- GOMES, Eldon CQ 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, Vivian 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.
- 5 GOORDIAL, Jacqueline et al. Comparative activity and functional ecology of permafrost soils and lithic niches in a hyper-arid polar desert. **Environmental Microbiology**, v. 19, n. 2, p. 443-458, 2017.
- GOORDIAL, Jacqueline et al. Nearing the cold-arid limits of microbial life in permafrost of an upper Dry Valley, Antarctica. **The ISME Journal**, v. 10, n. 7, p. 1613, 2016.
- GOORDIAL, Jacqueline; WHYTE, Lyle. Microbial life in Antarctic permafrost environments. In: **Antarctic Terrestrial Microbiology**. Springer, Berlin, Heidelberg, p. 217-232. 2014.
- 10 GOSTINČAR, Cene; GRUBE, Martin; GUNDE-CIMERMAN, Nina. Evolution of fungal pathogens in domestic environments? **Fungal Biology**, v. 115, n. 10, p. 1008-1018, 2011.
- GRUPE, Arthur C.; QUANDT, C. Alisha. A growing pandemic: A review of *Nosema* parasites in globally distributed domesticated and native bees. **PLoS pathogens**, v. 16, n. 6, p. e1008580, 2020.
- 15 GUARRO, Josep et al. Cerebral aspergillosis caused by *Neosartorya hiratsukae*, Brazil. **Emerging infectious diseases**, v. 8, n. 9, p. 989, 2002.
- GUGLIELMIN, Mauro; CANNONE, Nicoletta. A permafrost warming in a cooling Antarctica? **Climatic Change**, v. 111, n. 2, p. 177-195, 2012.
- 20 HAMMER, Øyvind; HARPER, D. A. T.; RYAN, P. D. PAST-palaeontological statistics, ver. 1.89. **Palaeontol Electron**, v. 4, n. 1, p. 1-9, 2001.
- HOFER, Ursula. *Candida auris* potential link to climate change. **Nature Reviews Microbiology**, v. 17, n. 10, p. 588-588, 2019.
- 25 HOUBRAKEN, J. et al. New penicillin-producing *Penicillium* species and an overview of section Chrysogena. **Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, v. 29, p. 78, 2012.
- HULTMAN, Jenni et al. Multi-omics of permafrost, active layer and thermokarst bog soil microbiomes. **Nature**, v. 521, n. 7551, p. 208, 2015.
- 30 JANSSON, Janet K.; HOFMOCKEL, Kirsten S. Soil microbiomes and climate change. **Nature Reviews Microbiology**, p. 1-12, 2019.
- JANSSON, Janet K.; TAŞ, Neslihan. The microbial ecology of permafrost. **Nature Reviews Microbiology**, v. 12, n. 6, p. 414, 2014.

- JÄRV, H. et al. Isolation of *Neosartorya pseudofischeri* from blood: first hint of pulmonary aspergillosis. **Journal of clinical microbiology**, v. 42, n. 2, p. 925-928, 2004.
- JOSHI, N.; SICKLE, F. J. A sliding-window, adaptive, quality-based trimming tool for FastQ files. 2011. (Version 1.33) [Software]. <https://github.com/najoshi/sickle>.
- 5 KIRK, P. M., et al. **Dictionary of the Fungi: CABI**. Wallingford, UK, 2008.
- KOCHKINA, G. A. et al. Fungal diversity in the Antarctic active layer. **Microbiology**, v. 83, n. 1-2, p. 94-101, 2014.
- KOCHKINA, G. A. et al. Survival of micromycetes and actinobacteria under conditions of long-term natural cryopreservation. **Microbiology**, v. 70, n. 3, p. 356-364, 2001.
- 10 KOCHKINA, Galina et al. Ancient fungi in Antarctic permafrost environments. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 82, n. 2, p. 501-509, 2012.
- KOEHLER, Philipp et al. COVID-19 associated pulmonary aspergillosis. **Mycoses**, v. 63, n. 6, p. 528-534, 2020.
- KÖLJALG, Urmas et al. Towards a unified paradigm for sequence-based identification of
15 fungi. **Molecular Ecology**, v. 22, n. 21, p. 5271-5277, 2013.
- KOUTROUTSOS, Konstantinos et al. *Neosartorya hiratsukae* peritonitis through continuous ambulatory peritoneal dialysis. **Journal of medical microbiology**, v. 59, n. 7, p. 862-865, 2010.
- KURTZMAN, Cletus P.; ROBNETT, Christie J. Identification and phylogeny of
20 Ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 73, n. 4, p. 331-371, 1998.
- LACHANCE, Marc-Andre 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.
- 25 LATGÉ, Jean-Paul. The pathobiology of *Aspergillus fumigatus*. **Trends in Microbiology**, v. 9, n. 8, p. 382-389, 2001.
- LEE, Jasmine R. et al. Climate change drives expansion of Antarctic ice-free habitat. **Nature**, v. 547, n. 7661, p. 49-54, 2017.
- LEGENDRE, Matthieu et al. Thirty-thousand-year-old distant relative of giant icosahedral
30 DNA viruses with a pandoravirus morphology. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 11, p. 4274-4279, 2014.
- LIECKFELDT, Elke; MEYER, Wieland; BÖRNER, Thomas. Rapid identification and differentiation of yeasts by DNA and PCR fingerprinting. **Journal of Basic Microbiology**, v. 33, n. 6, p. 413-425, 1993.

- LORCH, Jeffrey M. et al. A culture-based survey of fungi in soil from bat hibernacula in the eastern United States and its implications for detection of *Geomyces destructans*, the causal agent of bat white-nose syndrome. **Mycologia**, v. 105, n. 2, p. 237-252, 2013.
- LULÁKOVÁ, Petra et al. High-alpine permafrost and active-layer soil microbiomes differ in their response to elevated temperatures. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 668, 2019.
- 5 LUO, Gang; SAMARANAYAKE, Lakshman P.; YAU, Joyce YY. *Candida* species exhibit differential in vitro hemolytic activities. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 8, p. 2971-2974, 2001.
- MACELROY, Robert D. Some comments on the evolution of extremophiles. **Biosystems**, v. 10 6, n. 1, p. 74-75, 1974.
- MAEDER, M. et al. Aortic homograft endocarditis caused by *Rhodotorula mucilaginosa*. **Infection**, v. 31, n. 3, p. 181-183, 2003.
- MALKUS, Arkadiusz et al. RNA polymerase II gene (RPB2) encoding the second largest protein subunit in *Phaeosphaeria nodorum* and *P. avenaria*. **Mycological Research**, v. 15 110, n. 10, p. 1152-1164, 2006.
- MARGESIN, Rosa (Ed.). **Permafrost soils**. Springer Science & Business Media, 2008.
- MARGESIN, Rosa; COLLINS, Tony. Microbial ecology of the cryosphere (glacial and permafrost habitats): current knowledge. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, n. 6, p. 2537-2549, 2019.
- 20 MAXWELL, J. Barrie; BARRIE, Leonard A. Atmospheric and climatic change in the Arctic and Antarctic. **Ambio**, v. 18, n. 1, p. 42-49, 1989.
- MESSAN, Komi S. et al. The role of changing temperature in microbial metabolic processes during permafrost thaw. **PloS one**, v. 15, n. 4, p. e0232169, 2020.
- MOHANDAS, Vinitha; BALLAL, Mamatha. Distribution of *Candida* species in different clinical samples and their virulence: biofilm formation, proteinase and phospholipase production: a study on hospitalized patients in southern India. **Journal of Global Infectious Diseases**, v. 3, n. 1, p. 4, 2011.
- MORRISON, Vicki A. Echinocandin antifungals: review and update. **Expert review of anti-infective therapy**, v. 4, n. 2, p. 325-342, 2006.
- 30 MORTEZAEE, Vida et al. Invasive Aspergillosis in COVID-19: A Review Study and Recommendations for Diagnostic Approaches. **Journal of Mazandaran University of Medical Sciences**, v. 30, n. 184, p. 169-178, 2020.

- NAGLIK, Julian R.; CHALLACOMBE, Stephen J.; HUBE, Bernhard. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, n. 3, p. 400-428, 2003.
- NASA. Antarctic Sea Ice. Disponível em: <<https://earthobservatory.nasa.gov/features/SeaIce/page4.php>> 2016. Acesso em: 13/10/2020.
- NASA. What Is Antarctica? Disponível em: <<https://www.nasa.gov/audience/forstudents/5-8/features/nasa-knows/what-is-antarctica-58.html>> 2008. Acesso em: 04/07/2020.
- NASRI, Tuba et al. PCR-RFLP on β -tubulin gene for rapid identification of the most clinically important species of *Aspergillus*. **Journal of microbiological methods**, v. 117, p. 144-147, 2015.
- NEWSHAM, Kevin 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.
- NIKRAD, Mrinalini P.; KERKHOF, Lee J.; HÄGGBLÖM, Max M. The subzero microbiome: microbial activity in frozen and thawing soils. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 92, n. 6, p. fiw081, 2016.
- NILSSON, R. Henrik et al. Mycobiome diversity: high-throughput sequencing and identification of fungi. **Nature Reviews Microbiology**, v. 17, n. 2, p. 95-109, 2019.
- O'DONNELL, K. *Fusarium* and its near relatives. **The fungal holomorph: mitotic, meiotic and pleomorphic speciation in fungal systematics**. In: Reynolds DR, Taylor JW (eds) The fungal holomorph: mitotic, meiotic and pleomorphic speciation in fungal systematics. CAB International, Wallingford, p. 225–233, 1993.
- ONOFRI, S. et al. Antarctic microfungi as models for exobiology. **Planetary and Space Science**, v. 52, n. 1-3, p. 229-237, 2004.
- OZERSKAYA, Svetlana et al. Fungi in permafrost. In: **Permafrost Soils**. Springer, Berlin, Heidelberg, p. 85-95, 2009.
- PALMEIRA, Vanila Faber et al. Phospholipase and esterase production by clinical strains of *Fonsecaea pedrosoi* and their interactions with epithelial cells. **Mycopathologia**, v. 170, n. 1, p. 31-37, 2010.
- PELÁEZ, F. et al. Phylogeny and intercontinental distribution of the pneumocandinproducing anamorphic fungus *Glarea lozoyensis*. **Mycology**, v. 2, n. 1, p. 1-17, 2011.
- PENGRÁ, R. M.; COLE, M. A.; ALEXANDER, M. Cell walls and lysis of *Mortierella parvispora* hyphae. **Journal of bacteriology**, v. 97, n. 3, p. 1056-1061, 1969.

- PERRIN, Robyn M. et al. Transcriptional regulation of chemical diversity in *Aspergillus fumigatus* by LaeA. **PLoS Pathogen**, v. 3, n. 4, p. e50, 2007.
- PRICE, Margaret F.; WILKINSON, Ian D.; GENTRY, Layne O. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. **Sabouraudia: Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 20, n. 1, p. 7-14, 1982.
- RAMOS, M. et al. Recent shallowing of the thaw depth at Crater Lake, Deception Island, Antarctica (2006–2014). **Catena**, v. 149, p. 519-528, 2017.
- REVICH, Boris A.; PODOLNAYA, Marina A. Thawing of permafrost may disturb historic cattle burial grounds in East Siberia. **Global Health Action**, v. 4, n. 1, p. 8482, 2011.
- ROBERT, Vincent; CARDINALI, Gianluigi; CASADEVALL, Arturo. Distribution and impact of yeast thermal tolerance permissive for mammalian infection. **BMC Biology**, v. 13, n. 1, p. 18, 2015.
- ROBINSON, Clare H. Cold adaptation in Arctic and Antarctic fungi. **New Phytologist**, v. 151, n. 2, p. 341-353, 2001.
- RODRÍGUES, Debora Frigi; TIEDJE, James M. Coping with our cold planet. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 6, p. 1677-1686, 2008.
- ROSA, Luiz 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, Luiz Henrique (Ed.). **Fungi of Antarctica: Diversity, ecology and biotechnological applications**. Springer, 2019.
- ROSA, Luiz Henrique et al. Uncultured fungal diversity in soils of protected and non-protected areas on Deception Island, South Shetland Islands, Antarctica. *Scientific Reports (In press)*, 2020.
- ROTHSCHILD, Lynn J.; MANCINELLI, Rocco L. Life in extreme environments. **Nature**, v. 409, n. 6823, p. 1092, 2001.
- RUISI, Serena et al. Fungi in Antarctica. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 6, n. 1-3, p. 127-141, 2007.
- SCAMBOS, T. A. et al. Ultralow surface temperatures in east Antarctica from satellite thermal infrared mapping: the coldest places on Earth. **Geophysical Research Letters**, v. 45, n. 12, p. 6124-6133, 2018.
- SCHARF, Daniel H.; HEINEKAMP, Thorsten; BRAKHAGE, Axel A. Human and plant fungal pathogens: the role of secondary metabolites. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 1, p. e1003859, 2014.

- SCHOCH, Conrad L. et al. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 16, p. 6241-6246, 2012.
- 5 SCHÜTTE, Ursel ME et al. Effect of permafrost thaw on plant and soil fungal community in a boreal forest: Does fungal community change mediate plant productivity response?. **Journal of Ecology**, v. 107, n. 4, p. 1737-1752, 2019.
- SEYEDMOUSAVI, Seyedmojtaba et al. Aspergillus and aspergilloses in wild and domestic animals: a global health concern with parallels to human disease. **Medical Mycology**, v. 53, n. 8, p. 765-797, 2015.
- 10 SHUR, Y. L.; JORGENSEN, M. T. Patterns of permafrost formation and degradation in relation to climate and ecosystems. **Permafrost and Periglacial Processes**, v. 18, n. 1, p. 7-19, 2007.
- STEVEN, Blaire et al. Microbial ecology and biodiversity in permafrost. **Extremophiles**, v. 10, n. 4, p. 259-267, 2006.
- 15 TALBOT, Jennifer M. et al. Functional guild classification predicts the enzymatic role of fungi in litter and soil biogeochemistry. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 88, p. 441-456, 2015.
- TAMURA, Koichiro et al. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, n. 12, p. 2725-2729, 2013.
- 20 TAYLOR, Louise H.; LATHAM, Sophia M.; MARK, E. J. Risk factors for human disease emergence. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 356, n. 1411, p. 983-989, 2001.
- THOMSON, Pamela et al. Virulence and antifungal therapy of murine disseminated infection by *Rhodotorula mucilaginosa*. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 89, n. 1, p. 47-51, 2017.
- 25 TOMEE, J. F.; KAUFFMAN, H. F. Putative virulence factors of *Aspergillus fumigatus*. **Clinical and experimental Allergy**, v. 30, n. 4, p. 476-484, 2000.
- TSUJI, Masaharu 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, 30 2013.
- TSUJI, Masaharu. Cold-stress responses in the Antarctic basidiomycetous yeast *Mrakia blollopis*. **Royal Society open science**, v. 3, n. 7, p. 160106, 2016.
- TURNER, John et al. Antarctic climate change and the environment: an update. **Polar Record**, v. 50, n. 3, p. 237-259, 2013.

- VIEIRA, Gonçalo et al. Thermal state of permafrost and active-layer monitoring in the Antarctic: Advances during the international polar year 2007–2009. **Permafrost and Periglacial Processes**, v. 21, n. 2, p. 182-197, 2010.
- VINCENT, Warwick F. Evolutionary origins of Antarctic microbiota: invasion, selection and
5 endemism. **Antarctic Science**, v. 12, n. 3, p. 374-385, 2000.
- VOROBYOVA, E. et al. Micro-organisms and biomarkers in permafrost. In: **Permafrost Response on Economic Development, Environmental Security and Natural Resources**. Springer, Dordrecht, p. 527-541, 2001.
- VYLKOVA, Slavena. Environmental pH modulation by pathogenic fungi as a strategy to
10 conquer the host. **PLoS pathogens**, v. 13, n. 2, p. e1006149, 2017.
- WATTS, J. Antarctic temperature rises above 20 °C for first time on record. **The Guardian**.
Disponível em: <<https://www.theguardian.com/world/2020/feb/13/antarctic-temperature-rises-above-20c-first-time-record>>. Acesso em 04/07/2020.
- WERNER, Sebastian; PERŠOH, Derek; RAMBOLD, Gerhard. New aspects of the biology of
15 *Mortierella alliacea*. **Mycological Progress**, v. 15, n. 12, p. 1293-1301, 2016.
- WHITE, Thomas 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.
- WILLERSLEV, Eske; HANSEN, Anders J.; POINAR, Hendrik N. Isolation of nucleic acids
20 and cultures from fossil ice and permafrost. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 19, n. 3,
p. 141-147, 2004.
- WOYKE, Tanja et al. Symbiosis insights through metagenomic analysis of a microbial
consortium. **Nature**, v. 443, n. 7114, p. 950-955, 2006.
- WUTKOWSKA, Magdalena et al. Dead or alive; or does it really matter? Level of
25 congruency between trophic modes in total and active fungal communities in high arctic
soil. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 3243, 2019.
- XIN, Ming-xiu; ZHOU, Pei-jin. *Mrakia psychrophila* sp. nov., a new species isolated from
Antarctic soil. **Journal of Zhejiang University Science B**, v. 8, n. 4, p. 260-265, 2007.
- XUE, Yaxin et al. Metagenome-assembled genome distribution and key functionality
30 highlight importance of aerobic metabolism in Svalbard permafrost. **FEMS Microbiology
Ecology**, v. 96, n. 5, p. fiae057, 2020.
- YARZÁBAL, Luis Andrés. Antarctic psychrophilic microorganisms and biotechnology:
History, current trends, applications, and challenges. In: **Microbial Models: From
Environmental to Industrial Sustainability**. Springer, Singapore, p. 83-118, 2016.

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

ZUKAL, Jan et al. White-nose syndrome without borders: *Pseudogymnoascus destructans* infection tolerated in Europe and Palearctic Asia but not in North America. **Scientific Reports**, v. 6, p. 19829, 2016.

9. ANEXOS

9.1 Material Suplementar do Capítulo 02

5 **Supplementary Table 1.** Frequency of fungal isolates obtained from active layer and permafrost of each islands sampled.

Sample	Media								Total
	MM		DRBC		DG18		SAB		
	10 °C	25 °C	10 °C	25 °C	10 °C	25 °C	10 °C	25 °C	
Robert Island									
AL1	6	2	5	3	10	6	6	5	43
AL2	4	3	7	5	5	6	8	2	40
P1	7	3	5	2	4	1	3	2	27
P2	5	1	3	0	6	6	4	2	27
Total	22	9	20	10	25	19	21	11	137
Deception Island									
AL1	4	5	3	1	10	3	5	4	35
AL2	6	3	3	2	4	2	6	6	32

Sample	Media								Total
	MM		DRBC		DG18		SAB		
	10 °C	25 °C	10 °C	25 °C	10 °C	25 °C	10 °C	25 °C	
P1	7	7	4	0	5	2	5	3	33
P2	6	4	4	2	4	6	3	4	33 5
Total	23	19	14	5	23	13	19	17	133
Livingston Island									
AL1	8	14	21	19	21	18	21	21	143
AL2	9	8	7	4	9	7	7	7	58
P1	12	3	11	9	14	5	14	10	78 10
P2	0	6	0	1	3	2	2	1	15
Total	29	31	39	33	47	32	44	39	294

AL1 = active layer sample 1, AL2 = active layer sample

2, P1 = Permafrost sample 1, P2 = Permafrost sample 2. MM = minimal medium, DRBC = Dichloran Rose Bengal chloramphenicol agar, DG18 = dicloran glicerol agar, and SAB = Sabouraud agar

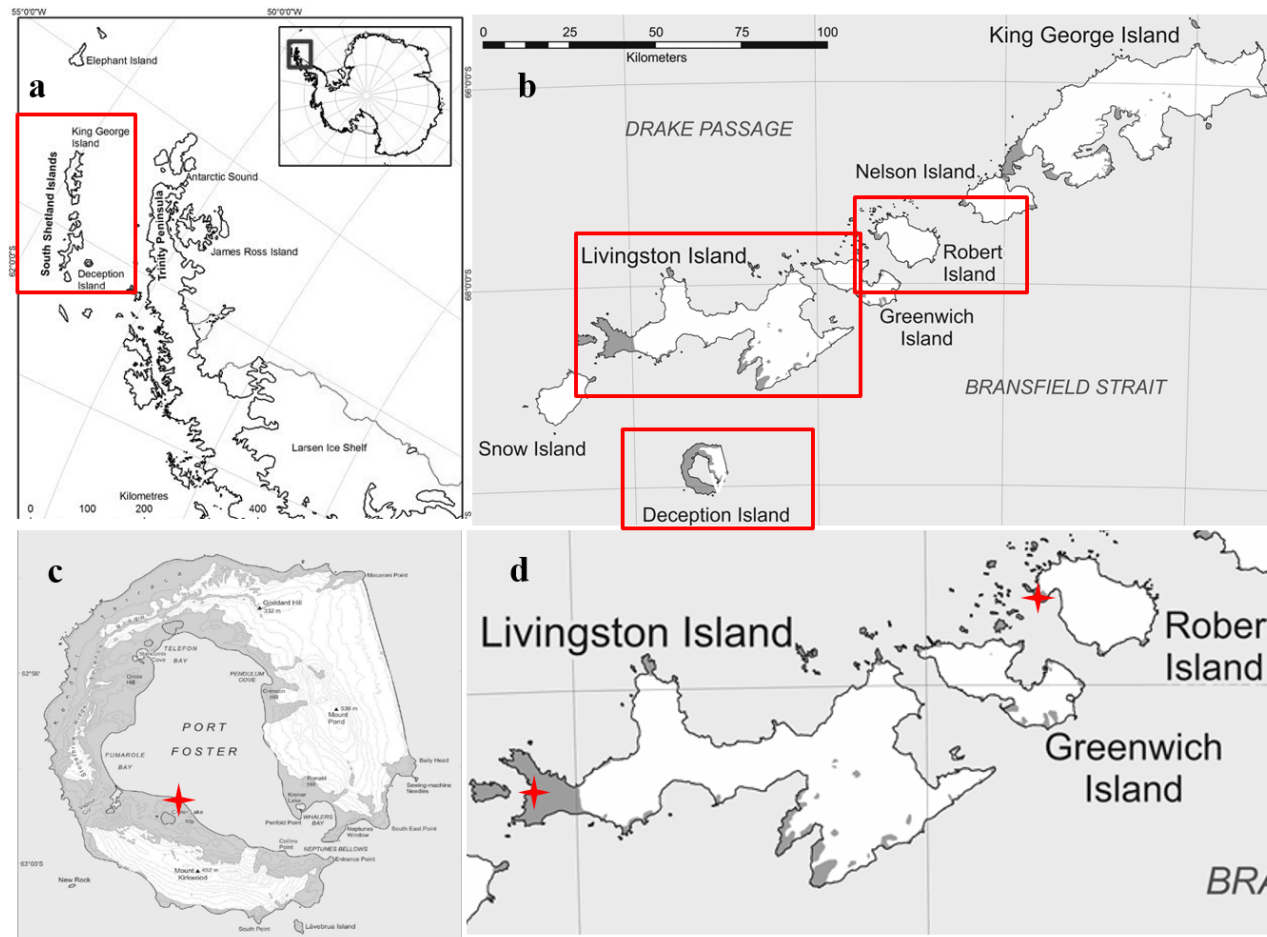
Supplementary Table 2. Chemical properties of permafrost and active layer in soils from Deception, Livingston, and Robert islands.

Island/sample	pH	mg dm^3		$\text{cmol}_c \text{ dm}^3$					Percentage			
		P	K	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Al ³⁺	SB	CEC	m	TOC	TH	TN
Deception												
Permafrost	6.3	20.6	95	1.27	0.62	0	2.13	2.13	0	0.63	0.08	0.01
Active layer	6.25	23.6	89	1.13	0.56	0	1.92	1.92	0	0.67	0.09	0.01
Livingston												
Permafrost	6	26.2	161	4.53	4.52	0.39	9.46	9.85	4	9.95	0.91	0.15
Active layer	6.18	23.6	147	4.95	3.88	0.2	9.21	9.41	2.1	8.15	0.73	0.05
Robert												
Permafrost	5.17	239.2	228	9.14	7.59	4.39	17.31	21.7	20.2	14.5	1.29	0.15
Active layer	5.29	227.4	236	9.03	9.06	2.73	18.7	21.43	12.7	11.62	1.06	0.19

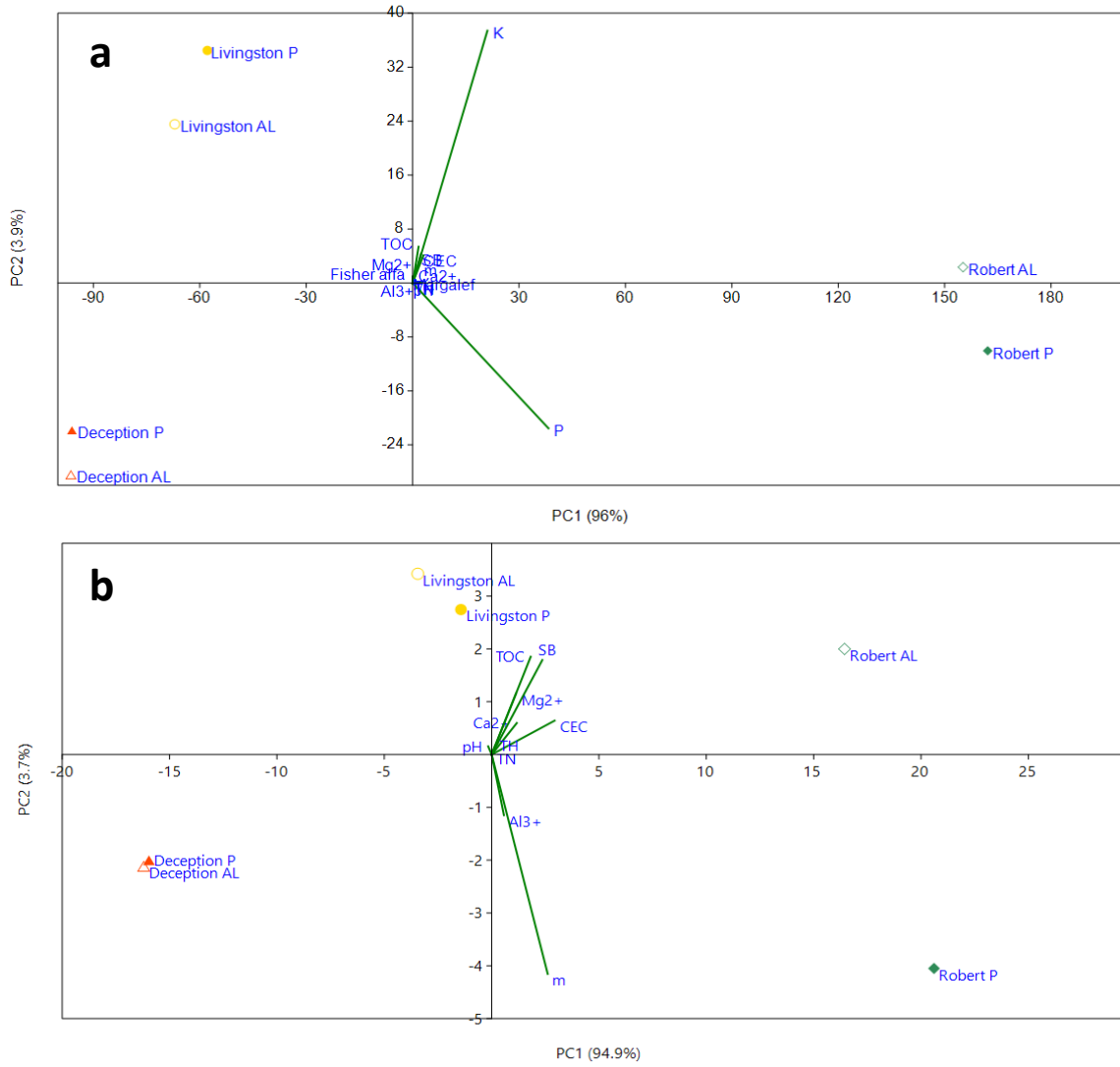
SB = sum of bases, CEC = cation exchangeable capacity, m = aluminum saturation, TOC = total organic carbon, TN = total nitrogen, TH = total hydrogen.

Supplementary Table 3. Diversity indices of fungal assemblages present in permafrost and active layer in different islands in the Antarctic Peninsula.

Parameters	Island			Substrate	
	Deception	Livingston	Robert	Active Layer	Permafrost
Number of taxa	13	27	18	30	27
Total fungal density (CFU g ⁻¹)	789	2109	778	1861	1815
Fisher- α (diversity)	2.21	4.36	3.30	5.01	4.50
Margalef (richness)	1.80	3.4	2.55	3.85	3.46
Simpson's (dominance)	0.80	0.91	0.80	0.90	0.90



Supplementary Figure 1. Maps of the South Shetland Islands where the samples were obtained. a = Robert, b = Livingston, and c = Deception islands. Red stars (c and d) are the specific sites where the permafrost and active layer were sampled.



Supplementary Figure 2. Principal components analyses (PCA) of the physico-chemical characteristics and microbiological variables of soils in permafrost (P) and active layer (AL). **a** with all variables and **b** without K and P parameters.

9.2 Submissão do Capítulo 3 para a revista Scientific Reports

30/10/2020

Gmail - Scientific Reports - Receipt of Manuscript 'Diversity of fungi...'



Thamar Holanda <thamarhs@gmail.com>

Scientific Reports - Receipt of Manuscript 'Diversity of fungi...'

1 mensagem

Scientific Reports <srep@nature.com>
 Para: thamarhs@gmail.com

30 de outubro de 2020 06:30

Ref: Submission ID 7c3b9cd9-1e35-4792-90ce-42c4bd34655d

Dear Dr da Silva,

Please note that you are listed as a co-author on the manuscript "Diversity of fungi present in permafrost in the South Shetland Islands, maritime Antarctic", which was submitted to Scientific Reports on 30 October 2020 UTC.

If you have any queries related to this manuscript please contact the corresponding author, who is solely responsible for communicating with the journal.

Kind regards,

Peer Review Advisors
 Scientific Reports

****Our flexible approach during the COVID-19 pandemic****

If you need more time at any stage of the peer-review process, please do let us know. While our systems will continue to remind you of the original timelines, we aim to be as flexible as possible during the current pandemic.

<https://mail.google.com/mail/u/0?ik=cebcadf7f0&view=pt&search=all&permthid=thread-f%3A1681968573879050268&simpl=msg-f%3A16819685...> 1/1

9.3 Produção Acadêmica

Artigos publicados em colaboração

- CÂMARA PEAS, CARVALHO-SILVA M, PINTO OHB, HENRIQUES DK, SILVA TH, STECH M, ROSA LH. Diversity and Ecology of Chlorophyta (Viridiplantae) Assemblages in Protected and Non-protected Sites in Deception Island (Antarctica, South Shetland Islands) Assessed Using an NGS Approach. **Microbial Ecology**, p. 1-12, 2020.
- ROSA LH, SILVA TH, PINTO OHB, STECH M, CONVEY PC, CARVALHO-SILVA M, ROSA CA, CÂMARA PEAS. DNA metabarcoding high-throughput sequencing uncovers cryptic fungal diversity in soils of protected and non-protected areas on Deception Island, Antarctica. **Scientific Reports**, 2020 (*In press*).
- PORTO BA, SILVA TH, MACHADO MR, OLIVEIRA FS, ROSA, CA, ROSA LH. Diversity and distribution of cultivable fungi in acid-sulfate soils in chronosequence under para-periglacial conditions in Keller Peninsula, King George Island, Antarctica. **Extremophiles**, 24(5), 797-807, 2020.

15

Textos em revistas de divulgação científica:

- OGAKI, M. B.; SILVA, T. H.; ROSA, L. H. Fungos da Antártica: estudos de micro-organismos em condições extremas. **INFOCIRM, SECIRM**, p. 06–08, jan. 2018.
- MENEZES, G. C. A. Como o conhecimento da biodiversidade de fungos da Antártica pode ajudar a melhorar o mundo? **Informativo APECS**, Ano VIII Edição I, p. 23–24, 2017.
- SILVA, T. H; OGAKI, M. B.; ROSA, L. H. Antártica: mudanças climáticas e a emergência de novas doenças. **Informativo APECS**, Ano XI Edição I p. 17–18, 2020.

20

Resumos apresentados em eventos:

- SILVA, D.A.S, SILVA, T. H., ROSA, L.H. Avaliação da eficácia de diferentes meios de cultura para cultivo de fungos filamentosos de solos antárticos. In: XXVI Semana de iniciação científica, 2017, Belo Horizonte. **XXI Semana do conhecimento e X Semana Nacional de Ciência e Tecnologia**, Belo Horizonte, 2017.
- SILVA, T. H, SILVA, D.A.S, ROSA, L.H. Identification of Permafrost Fungi of Robert Island and their potential of freezing resistance. In: **V Simpósio APECS-Brasil**, Belo Horizonte, 2018.

25

30

- SILVA, D.A.S, SILVA, T. H., ROSA, L.H. Evaluation of the efficacy of different temperatures in the isolation of fungi from soil. In: **V Simpósio APECS-Brasil**, Belo Horizonte, 2018.
- GOMES, E.C.Q, DA SILVA, T.H., GONÇALVES, V.N., ROSA, L.H. In vitro
5 characterization of *Pseudogymnoascus* virulence isolated in Antarctica. **30º Congresso Brasileiro de Microbiologia**, Maceió-AL, 2019.
- PORTO, B.A., SILVA, T.H., OLIVEIRA, F.S., MACHADO, M. R., ROSA, L.H. Identification of fungi present in sulfide Antarctic soils. **30º Congresso Brasileiro de Microbiologia**, Maceió-AL, 2019.
- 10 • GOMES, E.C.Q; DA SILVA, T.H. ; GONÇALVES, V.N. ; ROSA, L.H. Caracterização in vitro da virulência de isolados do gênero *Pseudogymnoascus* provenientes da Antártica. **VI Simpósio de Microbiologia da UFMG**, Belo Horizonte, 2019.
- PORTO, B.A.; SILVA, T.H.; OLIVEIRA F.S.; MACHADO, M.R.; ROSA, L.H. Sobrevivência de fungos de solos sulfetados da Antártica sobre diferentes faixas de pH e
15 temperatura. **VI Simpósio de Microbiologia da UFMG**, Belo Horizonte, 2019.
- SILVA, T. H; GOMES, E.C.Q; ROSA, L. H. Permafrost Antarctic fungi and your potential for virulence factors in vitro. **1st ISME Latin America Congress**. Valparaíso-Chile 2019.
- SILVA, T. H; GOMES, E.C.Q; ALVES, IMS; ROSA, L. H. Analysis of possible new
20 species of the genus *Glarea* from the Antarctic Peninsula. **1st ISME Latin America Congress**. Valparaíso-Chile 2019.
- SILVA, T. H; ROSA, L. H. Taxonomia e diversidade de fungos presentes no permafrost da ilha Livingston – Antártica. **VI Simpósio de Microbiologia da UFMG**, Belo Horizonte, 2019.
- 25 • GOMES, E.C.Q; SILVA, T. H ; GONÇALVES, V.N.; ROSA, L. H. Caracterización de la virulencia in vitro del género *Pseudogymnoascus* de aislamientos antárticos. **2ndo Simposio Internacional de Ecosistemas Extremos y Organismos Extremófilos - ISE3O**, Santiago-Chile 2019.
- SOUTO, M. F; DE PAULA, M. T. R; DA SILVA, T. H.; COELHO, L.C;
30 PELLIZZARI, F. M.; ROSA, L. H. Detection of algiculous fungi associated of Antarctic macroalgae. **2ndo Simposio Internacional de Ecosistemas Extremos y Organismos Extremófilos - ISE3O**, Santiago-Chile 2019.

- SILVA, T.H.; SILVA, D.; OLIVEIRA, F.; SCHAEFER, C.; ROSA, C.; ROSA, L. Cultured fungal diversity in permafrost of Antarctic Peninsula. **SCAR Open Science Conference 2020.**
- 5 • SILVA, T.H.; SILVA, D.; GOMES, E.; ROSA, L. Global warming and the emergence of pathogens trapped in Antarctic permafrost. **SCAR Open Science Conference 2020.**
- SILVA, T.H.; OGAKI, M.; HENRIQUES, D.K.; CÂMARA, P.E.A.S.; STECH, M.; ROSA, L. Uncultured fungal diversity in permafrost of the Antarctic Peninsula. **SCAR Open Science Conference 2020.**
- 10 • CAMARA, P.; SILVA, M., PINTO, O.; HENRIQUES, D.; HOLANDA, T.; STECH, M.; PELLIZZARI, F.; CONVEY, P.; ROSA, L. Diversity and Ecology of Uncultured Chlorophyta (Viridiplantae) Assemblages in Protected and Non-Protected Sites in Deception Island (Antarctica, South Shetland Islands) Investigated Using an NGS Approach. **SCAR Open Science Conference 2020.**
- 15 • OGAKI, M.; SILVA, T.H.; CAMARA, P.E.A.S.; STECH, M.; LÍRIO, J.M.; ROSA, L.H. Assessment of uncultured fungal diversity in lake sediments of Vega Island, Antarctica. **SCAR Open Science Conference 2020.**
- OGAKI, M.; SILVA, T.H.; CAMARA, P.E.A.S.; STECH, M., VIEIRA, R.; NETO, A.A.; ROSA, L.H. Uncultured fungal diversity in Antarctic marine sediments. **SCAR Open Science Conference 2020.**
- 20 • ROSA, L.; SILVA, T.; PINTO, O.; STECH, M.; CONVEY, P.; CARVALHO-SILVA, M.; CAMARA, P. Uncultured cryptic fungal diversity in soils of Deception Island, Antarctica: taxonomy and distribution in protected and non-protected areas using an NGS approach. **SCAR Open Science Conference 2020.**
- 25 • PORTO, B.; SILVA, T.; MACHADO, M.; OLIVEIRA, F.; ROSA, L. Characterization of fungi present in sulfide soils in Antarctica and their evaluation for studies in metal bioleaching processes. **SCAR Open Science Conference 2020.**
- CAMARA, P.; CARVALHO-SILVA, M.; HENRIQUES, D.; PINTO, O.; SILVA, T.; ŠANTL-TEMKIV, T.; CONVEY, P.; ROSA, L. Survey of Viridiplantae present in Air and precipitated with Snow on Livingston island. (South Shetlands). **SCAR Open Science Conference 2020.**
- 30 • ROSA, L.; SILVA, T.; PINTO, O.; STECH, M.; CONVEY, P.; CARVALHO-SILVA, M.; CAMARA, P. Uncultured fungal diversity in recent superficial snow on Livingston Island, Antarctica. **SCAR Open Science Conference 2020.**

• CARVALHO-SILVA, M.; CAMARA, P.; PINTO, O.; HENRIQUES, D.; STECH, M.; ROSA, L. Exploring the Streptophyta at Deception island (Antarctica, South Shetlands) using metabarcoding of environmental soil DNA. **SCAR Open Science Conference 2020.**

5 • GOMES, E.C.Q; DA SILVA, T.H.; FERNANDES, B.; VALÉRIO, A.; GONÇALVES, V.N; COSTA, M.; SANTOS, D.; JOHANN, S.; ROSA, L.H. In vitro virulence of Antarctic Pseudogymnoascus fungi of Antarctica. **SCAR Open Science Conference 2020.**

Co-orientações e colaborações

10 • Co-orientação de Trabalho de Conclusão de Curso: Débora Amorim Saraiva Silva. Isolamento e taxonomia de fungos presentes em *permafrost* da Ilha Deception, Antártica. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Minas Gerais, 2017.

15 • Co-orientação de Iniciação Científica: Débora Amorim Saraiva Silva. Isolamento e taxonomia de fungos presentes em *permafrost* da Ilha Deception, Antártica. Iniciação Científica, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, 2017.

• Colaboração na Dissertação: Bárbara Alves Porto. Caracterização de fungos presentes em solos sulfetados da Antártica e sua avaliação em processo biolixiviação de metais. Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Microbiologia, Fevereiro 2020.

20 • Colaboração na Dissertação de Mateus Souto de Freitas. Diversidade e bioprospecção de fungos associados à macroalgas de regiões subantárticas e Antártica. Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Minas Gerais.

25 • Colaboração no artigo: Metagenômica de organossolos endêmicos da Ilha da Trindade. Tese de Larissa Paraguassú Campos, Departamento de Geologia da Universidade Federal de Ouro Preto.

• Colaboração no artigo: Metagenômica em topsoils para a recuperação de áreas degradadas. Tese de Maurílio Assis Figueiredo, Departamento de Geologia da Universidade Federal de Ouro Preto.

30 • Colaboração no trabalho de levantamento da Taxonomia e Diversidade de fungos presentes em Queijos de Minas Gerais.

Capítulo de livro

- Livro: Micologia Antártica. Capítulo 6: Antarctic permafrost: an unexplored and extreme environment for fungal communities. Editora: SPRINGER.

Participação na Operação Antártica Brasileira

- 5 • OP XXXVI (2017). Programa Antártico Brasileiro (PROANTAR) a bordo do navio Polar Brasileiro Almirante Maximiano.

Participação em eventos

- 10 • Organização III International Symposium on Microbiology and Biotechnology. 2016.
- Monitora na 69ª Reunião Anual da SBPC-2017.
- Comissão de Pré-avaliação 16ª Feira Brasileira de Ciências e Engenharia. 2017. Universidade de São Paulo.
- 2º Congresso Brasileiro de Qualidade em Laboratórios - CBQIAB. 2018.
- 15 • Organização V Symposium APECS-Brazil - Achievements and challenges in a decade of changes in national and international scene. 2018.
- Preleitora Minicurso Micologia Antártica - MycoAntar. 2018. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra). V Symposium APECS-Brazil.
- Formação de mediadores – palestrante convidada: Exposição Expedição Antártica- Espaço do conhecimento UFMG, 2018.
- 20 • Pesquisa e produção de textos para a Exposição Expedição Antártica- Espaço do conhecimento da UFMG, Belo Horizonte, 2018.
- Comissão avaliadora da 6ª Feira Brasileira de Colégios de Aplicação e Escolas Técnicas (6ªFEBRAT), 2018.
- 25 • 1st ISME Latin America Congress. Valparaíso-Chile 2019.
- VI Simpósio de Microbiologia da UFMG – CONECTA SIM: Microbiologia Interligada, Belo Horizonte, 2019.
- Comissão de Avaliação durante a XXVIII Semana de Iniciação Científica da UFMG. Belo Horizonte, 2019.
- 30 • Comissão avaliadora da 8ª Feira Brasileira de Colégios de Aplicação e Escolas Técnicas (8ªFEBRAT), 2020.