

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia

Elisa Amorim Amâncio Teixeira

**BIOPROSPECÇÃO DE ENZIMAS E BIOSSURFACTANTES DE INTERESSE
INDUSTRIAL PRODUZIDOS POR FUNGOS PRESENTES EM SEDIMENTOS DO
LAGO BOECKELLA, BAÍA ESPERANÇA, NORDESTE DA PENÍNSULA
ANTÁRTICA**

Belo Horizonte

2024

Elisa Amorim Amâncio Teixeira

**BIOPROSPECÇÃO DE ENZIMAS E BIOSURFACTANTES DE INTERESSE
INDUSTRIAL PRODUZIDOS POR FUNGOS PRESENTES EM SEDIMENTOS DO
LAGO BOECKELLA, BAÍA ESPERANÇA, NORDESTE DA PENÍNSULA
ANTÁRTICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestra em Microbiologia.

Orientador: Dr. Luiz Henrique Rosa

Belo Horizonte

2024

043

Teixeira, Elisa Amorim Amâncio.

Bioprospecção de enzimas e biossurfactantes de interesse industrial produzidos por fungos presentes em sedimentos do lago Boeckella, baía esperança, nordeste da península antártica [manuscrito] / Elisa Amorim Amâncio Teixeira. – 2024.

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

Orientador: Luiz Henrique Rosa.

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

1. Microbiologia. 2. Enzimas. 3. Tensoativos. 4. Bioprospecção. 5. Classificação. 6. Regiões Antárticas. I. Rosa, Luiz Henrique. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 579



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

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE **ELISA AMORIM AMÂNCIO TEIXEIRA**

Nº REGISTRO: **2022666350**

Às 14:00 horas do dia **07 de março de 2024**, reuniu-se, por via remota, a Comissão Examinadora composta pelos Drs. Nalu Teixeira de Aguiar Peres (Departamento de Microbiologia/ICB/UFMG), Camila Rodrigues de Carvalho (Instituto René Rachou Fundação Oswaldo Cruz- MÇ) e o Prof. Dr. Luiz Henrique Rosa (Orientador), para julgar o trabalho final "**Bioprospecção de enzimas e biossurfactantes de interesse industrial produzidos por fungos presentes em sedimentos do Lago Boeckella, Baía Esperança, nordeste da Península Antártica**", da aluna **Elisa Amorim Amâncio Teixeira**, requisito final para a obtenção do Grau de **MESTRA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS MICROBIOLOGIA**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Dr. Luiz Henrique Rosa, 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 pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. A candidata tem **60 (sessenta) dias**, a partir desta data, para entregar a versão final da dissertação ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da UFMG e requerer seu diploma.

Belo Horizonte, 07 de março de 2024

Membros da banca:

Profa. Dra. Nalu Teixeira de Aguiar Peres

Dra. Camila Rodrigues de Carvalho

De acordo:

Prof. Dr. Luiz Henrique Rosa

(Orientador)

Prof. Dr. Daniel de Assis Santos

(Coordenador do Programa de Pós-graduação
em Microbiologia)



Documento assinado eletronicamente por **Daniel de Assis Santos, Coordenador(a) de curso de pós-graduação**, em 08/03/2024, às 11:09, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Camila Rodrigues de Carvalho, Usuária Externa**, em 08/03/2024, às 14:50, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luiz Henrique Rosa, Professor do Magistério Superior**, em 11/03/2024, às 16:59, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Nalu Teixeira de Aguiar Peres, Professora do Magistério Superior**, em 19/03/2024, às 13:46, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador 3031884 e o código CRC CC7E5447.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, Valéria e Eugênio, por serem meu alicerce, meu exemplo de resiliência e por sempre acreditarem em mim. Obrigada pelo incentivo, apoio e por serem minha força nos momentos difíceis. Amo vocês com todo meu coração e alma.

Agradeço ao Gabriel pelo companheirismo e amor ao longo desses dez anos, por mesmo de longe estar sempre presente em todos os momentos de alegria e de angústia, me amparando e aconselhando.

Aos amigos de infância e de graduação, que me fazem perceber o quão bom é viver a vida. À minha cachorrinha Juju, que é minha companheirinha desde 2009 e foi meu suporte emocional durante a escrita deste trabalho.

A todos os alunos que passaram pelo Lab Fungos durante esses dois anos por terem sido a parte leve de toda essa jornada. Em especial a Láuren, Débora, Lívia, Mayanne, Luiza, Gisele, Luiz Felipe, Ana Raquel e Thais.

Ao meu orientador Luiz Rosa pela oportunidade de fazer parte do Laboratório de Microbiologia Polar e Conexões Tropicais desde 2021, pela paciência e pelo conhecimento compartilhado. Agradeço também aos colaboradores Dr. Carlos Augusto Rosa, Dra. Rosemary Vieira, Dr. Juan Manuel Lirio e Dra. Silvia H. Coria pelo auxílio na coleta das amostras e na análise dos resultados.

Ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da UFMG pelo conhecimento passado e pelo exemplo de profissionalismo e dedicação à ciência. Aos funcionários pelo cumprimento exímio de suas atribuições. E, por fim, meu agradecimento ao apoio financeiro fornecido pela CAPES e pelo CNPq, que foi essencial para realização deste trabalho.

RESUMO

A Antártica é caracterizada por suas diferentes condições extremas, como baixas temperaturas, baixa disponibilidade de nutrientes, ventos fortes, alto índice de radiação UV, salinidade elevada e variações de pH. Os micro-organismos capazes de sobreviver a essas condições extremas vêm atraindo grande interesse biotecnológico nos últimos anos devido a sua capacidade em produzir diferentes metabólitos bioativos, cujas vantagens são a estabilidade, fornecimento regular e, em muitos casos, baixa toxicidade, quando comparados às substâncias sintéticas tradicionais utilizados nas indústrias. Tendo em vista as diversas aplicações biotecnológicas dos micro-organismos encontrados na Antártica, este trabalho teve como objetivo caracterizar fungos cultiváveis presentes em sedimentos do Lago Boeckella, localizado na Baía Esperança, nordeste da Península Antártica e avaliá-los quanto à produção de enzimas e biossurfactantes de interesse industrial. Os fungos foram obtidos de sedimentos de dois testemunhos, correspondentes às margens oeste e sudeste do Lago Boeckella, utilizando os meios de cultura Ágar Dicloran Rosa Bengala, Ágar Dicloran Glicerol, Meio Mínimo e Meio Extrato de Malte, e as placas foram incubadas a 15 °C por 60 dias. Foram obtidos 116 isolados fúngicos (86 filamentosos e 30 leveduras), dos quais 104 foram identificados. Os 16 gêneros identificados pertencem aos filos *Ascomycota* (56,25%), *Basidiomycota* (37,5%) e *Mortierellomycota* (6,25%). O lago, de forma geral, apresentou alta diversidade e riqueza, e moderada dominância. Para detecção das enzimas, os isolados foram cultivados em meios específicos para cada enzima estudada e os táxons que apresentaram Índice Enzimático (IE) ≥ 2 foram considerados bons produtores. Dos fungos filamentosos, apenas isolados de *Ramgea* cf. *ozimecii* apresentaram IE ≥ 2 . Quanto às leveduras, isolados dos táxons *Holtermanniella wattica*, *Leucosporidium creatinivorum*, *Leucosporidium* sp., *Mrakia blollopis*, *Naganishia* sp. e *Phenoliferia* sp. apresentaram IE ≥ 2 para mais de uma enzima. O isolado *Naganishia* sp. (UFMGCB 19775) apresentou o maior IE ($4,03 \pm 0,08$). Para a análise da produção dos biossurfactantes, cada isolado foi inoculado em meio composto por óleo de girassol e extrato de levedura e incubado a 20 °C sob agitação por nove dias e, após 24 horas, foi realizado o teste de emulsificação. Os isolados que apresentaram média de emulsificação ($E_{24\%}$) $> 50\%$ foram classificados como produtores satisfatórios de biossurfactantes. Em relação aos fungos filamentosos, 16 isolados apresentaram $E_{24\%} > 50\%$, os quais foram identificados como *Antarctomyces psychrotrophicus* (08 isolados), *Cosmospora* sp. (02), *Pseudogymnoascus* sp. (02), *R. cf. ozimecii* (01), *Thelebolus* sp. (01) e dois isolados que não foram identificados. Dentre os isolados produtores, três isolados de *A. psychrotrophicus* apresentaram valores acima de 80%, os quais foram superiores ao surfactante sintético (SDS). Quanto às leveduras,

“*Candida davisiana*” (07 isolados) e *Cystobasidium* sp. 2 (01) apresentaram $E_{24\%} > 50\%$. Dessa forma, este trabalho contribui para a compreensão da diversidade fúngica cultivável do Lago Boeckella, que sofre com as consequências das mudanças climáticas locais. Além disso, evidencia a importância da diversidade taxonômica e do papel ecológico que esses microorganismos desempenham nos ambientes lacustres da Antártica, além do seu potencial biotecnológico quanto à produção de enzimas e biossurfactantes em baixas temperaturas.

Palavras-chave: enzimas; biossurfactantes; bioprospecção; taxonomia; Antártica.

ABSTRACT

Antarctica is characterized by its different extreme conditions, such as low temperatures, low nutrient availability, strong winds, high levels of UV radiation, high salinity and pH variations. Microorganisms capable of surviving these extreme conditions have attracted great biotechnological interest in recent years due to their ability to produce different bioactive metabolites, whose advantages are stability, regular supply and, in many cases, low toxicity, when compared to other substances. traditional synthetic materials used in industries. Considering the diverse biotechnological applications of microorganisms found in Antarctica, this work aimed to characterize cultivable fungi present in sediments from Lake Boeckella, located in Hope Bay, northeast of the Antarctic Peninsula, and evaluate them for the production of enzymes and biosurfactants of industrial interest. The fungi were obtained from sediments from two cores, corresponding to the western and southeastern margins of Lake Boeckella, using the culture media Dicloran Rose Bengal Agar, Dicloran Glycerol Agar, Minimum Medium and Malt Extract Medium, and the plates were incubated at 15 °C for 60 days. 116 fungal isolates were obtained (86 filamentous and 30 yeast), of which 104 were identified. The 16 genera identified belong to the phyla *Ascomycota* (56.25%), *Basidiomycota* (37.5%) and *Mortierellomycota* (6.25%). The lake, in general, presented high diversity and richness, and moderate dominance. To detect the enzymes, the isolates were cultivated in specific media for each enzyme studied and the taxa that presented an Enzyme Index (EI) ≥ 2 were considered good producers. Of the filamentous fungi, only isolated from *Ramgea* cf. *ozimecii* presented EI ≥ 2 . As for yeasts, isolates of the taxa *Holtermanniella wattica*, *Leucosporidium creatinivorum*, *Leucosporidium* sp., *Mrakia blollopis*, *Naganishia* sp. and *Phenoliferia* sp. presented EI ≥ 2 for more than one enzyme. The isolate *Naganishia* sp. (UFMGCB 19775) presented the highest EI (4.03 ± 0.08). To analyze the production of biosurfactants, each isolate was inoculated in a medium composed of sunflower oil and yeast extract and incubated at 20 °C under agitation for nine days and, after 24 hours, the emulsification test was performed. Isolates that showed an average emulsification index ($E_{24\%}$) $> 50\%$ were classified as satisfactory producers of biosurfactants. Regarding filamentous fungi, 16 isolates presented $E_{24\%} > 50\%$, which were identified as *Antarctomyces psychrotrophicus* (08 isolates), *Cosmospora* sp. (02), *Pseudogymnoascus* sp. (02), *R. cf. ozimecii* (01), *Thelebolus* sp. (01) and two isolates that were not identified. Among the producing isolates, three isolates of *A. psychrotrophicus* presented values above 80%, which were higher than synthetic surfactant (SDS). As for yeasts, “*Candida davisiana*” (07 isolates) and *Cystobasidium* sp. 2 (01) presented $E_{24\%} > 50\%$. In this way, this work contributes to the understanding of the cultivable fungal diversity of Lake Boeckella,

which suffers from the consequences of local climate change. Furthermore, it highlights the importance of taxonomic diversity and the ecological role that these microorganisms play in Antarctic lake environments, in addition to their biotechnological potential in terms of the production of enzymes and biosurfactants at low temperatures.

Keywords: enzymes; biosurfactants; bioprospecting; taxonomy; Antarctica.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Imagens com a localização do Lago Boeckella, Baía Esperança, região nordeste da Antártica. (a) Continente Antártico com a região do lago destacada pelo retângulo vermelho (b) Lago Boeckella, Baía Esperança, Antártica. Imagens: Google Earth. (c) Foto do Lago Boeckella em janeiro de 2018. A delimitação em vermelho corresponde ao tamanho do lago em 2001. (d) Localização do Lago Boeckella próximo ao Lago Buenos Aires e à Geleira Buenos Aires. Fotos: Silvia H. Coria. 31
- Figura 2.** Isolamento dos fungos isolados do Lago Boeckella. (a) número de fungos isolados de cada meio de cultura. (b) porcentagem de fungos isolados por seção do testemunho, OT: oeste topo; ST: sudeste topo; SM: sudeste meio; OB: oeste base; OM: oeste meio; SB: sudeste base..... 43
- Figura 3.** Curva de rarefação individual das comunidades fúngicas isoladas das margens oeste (A) e sudeste (B) do Lago Boeckella, comparadas com o total de táxons do lago (C). 47
- Figura 4.** Diagrama de Venn relacionando os táxons compartilhados ou não entre as assembleias estudadas. (a) similaridade dos táxons encontrados nas seções do Lago Boeckella, (b) número de táxons em cada seção, (c) número de táxons específicos ou compartilhados por mais de uma seção. 49
- Figura 5.** Observação dos halos, indicados por setas, formados pela degradação do substrato presente em meio sólido. (a) agarase, (b) amilase, (c) carragenase, (d) celulase, (e) esterase, (f) inulinase, (g) invertase, (h) lipase, (i) pectinase e (j) protease. Fotos: E.A.A. Teixeira..... 50
- Figura 6.** Relação entre o número de isolados produtores de halos e o número de isolados que apresentaram $IE \geq 2$ para cada enzima. **AMI** = Amilase, **AGA** = Agarase, **CAR** = Carragenase, **CEL** = Celulase, **EST** = Esterase, **INU** = Inulinase, **INV** = Invertase, **PEC** = Pectinase, **PRO** = Protease e **LIP** = Lipase..... 52
- Figura 7.** Observação da produção de biossurfactantes. (a) macromorfologia do isolado *Antarctomyces psychrotrophicus* UFMGCB 19677; (b) crescimento do isolado após nove dias a 20 °C e 100 rpm; (c) resultado do teste de emulsificação em triplicata, ao lado dos controles positivo (SDS: dodecil sulfato de sódio a 1%) e negativo (C: meio de cultivo). Fotos: E.A.A. Teixeira..... 63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Exemplos de fungos obtidos de ambientes frios produtores das enzimas e suas aplicações biotecnológicas.	25
Tabela 2. Identificação dos fungos isolados dos sedimentos do Lago Boeckella por meio do sequenciamento de regiões do rDNA e análise utilizando o <i>Basic Local Alignment Search Tool</i> (BLASTn).....	45
Tabela 3. Índices de diversidade dos fungos isolados das margens oeste e sudeste do Lago Boeckella.	48
Tabela 4. Médias dos Índices Enzimáticos (MIE) produzidos pelos fungos obtidos dos sedimentos do Lago Boeckella.	53
Tabela 5. Produção de biossurfactantes pelos fungos obtidos dos sedimentos do Lago Boeckella.	59

LISTA DE ABREVIATURAS

‰: Por cento

°C: Graus Celsius

μS/cm: Micro-Siemens por centímetro

ABI: Applied Biosystems

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool

BLASTn: Nucleotide Basic Locus Alignment Search Tool

cm: Centímetros

CTAB: Brometo de cetil trimetilamônio

D1/D2: Região da Subunidade Maior do rRNA

DNA: Ácido desoxirribonucleico

dNTP: Desoxirribonucleotídeo trifosfato

EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético

g L⁻¹: Grama por litro

g: Grama

GYMP: Glucose-Yeasts Extract- Malt Extract- Potassium phosphate

h: Horas

HCl: Ácido clorídrico

ICB: Instituto de Ciências Biológicas

ITS: Região transcrita interna

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

KH₂PO₄: Fosfato monopotássico

Km: Quilômetros

L: Litro

M: Molar

mg: Miligrama

MgCl₂: Cloreto de Magnésio

MgSO₄•7H₂O: Sulfato de magnésio hepta-hidratado

min: minutos

mL: Mililitro

mm: Milímetros

NaCl: Cloreto de sódio

ng: Nanograma

nm: Nanômetros

PCR: Reação em cadeia da polimerase

pH: Potencial Hidrogeniônico

pmol: Picomol

rcf: Força centrífuga relativa

RNA: Ácido Ribonucléico

rpm: Rotações por minuto

SDS: Dodecil sulfato de sódio

TBE: Tris-borato

TE: Tampão Tris-EDTA

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

UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais

UFMGCB: Coleção de Micro-organismos e Células da UFMG

UV: Ultravioleta

v/v: Volume por volume

V: Volts

YM: Ágar extrato de malte - Extrato de levedura

YNB: Base de nitrogênio de levedura

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

μL : Microlitro

μmol : Micromol

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
1.1. Antártica: habitat natural de organismos extremófilos	18
1.2. Fungos em ambientes lacustres da Antártica	19
1.3. Enzimas de interesse industrial e suas aplicações biotecnológicas	20
1.4. Biossurfactantes	27
2. JUSTIFICATIVA	29
3. OBJETIVOS	30
3.1. Objetivo Geral	30
3.2. Objetivos Específicos.....	30
4. MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1. Coleta das amostras	31
4.2. Isolamento	32
4.3. Preservação.....	32
4.4. Identificação	33
4.4.1. Identificação de fungos filamentosos	33
4.4.1.1. Extração de DNA total	33
4.4.1.2. Amplificação utilizando o iniciador (GTG) ₅	34
4.4.1.3. Amplificação da região ITS.....	34
4.4.1.4. Amplificação do gene da RNA polimerase II.....	35
4.4.2. Identificação de leveduras	35
4.4.2.1. Extração de DNA total	35
4.4.2.2. Amplificação do domínio D1/D2.....	36
4.4.3. Purificação dos amplicons	36
4.4.4. Sequenciamento	37
4.4.4.1. Reações de sequenciamento.....	37
4.4.4.2. Precipitação da reação de sequenciamento.....	37
4.4.4.3. Análise computacional das sequências.....	38
4.5. Análise da diversidade dos fungos: cálculo dos índices de abundância, riqueza e dominância	38
4.6. Detecção de enzimas.....	39
4.6.1. Agarases.....	39
4.6.2. Amilases.....	39
4.6.3. Carragenases	40

4.6.4. Celulases	40
4.6.5. Esterases.....	40
4.6.6. Inulinases	40
4.6.7. Invertases	40
4.6.8. Lipases	41
4.6.9. Pectinases.....	41
4.6.10. Proteases	41
4.7. Produção de biossurfactantes	41
4.7.1. Triagem da produção de biossurfactantes.....	41
4.7.2. Teste índice de emulsificação ($E_{24\%}$).....	42
5. RESULTADOS.....	43
5.1. Isolamento dos fungos	43
5.2. Identificação dos fungos	44
5.3. Análise da diversidade da comunidade fúngica	47
5.4. Avaliação das atividades enzimáticas	50
5.5. Avaliação da produção de biossurfactantes	58
6. DISCUSSÃO.....	64
6.1. Isolamento e identificação dos fungos	64
6.2. Produção enzimática dos isolados fúngicos	69
6.3. Produção de biossurfactantes pelos isolados fúngicos.....	70
7. CONCLUSÃO	73
8. PRODUÇÃO ACADÊMICA	74
REFERÊNCIAS.....	76

1. INTRODUÇÃO

1.1. Antártica: habitat natural de organismos extremófilos

A Antártica é um continente com superfície de 13.661.000 km², o que equivale a aproximadamente 1,6 vezes a área do Brasil (Loose, 2011). Além disso, é o continente mais meridional do planeta e abriga tanto o polo geográfico sul (a -90° de latitude S), quanto o polo magnético sul (Bischoff, 1996; Ferreira, 2009). A Antártica é um continente caracterizado por suas condições extremas, como temperaturas médias abaixo de 0 °C e a presença de fortes ventos (Duarte et al., 2017; Scambos et al., 2018). Essas características fazem com que esse seja o continente mais frio e seco do planeta, principalmente em sua região mais interna, na qual a precipitação de chuva anual varia entre 30 mm e 70 mm, que são valores inferiores aos registros anuais de chuva no deserto do Saara (Child & Kelly, 1990; Ferreira, 2009). Além disso, a maior parte do solo da Antártica é permanentemente coberto por uma espessa camada de gelo, com volume estimado em 25,4 milhões de km³ (Bischoff, 1996; Loose, 2011).

Dado que somente ~0,3% do território antártico não é coberto por gelo, a diversidade de plantas e animais relatadas no ambiente é considerada baixa em comparação com outros seres vivos (Convey & Stevens, 2007; Chown et al., 2015). Essa baixa diversidade é consequência das condições extremas e também da espessura do solo, que são fatores limitantes ao desenvolvimento e sobrevivência das plantas (Bischoff, 1996). Quanto à fauna, espécies de peixes, aves aquáticas, mamíferos e invertebrados estão presentes nesse ecossistema (Loose, 2011).

As condições extremas da Antártica consistem em baixas temperaturas, ventos fortes, altos índices de radiação UV, salinidade elevada, escassez de nutrientes, ciclos de congelamento e degelo e variações de pH (Brasil, 2006; Gonçalves et al., 2012; de Souza, 2021). Nestas condições, os micro-organismos capazes de sobreviver são denominados poliextremófilos, os quais despertam a atenção dos pesquisadores devido às suas adaptações às condições extremas do ambiente e, conseqüentemente, podem favorecer o seu emprego em processos biotecnológicos (Yarzabal, 2016).

O Lago Boeckella é o maior corpo d'água presente na Baía Esperança, situado próximo à extremidade nordeste da Península Antártica, com uma área de 67,454 m² (Izaguirre et al., 1998). O lago está 49 m acima do nível do mar, localizado em uma depressão fluvio-glacial represada por sedimentos de uma moraina lateral e a 600 m da Estação Argentina Esperanza (Izaguirre et al., 1993; Gibson & Zale, 2006). As águas desse lago são leitosas devido à entrada de sedimentos da geleira de Buenos Aires e o seu fundo se localiza em rochas Triássicas da Formação Trinity (Izaguirre et al., 1998; Rosa et al., 2022). De acordo com as análises

realizadas por Izaguirre et al. (1998), as características do Lago Boeckella variaram de oligotróficas a mesotróficas de acordo com a margem do lago e com o período do verão, sendo as margens adjacentes às colônias de pinguins as que apresentaram maiores indícios de eutrofização. Esses solos ornitogênicos favorecem o acúmulo de matéria orgânica no fundo do lago e são sua fonte mais importante de nutrientes (Izaguirre et al., 1993).

Em 2002, a camada ativa de *permafrost* abaixo do Lago Boeckella possuía 2,5-3,5 m de espessura (Ermolin, 2003). A redução do *permafrost* na área do Lago Boeckella provavelmente possui relação com o aumento da temperatura na Baía Esperança, o que influenciou diretamente na perda de volume de água e diminuição do tamanho do lago (Rosa et al., 2022). Devido a esses fatores de mudanças climáticas na região, atualmente, o Lago Boeckella reduziu significativamente sua área e compreende uma depressão ao longo da margem; por isso, o sedimento lacustre exposto está sujeito a intensos processos de erosão e intemperismo, restando apenas pequenas piscinas efêmeras que contêm água por curtos períodos durante os meses de verão. Dessa forma, o Lago Boeckella corre o risco de desaparecer, bem como todos os organismos ali residentes (Rosa et al., 2022).

1.2. Fungos em ambientes lacustres da Antártica

A Antártica possui diferentes tipos de lagos cujas características variam de ultra-oligotróficas a hipereutróficas, os quais podem ser de águas continentais ou hipersalinas; além disso, muitos lagos são permanentemente estratificados, podendo ser perenemente cobertos de gelo ou meromíticos salinos; outros podem ser rasos, geralmente presentes nas regiões costeiras, e livres de gelo durante o verão (Izaguirre et al., 2020). Muitos dos lagos da Península Antártica são sistemas rasos, apresentando menos de 10 m de profundidade, altamente cristalinos e permitem altos níveis de incidência solar, o que caracteriza um fator de estresse à comunidade microbiana (Izaguirre et al., 1993; Gonçalves et al., 2012).

A geologia complexa das diferentes ilhas na Antártica resulta em composições químicas diferentes de cada lago, o que pode favorecer a dominância de micro-organismos variados nesses ecossistemas, tornando os sedimentos lacustres importantes locais para o estudo da diversidade e ecologia microbiana (Chaparro et al., 2017; de Souza et al., 2022). Além disso, esses lagos possuem teias alimentares aquáticas incomuns, apresentando baixa biomassa de zooplâncton, ausência de peixes e baixa diversidade vegetal no seu entorno; por outro lado, os lagos antárticos apresentam alta diversidade de micro-organismos como vírus, cianobactérias, arqueias, bactérias, microalgas e fungos (Vincent, 2000; Ogaki et al., 2019; de Souza et al., 2021).

A colonização dos ambientes lacustres pelos fungos ocorre principalmente pela dispersão de propágulos aéreos, que podem ser transportados por meio do vento, precipitações ou inundações, os quais são posteriormente depositados na água e concentrados em diferentes estratos sedimentares (Dix & Webster, 1995). Os táxons relatados em habitats aquáticos variam desde organismos endêmicos, que são adaptados para completar seus ciclos de vida nesses ambientes, aos cosmopolitas, que estão presentes em diferentes ecossistemas (Shearer et al., 2007). Tendo isso em vista, não são todos os propágulos que chegarão a esses ambientes e completarão seus ciclos de vida; alguns podem até sobreviver, mas são incapazes de esporular e colonizar o ambiente (Dix & Webster, 1995; Shearer et al., 2007).

As condições bióticas e abióticas intrínsecas exercem alta pressão seletiva sobre os fungos existentes nos lagos da Antártica. Os ciclos de congelamento e degelo, o alto índice de radiação UV, variações de pH, condições oligotróficas e as baixas temperaturas são condições que limitam o crescimento e reprodução da maioria dos organismos (Ogaki et al., 2019, 2020a, 2020b; de Souza et al., 2021; Rosa et al., 2022). Dessa forma, os fungos antárticos podem apresentar mecanismos genéticos, bioquímicos, morfológicos e fisiológicos que possibilitam sua existência nessas condições extremas, como mudanças na composição da membrana celular, produção de enzimas, substâncias fotoprotetoras e anticongelantes intra e extracelulares (Vaz et al., 2011, Ogaki et al., 2019, 2020a, 2020b). Adaptados a essas condições poliextremófilas, os fungos presentes nos lagos antárticos desempenham um importante papel ecológico como decompositores primários de materiais orgânicos, participando ativamente na ciclagem de nutrientes importantes para o equilíbrio dos sistemas lacustres; além de serem produtores de bioprodutos com potenciais aplicações biotecnológicas (Ogaki et al., 2019, 2020b; de Souza et al., 2021; Rosa et al., 2022).

1.3. Enzimas de interesse industrial e suas aplicações biotecnológicas

As enzimas são proteínas que agem como biocatalisadores altamente eficientes nas reações metabólicas de um organismo. Elas diminuem a energia de ativação da reação e propiciam uma alta taxa de formação de produto sem serem consumidas durante o processo (Kulshrestha et al., 2013). Em geral, as enzimas são classificadas em sete classes: transferases, oxidoredutases, hidrolases, liases, ligases, translocases e isomerases (Jeske et al., 2019; El-Gendi et al., 2022). Atualmente, as enzimas mais utilizadas na biotecnologia são as hidrolases (**Tabela 1**), que catalisam a hidrólise do seu substrato por meio da reação com a água (Gurung et al., 2013; Kumari et al., 2021).

Visto que os fungos são os grandes decompositores naturais, eles podem produzir um elevado número de enzimas extracelulares importantes para a bioconversão de uma gama de substratos complexos (Berbee et al., 2017). As enzimas possuem a capacidade de catalisar reações em uma ampla faixa de temperatura, variando entre 0° e 110 °C e pH 2-14 (Kulshrestha et al., 2013). Tendo em vista que as enzimas psicrófilas são uma estratégia de adaptação dos micro-organismos ao ambiente frio, acredita-se que elas apresentam uma diminuição das interações estabilizadoras da estrutura da proteína, como ligações de hidrogênio, pontes salinas, interações iônicas e aromáticas (Buzzini et al., 2012; Michetti et al., 2017; Yusof et al., 2021). Como consequência dessa flexibilidade, a baixa energia cinética dessas enzimas é compensada pela redução na entalpia de ativação e, dessa forma, a velocidade das reações diminui lentamente com a diminuição da temperatura, preservando a alta atividade catalítica das enzimas em ambientes frios (Parvizpour et al., 2021).

Em escala industrial, as enzimas de micro-organismos psicrófilos e psicrotolerantes são de grande interesse em processos biotecnológicos, uma vez que possuem excepcional seletividade de produto e menor toxicidade ambiental e fisiológica (Bommarius & Paye, 2013; Choi et al., 2015). Apesar de plantas e animais também serem fontes dessas enzimas, a utilização daquelas com origem microbiana é, na maioria das vezes, mais vantajosa devido aos rendimentos mais elevados, ao rápido crescimento dos micro-organismos em meios de cultura mais econômicos, à facilidade de manipulação genética e ao seu fornecimento regular (Kasana & Gulati, 2011). Além disso, as enzimas microbianas são mais estáveis e sua produção é relativamente mais conveniente e segura quando comparadas às correspondentes enzimas vegetais e animais (Kasana & Gulati, 2011; de Souza, 2021). A alta eficiência catalítica das enzimas na faixa de temperatura de 0-20 °C diminui o risco de contaminação bacteriana e pode diminuir o tempo de processamento, renunciando o uso de equipamentos e sistemas caros de aquecimento (Skowronek et al., 2003).

Dessa forma, os micro-organismos extremófilos são importantes alvos em estudos biotecnológicos, visto que suas enzimas são estáveis em condições ambientais consideradas adversas para grande parte dos organismos, como variações de pH e de temperatura (Madhavan et al., 2017). Esses mecanismos desenvolvidos pelos extremófilos são úteis para processos industriais que precisam de atividade em baixas temperaturas, como a biorremediação ambiental e produção de detergentes (Santiago et al., 2016). De forma geral, as enzimas ativas a baixas temperaturas são empregadas nas indústrias alimentícia (fabricação de geleias e pães, produção de cervejas, vinhos, xaropes e sucos), farmacêutica (antivirais, antitumorais, imunomoduladoras, antioxidantes e anticoagulantes), cosmética, têxtil, de papel, na agricultura,

na produção de detergentes (alvejantes e surfactantes), de biocombustíveis e rações para animais (Kashyap et al., 2001; Kirk et al., 2002; Feitkenhauer, 2003; Kuhad et al., 2011; Ferreira-Dias et al., 2013; Necas & Bartosikova, 2013; Santiago et al., 2016; Furbino et al., 2018; Avhad & Marchetti, 2019; Uzuner, 2019; Nevalainen, 2020).

5 As agarases são hidrolases glicosídicas que catalisam a hidrólise do ágar (Fawzy et al., 2020). O ágar é o ficocoloide estrutural de algumas macroalgas vermelhas marinhas e consiste em agarose e agarpectina (Fawzy et al., 2020). Os oligossacarídeos derivados da quebra do ágar pela agarase são promissores para a pesquisa devido às suas propriedades imunomoduladoras, antiobesidade, antitumoral e antioxidante (Park et al., 2020). Portanto,
10 essas enzimas podem ser aplicadas nas indústrias farmacêutica, cosmética, médica ou alimentícia, além de serem utilizadas em biologia molecular para recuperação de fragmentos de DNA em géis de agarose (Sugano et al., 1993; Park et al., 2020; Strat et al., 2022).

 As amilases são hidrolases que quebram as ligações glicosídicas nas moléculas de amido, um polissacarídeo vegetal utilizado como carboidrato de reserva, e produzem dextrinas
15 e oligossacarídeos (Sundarram & Murthy, 2014). As amilases são categorizadas em três subtipos: α , β e γ , sendo a α -amilase a mais estudada. Essa enzima é secretada por animais, plantas e micro-organismos e o seu substrato é o amido (Farooq et al., 2021). As amilases microbianas atendem de forma mais eficiente às demandas industriais e substituem de forma satisfatória a hidrólise química do amido (Khokhar et al., 2011). Em virtude disso, essas foram
20 as primeiras enzimas microbianas a serem aplicadas em larga escala na indústria de alimentos (Arora, 2003). Dessa forma, possuem aplicação nas indústrias alimentícia, farmacêutica, de papel e na produção de detergentes (Feitkenhauer, 2003; Mobini-Dehkordi & Javan, 2012).

 As carragenases são responsáveis pela quebra da carragenina, que é o componente essencial da matriz extracelular de algas vermelhas (Guo et al., 2022). O polissacarídeo
25 carragenina não pode ser assimilado e utilizado diretamente pelo ser humano; entretanto, os oligossacarídeos resultantes da quebra da carragenina apresentam excelente solubilidade e biodisponibilidade e possuem características funcionais que podem ser amplamente utilizadas na indústria farmacêutica, como antivirais, antitumorais e imunomoduladores; na indústria de cosméticos, para a produção de protetores solares, cremes antienvhecimento e sabonetes; e na
30 indústria alimentícia, como emulsificante, gelificante e engrossador (Necas & Bartosikova, 2013; Furbino et al., 2018; Guo et al., 2022).

 As celulasas catalisam a quebra glicosídica da molécula de celulose, componente da parede celular das plantas (Kirk et al., 2002). A biomassa vegetal, constituída por celulose e hemicelulose, é indiscutivelmente a matéria-prima renovável mais abundante disponível para a

produção de bioetanol (Srivastava et al., 2018; Sukumaran et al., 2021). As enzimas celulolíticas industriais provêm principalmente de fungos filamentosos, como de espécies dos gêneros *Aspergillus*, *Trichoderma* e *Penicillium*, devido à sua versatilidade de utilização do substrato (Yao et al., 2016). Dessa forma, as celulasas possuem aplicação na indústria alimentícia, como na produção de vinhos, cervejas, chás e cafés, além das indústrias têxtil, de papel, de detergentes e na produção de biocombustíveis (Kirk et al., 2002; Cherry & Fidantsef, 2003; Kuhad et al., 2011; Uzunur, 2019).

As esterases são enzimas hidrolíticas envolvidas na clivagem e formação de ligações éster (Sayali et al., 2013). Elas estão amplamente distribuídas em vários tecidos de mamíferos, plantas e micro-organismos, e as esterases microbianas despertam grande atenção da indústria por serem mais estáveis e mais fáceis de serem produzidas em larga escala (Liu et al., 2013). Essas enzimas possuem aplicação nas indústrias alimentícia, farmacêutica, cosmética e na agricultura; além disso, são essenciais na degradação de materiais naturais e poluentes industriais, como resíduos de plásticos e produtos químicos tóxicos (Panda & Gowrishankar, 2005; Sayali et al., 2013).

As inulinases são importantes enzimas que hidrolisam a inulina, resultando em frutose e frutooligossacarídeos como principais produtos (Germec et al., 2020). Essas enzimas já foram relatadas em plantas, animais e micro-organismos (sendo esses a principal fonte da enzima) e apresentam um papel relevante na produção de xaropes com alta concentração de frutose e também na produção de etanol (Chi et al., 2009; Martinez et al., 2016; Singh & Singh, 2017). Além disso, são utilizadas na produção de oligossacarídeos, que são prebióticos pouco calóricos e podem ser empregados para melhorar o sabor e o prazo de validade de leites e pães (Singh et al., 2020).

As invertases são hidrolases que atuam na quebra da ligação entre D- glicose e D-frutose da molécula de sacarose (Toledo et al., 2019). Elas são produzidas por plantas, abelhas e micro-organismos e são muito utilizadas na indústria alimentícia devido à preferência pelo açúcar resultante da hidrólise realizada pela enzima (Veana, 2018). A utilização dessa enzima proporciona a redução do número de adoçantes utilizados na indústria e o aumento da vida útil dos produtos; além disso, possui aplicação na produção de pães, bebidas e na formulação de medicamentos (Ghasemi et al., 2014; Veana, 2018). Essas enzimas também apresentam propriedades antioxidantes e antibacterianas, prevenindo infecções bacterianas e a fermentação intestinal oxidativa (Nadeem et al., 2015).

As lipases são hidrolases de triacilglicerol que desempenham um papel importante no metabolismo e digestão de gordura (Cesário et al., 2021). A expressão das lipases microbianas

é modulada principalmente por fatores ambientais, como uma resposta extracelular ao meio que apresenta variações de temperatura e é desprovido de nutrientes; dessa forma, a presença de lipídeos e ácidos graxos como fontes de carbono induz a produção dessas enzimas extracelulares (Nielsen, 2013; Casas-Godoy et al., 2018; Cesário et al., 2021). As lipases são
5 utilizadas como aditivos para ingredientes alimentícios, como hidrólise da gordura do leite, aceleração da maturação do queijo, além de possuírem aplicação na biorremediação, nas indústrias têxtil, farmacêutica, cosmética, de papel, de detergentes e de biodiesel (Ferreira-Dias et al., 2013; Avhad & Marchetti, 2019; Nevalainen, 2020).

As pectinases degradam a pectina, componente da lamela média e da parede celular primária das plantas superiores; elas são produzidas por fungos, bactérias, insetos, nematódeos e protozoários (Khairnar et al., 2009; Sudeep et al., 2020). Essas enzimas são aplicadas na indústria alimentícia, para extração de sucos de frutas, fermentação de cafés e chás, clarificação de vinhos e preparação de geleias; na indústria farmacêutica, para a formulação de comprimidos devido à sua propriedade gelificante; nas indústrias cosméticas e de papel, na biorremediação,
15 produção de detergentes e alimentação animal (Nevalainen, 2020; Haile & Ayele, 2022).

Por fim, as proteases são uma importante classe de enzimas hidrolíticas encontradas em todas as formas de vida, sendo as produzidas por micro-organismos predominantemente extracelulares e diretamente afetadas por fatores nutricionais e fisicoquímicos (Joshi & Satyanarayana, 2013). As proteases extracelulares catalisam a hidrólise de proteínas em
20 peptídeos e aminoácidos menores para a posterior absorção das células, o que constitui uma etapa extremamente necessária no metabolismo do nitrogênio (Sabotic & Kos, 2012; de Souza et al., 2015). Essas enzimas possuem aplicação nas indústrias alimentícia, farmacêutica, fotográfica, de detergentes, na agricultura, pecuária, na biorremediação, na degomagem de seda e na recuperação da prata de filme de raios X (Rao et al., 1998; Joshi & Satyanarayana, 2013;
25 Solanki et al., 2021).

Tabela 1. Exemplos de fungos obtidos de ambientes frios produtores das enzimas e suas aplicações biotecnológicas.

Enzimas	Táxons	Aplicações	Referências
Agarase	<i>Penicillium chrysogenum</i> , <i>Beauveria bassiana</i> , <i>Cladosporium</i> sp., <i>Doratomyces</i> sp., <i>Cladosporium</i> sp., <i>Pseudogymnoascus</i> sp.	Indústrias farmacêutica, cosmética, médica e alimentícia	Furbino et al. (2018), Park et al. (2020); Strat et al. (2022)
Amilase	<i>Aspergillus oryzae</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Candida antarctica</i> , <i>Sporidiobolus salmonicolor</i> , <i>Sporobolomyces roseus</i> , <i>Dioszegia fristingensis</i> , <i>Dioszegia hungarica</i> , <i>Cryptococcus adeliensis</i> , <i>Cryptococcus victoriae</i> , <i>Fellomyces penicillatus</i> , <i>Guehomyces pullulans</i> , <i>Leuconeuropa</i> sp., <i>Torrubiella</i> sp.	Produção de biocombustível, indústrias alimentícia, farmacêutica, de papel, de detergentes e têxtil	De Mot & Verachtert, (1987), Feitkenhauer, (2003), Oyeleke et al. (2011), Carrasco et al. (2012), Mobini-Dehkordi & Javan (2012), Barahona et al. (2016), Martorell et al. (2017), Aggarwal et al. (2019)
Carragenase	<i>Doratomyces</i> sp., <i>Penicillium chrysogenum</i> , <i>Beauveria bassiana</i> , <i>Cladosporium</i> sp., <i>Pseudogymnoascus</i> sp.	Indústrias alimentícia e farmacêutica	Necas & Bartosikova (2013), Furbino et al. (2018)
Celulase	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Dioszegia fristingensis</i> , <i>Dioszegia hungarica</i> , <i>Mrakia frigida</i> , <i>Sporidiobolus metaroseus</i> , <i>Cryptococcus victoriae</i> , <i>Guehomyces pullulans</i> , <i>Microsporium</i> sp., <i>Cryptococcus</i> sp., <i>Leuconeuropa</i> sp.	Produção de biocombustível, indústrias alimentícia, farmacêutica, de papel, de detergentes e têxtil	Kirk et al. (2002), Cherry & Fidantsef, (2003), Kuhad et al. (2011), Carrasco et al. (2012), Maharana & Ray (2014), Barahona et al. (2016), Martorell et al. (2017), Uzuner (2019)
Esterase	<i>Monascus ruber</i> , <i>Glaciozyma antarctica</i> , <i>Penicillium rubens</i> , <i>Cryptococcus adeliensis</i> , <i>Cryptococcus gilvescens</i> , <i>Cryptococcus victoriae</i> , <i>Cystobasidium laryngis</i> , <i>Dioszegia hungarica</i> , <i>Leucosporidium creatinivorum</i> , <i>Mrakia frigida</i> , <i>Phenoliferia glacialis</i> , <i>Rhodotorula muscorum</i> , <i>Leuconeuropa</i> sp., <i>Holtermanniella</i> sp.	Agricultura, degradação de resíduos, indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética	Panda & Gowrishankar (2005), Carrasco et al. (2012), Sayali et al. (2013), Guo et al. (2016), Martorell et al. (2017), Yusof et al. (2021), García-Calvo et al. (2023)

Inulinase	<i>Cryptococcus gastricus</i> , <i>Cryptococcus tephrensensis</i> , <i>Guehomyces pullulans</i> , <i>Candida davisiana</i> , <i>Leucosporidiella fragaria</i> , <i>Metschnikowia australis</i> , <i>Vishniacozyma victoriae</i>	Indústria alimentícia e produção de etanol	Martinez et al. (2016), Singh & Singh (2017)
Invertase	<i>Leucosporidium antarcticum</i> , <i>Sporidiobolus salmonicolor</i> , <i>Sporidiobolus metaroseus</i> , <i>Cryptococcus gilvencens</i> , <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> , <i>Mrakia gelida</i> , <i>Kriegeria</i> sp., <i>Cystobasidium</i> sp., <i>Fellozima</i> sp.	Produção de combustíveis, indústrias alimentícia, farmacêutica e de detergentes	Turkiewicz et al. (2005), Barahona et al. (2016), Troncoso et al. (2017)
Lipase	<i>Leucosporidium antarcticum</i> , <i>Pseudozyma antarctica</i> , <i>Penicillium allii</i> , <i>Dioszegia fristingensis</i> , <i>Mucor</i> sp., <i>Penicillium</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Alternaria</i> sp., <i>Rhizopus</i> sp., <i>Geotrichum</i> sp., <i>Rhizomucor</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp., <i>Leuconeurospora</i> sp., <i>Rhodotorula</i> sp.	Indústrias têxtil, alimentícia, médica, cosmética, de detergentes, biocombustível e biorremediação	Bradner et al. (2003), Turkiewicz et al. (2003), Larios et al. (2004), Carrasco et al. (2012), Gurung et al. (2013), Maharana & Ray (2014), Geoffry et al. (2018); Cesário et al. (2021)
Pectinase	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Dioszegia fristingensis</i> , <i>Cryptococcus adeliensis</i> , <i>Guehomyces pullulans</i> , <i>Mrakia frigida</i> , <i>Kriegeria</i> sp., <i>Fellozima</i> sp., <i>Leuconeurospora</i> sp., <i>Rhodotorula</i> sp., <i>Wickerhamomyces</i> sp., <i>Metschnikowia</i> sp., <i>Dioszegia</i> sp., <i>Leucosporidiella</i> sp., <i>Candida</i> sp.	Indústrias alimentícia, farmacêutica, cosmética, de papel, biorremediação, produção de detergentes e alimentação animal	Carrasco et al. (2012), Gurung et al. (2013), Martorell et al. (2017), Nevalainen (2020), Haile & Ayele (2022)
Protease	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Sporidiobolus salmonicolor</i> , <i>Sporidiobolus metaroseus</i> , <i>Leucosporidium creatinivorum</i> , <i>Glaciozyma litoralis</i> , <i>Guehomyces pullulans</i> , <i>Mrakia frigida</i> , <i>Cryptococcus</i> sp., <i>Penicillium</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Leuconeurospora</i> sp.	Biorremediação, indústrias alimentícia, farmacêutica, fotográfica, de detergentes, na agricultura, pecuária e gerenciamento de resíduos	Rao et al. (1998), Pekkarinen et al. (2000), Oyeleke et al. (2011), Carrasco et al. (2012), Gurung et al. (2013), Joshi & Satyanarayana (2013), Benluvankar et al. (2015), Barahona et al. (2016), Martorell et al. (2017), Solanki et al. (2021)

1.4. Biossurfactantes

Os surfactantes são moléculas anfipáticas utilizadas em diversos setores industriais e, em sua grande maioria, derivada do petróleo (Nitschke & Pastore, 2002; Makkar et al., 2011). A propriedade anfipática dessas moléculas permite que elas diminuam a tensão na interface
5 entre fluidos com diferentes polaridades, aumentando a solubilidade de substâncias imiscíveis em água (Singh et al., 2018). Em busca de alternativas com menor toxicidade e maior biodegradabilidade, os biossurfactantes são a classe de surfactantes naturais que melhor atende às necessidades industriais para a substituição dos surfactantes sintéticos (Nitschke & Pastore, 2002).

10 Os biossurfactantes são produzidos durante o crescimento e metabolismo de algumas bactérias, fungos filamentosos e leveduras (Jimoh & Lin, 2019). Essas moléculas são secretadas extracelularmente ou ligadas a partes das células durante o crescimento dos micro-organismos em substratos imiscíveis em água (Desai & Banat, 1997; Santos et al., 2016; Jimoh & Lin, 2019). Além disso, podem ser produzidos por processos de fermentação microbiana, utilizando
15 materiais residuais e substratos agrícolas mais baratos (Banat et al., 2010; Handa et al., 2022). Sua classificação é baseada em sua estrutura química e no micro-organismo produtor, sendo alguns exemplos dessas moléculas: glicolipídeos, lipopeptídeos, lipoproteínas, fosfolipídeos e ácidos graxos (Shekhar et al., 2014). Algumas das vantagens dos biossurfactantes quando comparados aos surfactantes sintéticos são: (i) maior eficiência (produzem menor tensão
20 superficial em menores concentrações), (ii) maior estabilidade térmica e de pH, (iii) baixa toxicidade e (iv) maior biodegradabilidade (Nitschke & Pastore, 2002; Sharma et al., 2015).

Existem algumas possíveis explicações sobre a evolução dos biossurfactantes microbianos. A primeira está relacionada ao fato da emulsificação e da solubilização de substratos hidrofóbicos servirem para criar um microambiente favorável ao crescimento e
25 produção dos micro-organismos (Van Hamme et al., 2006). A segunda relaciona a adesão das células às superfícies, possibilitando que o organismo se desprenda de ambientes desfavoráveis e busque ambientes favoráveis com maior disponibilidade de nutrientes (Cameotra et al., 2010). A terceira propõe que a produção dessas moléculas serve como reserva energética, uma vez que os micro-organismos podem entrar no processo catabólico utilizando-as como possível fonte
30 de energia durante períodos de escassez de nutrientes (Mimee et al., 2009; Silva et al., 2019). Já a quarta sugere essa produção como proteção dos micro-organismos contra ambientes com alta pressão osmótica, desequilíbrio iônico e contra ciclos de congelamento e degelo (Selbmann et al., 2002; da Silva et al., 2021).

Devido às suas propriedades de detergência, emulsificação, lubrificação e solubilização de substâncias apolares, os biossurfactantes possuem aplicações na agricultura (biopesticidas), na medicina (atividades antimicrobiana, antitumoral e moduladores imunológicos), na biorremediação e nas indústrias cosmética e alimentícia (Nitschke & Pastore, 2002; Fakruddin, 5 2012). Ainda que estudos relacionados à produção dessas moléculas por fungos filamentosos sejam escassos quando comparados aos estudos envolvendo bactérias, observa-se que os fungos apresentam maiores rendimentos quando comparados aos procariotos, o que pode estar associado à rigidez da parede celular desses organismos eucariotos (Bhardwaj, 2013). Além disso, com a crescente preocupação acerca da natureza patogênica relacionada aos 10 biossurfactantes bacterianos, houve um direcionamento do foco das pesquisas envolvendo a síntese de biossurfactantes fúngicos (Amaral et al., 2010; Handa et al., 2022).

Os micro-organismos de ambientes frios apresentam grande importância biotecnológica, uma vez que a produção de biomoléculas ativas a baixas temperaturas pode diminuir o consumo de energia durante os processos industriais (Perfumo et al., 2018). Além 15 disso, esses biossurfactantes podem ser utilizados como ingredientes em aditivos congelantes, detergentes frios e para melhorar as propriedades de fluxo em temperaturas de congelamento durante a produção de biodiesel (Perfumo et al., 2018; da Silva et al., 2021). A temperatura ideal de cultura para leveduras e fungos filamentosos está normalmente entre 25-30 °C; no entanto, leveduras psicrotolerantes isoladas de ambientes frios produzem biossurfactantes a 20 20 °C (Bueno et al., 2019; da Silva et al., 2021). Essa temperatura é vantajosa para a indústria, já que não aumenta os custos relacionados às etapas de resfriamento do meio de cultura (Santos et al., 2017; da Silva et al., 2021).

A produção de biossurfactantes parece ser uma característica comum entre os micro-organismos adaptados ao frio; *Moesziomyces antarcticus* (anteriormente denominada 25 *Pseudozyma antarctica*), levedura extremófila isolada do Lago Vanda, Antártica, é um exemplo de organismo produtor dessas moléculas, como lipídeos manosileritritol e diacilmanosileritritol (Goto et al., 1969; Kitamoto et al., 2001; Morita et al., 2013; Perfumo et al., 2018). Outros exemplos de fungos com propriedades biossurfactantes são *Pleurotus djamor*, *Candida parapsilosis*, *Candida antarctica*, *Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus flavus* e *Fusarium 30 fujikuroi* (Wakamatsu et al., 2001; Gautam, 2014; Ishaq et al., 2015; Velioglu & Urek, 2015; Garg et al., 2018; Reis et al., 2018; Luft et al., 2020).

2. JUSTIFICATIVA

A Antártica é um continente que apresenta condições limitantes para a existência de grande parte dos seres vivos, como baixas temperaturas, ventos fortes e secos, ciclos de congelamento e degelo, longos períodos de escuridão e alta exposição à radiação UV (Onofri et al., 2007; Duarte et al., 2017). Os micro-organismos existentes nesse ambiente apresentam papel relevante no transporte de energia e na ciclagem de nutrientes, fornecendo a base para o funcionamento dos ecossistemas terrestres e aquáticos da Antártica (Ruisi et al., 2007; Duarte et al., 2017). Nos últimos 50 anos, porções da Antártica sofreram algumas mudanças nas temperaturas médias do ar de forma superior ao aumento geral da temperatura em outros pontos da superfície da Terra (Selbmann et al., 2012). Por conseguinte, as comunidades microbianas, incluindo os fungos, sofrem diretamente com as consequências do aquecimento global, e o ambiente que antes era restritivo pode se tornar permissivo para espécies invasoras destrutivas, alterando o equilíbrio do ecossistema (Selbmann et al., 2012). Dessa forma, estudos acerca da diversidade dos ambientes lacustres antárticos se tornam ainda mais necessários.

Ademais, os fungos existentes na Antártica tiveram suas características genótípicas e fenotípicas selecionadas de forma que eles conseguissem superar as condições limitantes apresentadas pelos ambientes frios, favorecendo seu crescimento e desenvolvimento nesses ambientes inóspitos (Parvizpour et al., 2021). A produção de enzimas e de biossurfactantes por esses micro-organismos adaptados a ambientes frios é de grande interesse industrial, uma vez que esses produtos apresentam maior biodegradabilidade e estabilidade quando submetidos a variações de temperatura e pH (Nitschke & Pastore, 2002; Duarte et al., 2017; Madhavan et al., 2017).

De forma geral, são escassos os estudos sobre fungos presentes em lagos da Antártica (Marchetta et al., 2023). Em relação ao Lago Boeckella, o estudo mais recente mostra a caracterização da microbiota não cultivável presente nesse lago, que foi avaliada pelo método de *metabarcoding* (Rosa et al. 2022); dessa forma, torna-se essencial a realização de mais estudos que avaliem a diversidade de fungos cultiváveis nesse lago. Tendo em vista a diversidade fúngica presente em ambientes lacustres da Antártica e a potencial aplicação industrial desses micro-organismos, é imprescindível que mais estudos sejam conduzidos a fim de aprimorar o conhecimento acerca da taxonomia e da bioprospecção de enzimas e biossurfactantes com potencial biotecnológico.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

5 Caracterizar a comunidade de fungos cultiváveis presentes em sedimentos lacustres do Lago Boeckella, Baía Esperança, nordeste da Antártica e avaliá-los quanto à produção de enzimas e biossurfactantes de interesse industrial.

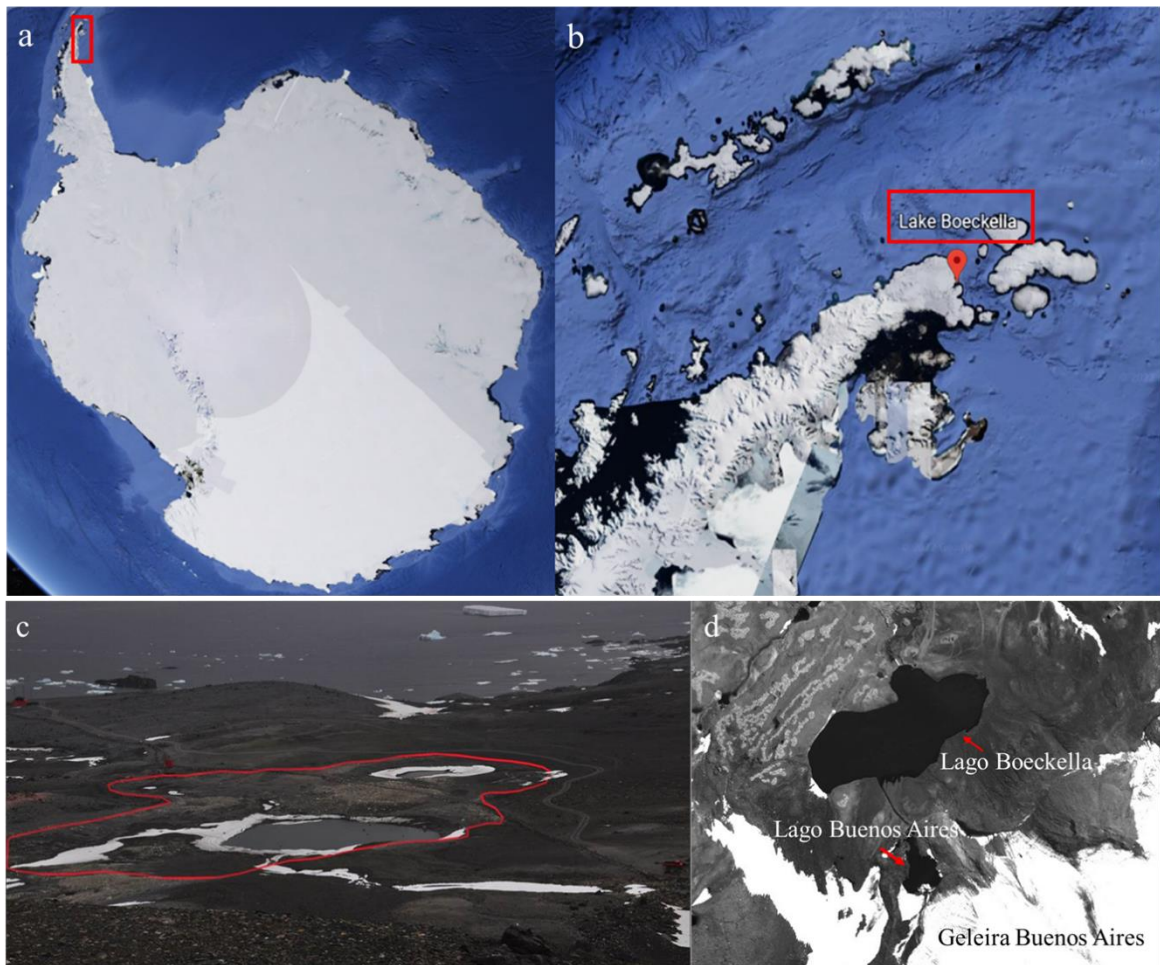
3.2. Objetivos Específicos

- Obter fungos cultiváveis a partir de dois testemunhos do Lago Boeckella;
- 10 • Depositar todos os fungos obtidos para preservação da biodiversidade *ex situ* na Coleção de Micro-organismos e Células da UFMG;
- Identificar todos os isolados obtidos por meio da taxonomia polifásica utilizando técnicas de biologia molecular;
- Avaliar a capacidade dos fungos obtidos em produzir enzimas e biossurfactantes de
15 interesse industrial.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Coleta das amostras

Dois testemunhos de 30 cm de comprimento foram coletados das margens oeste e sudeste do Lago Boeckella, Baía Esperança, nordeste da Península Antártica ($63^{\circ} 24' 30,3''$ S $56^{\circ} 59' 49,4''$ W) (**Figura 1**), durante o verão austral de 2019. O lago possuía uma área total de 3270 m^2 em 2018-2019, com profundidade de menos de 1 m na mesma época; além de apresentar pH 7.4, temperatura 2.4°C e $73 \mu\text{S/cm}$ de condutividade elétrica (Rosa et al., 2022). Os testemunhos foram coletados com tubos de PVC (60 mm de diâmetro x 50 cm de comprimento) previamente desinfetados. Após a coleta, as amostras foram mantidas a -20°C em sacos plásticos esterilizados e lacrados até chegarem ao Brasil, a fim de manter suas características. Em seguida, essas amostras foram levadas ao Laboratório de Microbiologia Polar e Conexões Tropicais (MICROPOLAR) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e mantidas a -20°C até o processamento.



15 **Figura 1.** Imagens com a localização do Lago Boeckella, Baía Esperança, região nordeste da Antártica. (a) Continente Antártico com a região do lago destacada pelo retângulo vermelho (b) Lago Boeckella, Baía Esperança, Antártica. Imagens: Google Earth. (c) Foto do Lago Boeckella em janeiro de 2018. A

delimitação em vermelho corresponde ao tamanho do lago em 2001. **(d)** Localização do Lago Boeckella próximo ao Lago Buenos Aires e à Geleira Buenos Aires. Fotos: Silvia H. Coria.

4.2. Isolamento

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

- 10 1. Ágar Dicloran Rosa Bengala (0.5% de peptona, 1% de glicose, 0.1% de KH_2PO_4 , 0.05% de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.0002% de dicloran, 0.0025% de rosa bengala, 0.01% de cloranfenicol);
2. Ágar Dicloran Glicerol (1% de dextrose, 0.0002% de dicloran, 0.05% de MgSO_4 , 0.1% de KH_2PO_4 , 0.5% de digestão péptica de tecido animal, 0.01% de cloranfenicol e 22% de glicerol);
- 15 3. Meio Mínimo (0.025% de peptona, 0.5% de glicose, 0.698% de K_2HPO_4 , 0.544% de KH_2PO_4 , 0.1% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.11% de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.01% de cloranfenicol);
4. Meio Extrato de Malte (5% de extrato de malte, 0.01% de cloranfenicol).

As amostras de cada uma das três seções (topo, meio e base) dos dois testemunhos correspondentes às duas margens (oeste e sudeste) foram processadas em triplicata. Dessa
20 forma, 200 mg de cada sedimento subamostrado foram ressuspensos em 1800 μL de solução salina 0.85%, e 100 μL foram plaqueados nos meios de cultura citados anteriormente. As placas foram incubadas a 15 °C durante 60 dias.

Neste período, foi realizada a contagem das unidades formadoras de colônias (UFC's) na diluição 10^1 , seguida da purificação das colônias, que consiste na separação de cada isolado
25 de acordo com sua macromorfologia em novas placas contendo o meio MEA (5% de extrato de malte). As placas foram incubadas a 15 °C por 7 dias e, em seguida, foi realizada a preservação dos isolados.

4.3. Preservação

30 Após a obtenção das colônias purificadas, os isolados de leveduras foram inoculados em tubos contendo 2 mL de caldo GYMP (1% de extrato de malte, 0.2% de fosfato de potássio dibásico, 2% de glicose e 0.5% de extrato de levedura) e incubados por 48 horas a 15 °C. Em seguida, 800 μL desse caldo foram transferidos em duplicatas para criotubos esterilizados

contendo 200 µL de glicerol puro. Já os isolados de fungos filamentosos foram preservados em duplicata em frascos de penicilina (Castellani, 1939) contendo água destilada e mantidos a temperatura ambiente. Além disso, 10 fragmentos de micélio fúngico foram preservados em criotubos esterilizados, também em duplicata, contendo 1 mL de solução de glicerol 15%, e, por fim, foram armazenados a -80 °C em ultrafreezer. Todos os fungos obtidos foram depositados na Coleção de Micro-organismos e Células do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) sob o código UFMGCB.

4.4. Identificação

10 4.4.1. Identificação de fungos filamentosos

Após o agrupamento macromorfológico, foi realizado o agrupamento molecular por meio da técnica de PCR microssatélite (PCR-MST), conhecida como “DNA *fingerprint*”, utilizando como iniciador o oligonucleotídeo sintético (GTG)₅. Um isolado de cada grupo foi identificado pela amplificação da região transcrita interna (ITS1-5.8S-ITS2) do gene do rRNA e de outro marcador complementar (RNA polimerase II).

15 4.4.1.1. Extração de DNA total

A extração do DNA total foi adaptada de Rosa et al. (2009). Inicialmente, os fungos filamentosos foram inoculados em meio de cultura MEA (5% de extrato de malte) durante 7 a 14 dias. Posteriormente, fragmentos do micélio foram retirados e colocados em microtubos estéreis de 2 mL contendo 400 µL de tampão de lise (Tris-HCl 0.05 M, EDTA 0.005 M, NaCl 0.1 M e SDS 1%) e foram mantidos a -20 °C por no mínimo 30 min. Pérolas de aço inoxidável foram adicionadas a esses microtubos a fim de triturar o micélio com o auxílio de microdesmembrador sob intensa agitação. Após homogeneização, foram adicionados 162 µL de CTAB (Tris 2 M, NaCl 8.2%, EDTA 2 M e CTAB 0.2%) aos microtubos, que, em seguida, foram incubados a 65 °C por 40 min. Logo após, foram adicionados 570 µL de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) aos microtubos, que foram homogeneizados e incubados no freezer a -20 °C por 30 min e, posteriormente, centrifugados a 14.000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo com adição de 10% de seu volume de uma solução de acetato de sódio 3 M. Essa suspensão foi homogeneizada, incubada a -20 °C por 30 min e, em seguida, centrifugada a 14.000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo acrescido de 50% de seu volume de isopropanol (Merck) e deixado em repouso por aproximadamente 30 min. A suspensão foi homogeneizada e centrifugada a 14.000 rpm por 5 min. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento foi homogeneizado com

etanol 70% (Merck) v/v. As amostras foram mantidas em temperatura ambiente *overnight* e 50 μL de tampão TE/Tris-EDTA (Tris-HCl 0.01 M e EDTA 0.001 M) foram acrescentados aos tubos. As amostras foram incubadas a 65 °C por 60 min para a hidratação do DNA e armazenadas em freezer a -20 °C. Por fim, as concentrações de DNA das amostras foram dosadas em Nanodrop 5 ND 1000 (NanoDrop Technologies) e ajustadas de 50 a 500 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ para posterior utilização.

4.4.1.2. Amplificação utilizando o iniciador (GTG)₅

Foi utilizado o iniciador (GTG)₅ (5'-GTGGTGGTGGTGGTG-3') para amplificar regiões microssatélites por meio de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), segundo a metodologia descrita por Lieckfeldt et al. (1993). A PCR foi conduzida em microtubos de 0.2 mL, com volume final de 25 μL , contendo: 1 a 5 μL de DNA (dependendo da concentração de DNA, variável de 50-500 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$); 2 μL do iniciador (GTG)₅ 10 $\mu\text{mol } \mu\text{L}^{-1}$ (MWG Biotech); 2.5 μL de tampão de PCR 5X (Fermentas); 1.5 μL de MgCl_2 25 mM; 1 μL de dNTP 10 mM; 0.2 μL de Taq DNA polimerase 5U (Fermentas) e o volume final foi completado com água ultrapura esterilizada. As reações de PCR foram realizadas em termociclador PCR Mastercycler (Eppendorf), nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94 °C por 5 min, seguida por 40 ciclos de desnaturação a 94 °C por 15 s, pareamento a 55 °C por 1 min e extensão a 72 °C por 90 s, e uma extensão final a 72 °C por 6 min. A observação dos produtos da PCR (*amplicons*) foi feita por eletroforese em gel de agarose 1.5%, em tampão TBE 0.5X (54 g de tris base, 27.5 g de ácido bórico, 20 mL de EDTA 0.5 M, pH 8), que foram submetidos a 80 V por 1h e 30 min e corados com uma solução de agente intercalante (GelRed). Os géis foram visualizados sob luz ultravioleta e fotodocumentados (Vilber Lourmat, França).

4.4.1.3. Amplificação da região ITS

A amplificação da região transcrita interna (ITS1-5.8S-ITS2) do gene do rRNA foi realizada segundo a metodologia de White et al. (1990), com a utilização dos iniciadores universais ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) e ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC). A reação de PCR foi realizada com volume final de 50 μL , contendo: 1 a 5 μL de DNA (dependendo da concentração de DNA, variável de 50-500 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$); 1 μL de cada iniciador ITS1 e ITS4 10 $\mu\text{mol } \mu\text{L}^{-1}$ (MWG Biotech); 5 μL de tampão de PCR 5X (Fermentas); 2 μL de 10 MgCl_2 25 mM; 2 μL de dNTP 10 mM; 0.2 μL de Taq DNA polimerase 5U (Fermentas), com o volume final completado com água esterilizada. As reações da PCR foram realizadas utilizando o termociclador PCR Mastercycler (Eppendorf), nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94 °C por 5 min, seguido por 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1

min, pareamento a 55 °C por 1 min, extensão a 72 °C por 1 min, e uma extensão final a 72 °C por 5 min. Os *amplicons* foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1%, em tampão TBE 0.5X, sendo submetidos a 120 V por 20 min, e, em seguida corados com solução de GelRed. Os géis foram visualizados sob luz ultravioleta e fotodocumentados (Vilber Lourmat, França).

4.4.1.4. Amplificação do gene da RNA polimerase II

Na amplificação parcial do gene que codifica a RNA polimerase II (RBP2) foram utilizados os *primers* RBP2 5F (5'-GATGACCGTGACCACTTCGG-3') e RBP2 7R (5'-CCCATGGCTTGTTTGCCCAT-3'), conforme descrito por Malkus et al. (2006). Para tanto, a reação teve um volume final padronizado de 50 µL, contendo: 33,8 µL de água esterilizada; 5 µL de tampão de PCR 5X; 3 µL de MgCl₂ 25 mM; 2 µL de dNTP 10 mM; 2 µL de betaína; 1 µL de cada *primer* 10 pmol µL⁻¹; 1 µL de DMSO; 0,2 µL de Taq DNA polimerase 5U e 1 µL de DNA da amostra (concentração entre 100 - 500 ng µL⁻¹). As seguintes condições no termociclador foram usadas: (a) desnaturação inicial a 94 °C por 3 min, seguido por (b) 35 ciclos de desnaturação (94 °C/ 20 s) - anelamento (55 °C/30 s) - extensão (72 °C/1 min) e (c) uma extensão final por 10 min a 72 °C. Os *amplicons* foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1%, em tampão TBE 0,5X, sendo submetidos a 120 V por 20 min, corados com solução de agente intercalante (GelRed) e visualizados sob luz ultravioleta e fotodocumentados (Vilber Lourmat, França).

4.4.2. Identificação de leveduras

Após o agrupamento macromorfológico, os grupos formados foram submetidos à análise de perfis moleculares por meio da técnica de PCR microsatélite (PCR-MST), da mesma maneira descrita no item 4.4.1.2. Em seguida, um isolado de levedura de cada grupo molecular formado foi selecionado para sequenciamento dos domínios D1-D2 da subunidade maior do DNA ribossomal utilizando os iniciadores ITS1/NL4.

4.4.2.1. Extração de DNA total

Uma alçada do cultivo foi ressuspensa em 100 µL de tampão de lise (Tris-HCl 0.05 M, EDTA 0.005 M, NaCl 0.1 M e SDS 1%) em tubos de 0.6 mL e incubada a 65 °C por, no mínimo, 30 min. Posteriormente, foram adicionados 200 µL de clorofórmio: álcool isoamílico 24:1 e os tubos foram homogeneizados e centrifugados a 14.000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo contendo isopropanol (Merck) v/v e mantido

em repouso por 15 min para precipitar o DNA. Posteriormente, os tubos foram centrifugados a 14.000 rpm por 10 min e 200 μL de etanol 70% (Merck) foram adicionados. Logo após, os tubos foram centrifugados novamente a 14.000 rpm por 10 min. O sobrenadante contendo etanol foi desprezado e as amostras secaram na bancada por 60 min ou *overnight*. Em seguida, foram adicionados 50 μL de tampão TE às amostras, que foram incubadas a 65 °C por 60 min para a hidratação do DNA e, posteriormente, armazenadas em freezer a -20 °C. Por fim, as concentrações de DNA das amostras foram dosadas em Nanodrop ND 1000 (NanoDrop Technologies) e ajustadas de 50 a 500 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ para posterior utilização.

10 4.4.2.2. Amplificação do domínio D1/D2

Um isolado de cada um dos perfis moleculares de leveduras obtido foi selecionado e submetido ao sequenciamento da região D1-D2 da subunidade maior (26S) do gene do rRNA como descrito por Lachance et al. (1999). Para a reação de PCR, foram utilizados os iniciadores ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e NL4 (5'GGTCCGTGTTTCAAGACGG3'), que abrangem a região dos espaçadores transcritos internos (ITS1-5.8S-ITS2) do gene do RNA ribossomal e o domínio D1-D2. A reação foi realizada com um volume final de 50 μL , contendo 5 μL de tampão de PCR 10X (MBI Fermentas), 3 μL de MgCl_2 25 mM (MBI Fermentas), 1 μL de dNTP 2.5 mM (Invitrogen, USA), 1 μL de cada primer ITS1 e NL4 10 pmol (Invitrogen, USA), 0.2 μL de taq DNA polimerase 1.25U (MBI Fermentas) e 1 a 5 μL de DNA (dependendo da concentração de DNA, que deve estar entre 50-500 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$). O volume da reação foi ajustado com a adição de água esterilizada. A reação foi realizada no termociclador PCR Mastercycler (Eppendorf) nas seguintes condições: desnaturação inicial a 95 °C por 2 min, 35 ciclos de desnaturação a 95 °C por 15 s, anelamento a 54 °C por 25 s e extensão a 72 °C por 20 s, seguidos de extensão final a 72 °C por 10 min. Os *amplicons* foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1%, em tampão TBE 0.5X, sendo submetidos a 120 V por 20 min e, em seguida, corados com solução de GelRed. Os géis foram visualizados sob luz ultravioleta e fotodocumentados (Vilber Lourmat, França).

4.4.3. Purificação dos amplicons

30 Os *amplicons* gerados ao final da reação de PCR (volume de 47 μL) foram purificados com a adição de 11.25 μL de EDTA 125 mM e 141 μL de etanol absoluto (Merck). Em seguida, os tubos foram homogeneizados por inversão, deixados à temperatura ambiente por 30 min e centrifugados a 14.000 rpm por 30 min. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi tratado com 120 μL de etanol 70% e, posteriormente, homogeneizado e centrifugado a 14.000 rpm por

15 min. O sobrenadante foi descartado novamente e o restante do etanol evaporou a 37 °C por 30 min. Em seguida, o DNA foi ressuscitado em 10 µL de água esterilizada, dosado em NanoDrop ND 1000 (NanoDrop Technologies) e armazenado a -20 °C para ser utilizado nas reações de sequenciamento.

5

4.4.4. Sequenciamento

4.4.4.1. Reações de sequenciamento

As reações de sequenciamento foram realizadas utilizando-se o Kit BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems, EUA) em combinação com o sistema de sequenciamento automatizado ABI 3730x1 (Applied Biosystems, EUA) da plataforma de sequenciamento do Instituto René Rachou. A reação de PCR foi realizada em microplacas de 96 poços (Applied Biosystems, EUA) e preparada para um volume final de 10 µL, contendo: 1 µL do iniciador (5 pmol), 1 µL de tampão (presente no kit de sequenciamento), 1 µL de Big Dye, 1 µL de DNA (contendo entre 10-20 ng/µL) e o volume foi completado com água ultrapura esterilizada. O programa de ciclagem utilizado consistiu de uma desnaturação inicial a 36 °C por 1 min, 36 ciclos de anelamento a 96 °C por 15 s, seguido de extensão a 50 °C por 15 s e 4 min de extensão final a 60 °C.

4.4.4.2. Precipitação da reação de sequenciamento

Para precipitação das reações de sequenciamento, 1 µL de EDTA a 125 mM, 1 µL de acetato de sódio 3 M e 50 µL de etanol absoluto (Merck) gelado foram adicionados em cada poço da placa de 96 poços. A placa foi submetida à agitação em vórtex e incubada por 15 min à temperatura ambiente. Após a incubação, a placa foi centrifugada por 45 min a 4.000 rpm a 4 °C e o sobrenadante foi descartado por inversão. Em seguida, foram acrescentados 100 µL de etanol 70% (Merck) gelado, a placa foi novamente centrifugada por 15 min a 4.000 rpm a 25 °C e o sobrenadante foi descartado por inversão. Para remoção do excesso de etanol, o selante foi retirado e a placa invertida sobre um papel absorvente e submetida a um spin (pulso até a centrífuga atingir 900 rpm). Após essa etapa, a placa foi mantida em repouso, sem o selante, durante 20 min em temperatura ambiente para evaporação do etanol residual. Em seguida, o DNA das amostras precipitado em cada poço foi ressuscitado em 10 µL de Formamida HI 30 DI (Applied Biosystems, EUA). A placa foi armazenada a 4 °C, protegida da luz, até a injeção das amostras no sistema automatizado ABI 3730 (Applied Biosystems, EUA).

4.4.4.3. Análise computacional das sequências

As sequências de DNA foram analisadas de acordo com sua qualidade no portal Embrapa (<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>) e comparadas com as sequências de espécies de fungos referências depositadas no *GenBank*, incluindo “*type species*”, pertencentes às coleções de culturas internacionais, utilizando o programa BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool - versão 2.215 do BLAST 2.0) disponível no portal NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), desenvolvido pelo National Center For Biotechnology.

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

4.5. Análise da diversidade dos fungos: cálculo dos índices de abundância, riqueza e dominância

A diversidade de espécies foi avaliada utilizando índices de (a) Fisher- α (diversidade), (b) Margalef (riqueza) e (c) Simpson (dominância). O índice de Fisher- α se refere à diversidade, relacionando o número de táxons com o número de indivíduos em uma comunidade. Esse índice é calculado pela fórmula $S = a \cdot \ln(1 + n/a)$, em que S é o número de táxons presente na amostra, n é o número de indivíduos e a representa o índice de Fisher- α . O Índice de Margalef estima a riqueza em determinada área, baseando-se na distribuição numérica dos indivíduos das diferentes espécies em função do número total de indivíduos existentes na amostra analisada. Sua fórmula é dada por $S = (n-1) / \ln(N)$, em que n é o número de táxons encontrados e N representa o número de indivíduos. Quanto mais alto o valor de S , maior a riqueza de espécies do local amostrado. Já o índice de Simpson é um índice de dominância e reflete a probabilidade de dois indivíduos, escolhidos ao acaso na comunidade, pertencerem à mesma espécie. O cálculo da Dominância de Simpson (1-D) é dado pela fórmula $D = \sum (n / N)^2$, em que n é o número total de organismos de uma mesma espécie e N o número total de organismos de todas as espécies. O valor estimado de $1 - D$ pode variar de 0 a 1 e quanto mais próximo esse valor estiver de 1, maior é a dominância dos táxons naquela determinada área.

Uma curva de rarefação foi traçada utilizando o índice de rarefação individual, cujo propósito é comparar a diversidade taxonômica em amostras diferentes (Chao et al., 2014). Todos os resultados foram obtidos com 95% de confiança, e os valores de *bootstrap* foram calculados a partir de 1.000 repetições. Todos os índices foram calculados utilizando o programa computacional PAST v4.03 (Hammer et al., 2001). Além disso, o Diagrama de Venn foi utilizado para comparar as assembleias de fungos em comum nas amostras de sedimentos do lago (Bardou et al., 2014).

4.6. Detecção de enzimas

Assim como descrito por Hankin & Anagnostakis (1975), as atividades enzimáticas foram determinadas a partir da relação entre o diâmetro do halo de degradação e o diâmetro da colônia, ambos medidos com paquímetro. Essa relação foi mensurada de acordo com a fórmula para o cálculo do Índice Enzimático (IE) = diâmetro do halo de degradação/diâmetro da colônia, sendo considerados bons produtores aqueles que apresentaram a média do $IE \geq 2$. Os isolados foram inoculados em meios de cultura sólidos contendo o substrato específico para cada enzima. Para os fungos filamentosos, um fragmento do micélio fúngico (5 mm de diâmetro) foi colocado no centro da placa de Petri. Já para as leveduras, um inóculo de 1 cm feito com a alça foi depositado na placa. As placas foram incubadas a 15 °C por 7 dias e o halo foi revelado de forma específica para cada enzima. Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

20

4.6.1. Agarases

O ensaio para a observação da produção de agarase foi adaptado de Furbino et al. (2018) no qual os isolados foram cultivados em meio YM (1% de glicose, 0.5% de peptona, 0.3% de extrato de levedura, 0.3% de extrato de malte e 2% de ágar) suplementado com 1.5% de ágar. A determinação das atividades agarolíticas foi realizada pela adição de lugol à placa e o halo amarelado formado foi um indicador da atividade enzimática.

25

4.6.2. Amilases

Os isolados foram cultivados em ágar amido (6.7 g L⁻¹ de YNB [Difco], 2 g L⁻¹ de amido solúvel e 20 g L⁻¹ de ágar). Após 7 dias, as placas foram inundadas com solução de iodo de lugol (3.0 mg L⁻¹ de iodo e 7.0 mg L⁻¹ de iodeto de potássio). A degradação do halo foi determinada pela formação de um halo transparente ao redor da colônia em um fundo roxo escuro (Brizzio et al., 2007; Carrasco et al., 2012).

30

4.6.3. Carragenases

O ensaio para a observação da produção de carragenase foi adaptado de Furbino et al. (2018), no qual os isolados foram cultivados em meio YM suplementado com 1.5% de carragenana (Sigma Aldrich). A atividade enzimática foi visualizada após a adição de lugol à placa, sendo a presença de halo amarelado o indicador dessa atividade.

4.6.4. Celulases

Os isolados foram cultivados em meio YM (1:10) com a substituição da glicose pela carboximetilcelulose (5 g L^{-1}). As placas de Petri foram inundadas com uma solução de vermelho Congo (2.5 g L^{-1} em tampão Tris HCl 0.1 M, pH 8), que foi descartada após 15 min. Em seguida, as placas foram inundadas com NaCl 1 M por 15 min, que também foi descartado. A atividade positiva da enzima foi determinada por um halo alaranjado formado ao redor da colônia em um fundo vermelho (Bortolazzo, 2011; Martorell et al., 2017).

15 4.6.5. Esterases

Os isolados foram cultivados em meio composto por 10 g L^{-1} de peptona bacteriológica, 5 g L^{-1} de NaCl, 4 g L^{-1} de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e 10 g L^{-1} de Tween 80. A atividade da esterase foi evidenciada como um precipitado branco ao redor da colônia (Martorell et al., 2017).

20 4.6.6. Inulinases

Para a análise da produção de inulinase, foi utilizada a metodologia descrita por Martinez et al. (2016). Os isolados foram cultivados em ágar inulina (10 g L^{-1} de inulina, 2 g L^{-1} de extrato de levedura, 5 g L^{-1} de peptona, 0.5 g L^{-1} MgSO_4 , 0.5 g L^{-1} NaCl, 0.15 g L^{-1} CaCl_2 e 20 g L^{-1} de ágar, pH 6.0). Para a revelação do halo, as placas foram inundadas com solução de iodo de Lugol (3.0 mg L^{-1} de iodo e 7.0 mg L^{-1} de iodeto de potássio). A degradação da inulina foi determinada pela formação de uma zona amarelada em fundo marrom.

4.6.7. Invertases

Os isolados foram cultivados em meio YM acrescido com 2% de sacarose e 0.003% de bromocresol verde. A atividade positiva foi determinada a partir do aparecimento de um halo amarelo ao redor da colônia (Troncoso et al., 2017).

4.6.8. Lipases

Os isolados foram cultivados em meio contendo: 1 g L⁻¹ de peptona, 0.5 g L⁻¹ de extrato de levedura, 15 g L⁻¹ de ágar, 31.25 mL L⁻¹ de azeite de oliva como fonte de carbono e solução de Rodamina B 0.01% v/v (10 mL L⁻¹ em etanol absoluto). A atividade positiva foi detectada
5 pela presença de um halo fluorescente de cor laranja sob luz UV a 350 nm, formado pela interação da rodamina B com os ácidos graxos liberados pela hidrólise enzimática do azeite (Duarte et al., 2013).

4.6.9. Pectinases

10 Os isolados foram cultivados em meio YM (1:10), contendo 10 g L⁻¹ de pectina, pH 7. Para verificar a atividade da enzima, as placas foram inundadas com 10 g L⁻¹ de CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio). A degradação da pectina foi indicada por um halo claro ao redor da colônia em um fundo branco (Martorell et al., 2017; Poveda et al., 2018).

15 4.6.10. Proteases

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

20

4.7. Produção de biossurfactantes

4.7.1. Triagem da produção de biossurfactantes

A metodologia para produção de biossurfactantes foi adaptada de Sena et al. (2018). Para os fungos filamentosos, após o crescimento das colônias, foram retirados cinco fragmentos
25 com aproximadamente 5 mm de diâmetro do meio de cultivo contendo o micélio de cada um dos isolados, os quais foram inoculados em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio de cultivo líquido (óleo de girassol 40 g L⁻¹ e extrato de levedura 10 g L⁻¹) previamente esterilizado em autoclave a 121 °C por 15 minutos. Os Erlenmeyers foram mantidos sob agitação em shaker a 100 rpm e a 20 °C por 9 dias. Já para as leveduras, foi realizado um pré-
30 inóculo, no qual uma colônia crescida em ágar extrato de malte foi transferida para tubos Falcon contendo 15 mL de caldo YM (glicose 10 g L⁻¹, peptona bacteriológica 5 g L⁻¹, extrato de levedura 3 g L⁻¹ e extrato de malte 3 g L⁻¹), os quais foram mantidos sob agitação a 100 rpm e a 20 °C por 2 dias. Em seguida, a solução foi padronizada em espectrofotômetro com

absorbância entre 0.4-0.5 no comprimento de onda de 660 nm, e 2,5 mL (5%) dessa solução foram transferidos para Erlenmeyers contendo 50 mL do mesmo meio líquido com óleo de girassol utilizado para os fungos filamentosos, onde o cultivo permaneceu também sob agitação a 100 rpm, a 20 °C por 9 dias. Ao final do crescimento, os líquidos foram centrifugados a 7.197 rcf por 8 min a 20 °C em tubos Falcon de 50 mL e o sobrenadante obtido foi utilizado posteriormente para o teste de determinação do índice de emulsificação ($E_{24\%}$).

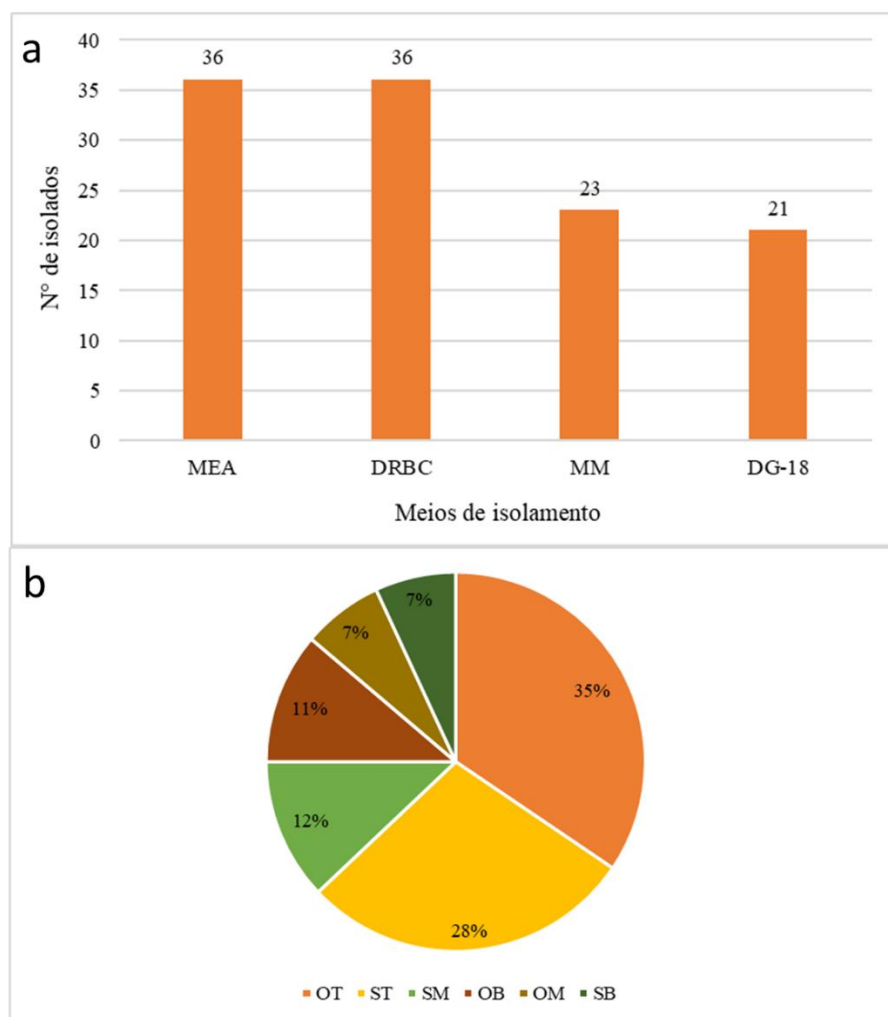
4.7.2. Teste índice de emulsificação ($E_{24\%}$)

O teste de determinação do índice de emulsificação foi realizado com base no original desenvolvido por Cooper & Goldberg (1987). Tubos ensaio de 15 mL foram preenchidos com 6 mL do solvente querosene e 4 mL do sobrenadante obtido da centrifugação do crescimento fúngico e cada tubo foi agitado utilizando vórtex a 3000 rpm durante 2 min. Os tubos foram deixados em repouso a temperatura ambiente por 24h e, em seguida, o índice de emulsificação foi analisado e calculado dividindo a medida da altura da camada de emulsão pela altura total da mistura (mm), e o resultado multiplicado por 100 ($E_{24\%} = h_{emulsão}/h_{total} \times 100$). Os ensaios foram realizados em triplicata, e os valores finais foram definidos a partir da média dos resultados. Para o controle negativo foi utilizado o meio de cultivo líquido livre de inóculo e para o controle positivo foi utilizado o surfactante industrial SDS a 1%. Os resultados foram considerados satisfatórios quando a média do $E_{24\%}$ atingiu valores > a 50% (Willumsen & Karlson, 1996).

5. RESULTADOS

5.1. Isolamento dos fungos

Após o processo de isolamento descrito, foram obtidos 116 isolados fúngicos (86 fungos filamentosos e 30 leveduras), os quais foram isolados em diferentes quantidades e densidades de cada região (sudeste e oeste) e seção (topo, meio e base). Os isolados foram agrupados em 18 morfotipos de fungos filamentosos e nove de leveduras. O número de fungos isolados de cada meio de cultura, bem como a porcentagem de distribuição nas diferentes regiões/seções do lago estão apresentados na **Figura 2**.



10

Figura 2. Isolamento dos fungos isolados do Lago Boeckella. (a) número de fungos isolados de cada meio de cultura. (b) porcentagem de fungos isolados por seção do testemunho, OT: oeste topo; ST: sudeste topo; SM: sudeste meio; OB: oeste base; OM: oeste meio; SB: sudeste base.

5.2. Identificação dos fungos

A partir do sequenciamento da região ITS e dos domínios D1-D2 dos 116 isolados fúngicos, foram identificados 104 isolados, 77 de fungos filamentosos e 27 leveduras (**Tabela 2**). Dezesesseis gêneros foram identificados, os quais pertencem aos filos *Ascomycota* (56,25%),
5 *Basidiomycota* (37,5%) e *Mortierellomycota* (6,25%). Os gêneros mais abundantes de fungos filamentosos foram *Pseudogymnoascus* (32,46%), *Pseudeurotium* (18,18%) e *Antarctomyces* (14,28%); e de leveduras foram *Candida* (37,03%) e *Naganishia* (22,22%). Dos 104 isolados identificados, as espécies *Antarctomyces psychrotrophicus* (11 isolados), “*Candida davisiana*” (10), *Ramgea ozimecii* (09), *Holtemanniella wattica* (04), *Leucosporidium creatinivorum* (02),
10 *Penicillium polonicum* (02), *Penicillium allii-sativi* (01), *Mrakia blollopis* (01) foram identificadas.

Tabela 2. Identificação dos fungos isolados dos sedimentos do Lago Boeckella por meio do sequenciamento de regiões do rDNA e análise utilizando o *Basic Local Alignment Search Tool* (BLASTn).

Região	UFMGCB ^a	Resultado do top BLASTn (código de acesso no GenBank)	Densidade (UFC mL ⁻¹)	Identidade (%)	Cobertura (%)	Nº de pb ^g analisados	Táxon sugerido (código de acesso no GenBank)
OT, ST, SM	19677	<i>Antarctomyces psychrotrophicus</i> (NR164292) ^b	>300	100	100	442	<i>Antarctomyces psychrotrophicus</i> (PP473970 ^e)
OT, ST	19786	[Candida] sp. ‘davisiana’ (KY106409) ^c	>300	100	100	408	“ <i>Candida davisiana</i> ” (PP485052 ^f)
ST	19738	<i>Cladosporium puris</i> (MK253337) ^b	120	100	100	427	<i>Cladosporium</i> sp. (PP473971 ^e)
OT	19720	<i>Cosmospora viridescens</i> (NR154791) ^b	70	99	100	437	<i>Cosmospora</i> sp. (PP473973 ^e)
OT	19784	<i>Cystobasidium laryngis</i> (AF189937) ^c	10	99	100	368	<i>Cystobasidium</i> sp. 1 (PP485048 ^f)
OT	19788	<i>Cystobasidium laryngis</i> (KY107432) ^c	20	99	100	392	<i>Cystobasidium</i> sp. 2 (PP485049 ^f)
OT, ST	19769	<i>Holtermanniella wattica</i> (NG058307) ^c	30	100	100	460	<i>Holtermanniella wattica</i> (PP485053 ^f)
OT	19764	<i>Leucosporidium creatinivorum</i> (KY104012) ^b	20	100	100	429	<i>Leucosporidium creatinivorum</i> (PP473965 ^e)
OT	19781	<i>Leucosporidium escudeiroi</i> (NG060273) ^b	10	98	100	416	<i>Leucosporidium</i> sp. (PP485047 ^f)
OT, ST	19678	<i>Linnemannia longigemmata</i> (NR182440) ^b	>300	97	100	394	<i>Linnemannia</i> sp. (PP473972 ^e)
ST	19767	<i>Mrakia blollopis</i> (AB916506) ^b	10	100	100	519	<i>Mrakia blollopis</i> (PP473974 ^e)
OT	19773	<i>Naganishia friedmannii</i> (NG069413) ^c	190	100	100	432	<i>Naganishia</i> sp. (PP485050 ^f)
OB	19685	<i>Penicillium rubens</i> (MT348155) ^d	20	100	100	684	<i>Penicillium</i> sp. 1 (PP657024 ^g)

Região	UFMGCB ^a	Resultado do top BLASTn (código de acesso no GenBank)	Densidade (UFC mL ⁻¹)	Identidade (%)	Cobertura (%)	Nº de pb ^g analisados	Táxon sugerido (código de acesso no GenBank)
ST	19712	<i>Penicillium goetzii</i> (MT558933) ^b	10	99	100	363	<i>Penicillium</i> sp. 2 (PP473966 ^e)
OB, ST	19674	<i>Penicillium polonicum</i> (MK450846) ^d	>300	100	100	668	<i>Penicillium polonicum</i> (PP657025 ^g)
SM	19714	<i>Penicillium allii-sativi</i> (KM656086) ^d	100	100	100	688	<i>Penicillium allii-sativi</i> (PP657026 ^g)
OT	19774	<i>Phenoliferia glacialis</i> (NG058369) ^c	40	99	100	406	<i>Phenoliferia</i> sp. (PP485051 ^f)
OM	19698	<i>Pseudeurotium bakeri</i> (MH860393) ^b	>300	99	97	437	<i>Pseudeurotium</i> sp. 1 (PP473975 ^e)
OB, SM, SB	19709	<i>Pseudeurotium ovale</i> (MH857368) ^b	>300	99	100	408	<i>Pseudeurotium</i> sp. 2 (PP473976 ^e)
OT, OM, ST, SM, SB	19730	<i>Pseudogymnoascus verrucosus</i> (OR485038) ^b	>300	99	100	445	<i>Pseudogymnoascus</i> sp. (PP473967 ^e)
OT, OM, OB, ST, SB	19716	<i>Ramgea ozimecii</i> (NR164248) ^b	115	97	100	407	<i>Ramgea</i> cf. <i>ozimecii</i> (PP473968 ^e)
OT, ST	19673	<i>Thelebolus globosus</i> (MH862951) ^b	30	100	100	435	<i>Thelebolus</i> sp. (PP473969 ^e)

OT, OM, OB: oeste topo, meio e base; ST, SM, SB: sudeste topo, meio e base; ^aUFMGCB = Coleção de Micro-organismos e Células da Universidade Federal de Minas Gerais; ^gpb = pares de bases. Táxons sujeitos à análise no BLAST baseada em ^bITS, ^cDomínio D1-D2, ^dRNA polimerase II. Sequências de ^eITS, ^fD1-D2 e RNA polimerase II^g depositadas no banco de dados GenBank.

5.3. Análise da diversidade da comunidade fúngica

O esforço amostral, representado pelo modelo da curva de rarefação individual, não foi suficiente para caracterizar a comunidade estudada, uma vez que as curvas não atingiram a assíntota, o que indica que as comunidades obtidas não foram suficientes para representar a comunidade existente no lago e/ou que a diversidade presente nas amostras é maior do que a encontrada (**Figura 3**). A partir da análise dos índices de Fisher- α (diversidade), Margalef (riqueza) e Simpson (dominância), as seções superiores (T) das margens oeste e sudeste apresentaram maior diversidade e riqueza quando comparadas às outras seções (**Tabela 3**). Além disso, a dominância dessas seções foi considerada moderada, enquanto a das outras seções foi considerada baixa. De forma geral, o lago apresentou alta diversidade e riqueza e moderada dominância. De acordo com o Diagrama de Venn (**Figura 4**), *Ramgea* cf. *ozimecii* e *Pseudogymnoascus* sp. foram táxons comuns a cinco seções, enquanto *Antarctomyces psychrotrophicus* e *Pseudeurotium* sp. 2. foram comuns a três seções. Seis táxons foram compartilhados entre duas seções e 12 táxons foram exclusivos de uma determinada seção.

15

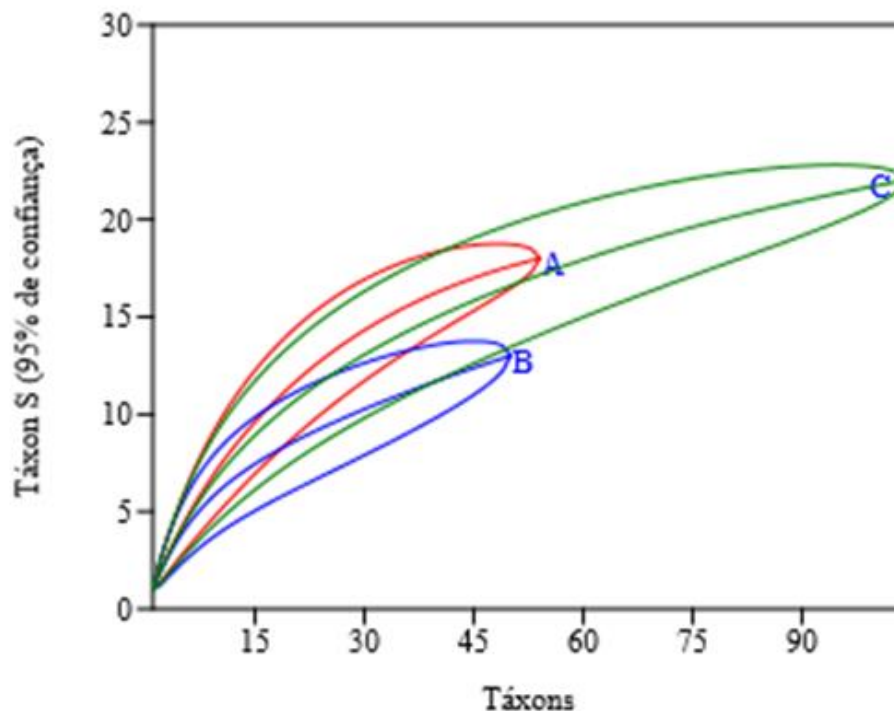


Figura 3. Curva de rarefação individual das comunidades fúngicas isoladas das margens oeste (**A**) e sudeste (**B**) do Lago Boeckella, comparadas com o total de táxons do lago (**C**).

Tabela 3. Índices de diversidade dos fungos isolados das margens oeste e sudeste do Lago Boeckella.

Índices	Margem Oeste T	Margem Oeste M	Margem Oeste B	Margem Sudeste T	Margem Sudeste M	Margem Sudeste B	Total
Nº de isolados	37	8	9	31	12	7	104
Nº de táxons	14	3	4	12	4	3	22
Fisher- α	8,2	1,74	2,75	7,18	2,10	1,98	8,52
Margalef	3,6	0,96	1,36	3,20	1,2	1,02	1,45
Simpson	0,88	0,53	0,71	0,83	0,65	0,61	0,89

T: topo; M: meio; B: base.

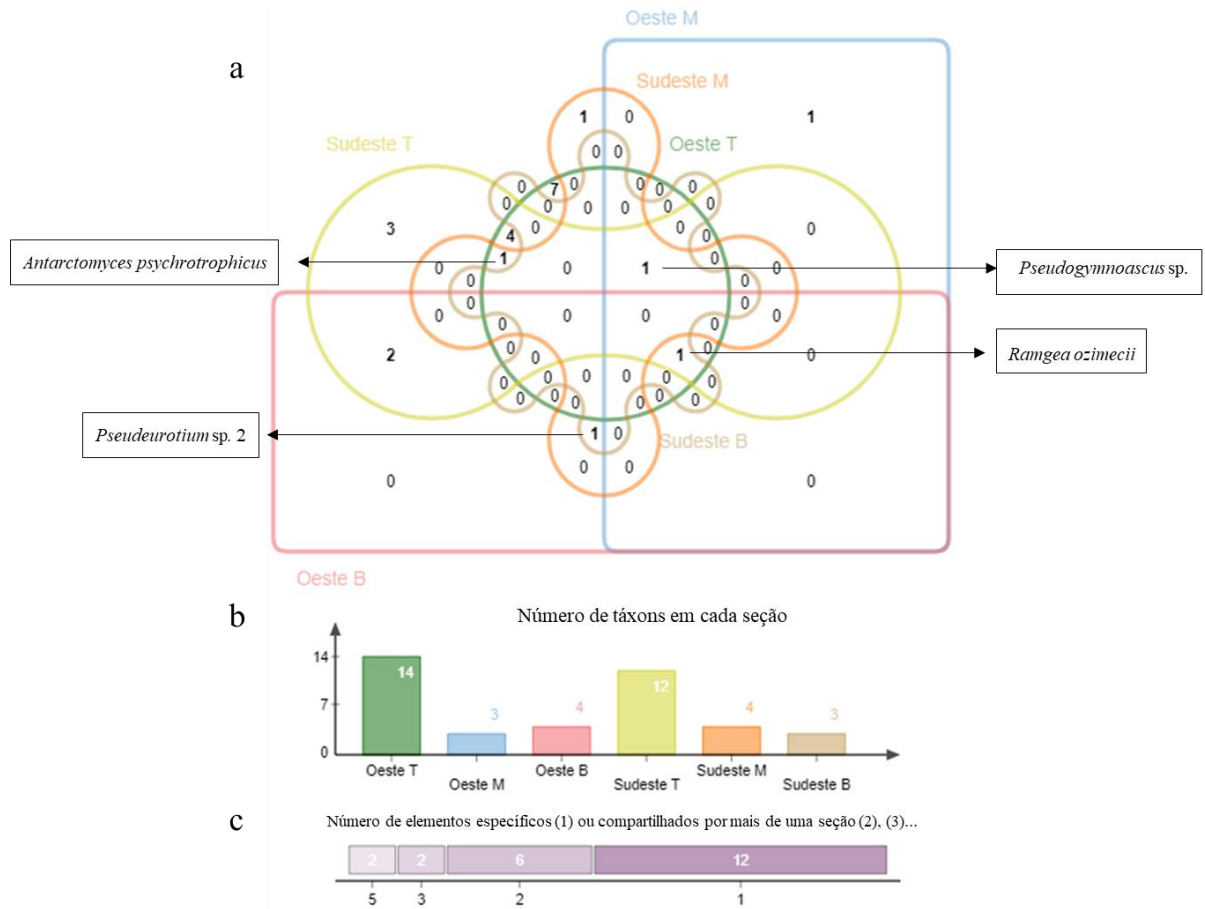
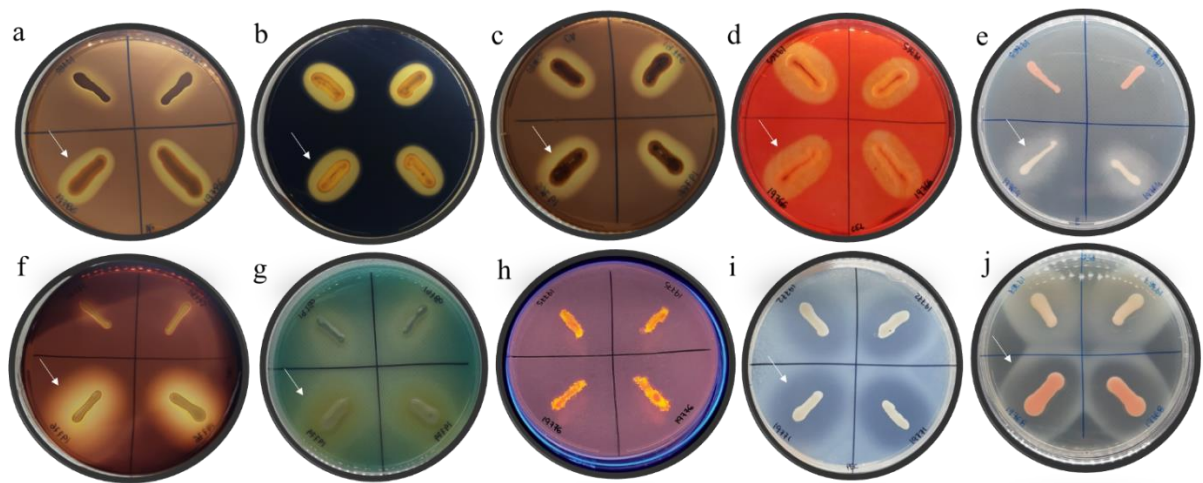


Figura 4. Diagrama de Venn relacionando os táxons compartilhados ou não entre as assembleias estudadas. **(a)** similaridade dos táxons encontrados nas seções do Lago Boeckella, **(b)** número de táxons em cada seção, **(c)** número de táxons específicos ou compartilhados por mais de uma seção.

5.4. Avaliação das atividades enzimáticas

Para a análise da produção enzimática pelos isolados fúngicos foi calculado o Índice Enzimático (IE) com base nos halos de degradação dos respectivos substratos (**Figura 5**). Os isolados que apresentaram $IE \geq 2$ foram considerados bons produtores enzimáticos, seguindo o critério estipulado por Hankin & Anagnostakis (1975). Todos os 116 isolados foram testados para as 10 enzimas alvos (**Tabela 4**). Para a enzima lipase, não foi possível a mensuração dos halos; dessa forma, os fungos foram avaliados como produtores (+) ou não produtores (-).



10 **Figura 5.** Observação dos halos, indicados por setas, formados pela degradação do substrato presente em meio sólido. (a) agarase, (b) amilase, (c) carragenase, (d) celulase, (e) esterase, (f) inulinase, (g) invertase, (h) lipase, (i) pectinase e (j) protease. Fotos: E.A.A. Teixeira.

Para agarase, 05 isolados filamentosos e 13 leveduras apresentaram halo, mas nenhum foi considerado um bom produtor dessa enzima. Para amilase, 10 fungos filamentosos e 09 leveduras produziram o halo de degradação. No entanto, nenhum isolado apresentou $IE \geq 2$. Já para carragenase, 16 isolados filamentosos e 14 leveduras a produziram, das quais duas
5 apresentaram $IE \geq 2$, identificados como *Leucosporidium* sp. e *Phenoliferia* sp.

Para celulase, 38 filamentosos e 11 leveduras foram ativos e o isolado identificado como *Mrakia blollopis* foi o único bom produtor. Esterase foi produzida por 31 isolados filamentosos e 21 leveduras. Desses, nenhum filamentosos apresentou $IE \geq 2$, enquanto 10 leveduras foram consideradas boas produtoras, identificadas como *Holtermanniella wattica* (quatro isolados),
10 *Leucosporidium creatinivorum* (dois isolados), *Leucosporidium* sp. (um isolado), *Mrakia blollopis* (um isolado), *Naganishia* sp. (um isolado) e *Phenoliferia* sp (um isolado).

Para inulinase, 23 filamentosos e 14 leveduras formaram o halo de degradação. Quatro leveduras apresentaram $IE \geq 2$; dessas, dois isolados foram identificados como *Leucosporidium* (*Leucosporidium creatinivorum* e *Leucosporidium* sp.), além de um isolado identificado como
15 *Phenoliferia* sp. Já para invertase, 06 isolados filamentosos e 16 leveduras foram produtores. No entanto, somente as leveduras foram consideradas boas produtoras, das quais sete apresentaram $IE \geq 2$ (seis identificadas como *Naganishia* sp. e uma identificada como *Mrakia blollopis*).

Para pectinase, 03 filamentosos e 06 leveduras foram ativos. Todas as leveduras
20 apresentaram $IE \geq 2$, das quais cinco foram identificadas como *Naganishia* sp. e uma como *Leucosporidium* sp. A enzima protease foi produzida por 24 filamentosos e 22 leveduras. Em relação aos filamentosos, essa enzima foi a única que apresentou isolados com $IE \geq 2$, sendo os dois identificados como *Ramgea* cf. *ozimecii*. Quanto às leveduras, 11 isolados foram considerados bons produtores, os quais foram identificados como *Leucosporidium*
25 *creatinivorum* (dois isolados); *Naganishia* sp. (seis isolados); *Mrakia blollopis* (um isolado) e outros dois isolados que não foram identificados. Por fim, para lipase, 18 filamentosos e 10 leveduras foram produtores de halo, incluindo isolados de *Antarctomyces psychrotrophicus*, *Linnemannia* sp., *Penicillium polonicum*, *Penicillium* sp. 1, *Pseudeurotium* sp. 2, “*Candida davisiana*”, *Leucosporidium creatinivorum*, *Naganishia* sp. e *Phenoliferia* sp.

30 É possível perceber que, em número de isolados fúngicos, as enzimas esterase, celulase, protease, inulinase e carragenase foram as mais produzidas, respectivamente; e protease e esterase foram as enzimas com maior número de isolados com $IE \geq 2$ (**Figura 6**). De forma geral, os isolados filamentosos não apresentaram potencial satisfatório de produção de nenhuma das enzimas apresentadas neste trabalho, com exceção dos dois isolados de *R. cf. ozimecii* que

foram bons produtores da enzima protease. Já as leveduras apresentaram resultados oportunos para as enzimas estudadas, com representantes identificados como *H. wattica*, *L. creatinivorum*, *Leucosporidium* sp., *M. blollopis*, *Naganishia* sp. e *Phenoliferia* sp. Dessas leveduras, seis isolados apresentaram $IE \geq 2$ para uma enzima, um isolado apresentou para duas enzimas, sete apresentaram para três enzimas e três apresentaram para quatro enzimas. Ademais, o isolado identificado como *Naganishia* sp. (UFMGCB 19775) apresentou o maior IE ($4,03 \pm 0,08$).

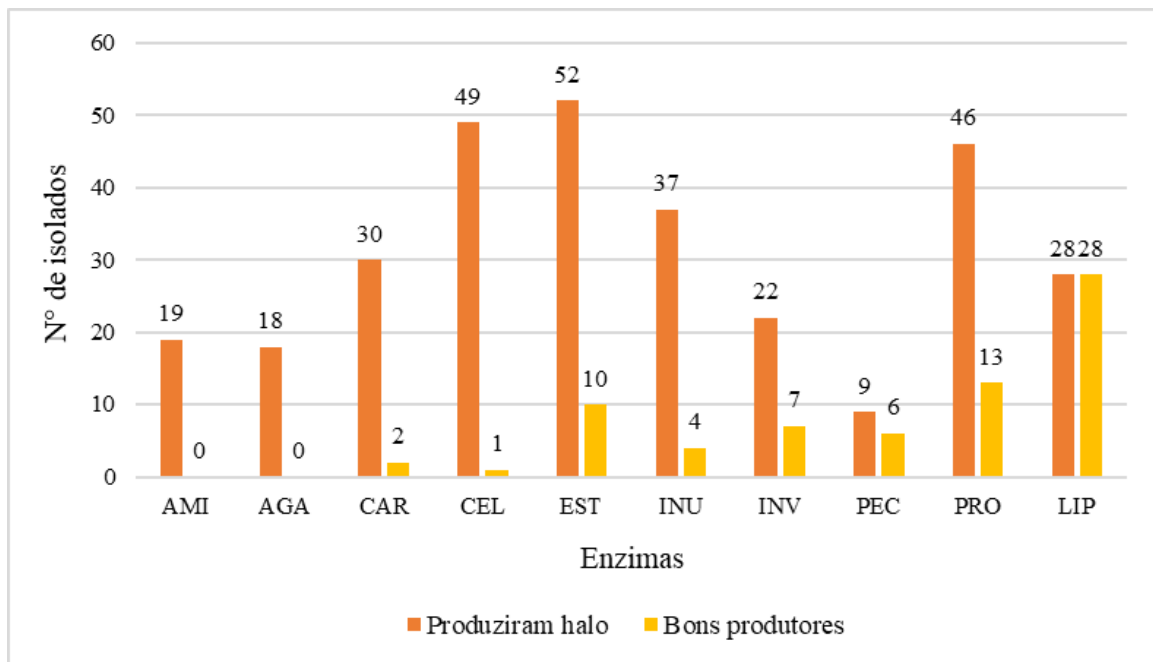


Figura 6. Relação entre o número de isolados produtores de halos e o número de isolados que apresentaram $IE \geq 2$ para cada enzima. **AMI** = Amilase, **AGA** = Agarase, **CAR** = Carragenase, **CEL** = Celulase, **EST** = Esterase, **INU** = Inulinase, **INV** = Invertase, **PEC** = Pectinase, **PRO** = Protease e **LIP** = Lipase.

Tabela 4. Médias dos Índices Enzimáticos (MIE) produzidos pelos fungos obtidos dos sedimentos do Lago Boeckella.

Fungos filamentosos	Halo de atividade enzimática (mm)										LIP	
	UFMGCB	MIE										
		AMI	AGA	CAR	CEL	EST	INU	INV	PEC	PRO		
<i>Antarctomyces psychrotrophicus</i>	19676	-	-	-	1,22 ± 0,01	-	-	-	-	-	-	+
<i>A. psychrotrophicus</i>	19677	-	-	-	1,22 ± 0	-	-	-	1,34 ± 0,03	-	-	-
<i>A. psychrotrophicus</i>	19680	-	-	-	1,23 ± 0,02	-	-	-	1,24 ± 0,05	-	-	+
<i>A. psychrotrophicus</i>	19681	-	-	-	1,18 ± 0	-	-	-	-	-	-	+
<i>A. psychrotrophicus</i>	19682	-	-	-	1,2 ± 0	-	-	-	-	-	-	+
<i>A. psychrotrophicus</i>	19683	-	-	-	1,23 ± 0,01	-	-	-	-	-	-	+
<i>A. psychrotrophicus</i>	19686	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>A. psychrotrophicus</i>	19688	-	-	-	1,2 ± 0,02	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. psychrotrophicus</i>	19690	-	-	-	1,25 ± 0	-	-	-	1,31 ± 0	-	-	+
<i>A. psychrotrophicus</i>	19694	-	-	1,19 ± 0	1,15 ± 0,01	-	-	-	-	-	-	+
<i>A. psychrotrophicus</i>	19739	-	-	-	1,19 ± 0,01	-	-	-	-	-	-	+
<i>Cladosporium</i> sp.	19738	-	-	-	1,31 ± 0,08	-	-	-	-	1,14 ± 0,02	-	-
<i>Cosmospora</i> sp.	19720	-	-	-	-	1,22 ± 0,02	-	-	-	-	-	-
<i>Cosmospora</i> sp.	19722	-	-	-	1,34 ± 0,01	1,37 ± 0,1	-	-	-	-	-	-
<i>Cosmospora</i> sp.	19723	-	-	-	1,24 ± 0,06	-	-	-	-	-	-	-
<i>Linnemannia</i> sp.	19678	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Linnemannia</i> sp.	19679	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Linnemannia</i> sp.	19691	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Linnemannia</i> sp.	19692	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Penicillium allii-sativi</i>	19714	-	-	-	1,32 ± 0,06	-	-	-	-	-	-	-
<i>Penicillium polonicum</i>	19674	-	-	-	-	-	-	1,19 ± 0,01	-	1,26 ± 0	-	+
<i>P. polonicum</i>	19695	-	-	-	1,13 ± 0,01	-	-	1,19 ± 0	-	1,28 ± 0,02	-	+
<i>Penicillium</i> sp. 1	19685	-	-	-	1,1 ± 0	-	-	1,27 ± 0,06	-	1,28 ± 0	-	+

Fungos filamentosos	Halo de atividade enzimática (mm)										LIP	
	UFMGCB	MIE										
		AMI	AGA	CAR	CEL	EST	INU	INV	PEC	PRO		
<i>Penicillium</i> sp. 1	19689	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Penicillium</i> sp. 1	19757	1,16 ± 0	-	-	1,14 ± 0	-	-	1,28 ± 0,05	-	-	-	+
<i>Penicillium</i> sp. 2	19712	1,13 ± 0,1	-	-	1,18 ± 0,07	-	-	-	-	1,21 ± 0,08	-	-
<i>Penicillium</i> sp. 2	19713	1,37 ± 0	-	-	1,12 ± 0	1,3 ± 0,02	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	19697	-	-	1,1 ± 0,02	-	1,25 ± 0,02	1,14 ± 0,05	-	-	-	-	-
<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	19699	-	-	1,25 ± 0,01	-	1,61 ± 0	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	19700	-	-	1,25 ± 0,03	1,11 ± 0	1,24 ± 0,06	1,25 ± 0,02	-	-	-	-	-
<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	19725	-	1,3 ± 0,04	1,51 ± 0,09	-	1,25 ± 0,03	1,86 ± 0,01	-	-	-	-	-
<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	19729	-	-	-	-	2,19 ± 0,02	1,21 ± 0,02	-	-	-	-	-
<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	19730	-	-	1,37 ± 0,02	-	1,3 ± 0,06	1,37 ± 0,04	-	-	-	-	-
<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	19731	-	-	1,36 ± 0,07	-	1,34 ± 0,05	1,26 ± 0,09	-	-	-	-	-
<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	19732	-	-	1,26 ± 0,02	-	1,45 ± 0,05	1,26 ± 0,01	-	-	-	-	-
<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	19733	-	1,18 ± 0,01	-	-	1,27 ± 0,1	1,33 ± 0,06	-	-	1,37 ± 0,21	-	-
<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	19734	-	1,22 ± 0,06	1,29 ± 0,09	-	1,31 ± 0,05	1,19 ± 0,05	-	-	1,37 ± 0	-	-
<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	19735	-	1,31 ± 0,05	1,41 ± 0,04	-	1,49 ± 0	1,62 ± 0,04	-	-	1,27 ± 0	-	-
<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	19736	-	-	-	-	-	1,27 ± 0,02	-	-	1,27 ± 0,03	-	-
<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	19737	-	-	-	-	-	1,19 ± 0,01	-	-	1,28 ± 0,02	-	-
<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	19740	-	-	1,36 ± 0,04	-	1,42 ± 0,01	1,27 ± 0,01	-	-	-	-	-
<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	19741	-	-	1,35 ± 0	-	1,22 ± 0	1,39 ± 0,06	-	-	-	-	-
<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	19742	-	-	-	-	1,53 ± 0,01	1,35 ± 0,04	-	-	1,39 ± 0,03	-	-
<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	19743	-	-	1,2 ± 0,02	-	1,34 ± 0,04	1,47 ± 0,03	-	-	1,33 ± 0,01	-	-
<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	19744	-	-	-	-	1,56 ± 0,04	1,36 ± 0,01	-	-	-	-	-
<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	19747	-	-	1,19 ± 0,01	1,43 ± 0,04	1,38 ± 0,13	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	19748	1,63 ± 0,27	-	-	1,41 ± 0,08	1,54 ± 0	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	19749	1,34 ± 0	-	-	1,42 ± 0,02	1,42 ± 0,04	-	-	-	-	-	-

Fungos filamentosos	Halo de atividade enzimática (mm)										LIP
	UFMGCB	MIE									
		AMI	AGA	CAR	CEL	EST	INU	INV	PEC	PRO	
<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	19750	1,64 ± 0,02	-	-	1,53 ± 0,09	1,71 ± 0,1	-	-	-	-	-
<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	19751	-	-	-	-	1,35 ± 0	1,51 ± 0,03	-	-	1,2 ± 0,01	-
<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	19752	-	1,31 ± 0,07	1,52 ± 0,03	-	1,43 ± 0,08	1,52 ± 0,09	-	-	1,32 ± 0,06	-
<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	19756	-	-	1,25 ± 0,01	-	1,38 ± 0,04	1,34 ± 0,01	-	-	1,22 ± 0	-
<i>Pseudeurotium</i> sp. 1	19696	-	-	-	1,27 ± 0,06	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudeurotium</i> sp. 1	19698	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudeurotium</i> sp. 2	19701	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudeurotium</i> sp. 2	19702	-	-	-	1,09 ± 0,04	-	-	-	-	-	+
<i>Pseudeurotium</i> sp. 2	19703	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudeurotium</i> sp. 2	19704	-	-	-	1,18 ± 0,02	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudeurotium</i> sp. 2	19705	-	-	-	-	1,22 ± 0,03	-	-	-	-	-
<i>Pseudeurotium</i> sp. 2	19706	-	-	-	1,18 ± 0,03	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudeurotium</i> sp. 2	19707	-	-	-	1,5 ± 0,03	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudeurotium</i> sp. 2	19708	-	-	-	1,29 ± 0	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudeurotium</i> sp. 2	19709	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudeurotium</i> sp. 2	19710	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Pseudeurotium</i> sp. 2	19726	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudeurotium</i> sp. 2	19755	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Ramgea</i> cf. <i>ozimecii</i>	19715	1,38 ± 0,06	-	-	-	-	-	-	-	1,67 ± 0,12	-
<i>R. cf. ozimecii</i>	19716	1,89 ± 0,07	-	-	1,56 ± 0,12	-	-	-	-	1,45 ± 0,08	-
<i>R. cf. ozimecii</i>	19717	-	-	-	-	1,23 ± 0,04	-	-	-	1,58 ± 0,13	-
<i>R. cf. ozimecii</i>	19718	-	-	-	1,45 ± 0,05	-	-	-	-	-	-
<i>R. cf. ozimecii</i>	19719	-	-	-	-	-	-	-	-	1,31 ± 0,04	-
<i>R. cf. ozimecii</i>	19721	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>R. cf. ozimecii</i>	19753	1,93 ± 0,06	-	-	-	-	1,22 ± 0,11	-	-	2,23 ± 0,29	-

Fungos filamentosos	Halo de atividade enzimática (mm)										LIP
	UFMGCB	MIE									
		AMI	AGA	CAR	CEL	EST	INU	INV	PEC	PRO	
<i>R. cf. ozimecii</i>	19759	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>R. cf. ozimecii</i>	19760	-	-	-	-	-	1,19 ± 0,01	-	-	2,28 ± 0,28	-
<i>Thelebolus</i> sp.	19673	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Thelebolus</i> sp.	19687	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Não identificado	19675	-	-	-	1,1 ± 0,02	-	-	-	-	-	+
Não identificado	19684	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Não identificado	19693	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Não identificado	19711	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Não identificado	19724	-	-	-	1,8 ± 0,11	1,31 ± 0,04	-	1,22 ± 0,01	-	-	-
Não identificado	19745	-	-	-	1,4 ± 0,01	1,52 ± 0,05	-	1,23 ± 0,01	-	-	+
Não identificado	19746	-	-	-	1,5 ± 0,17	-	-	-	-	1,17 ± 0,04	-
Não identificado	19754	1,18 ± 0	-	-	1,63 ± 0,08	1,37 ± 0,04	-	-	-	1,35 ± 0	-
Não identificado	19758	-	-	-	2,16 ± 0,05	-	1,21 ± 0,02	-	-	1,52 ± 0	-

Leveduras	Halo de atividade enzimática (mm)										LIP
	UFMGCB	MIE									
		AMI	AGA	CAR	CEL	EST	INU	INV	PEC	PRO	
<i>"Candida davisiana"</i>	19762	1,65 ± 0,04	1,47 ± 0,02	1,7 ± 0,02	1,53 ± 0,04	-	-	-	-	1,59 ± 0,16	-
<i>"C. davisiana"</i>	19765	1,66 ± 0,01	1,49 ± 0	1,78 ± 0,01	1,7 ± 0,01	-	1,61 ± 0,06	-	-	1,48 ± 0,03	-
<i>"C. davisiana"</i>	19766	1,69 ± 0	1,53 ± 0,01	1,79 ± 0	1,56 ± 0,01	-	1,45 ± 0	-	-	1,52 ± 0,02	-
<i>"C. davisiana"</i>	19770	1,63 ± 0,03	1,44 ± 0,02	-	1,62 ± 0,04	-	1,65 ± 0,05	-	-	1,64 ± 0,04	-
<i>"C. davisiana"</i>	19782	1,78 ± 0	1,54 ± 0,03	1,68 ± 0	1,62 ± 0,04	-	1,71 ± 0,01	-	-	1,55 ± 0,03	+
<i>"C. davisiana"</i>	19783	1,68 ± 0,06	1,54 ± 0,01	1,71 ± 0,05	1,69 ± 0,09	-	1,57 ± 0	-	-	1,41 ± 0	+
<i>"C. davisiana"</i>	19786	1,67 ± 0,06	1,45 ± 0,03	1,65 ± 0,01	1,74 ± 0,01	-	1,28 ± 0	-	-	1,77 ± 0,05	-
<i>"C. davisiana"</i>	19787	-	-	-	1,76 ± 0,08	1,58 ± 0,01	-	-	-	1,44 ± 0,01	+

Leveduras	Halo de atividade enzimática (mm)										LIP
	UFMGCB	MIE									
		AMI	AGA	CAR	CEL	EST	INU	INV	PEC	PRO	
<i>"C. davisiana"</i>	19727	1,24 ± 0,11	-	1,25 ± 0	1,63 ± 0,09	1,25 ± 0,05	1,43 ± 0,05	-	-	-	-
<i>"C. davisiana"</i>	19728	1,47 ± 0,06	-	1,52 ± 0,08	1,91 ± 0,14	1,53 ± 0,16	1,62 ± 0,03	-	-	1,84 ± 0,02	-
<i>Cystobasidium</i> sp. 1	19784	-	-	-	-	1,61 ± 0	-	-	-	-	-
<i>Cystobasidium</i> sp. 2	19788	-	-	-	-	1,77 ± 0,1	-	1,58 ± 0,06	-	-	-
<i>Holtermanniella wattica</i>	19769	-	1,39 ± 0,09	1,47 ± 0,05	-	3,05 ± 0,01	1,51 ± 0,06	1,71 ± 0,12	-	-	-
<i>H. wattica</i>	19778	-	1,56 ± 0,07	1,72 ± 0,03	-	3,2 ± 0,09	-	1,56 ± 0,09	-	-	-
<i>H. wattica</i>	19780	-	1,51 ± 0,05	1,64 ± 0,04	-	2,68 ± 0,09	-	1,72 ± 0,16	-	-	-
<i>H. wattica</i>	19785	-	1,42 ± 0,07	1,74 ± 0,06	-	2,72 ± 0,04	-	1,53 ± 0,02	-	-	-
<i>Leucosporidium creatinivorum</i>	19764	-	-	-	-	2,41 ± 0,27	2,68 ± 0,17	1,44 ± 0,06	-	2,31 ± 0,01	+
<i>L. creatinivorum</i>	19776	-	-	-	-	2,36 ± 0,01	3,4 ± 0,17	1,88 ± 0,12	-	2,08 ± 0,01	+
<i>Leucosporidium</i> sp.	19781	-	-	3,23 ± 0,14	-	2,46 ± 0,19	3,33 ± 0,03	-	3,13 ± 0,01	1,91 ± 0,06	-
<i>Mrakia blollopis</i>	19767	-	1,59 ± 0,03	-	2,4 ± 0,05	2,58 ± 0,09	1,39 ± 0,06	2,89 ± 0,32	-	3,21 ± 0,02	-
<i>Naganishia</i> sp.	19771	-	-	-	-	2,05 ± 0,02	-	2,74 ± 0,22	3,88 ± 0,02	3,11 ± 0,1	-
<i>Naganishia</i> sp.	19772	-	-	-	-	1,7 ± 0	-	2,04 ± 0,05	3,59 ± 0,03	3,2 ± 0,11	-
<i>Naganishia</i> sp.	19773	-	-	-	-	1,38 ± 0,05	-	3,1 ± 0,05	3,99 ± 0,15	3,38 ± 0,05	-
<i>Naganishia</i> sp.	19775	-	-	-	-	1,48 ± 0,03	-	2,63 ± 0	4,03 ± 0,08	3,06 ± 0,1	+
<i>Naganishia</i> sp.	19777	-	-	-	-	1,36 ± 0,06	-	2,21 ± 0,05	-	2,83 ± 0,03	-
<i>Naganishia</i> sp.	19779	-	-	-	-	1,55 ± 0	-	2,2 ± 0,1	3,77 ± 0,13	2,94 ± 0	+
<i>Phenoliferia</i> sp.	19774	-	1,17 ± 0,06	2,75 ± 0	-	2,31 ± 0,14	3,05 ± 0	-	-	1,76 ± 0,02	+
Não identificado	19761	-	-	-	-	1,85 ± 0,11	-	-	-	-	-
Não identificado	19763	-	-	-	-	-	-	1,43 ± 0,11	-	2,48 ± 0,09	+
Não identificado	19768	-	-	-	-	-	-	1,57 ± 0,04	-	2,77 ± 0,07	+

UFMGCB = Coleção de Micro-organismos e Células da Universidade Federal de Minas Gerais. MIE = Média do Índice Enzimático, **AMI** = Amilase, **AGA** = Agarase, **CAR** = Carragenase, **CEL** = Celulase, **EST** = Esterase, **INU** = Inulinase, **INV** = Invertase, **PEC** = Pectinase, **PRO** = Protease e **LIP** = Lipase. + (apresentaram halo) e - (não apresentaram halo). Negrito = bons produtores (≥ 2) e destacado em cinza = melhor produtor UFMGCB 19775 (IE = 4,03 ± 0,08).

5.5. Avaliação da produção de biossurfactantes

Um total de 116 isolados fúngicos foram avaliados quanto à produção de biossurfactantes por meio do $E_{24\%}$ (**Tabela 5**). Seguindo o método proposto por Willumsen & Karlson (1996), os isolados que apresentaram média de emulsificação $> 50\%$ foram classificados como produtores satisfatórios dessas moléculas (**Figura 7**). Em relação aos fungos filamentosos, 16 isolados apresentaram $E_{24\%} > 50\%$, os quais foram identificados como *A. psychrotrophicus* (oito isolados), *Cosmospora* sp. (dois isolados), *Pseudogymnoascus* sp. (dois isolados), *R. cf. ozimecii* (um isolado) e *Thelebolus* sp. (um isolado), além de dois isolados que não foram identificados (UFMGCB 19675 e UFMGCB 19724). Desses fungos filamentosos, três isolados de *A. psychrotrophicus* apresentaram valores acima de 80%, que foram superiores ao controle positivo SDS 1% ($E_{24\%} = 78,60 \pm 7,04$). Já em relação às leveduras, oito isolados foram bons produtores, dos quais sete foram identificados como “*C. davisiana*” e um como *Cystobasidium* sp. 2. Apesar de apresentarem $E_{24\%} > 50\%$, nenhum isolado leveduriforme foi superior ao controle positivo SDS 1%.

Tabela 5. Produção de biossurfactantes pelos fungos obtidos dos sedimentos do Lago Boeckella.

Fungo Filamentoso	UFMGCB^a	E_{24%}^b
<i>Antarctomyces psychrotrophicus</i>	19677	84,17 ± 0,75
<i>A. psychrotrophicus</i>	19683	81,92 ± 0,92
<i>A. psychrotrophicus</i>	19676	81,09 ± 2,83
<i>A. psychrotrophicus</i>	19681	77,18 ± 3,82
<i>A. psychrotrophicus</i>	19688	70,94 ± 5,28
<i>A. psychrotrophicus</i>	19694	63,35 ± 20,65
<i>A. psychrotrophicus</i>	19686	62,96 ± 1,53
<i>A. psychrotrophicus</i>	19682	59,99 ± 0,35
<i>Cosmospora</i> sp.	19720	70,69 ± 2,37
<i>Cosmospora</i> sp.	19722	52,75 ± 0,79
<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	19740	60,91 ± 3,09
<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	19756	52,50 ± 1,78
<i>R. cf. ozimecii</i>	19760	60,46 ± 0,57
<i>Thelebolus</i> sp.	19687	63,58 ± 0,7
Não identificado	19675	62,56 ± 23,6
Não identificado	19724	50,26 ± 4,20
<i>A. psychrotrophicus</i>	19739	21,92 ± 6,91
<i>A. psychrotrophicus</i>	19680	13,00 ± 1,46
<i>A. psychrotrophicus</i>	19690	14,78 ± 3,79
<i>Cladosporium</i> sp.	19738	7,83 ± 2,16
<i>Cosmospora</i> sp.	19723	44,38 ± 9,67
<i>Linnemannia</i> sp.	19678	7,15 ± 0,33
<i>Linnemannia</i> sp.	19679	6,08 ± 3,36
<i>Linnemannia</i> sp.	19691	1,51 ± 0,73
<i>Linnemannia</i> sp.	19692	17,30 ± 4,42
<i>Penicillium allii-sativi</i>	19714	5,91 ± 2,61
<i>Penicillium polonicum</i>	19674	33,52 ± 2,14
<i>P. polonicum</i>	19695	47,71 ± 8,09
<i>Penicillium</i> sp. 1	19685	27,66 ± 6,08
<i>Penicillium</i> sp. 1	19689	10,15 ± 1,26
<i>Penicillium</i> sp. 1	19757	49,78 ± 3,21
<i>Penicillium</i> sp. 2	19712	31,33 ± 1,53
<i>Penicillium</i> sp. 2	19713	7,33 ± 1,77
<i>Pseudeurotium</i> sp. 1	19696	5,82 ± 0,96

<i>Pseudeurotium</i> sp. 1	19698	4,30 ± 0,90
<i>Pseudeurotium</i> sp. 2	19701	16,55 ± 6,76
<i>Pseudeurotium</i> sp. 2	19702	22,63 ± 4,37
<i>Pseudeurotium</i> sp. 2	19703	5,87 ± 1,47
<i>Pseudeurotium</i> sp. 2	19704	9,18 ± 1,56
<i>Pseudeurotium</i> sp. 2	19705	37,91 ± 7,24
<i>Pseudeurotium</i> sp. 2	19706	18,64 ± 2,74
<i>Pseudeurotium</i> sp. 2	19707	10,14 ± 1,55
<i>Pseudeurotium</i> sp. 2	19708	6,51 ± 1,71
<i>Pseudeurotium</i> sp. 2	19709	7,66 ± 1,63
<i>Pseudeurotium</i> sp. 2	19710	24,60 ± 1,92
<i>Pseudeurotium</i> sp. 2	19726	4,79 ± 1,82
<i>Pseudeurotium</i> sp. 2	19755	4,64 ± 0,54
<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	19697	29,74 ± 3,51
<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	19699	4,84 ± 0,81
<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	19700	12,74 ± 6,1
<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	19725	9,31 ± 2,54
<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	19729	11,27 ± 8,15
<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	19730	46,08 ± 4,66
<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	19731	34,28 ± 4,42
<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	19732	36,75 ± 3,68
<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	19733	19,30 ± 3,62
<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	19734	29,94 ± 13,07
<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	19735	31,62 ± 28,72
<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	19736	29,92 ± 13,79
<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	19737	14,61 ± 3,35
<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	19741	11,22 ± 2,69
<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	19742	16,30 ± 3,21
<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	19743	8,77 ± 2,73
<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	19744	13,84 ± 8,81
<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	19747	4,22 ± 2,55
<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	19748	13,20 ± 2,43
<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	19749	5,58 ± 4,13
<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	19750	5,65 ± 0,80
<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	19751	33,68 ± 11,46
<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	19752	33,26 ± 3,56

<i>Ramgea cf. ozimecii</i>	19715	22,45 ± 3,58
<i>R. cf. ozimecii</i>	19716	49,78 ± 5,34
<i>R. cf. ozimecii</i>	19717	8,40 ± 0,94
<i>R. cf. ozimecii</i>	19718	39,87 ± 1,13
<i>R. cf. ozimecii</i>	19719	8,71 ± 0,66
<i>R. cf. ozimecii</i>	19721	11,22 ± 1,65
<i>R. cf. ozimecii</i>	19753	11,10 ± 0,59
<i>R. cf. ozimecii</i>	19759	33,02 ± 5,75
<i>Thelebolus sp.</i>	19673	3,53 ± 0,77
Não identificado	19684	-
Não identificado	19693	-
Não identificado	19711	3,89 ± 0,58
Não identificado	19745	6,28 ± 1,34
Não identificado	19746	21,85 ± 5,24
Não identificado	19754	7,99 ± 2,13
Não identificado	19758	15,41 ± 2,06

Leveduras	^aUFMGCB	^bE_{24%}
<i>"Candida davisiana"</i>	19728	74,38 ± 4,25
<i>"C. davisiana"</i>	19762	69,29 ± 1,42
<i>"C. davisiana"</i>	19765	68,01 ± 3,41
<i>"C. davisiana"</i>	19766	66,46 ± 0,75
<i>"C. davisiana"</i>	19786	59,23 ± 23,80
<i>"C. davisiana"</i>	19787	52,24 ± 2,92
<i>"C. davisiana"</i>	19727	54,73 ± 8,81
<i>Cystobasidium sp. 2</i>	19788	54,67 ± 3,03
<i>"C. davisiana"</i>	19770	46,49 ± 22,28
<i>"C. davisiana"</i>	19782	48,79 ± 23,94
<i>"C. davisiana"</i>	19783	45,80 ± 26,25
<i>Cystobasidium sp. 1</i>	19784	30,33 ± 20,28
<i>Holtermanniella wattica</i>	19769	6,97 ± 2,29
<i>H. wattica</i>	19778	9,97 ± 6,13
<i>H. wattica</i>	19780	10,74 ± 1,37
<i>H. wattica</i>	19785	28,26 ± 20,75
<i>Leucosporidium creatinivorum</i>	19764	2,15 ± 0,81
<i>L. creatinivorum</i>	19776	4,61 ± 1,55
<i>Leucosporidium sp.</i>	19781	24,85 ± 18,45

<i>Mrakia blollopis</i>	19767	6,51 ± 3,98
<i>Naganishia</i> sp.	19771	6,81 ± 1,47
<i>Naganishia</i> sp.	19772	5,43 ± 1,57
<i>Naganishia</i> sp.	19773	8,48 ± 3,85
<i>Naganishia</i> sp.	19775	9,13 ± 2,71
<i>Naganishia</i> sp.	19777	13,62 ± 4,82
<i>Naganishia</i> sp.	19779	7,91 ± 2,34
<i>Phenoliferia</i> sp.	19774	10,85 ± 4,79
Não identificado	19761	40,51 ± 14,96
Não identificado	19763	49,97 ± 4,94
Não identificado	19768	4,38 ± 1,96
<hr/>		
^c CP		78,60 ± 7,04
^d CN		2,86 ± 1,58

^aUFMGCB = Código de depósito na Coleção de Micro-organismos e Células da UFMG; ^bE_{24%} = Índice de emulsificação (%) com o valor do desvio padrão; ^cCP = SDS 1% (dodecil sulfato de sódio a 1%); ^dCN = Controle negativo (meio de cultivo livre de inóculo). Destacado em cinza = isolados que apresentaram E_{24%} acima de 50%. Destacado em azul = isolado com maior E_{24%}. Os valores são as médias das triplicatas utilizadas no experimento. (-): isolados não cresceram para o teste.

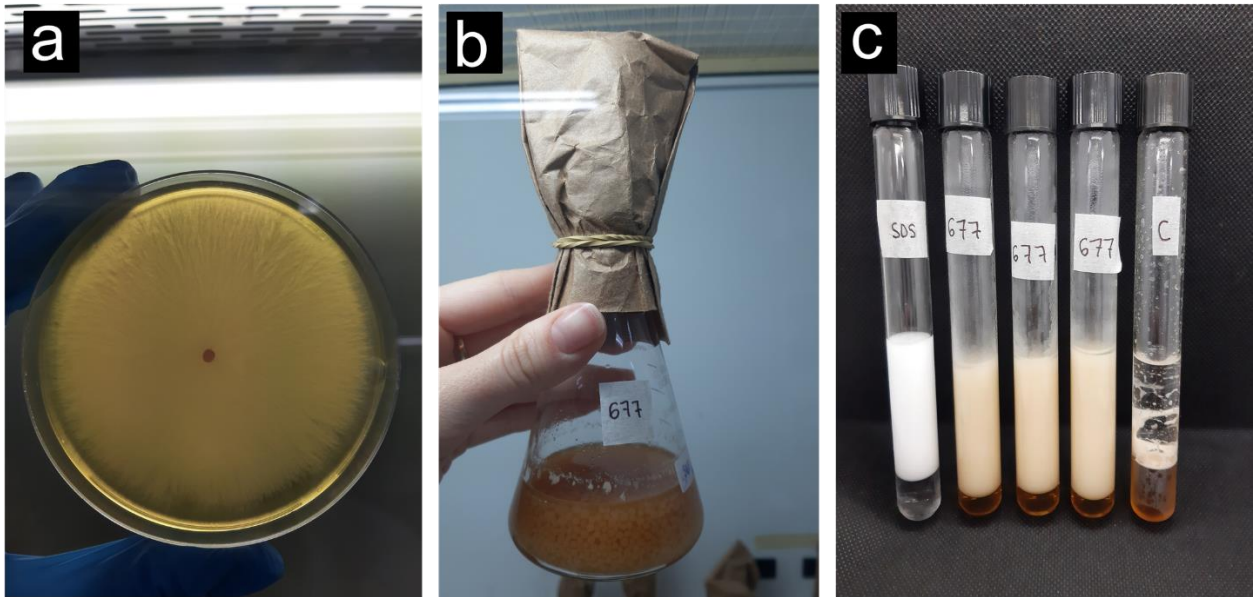


Figura 7. Observação da produção de biossurfactantes. **(a)** macromorfologia do isolado *Antarktomyces psychrotrophicus* UFMGCB 19677; **(b)** crescimento do isolado após nove dias a 20 °C e 100 rpm; **(c)** resultado do teste de emulsificação em triplicata, ao lado dos controles positivo (SDS: dodecil sulfato de sódio a 1%) e negativo (C: meio de cultivo). Fotos: E.A.A. Teixeira.

6. DISCUSSÃO

6.1. Isolamento e identificação dos fungos

Os estudos sobre comunidades de fungos presentes em lagos da Antártica aumentaram nos últimos anos, mas ainda permanecem escassos e fragmentados (Ogaki et al., 2020a, 2020b; de Souza et al., 2022; Marchetta et al., 2023). Conseqüentemente, as informações sobre a diversidade, riqueza e papéis ecológicos dos fungos que habitam esses lagos também são escassas (Ogaki et al., 2020a). Neste trabalho, as seções superiores das margens oeste e sudeste, bem como para o lago em geral, apresentaram maior diversidade e riqueza, além de dominância moderada. Ogaki et al. (2020a) também relataram alta diversidade e riqueza e baixos valores de dominância acerca das comunidades fúngicas isoladas de sedimentos de lagos da Península Antártica.

Alguns estudos já identificaram a presença de táxons fúngicos pertencentes aos gêneros *Antarctomyces*, *Cladosporium*, *Cystobasidium*, *Leucosporidium*, *Penicillium*, *Pseudogymnoascus*, *Pseudeurotium*, *Thelebolus*, *Phenoliferia*, *Mrakia* e *Holtermanniella* em lagos da Antártica (Gonçalves et al., 2012; Ogaki et al., 2020a, 2020b). Assim como no presente trabalho, Ogaki et al. (2020a) recuperaram táxons de diferentes lagos da Península Antártica pertencentes aos filos *Ascomycota*, *Basidiomycota* e *Mortierellomycota* e alguns dos seus principais representantes foram *A. psychrotrophicus*, *Pseudogymnoascus* sp. e *Phenoliferia* sp., os quais também foram detectados neste trabalho. Já no estudo de Ogaki et al. (2020b), foram recuperados de sedimentos dos três lagos estudados da Península Antártica os gêneros *Cladosporium*, *Pseudeurotium*, *Penicillium* e *Pseudogymnoascus*, que também foram encontrados no presente trabalho.

Rosa et al. (2022) analisaram o DNA ambiental fúngico dos sedimentos do Lago Boeckella utilizando a técnica de *metabarcoding* por meio do sequenciamento de alto rendimento (HTS) e as seqüências obtidas foram atribuídas aos filos *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Mortierellomycota*, *Chytridiomycota* e *Rozellomycota*. Assim como neste trabalho, Rosa et al. (2022) revelaram uma comunidade fúngica pertencente a filos frequentemente detectados na Antártica (*Ascomycota*, *Basidiomycota* e *Mortierellomycota*); entretanto, também mostrou a presença de representantes raramente detectados como *Chytridiomycota* e *Rozellomycota*, sugerindo que esses filos podem ter um papel importante na complexa teia ecológica dos lagos antárticos, mas sua ecologia e taxonomia são pouco conhecidas, apesar de ocorrerem em vários ambientes, incluindo a Antártica (Rosa et al., 2020).

Rosa et al. (2022) identificaram maior número de fungos na parte inferior (base) dos testemunhos coletados do Lago Boeckella, enquanto neste trabalho o maior número de táxons

fúngicos foi encontrado na seção superior (topo), como apresentado na **Figura 2** e na **Tabela 3**. Os gêneros encontrados em comum com o trabalho de Rosa et al. (2022) foram *Candida*, *Cladosporium*, *Cosmospora*, *Cystobasidium*, *Holtermanniella*, *Leucosporidium*, *Mrakia*, *Penicillium*, *Pseudeurotium*, *Pseudogymnoascus* e *Thelebolus*; enquanto isso, os gêneros retratados neste trabalho e ausentes no artigo foram *Antarctomyces*, *Linnemannia*, *Naganishia*, *Phenoliferia* e *Ramgea*. Dessa forma, o método de isolamento por cultivo complementa os dados obtidos por *metabarcoding* dos sedimentos lacustres estudados por Rosa et al. (2022), uma vez que o estudo do eDNA presente não significa que o organismo está vivo na amostra, possibilitando, assim, o melhor entendimento da comunidade fúngica presente no Lago Boeckella.

O filo *Ascomycota* foi o que apresentou maior número de representantes neste trabalho, o que corrobora com estudos anteriores que relatam a prevalência do filo entre os fungos filamentosos presentes no ambiente antártico; ademais, o filo é composto por gêneros cujas espécies podem ser cosmopolitas adaptados ao frio ou endêmicas (Arenz et al., 2006; Arenz & Blanchette, 2009; Santiago et al., 2015; Duarte et al., 2018).

Pseudogymnoascus foi o gênero com o maior número de isolados neste trabalho. De acordo com Villanueva et al. (2021), apesar de o gênero apresentar ampla distribuição geográfica em regiões frias, todas as espécies aceitas atualmente foram isoladas de amostras coletadas no Hemisfério Norte. Entretanto, a Antártica é uma das regiões onde *Pseudogymnoascus* predomina e diversos exemplares já foram isolados de diferentes ambientes do continente, como solos (Durán et al., 2019; dos Santos et al., 2020), plantas (Santiago et al., 2012; Coelho et al., 2021), sedimentos marinhos (Ogaki et al., 2020b; Ogaki et al., 2021), macroalgas (Furbino et al., 2018), neve (de Menezes et al., 2019), poríferos (Henríquez et al., 2014) e água de lagos (Gonçalves et al., 2012).

Pseudeurotium foi o segundo táxon mais frequentemente detectado neste trabalho. Na Antártica, exemplares do gênero já foram isolados de solos (Arenz & Blanchette, 2009), esponjas marinhas (Henríquez et al., 2014), solo de recuo de geleira (Nardo et al., 2023), sedimentos lacustres (Ogaki et al., 2020a; Rosa et al., 2022), sedimentos marinhos e madeira (Duarte et al., 2018; Nardo et al., 2023). O gênero *Antarctomyces* inclui apenas duas espécies, que são psicrófilas e endêmicas da Antártica: *A. psychrotrophicus* (Stchigel et al., 2001) e *A. pellizariae* (de Menezes et al., 2017). *Antarctomyces psychrotrophicus*, o terceiro táxon mais abundante neste trabalho, já foi encontrado em diferentes amostras na Antártica, como solos na Ilha Rei George (Stchigel et al., 2001) e em amostras de água do lago próximo à geleira Stenhouse na Ilha Rei George (Gonçalves et al., 2012). Essa espécie também já foi relatada em

líquens (Santiago et al., 2015), macroalgas (Ogaki et al., 2019) e invertebrados (Godinho et al., 2019; Simões et al., 2019).

Thelebolus já foi anteriormente descrito em lagos da Antártica Marítima e Continental (de Hoog et al., 2005; Brunati et al., 2009; Gonçalves et al., 2012; Tsuji et al., 2013; Connell et al., 2018; Ogaki et al., 2020a). Algumas espécies psicrófilicas de *Thelebolus* já foram associadas a solos ornitogênicos da Antártica (del Frate & Caretta, 1990), o que corrobora a sua presença no Lago Boeckella, já que uma de suas margens é próxima a colônias de pinguins. Além disso, *Thelebolus globosus* já foi encontrado em macroalgas (Furbino et al., 2014), estrelas do mar (Duarte et al., 2018), rochas (Alves et al., 2019), neve (de Menezes et al., 2019), invertebrados (Godinho et al., 2019) e sedimentos de lagos (Ogaki et al., 2020a).

Cosmospora possui representantes psicrotróficos e já foi encontrado em amostras terrestres da Antártica, incluindo solo ornitogênico e ossos de baleia (Duarte et al., 2018), além de lagos antárticos (Gonçalves et al., 2012), solo ártico (Ali et al., 2013), solo da rizosfera de *Deschampsia antarctica* (Gonçalves et al., 2015) e solo associado a raízes (Nardo et al., 2023). Já as espécies do gênero *Cladosporium* são cosmopolitas e seus esporos podem ser encontrados no ar, solo e água; além disso, requerem condições frias e úmidas para seu crescimento e esporulação (Domsch et al., 1980; Ogórek et al., 2012). Isolados do gênero já foram recuperados de solo ornitogênico, madeira, macroalgas (Duarte et al., 2018), sedimento marinho, solo de recuo de geleiras, invertebrados marinhos (Nardo et al., 2023) e neve (de Menezes et al., 2019). Muitas das suas espécies são psicotolerantes e são frequentemente encontradas em ambientes polares, como Ártico e Antártica (Mcrae et al., 1999; Held et al., 2006; Sonjak et al., 2006; Gonçalves et al., 2013, 2015).

Penicillium é um táxon amplamente distribuído pelo globo, o que evidencia sua alta adaptação às mudanças ambientais e também às condições extremas de alguns habitats (Kozlovsky et al., 2020). O gênero possui representantes psicotolerantes que já foram isolados do Ártico e da Antártica (Mcrae et al., 1999; Held et al., 2006; Sonjak et al., 2006; Gonçalves et al., 2013, 2015). Seus representantes ocorrem frequentemente em solos profundos do Ártico e da Antártica, especialmente os datados de milhões de anos, evidenciando a sua adaptação a condições extremas (Kochkina et al., 2012; Kozlovsky et al., 2020). Além disso, alguns isolados já foram recuperados de invertebrados marinhos, talos de líquens, madeira e ossos de baleia (Duarte et al., 2018; Poveda et al., 2018). *Penicillium polonicum* já teve sua presença relatada na Antártica por Rosa et al. (2020), utilizando a técnica de *metabarcoding* em amostras de neve obtidas da Ilha Livingston. *Penicillium allii-sativi* foi descrito por (Houbraken et al., 2012) e inicialmente isolado de alho, solo, salinas e ração para suínos; seu primeiro relato na Antártica

foi feito por Godinho et al. (2015), onde foi recuperado de solo oligotrófico dos Montes Ellsworth, Antártica Continental.

O gênero *Ramgea* foi descrito pela primeira vez por van Brummelen (1992) a partir de amostras de fezes de faisão na Holanda; é um gênero coprófilo semelhante morfologicamente a *Thelebolus* e que só possui duas espécies: *R. annulispora* e *R. ozimecii* (Quijada et al., 2022). Os indivíduos desse gênero costumam se desenvolver mais rapidamente devido à natureza transitória de seu substrato e à competição espacial por recursos limitados (Halbwachs & Bässler, 2020; Quijada et al., 2022). *Ramgea ozimecii* foi descrita recentemente por Hyde et al. (2017) e foi isolada de fezes de morcegos encontrados em zonas escuras de cavernas da Croácia. Além disso, essa espécie já foi isolada de amostras de lama de poço, que é um solo fermentado específico para a fabricação do licor chinês (Pu & Yan, 2022). Apesar de essa espécie já ter sido encontrada em ambientes inóspitos, este trabalho parece ser o primeiro relato de *R. ozimecii* na Antártica.

Candida foi o gênero de leveduras mais frequente deste trabalho e o único pertencente ao filo *Ascomycota*. Na Antártica, espécies do gênero já foram encontradas em amostras de solo (Arenz & Blanchette, 2011; Martinez et al., 2016), *permafrost* (Kochkina et al., 2012), sedimentos de lagos e água marinha (Martinez et al., 2016; Buzzini et al., 2017). *Candida davisiana* já foi isolada de talos de líquens (Duarte et al., 2013; Vasileva-Tonkova et al., 2014), substratos vegetais (Ferreira et al., 2019) e solo ornitogênico (Martinez et al., 2016). Além disso, Vasileva-Tonkova et al. (2014) mostraram *C. davisiana* como a levedura mais resistente à radiação UV em seus estudos, o que evidencia sua capacidade adaptativa a condições extremas de estresse da Antártica.

Linnemannia é o único gênero pertencente ao filo *Mortierellomycota* isolado neste trabalho, alguns de seus representantes são conhecidos por serem adaptadas ao frio (de Menezes et al., 2022). Aparentemente, só existem dois estudos relatando a presença do gênero na Antártica, nos quais os isolados foram recuperados de artefatos arqueológicos de focas da Ilha Livingston, Antártica (de Menezes et al., 2022) e de solo de degelo de geleira da Ilha Rei George (de Oliveira, 2022).

Os isolados do filo *Basidiomycota* caracterizados neste trabalho foram todos representados por leveduras, um padrão que parece ser recorrente na literatura (Ludley & Robinson, 2008; Duarte et al., 2013, 2016; Ferreira et al., 2019), uma vez que os fungos filamentosos pertencentes ao filo são raramente encontrados na Antártica (Arenz & Blanchette, 2009; Duarte et al., 2018). De acordo com Vishniac (2006), as leveduras pertencentes a esse

filo podem estar melhor adaptadas a ambientes frios quando comparadas àquelas pertencentes ao filo *Ascomycota*.

Naganishia foi o segundo gênero de leveduras mais frequente neste trabalho; algumas de suas espécies já foram isoladas de amostras de solo da Antártica (Białkowska et al., 2017; 5 Nizovoy et al., 2021; Nardo et al., 2023) e de salmouras nos Vales Secos de McMurdo na Antártica continental (Borruso et al., 2018). Além disso, outras espécies já foram descritas como alguns dos organismos mais resistentes à radiação UV, o que mostra sua adaptação a condições extremas (Schmidt et al., 2017). *Holtermanniella* já foi encontrada, na Antártica, em solos da ilha Rei George (Carrasco et al., 2012; Nardo et al., 2023), sedimento marinho (Nardo 10 et al., 2023) e macroalgas (Duarte et al., 2016). *Holtermanniella wattica* foi reportada pela primeira vez na Antártica por Santiago et al. (2015); além disso, já foi encontrada em sedimento de lago (Ogaki et al., 2020a), briófitas (Ferreira et al., 2019), solos (Tsuji, 2018), estromatólitos (Guffogg et al., 2004) e neve (de Menezes et al., 2019).

Espécies de *Leucosporidium* já foram isoladas de sedimentos marinhos da Antártica 15 (Duarte et al., 2013), solos da Ilha Victoria (Connell et al., 2008), solos da Ilha Rei George (Carrasco et al., 2012; Nardo et al., 2023), rochas (Rovati et al., 2013), associado a esponjas marinhas (Vaca et al., 2013) e neve (de Menezes et al., 2019). *Leucosporidium creatinivorum* já foi encontrado na Antártica em substratos vegetais (Ferreira et al., 2019), solo da ilha Rei George (Villarreal et al., 2018; Baeza et al., 2021) e água de lagos da ilha Rei George (Villarreal 20 et al., 2018). *Cystobasidium* já foi isolado de solo da Ilha Victoria (Connell et al., 2008), solos da ilha Rei George (Carrasco et al., 2012; Nardo et al., 2023), talos de líquens (Duarte et al., 2013), rochas (Rovati et al., 2013), neve (de Menezes et al., 2019) e sedimento marinho (Duarte et al., 2013; Nardo et al., 2023). *Cystobasidium laryngis* (anteriormente denominada *Rhodotorula laryngis*) já foi isolada da angiosperma *Deschampsia antarctica* (Santiago et al., 25 2017) e de talos líquens e solos antárticos (Carrasco et al., 2012; Santiago et al., 2015).

Phenoliferia possui diversas espécies típicas de ambientes frios (Buzzini et al., 2017), as quais já foram isoladas de biofilmes da Antártica (Ferreira et al., 2019), neve (de Menezes et al., 2019), solos (Carrasco et al., 2012), crioconitas da região da plataforma de gelo Amery, Antártica (Sanyal et al., 2020), sedimentos de lagos (Ogaki et al., 2019, 2020a), associadas a 30 plantas e outros substratos em zonas extra-aquáticas (Ogaki et al., 2019), macroalgas (Duarte et al., 2016) e rochas próximas a líquens (Duarte et al., 2013).

Por fim, o último gênero relatado neste trabalho foi *Mrakia*, cujas espécies são responsáveis por aproximadamente 35% dos fungos cultiváveis isolados de sedimentos de lagos e solos da Antártica Oriental, sugerindo que esse gênero de leveduras é o mais adaptado aos

ambientes extremos da Antártica (Tsuji et al., 2013, 2015). Suas espécies já foram isoladas de ambientes extremos, como Alasca e Antártica (Poliakova et al., 2001; Thomas-Hall et al., 2010). Isolados já foram recuperados de biofilmes da Antártica, de *Colobanthus quitensis* (Ferreira et al., 2019), de solo da Ilha Rei George (Carrasco et al., 2012), neve (de Menezes et al., 2019), sedimentos de mar (Hua et al., 2010; Nardo et al., 2023), sedimentos de lago e musgos (Tsuji et al., 2015). Ademais, *Mrakia blollopis* é uma espécie adaptada ao frio e foi isolada pela primeira vez na Antártica de *permafrost* da Ilha Livingston (da Silva et al., 2020); também já foi encontrada em solo (Thomas-Hall et al., 2010; Tsuji et al., 2016), sedimentos de lago e musgo (Tsuji et al., 2016).

10 Dessa forma, percebemos que todos os táxons encontrados neste trabalho são espécies psicrofílicas, psicrotolerantes ou cosmopolitas adaptadas ao frio e já foram relatados na Antártica, com exceção da espécie *R. ozimecii*. A presença desses micro-organismos nos lagos antárticos é essencial para o equilíbrio de micro e macronutrientes, uma vez que desempenham um importante papel na ciclagem de nutrientes, processos de fluxo de energia e na decomposição da matéria orgânica particulada em suspensão (Ogaki et al., 2019, 2020b; de Souza et al., 2023).

6.2. Produção enzimática dos isolados fúngicos

A síntese de enzimas psicrofílicas é uma das estratégias de adaptação a ambientes frios mais investigadas, a qual se baseia na flexibilidade estrutural e na modificação do sítio ativo da enzima (Gerday et al., 1997; Buzzini et al., 2012). A manutenção da atividade enzimática a baixas temperaturas requer o enfraquecimento de forças intermoleculares, o que garante a maior plasticidade dessas moléculas (Feller & Gerday, 2003). Neste sentido, um dos desafios para a produção biotecnológica é a economia de energia, requisito atendido pelas enzimas de organismos adaptados ao frio, já que elas atendem aos esforços para diminuição do consumo de energia (Chen & Jiang, 2018). Apesar de representarem uma alternativa promissora para a substituição de recursos pouco sustentáveis utilizados na indústria, essas enzimas geralmente requerem modificações para uso industrial (Longwell et al., 2017; Bruno et al., 2019); dessa forma, a engenharia genética e os recentes avanços na ciência têm possibilitado melhorias na modificação e caracterização funcional de enzimas promissoras (Bruno et al., 2019).

30 Dos isolados filamentosos deste trabalho, apenas dois representantes de *Ramgea ozimecii* foram bons produtores da enzima protease. Como essa espécie é pouco relatada na literatura, aparentemente não existem estudos relatando a produção de enzimas por seus isolados. Dessa forma, este trabalho é o primeiro a demonstrar o potencial da espécie em produzir a enzima protease. Já as leveduras isoladas deste trabalho apresentaram potencial

satisfatório de produção enzimática. Apesar de não apresentarem $IE \geq 2$ para nenhuma enzima, alguns isolados de “*C. davisiana*” produziram a enzima lipase, assim como já relatado por Duarte et al. (2013). Enquanto isso, o gênero *Holtermaniella* já foi relatado como bom produtor de invertase, esterase e carragenase (Mokhtarnejad et al., 2016; da Silva et al., 2022; de Souza et al., 2023), o que corrobora com o presente trabalho, no qual *H. wattica* foi boa produtora da enzima esterase.

Isolados de *Leucosporidium* obtidos neste trabalho foram bons produtores das enzimas carragenase, esterase, inulinase, pectinase e protease, além de terem produzido lipase, corroborando com os resultados encontrados por Turkiewicz et al. (2003), Brizzio et al. (2007), Buzzini et al. (2012), Carrasco et al. (2012), Duarte et al. (2013), Duarte et al. (2017), Martorell et al. (2017), de Souza et al. (2023) e da Silva et al. (2022). Ademais, o único isolado de *M. blollopis* foi bom produtor de celulase, esterase, invertase e protease, assim como também já foi relatado por Pathan et al. (2010), Carrasco et al. (2012), Tsuji et al. (2013) e de Souza et al. (2023).

Os isolados de *Naganishia* sp. apresentaram resultados bastante similares entre si, sendo bons produtores das enzimas esterase, invertase, lipase, pectinase e protease, corroborando com os estudos de Mokhtarnejad et al. (2016), Baeza et al. (2017), Cavello et al. (2019), Carvalho et al. (2021), Shesham et al. (2021) e Reinoso et al. (2023). Apesar desse gênero já ter sido retratado em diversos trabalhos como produtor de enzimas, aparentemente este é o seu primeiro relato como produtor da enzima invertase. O único isolado de *Phenoliferia* (anteriormente denominado *Rhodotorula*) se mostrou bom produtor das enzimas carragenase, esterase e inulinase, além de produzir lipase. Carrasco et al. (2012), Baeza et al. (2017), Sanyal et al. (2020) e da Silva et al. (2022) já relataram o gênero como produtor da enzima esterase; enquanto Martorell et al. (2017) relatou sua produção de lipase. No entanto, este trabalho parece ser o primeiro relato do gênero como produtor das enzimas carragenase e inulinase.

6.3. Produção de biossurfactantes pelos isolados fúngicos

Os biossurfactantes são uma alternativa sustentável em relação aos surfactantes sintéticos, uma vez que são sintetizados por seres vivos, como plantas e micro-organismos, e normalmente oferecem menor toxicidade e maior biodegradabilidade (Geetha et al., 2018; da Silva et al., 2021). Os biossurfactantes bacterianos têm sido constantemente estudados, enquanto aqueles produzidos por fungos representam apenas 19% da produção científica (Raaijmakers et al., 2012; da Silva et al., 2021). Alguns biossurfactantes são produzidos exclusivamente por fungos, como manosileritritol lipídico, lipídeos de celobiose,

soforolipídeos, xilolipídeos, polióis lipídicos e hidrofobinas (Abdel-Mawgoud & Stephanopoulos, 2018; Garay et al., 2018; da Silva et al., 2021).

Vários parâmetros influenciam a produção de biossurfactantes, como fontes de carbono e nitrogênio utilizadas no meio de fermentação, temperatura, pH e velocidade de agitação (Adetunji & Olaniran, 2021). As fontes de carbono podem ser classificadas como solúveis em água (glicose, sacarose e glicerol) e insolúveis (óleos brutos e óleos vegetais) (Cunha et al., 2004). A produção de biossurfactantes na presença de substratos insolúveis em água facilita a transferência de massa dos substratos através da superfície celular para o crescimento microbiano (Nurfarahin et al., 2018). O extrato de levedura como melhor fonte de nitrogênio já foi relatado por Deshpande & Daniels (1995), em que *Torulopsis bombicola* e *Candida bombicola* apresentaram maior secreção de soforolipídeos. Além disso, Sarubbo et al. (2007) e Rufino et al. (2008) obtiveram a produção ideal de lipídeos manosileritritol por *Candida* sp. utilizando extrato de levedura e nitrato de amônio como fonte de nitrogênio. Parâmetros físico-químicos, como pH, temperatura e velocidade de agitação diferem dependendo da fisiologia dos organismos, influenciando no crescimento e na atividade metabólica dos micro-organismos para a produção de biossurfactantes (Adetunji & Olaniran, 2021).

Apesar de ser uma proposta promissora, a produção de biossurfactantes ainda é limitada devido aos custos de produção e recuperação, que costumam ser superiores aos surfactantes já empregados nos bioprocessos (Jimoh & Kin, 2019; da Silva et al., 2021). Uma solução pra esse problema é o desenvolvimento de ferramentas estatísticas e de bioprocessos aplicados aos biossurfactantes, que podem resultar na obtenção de maiores rendimentos e produtividade para os processos industriais (da Silva et al., 2021).

Alguns exemplos de espécies de fungos frequentemente relatadas como produtoras de biossurfactantes são *Candida bombicola*, *C. ishiwadae*, *C. batistae*, *Yarrowia lipolytica*, *Pseudozyma antarctica* e *Aspergillus ustus* (Deshpande & Daniels, 1995; Casas et al., 1997; Casas & García-Ocho, 1999; Papanikolaou et al., 2002; Cavalero & Cooper, 2003; Morita et al., 2006; Felse et al., 2007; Fukuoka et al., 2007; Kiran et al., 2009; Bhardwaj, 2013). Em relação às espécies produtoras de biossurfactantes relatadas neste trabalho, *A. psychrotrophicus* foi o táxon que apresentou o maior número de isolados com $E_{24\%} > 50\%$. Esse gênero parece ter sido relatado somente por da Silva (2023), no qual o isolado recuperado de amostras marinhas da Antártica mostrou $E_{24\%}$ superior ao surfactante industrial utilizado como controle positivo, de forma semelhante ao apresentado no presente trabalho. Ademais, da Silva (2023) parece ser o único trabalho que menciona um isolado de *Thelebolus* como produtor de biossurfactantes. Como já citado anteriormente, existem poucas pesquisas relatando a produção

dessas moléculas por fungos (da Silva et al., 2021); tendo isso em vista, este trabalho parece ser o primeiro relato da produção de biossurfactantes por isolados dos gêneros *Cosmospora*, *Pseudogymnoascus* e *Ramgea*.

Já em relação às leveduras, isolados de “*C. davisiana*” e *Cystobasidium* sp. foram os
5 únicos táxons produtores de biossurfactantes. Leveduras do gênero *Candida* são
constantemente relatadas na literatura como produtoras dessas moléculas, a exemplo dos
soforolipídeos produzidos por *C. bombicola* e *C. apicola* (Hommel et al., 1994; Daverey &
Pakshirajan, 2009; Bueno et al., 2019). Os soforolipídeos de *C. sphaerica* são capazes de
degradar poluentes complexos e remover metais pesados tóxicos (de Luna et al., 2017; Khanna
10 et al., 2023). Rufino et al. (2007) isolaram um novo biossurfactante de *C. lipolytica* que possui
propriedades atrativas como emulsificante, além de diversas propriedades desejáveis para a
indústria petrolífera que podem ser aplicadas nos processos de limpeza de tanques e na
descontaminação de áreas poluídas.

“*Candida davisiana*” já foi isolada de diferentes ambientes da Antártica (Duarte et al.,
15 2013; Vasileva-Tonkova et al., 2014; Martinez et al., 2016; Ferreira et al., 2019) e, apesar de
espécies do gênero já terem sido descritas como produtoras de biossurfactantes, o presente
trabalho parece ser o primeiro a mostrar o potencial de produção dessas moléculas por “*C.*
davisiana”. Da mesma forma, este parece ser o primeiro relato do gênero *Cystobasidium* como
produtor de biossurfactantes.

7. CONCLUSÃO

A partir da análise dos resultados obtidos neste trabalho, pode-se perceber que os substratos coletados das margens oeste e sudeste do Lago Boeckella, o qual se encontra em processo de ressecamento e futura extinção, apresentam táxons fúngicos anteriormente descritos na Antártica, com exceção da espécie *R. ozimecii*, que parece ter sido relatada pela primeira vez no continente. A produção enzimática dos isolados de leveduras e fungos filamentosos relatada neste estudo corrobora com outros realizados anteriormente, o que parece demonstrar a importância dessas enzimas na sobrevivência dos micro-organismos em ambientes frios como a Antártica. Ademais, existem poucos estudos acerca dos biossurfactantes produzidos por fungos; dessa forma, trabalhos como este são essenciais para a descoberta de potenciais produtores dessas moléculas, principalmente no que se refere ao emprego de micro-organismos psicrófilos e psicrotolerantes em bioprocessos.

Por fim, este trabalho contribui para a compreensão da diversidade fúngica cultivável do Lago Boeckella, que sofre com as consequências das mudanças climáticas locais. Além disso, evidencia a importância da diversidade taxonômica e do papel ecológico que esses micro-organismos desempenham nos ambientes lacustres da Antártica, além do seu potencial biotecnológico quanto à produção de enzimas e biossurfactantes em baixas temperaturas.

8. PRODUÇÃO ACADÊMICA

Artigos em colaboração

- DE SOUZA, L. M. D., OGAKI, M. B., **TEIXEIRA, E. A. A.** *et al.* Communities of culturable freshwater fungi present in Antarctic lakes and detection of their low-temperature-active enzymes. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 1, p. 1-10, 2022. <https://doi.org/10.1007/s42770-022-00834-x>
- DE SOUZA, L. M. D., **TEIXEIRA, E. A. A.**, DA COSTA COELHO, L. *et al.* Cryptic fungal diversity revealed by DNA metabarcoding in historic wooden structures at Whalers Bay, Deception Island, maritime Antarctic. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 54, p. 213–222, 2023. <https://doi.org/10.1007/s42770-022-00869-0>

Capítulo de livro publicado

- DE SOUZA, L. M. D.; BARRETO, D. L. C.; COSTA, L. C.; **TEIXEIRA, E. A. A.** *et al.* Fungal Biosurfactants: Applications in Agriculture and Environmental Bioremediation Processes. In: Paulo Ricardo Franco Marcelino, Silvio Silverio da Silva, Antonio Ortiz Lopez. (Org.). Fungal Biosurfactants: Applications in Agriculture and Environmental Bioremediation Processes. 1ed.: John Wiley & Sons, Ltd., v. 1, p. 243-254, 2023. <https://doi.org/10.1002/9781119854395.ch12>

Participação em eventos

- **TEIXEIRA, E. A. A.**; de Souza, L.M.D.; RIBEIRO, J. P. M.; Rosa, L.H. Evaluation of lipid production of the oleaginous yeast *Solicoccozyma terricola* isolated from the whaling station at Whalers Bay, Deception Island, Antarctica. **10th SCAR Open Science Conference**. 2022.
- **TEIXEIRA, E. A. A.**; de Souza, L.M.D.; Rosa, L.H. Enzymatic activities of fungi present on different historic huts at Whalers Bay, Deception Island, Antarctica. **10th SCAR Open Science Conference**. 2022.
- **TEIXEIRA, E. A. A.**; de Souza, L.M.D.; Rosa, L.H. Detecção de enzimas de interesse industrial produzidas por leveduras isoladas do Lago Boeckella, Hope Bay, Antártica. **IX Simpósio de Microbiologia da UFMG**, Belo Horizonte. 2022.
- **TEIXEIRA, E. A. A.**; de Souza, L.M.D.; Rosa, L.H. Detecção de biossurfactantes de interesse industrial produzidos por fungos isolados do Lago Boeckella, Hope Bay, Antártica. **X Simpósio de Microbiologia da UFMG**, Belo Horizonte. 2023.

Co-orientação

- HENRIQUE OLIVEIRA CHUMAN BORGES. Bioprospecção de enzimas e biossurfactantes de interesse industrial produzidos por fungos presentes em sedimentos do Lago Erminda da Antártica. **Trabalho de Conclusão de Curso** (Graduação em Abi – Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Minas Gerais. 2023.

9. REFERÊNCIAS

- ABDEL-MAWGOUD A.M.; STEPHANOPOULOS G. Simple glycolipids of microbes: chemistry, biological activity and metabolic engineering. **Synth Syst Biotechnol** v. 3, p. 3–19, 2018.
- ADETUNJI, Adegoke Isiaka; OLANIRAN, Ademola Olufolahan. Production and potential biotechnological applications of microbial surfactants: an overview. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 28, n. 1, p. 669-679, 2021.
- AGGARWAL, Ruchika et al. Extraction of amylase from the microorganism isolated from textile mill effluent vis a vis desizing of cotton. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, v. 14, ISSN 2352-5541, 2019.
- ALI, SH *et al.* Studies on diversity of soil microfungi in the Hornsund area, Spitsbergen. **Pol Polar Res** v. 34, p.39–54, 2013.
- ALVES, Isabel M.S. *et al.* The diversity, distribution, and pathogenic potential of cultivable fungi present in rocks from the South Shetlands archipelago, Maritime Antarctica. **Extremophiles**, v. 23, n. 3, p. 327-336, 2019.
- AMARAL, Priscilla *et al.* Biosurfactants from yeasts: characteristics, production and application. **Adv Exp Med Biol**, v. 672, p. 236–49, 2010.
- ARENZ, BE, et al. Fungal diversity in soils and historic wood from the Ross Sea region of Antarctica. **Soil Biol Biochem** v. 38, p. 3057–3064, 2006.
- ARENZ, BE; BLANCHETTE RA. Investigations of fungal diversity in wooden structures and soils at historic sites on the Antarctic Peninsula. **Can J Microbiol** v. 55, p. 46–56, 2009.
- ARENZ, BE; BLANCHETTE, RA. Distribution and abundance of soil fungi in Antarctica at sites on the Peninsula, Ross Sea Region and McMurdo Dry Valleys. **Soil Biol Biochem** v. 43, p. 308–315, 2011.
- ARORA, Dilip K. Handbook of Fungal Biotechnology. **Mycology**, v. 20, 2003.
- AVHAD, Mangesh Ramesh; MARCHETTI, Jorge Mario. Uses of Enzymes for Biodiesel Production. **Advanced Bioprocessing for Alternative Fuels, Biobased Chemicals, And Bioproducts**, p. 135-152, 2019.
- BAEZA, Marcelo *et al.* Cold-Active Enzymes from Cold-Adapted Yeasts. **Biotechnology of Yeasts and Filamentous Fungi**, p. 297–324, 2017.
- BAEZA, Marcelo *et al.* Identification of Stress-Related Genes and a Comparative Analysis of the Amino Acid Compositions of Translated Coding Sequences Based on Draft Genome Sequences of Antarctic Yeasts. **Frontiers In Microbiology**, v. 12, 2021.
- BANAT, Ibrahim M, *et al.* Microbial biosurfactants production, applications and future potential. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 87, p. 427–44, 2012.

- BARAHONA, Salvador *et al.* Identification and characterization of yeasts isolated from sedimentary rocks of Union Glacier at the Antarctica. **Extremophiles**, v. 20, p. 479–491, 2016.
- BARDOU, P. *et al.* An interactive Venn diagram viewer. **BMC Bioinform** v. 15, 2014.
- BENLUVANKAR, Varghese *et al.* Protease production by *Penicillium* sp. LCJ228 under solid state fermentation using groundnut oilcake as substrate. **International Journal of Life Science and Pharma Research**, v. 5, p. 12–19, 2015.
- BERBEE, Mary L. *et al.* Early Diverging Fungi: Diversity and Impact at the Dawn of Terrestrial Life. **Annual Review of Microbiology**, v. 71, p. 41–60, 2017.
- BHARDWAJ, Garima *et al.* Biosurfactants from Fungi: a review. **Journal Of Petroleum & Environmental Biotechnology**, v. 04, n. 06, p. 1-6, 2013.
- BIAŁKOWSKA, A.M. *et al.* Genetic and biochemical characterization of yeasts isolated from Antarctic soil samples. **Polar Biol** v. 40, p. 1787–1803, 2017.
- BISCHOFF, Valter. **Antártica**. Trabalho de Pesquisa apresentado como requisito para a obtenção do Diploma de aprovação no Curso Superior de Defesa Continental – Colégio Interamericano de defesa. Washington D.C. 1996.
- BOMMARIUS, Andreas S.; PAYE, Mariétou F. Stabilizing biocatalysts. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, p. 6534, 2013.
- BORRUSO, L. *et al.* A thin ice layer segregates two distinct fungal communities in Antarctic brines from Tarn Flat (Northern Victoria Land). **Sci Rep** v. 8, 2018.
- BORTOLAZZO, Nara Gustinelli. Isolamento e seleção de fungos celulolíticos para hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar. 2011. 77 f. **Dissertação** (Mestrado) - Curso de Microbiologia Agrícola, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011. Disponível em: https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11138/tde-24052011-100406/publico/Nara_Gustinelli_Bortolazzo.pdf. Acesso em: 15 jul. 2022.
- BRADNER, J.Ron *et al.* The application of PCR for the isolation of a lipase gene from the genomic DNA of an Antarctic microfungus. **Current genetics**, v. 44, n. 4, p. 224-230, 2003.
- BRASIL, M.E. Coleção explorando o ensino - **Antártica**. 2006.
- BRIZZIO, Silvia *et al.* Extracellular enzymatic activities of basidiomycetous yeasts isolated from glacial and subglacial waters of northwest Patagonia (Argentina). **Canadian Journal of Microbiology**, v. 53, n. 4, p. 519-525, abr. 2007.
- BRUNATI, Mara *et al.* Diversity and pharmaceutical screening of fungi from benthic mats of Antarctic lakes Mar. **Genomics**, v. 2, p. 43-50, 2009.
- BRUNO, S. *et al.* Enzymes from marine polar regions and their biotechnological applications. **Marine drugs**, v. 17, n. 10, 2019.

BUENO, JL *et al.* Biosurfactant production by yeasts from different types of soil of the South Shetland Islands (Maritime Antarctica). **J Appl Microbiol** v. 126, p. 1402–1413, 2019.

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.

BUZZINI, P. *et al.* Yeasts in Polar and Subpolar Habitats. Yeasts in Natural Ecosystems: **Diversity**, 331–365, 2017.

CAMEOTRA, SS *et al.* Synthesis of biosurfactants and their advantages to microorganisms and mankind. In: **advances in experimental medicine and biology**, p. 261–280, 2010.

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. 1-9, 2012.

CARVALHO, Jéssyca Ketterine *et al.* Yeasts isolated from a lotic continental environment in Brazil show potential to produce amylase, cellulase and protease. **Biotechnology Reports**, v. 30, 2021.

CASAS, J.A. *et al.* Optimization of a synthetic medium for *Candida bombicola* growth using factorial design of experiments. **Enzyme And Microbial Technology**, v. 21, n. 3, p. 221-229, 1997.

CASAS, Joséa.; GARCÍA-OCHOA, Félix. Sophorolipid production by *Candida bombicola*: medium composition and culture methods. **Journal Of Bioscience and Bioengineering**, v. 88, n. 5, p. 488-494, 1999.

CASAS-GODOY, Leticia *et al.* Lipases: an overview. **Methods Mol Biol.**, p. 3-38, 2018.

CASTELLANI, A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 42, p. 225-226, 1939.

CAVALERO, David A.; COOPER, David G. The effect of medium composition on the structure and physical state of sophorolipids produced by *Candida bombicola* ATCC 22214. **Journal Of Biotechnology**, v. 103, n. 1, p. 31-41, 2003.

CAVELLO, Ivana Alejandra *et al.* Yeasts from Tierra Del Fuego Province (Argentina): Biodiversity, Characterization and Bioprospection of Hydrolytic Enzymes. **Geomicrobiology Journal**, p. 847-857, 2019.

CESÁRIO, Leticia Miranda *et al.* Optimization of lipase production using fungal isolates from oily residues. **BMC Biotechnol**, v. 21, n. 65, 2021.

CHAO, A. *et al.* Rarefaction and extrapolation with Hill numbers: a framework for sampling and estimation in species diversity studies. **Ecological Monographs** v. 84, p. 45-67, 2014.

CHAPARRO, Marcos A.E. *et al.* Sedimentary analysis and magnetic properties of Lake Anónima, Vega Island. **Antarctic Science**, v. 29, n. 5, p. 429-444, 2017.

CHEN, G.Q.; JIANG, X.R. Next generation industrial biotechnology based on extremophilic bacteria. **Curr. Opin. Biotechnol.** v. 50, p. 94–100, 2018.

CHERRY, Joel R; FIDANTSEF, Ana L. Directed evolution of industrial enzymes: an update. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 14, n. 4, p. 438-443, ago. 2003.

CHI, Zhenming *et al.* Inulinase-expressing microorganisms and applications of inulinases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 82, n. 2, p. 211-220, 2009.

CHILD, Jack; KELLY, Philip. Geopolítica, Integración y conflicto en el Cono Sur y la Antártida. **Geopolítica del Cono Sur y la Antártida**. 2 ed. Buenos Aires: Pleamar, 1990. P.01-10.

CHOI, Jung-Min *et al.* Industrial applications of enzyme biocatalysis: current status and future aspects. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 7, p. 1443-1454, 2015.

CHOWN, Steven L. *et al.* The changing form of Antarctic biodiversity. **Nature**, v. 522, n. 7557, p. 431-438, 2015.

COELHO, Livia da Costa., *et al.* Diversity, distribution, and xerophilic tolerance of cultivable fungi associated with the Antarctic angiosperms. **Polar Biol.** v. 44, p. 379–388, 2021.

CONNELL, Laurie *et al.* Biodiversity and abundance of cultured microfungi from the permanently ice-covered Lake Fryxell, Antarctica. **Life**, v. 8 pp. 1-10, 2018.

CONNELL, Laurie. *et al.* Diversity of Soil Yeasts Isolated from South Victoria Land, Antarctica. **Microb Ecol** v. 56, p. 448–459, 2008.

CONVEY, Peter; STEVENS, Mark I. Antarctic Biodiversity. **Science**, p. 1877-1878, 2007.

COOPER, David G.; GOLDENBERG, Beena G. Surface-Active Agents from Two Bacillus Species. **Applied And Environmental Microbiology**, v. 53, n. 2, p. 224-229, 1987.

CUNHA, C.D. *et al.* *Serratia* sp. SVGG16: a promising biosurfactant producer isolated from tropical soil during growth with ethanol-blended gasoline. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 12, p. 2277-2282, 2004.

DA SILVA, André Felipe *et al.* Fungal biosurfactants, from nature to biotechnological product: bioprospection, production and potential applications. **Bioprocess Biosyst Eng** v. 44, p. 2003–2034, 2021.

DA SILVA, Mayanne Karla *et al.* Extracellular hydrolytic enzymes produced by yeasts from Antarctic lichens. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 94, n. 1, 2022.

DA SILVA, Mayanne Karla. Diversidade e bioprospecção de enzimas, surfactantes e herbicidas de fungos presentes em sedimentos marinhos do Oceano Austral ao longo da Antártica Marítima. 2023. 116 f. **Dissertação** (Mestrado) – Pós-Graduação em Microbiologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2023.

DA SILVA, T.H *et al.* Diversity, distribution, and ecology of viable fungi in permafrost and active layer of Maritime Antarctica. **Extremophiles** v. 24, p. 565–576, 2020.

DAVEREY, A.; PAKSHIRAJAN, K. Production of sophorolipids by the yeast *Candida bombicola* using simple and low cost fermentative media. **Food Res Int** v. 42, n. 4, p. 499 - 504, 2009.

DE HOOG, G.S. *et al.* Evolution, taxonomy and ecology of the genus *Thelebolus* in Antarctica. **Stud. Mycol.**, v. 51, p. 33-76, 2005.

DE LUNA, JM *et al.* Application of *Candida sphaerica* biosurfactant for enhanced removal of motor oil from contaminated sand and Sea Water. **Chem Eng Trans** v. 20, p. 565–570, 2017.

DE MENEZES, Graciéle C.A. *et al.* Diversity, Distribution, and Ecology of Fungi in the Seasonal Snow of Antarctica. **Microorganisms**, v. 7, n. 10, p. 445, 2019.

DE MENEZES, Graciéle C.A. *et al.* Fungal impact on archaeological materials collected at Byers Peninsula Livingston Island, South Shetland Islands, Antarctica. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 94, n. 1, p. 1-2, 2022.

DE MENEZES, Graciéle C.A. *et al.* Fungal diversity present on rocks from a polar desert in continental Antarctica assessed using DNA metabarcoding. **Extremophiles** v. 25, p. 193–202, 2021.

DE MENEZES, Graciéle CA *et al.* *Antarctomyces pellizariae* sp. nov., a new, endemic, blue, snow resident psychrophilic ascomycete fungus from Antarctica. **Extremophiles**, v. 21, 2017.

DE MOT, René.; VERACHTERT, Hubert. Purification and characterization of extracellular α -amylase and glucoamylase from the yeast *Candida antarctica* CBS 6678. **European Journal of Biochemistry**, v. 164: p. 643 – 654, 1987.

DE OLIVEIRA, Rafaela Bodaneze. Avaliação da produção de lipídios por fungos filamentosos da família *Mortierellaceae* isolados da Antártida. 2022. 113 f. **Dissertação (Mestrado)** - Curso de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2022.

DE SOUZA, Láuren M.D. *et al.* Communities of culturable freshwater fungi present in Antarctic lakes and detection of their low-temperature-active enzymes. **Braz J Microbiol** v. 54, p. 1923–1933, 2023.

DE SOUZA, Láuren M. D. *et al.* Assessment of fungal diversity present in lakes of Maritime Antarctica using DNA metabarcoding: a temporal microcosm experiment. **Extremophiles**, v. 25, n. 1, p. 77-84, 2021.

DE SOUZA, Láuren M. D. *et al.* Diversity, distribution and ecology of fungal communities present in Antarctic lake sediments uncovered by DNA metabarcoding. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 1-2, 2022.

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

DEL FRATE, Giuseppe; CARETTA, Giuseppe. Fungi isolated from Antarctic material. **Polar Biol.**, v. 11, p. 1-7, 1990.

DESAI, J D; BANAT, I M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiology And Molecular Biology Reviews**, v. 61, n. 1, p. 47-64, 1997.

DESHPANDE, Milind; DANIELS, Lacy. Evaluation of sophorolipid biosurfactant production by *Candida bombicola* using animal fat. **Bioresource Technology**, v. 54, n. 2, p. 143-150, 1995.

DIX, Neville J.; WEBSTER, John. Aquatic Fungi. **Fungal Ecology**, p. 225-283, 1995.

DOMSCH, KH *et al.* Compendium of soil fungi. **Academic Press. London**, p.201-208, 1980.

DOS SANTOS, Juliana Aparecida *et al.* Fungal community in Antarctic soil along the retreating Collins Glacier (Fildes Peninsula, King George Island). **Microorganisms** v. 8, n 1145, 2020.

DUARTE, Alisson W. F. *et al.* Cold-adapted enzymes produced by fungi from terrestrial and marine Antarctic environments. **Critical Reviews In Biotechnology**, v. 38, n. 4, p. 600-619, 2017.

DUARTE, Alisson W. F. *et al.* Taxonomic assessment and enzymes production by yeasts isolated from marine and terrestrial Antarctic samples. **Extremophiles**, v. 17, n. 6, p. 1023-1035, 2013.

DUARTE, Alisson W. F. *et al.* Production of cold-adapted enzymes by filamentous fungi from King George Island, Antarctica. **Polar Biol** v. 41, p. 2511–2521, 2018.

DUARTE, Alisson W. F. *et al.* Yeasts from macroalgae and lichens that inhabit the South Shetland Islands, Antarctica. **Environ Microbiol Rep** v. 8, p. 874–886, 2016.

DURÁN, Paola *et al.* Occurrence of soil fungi in Antarctic pristine environments. **Front. Bioeng. Biotechnol**, v.7, 2019.

EL-GENDI, Hamada *et al.* A Comprehensive Insight into Fungal Enzymes: Structure, Classification, and Their Role in Mankind's Challenges. **Journal of Fungi**, v. 8, 2022.

ERMOLIN, E. Primera experiencia en diseño y construcción de undique en permafrost Antártico: Lago Boeckella, Bahía Esperanza. **Contrib Inst Antar Argentino** 537:1-41, 2003.

FAKRUDDIN, MD. Biosurfactant: production and application. **Journal of Petroleum & Environmental Biotechnology**, v. 03, n. 04, 2012.

FAROOQ, Muhammad Adeel *et al.* Biosynthesis and industrial applications of α -amylase: a review. **Archives of Microbiology**, v. 203, p. 1281–1292, 2021.

FAWZY, Mustafa A. *et al.* Fungal agarase production in a cost-effective macroalgal based medium and enzymatic hydrolysis of the alkali extracted macroalgal biomass: an optimization study. **Waste and Biomass Valorization**, v. 11, n. 1, p. 255-264, 2020.

FEITKENHAUER, Heiko. Anaerobic digestion of desizing wastewater: influence of pretreatment and anionic surfactant on degradation and intermediate accumulation. **Enzyme And Microbial Technology**, v. 33, n. 2-3, p. 250-258, ago. 2003.

FELLER, G.; GERDAY, C. Psychrophilic enzymes: hot topics in cold adaptation. **Nat Rev Microbiol** 1, p. 200–208, 2003.

FELSE, P. Arthur *et al.* Sphorolipid biosynthesis by *Candida bombicola* from industrial fatty acid residues. **Enzyme And Microbial Technology**, v. 40, n. 2, p. 316-323, 2007.

FERREIRA, E.M.S. *et al.* Taxonomy and richness of yeasts associated with angiosperms, bryophytes, and meltwater biofilms collected in the Antarctic Peninsula. **Extremophiles** v. 23, p. 151–159, 2019.

FERREIRA, Felipe. O Sistema do Tratado da Antártica: evolução do regime e seu impacto na política externa brasileira. 1 ed. Brasília: Funag, 2009.

FERREIRA-DIAS S *et al.* The potential use of lipases in the production of fatty acid derivatives for the food and nutraceutical industries. **Electron J Biotechnol** v. 16, n. 3, p. 1-2, 2013.

FUKUOKA, T. *et al.* Structural characterization and surface-active properties of a new glycolipid biosurfactant, mono-acylated mannosylerythritol lipid, produced from glucose by *Pseudozyma antarctica*. **Appl Microbiol Biotechnol** v. 76, p. 801–810, 2007.

FURBINO, Laura E. *et al.* Diversity patterns, ecology and biological activities of fungal communities associated with the endemic macroalgae across the Antarctic Peninsula. **Microbial ecology**, v. 67, n. 4, p. 775-787, 2014.

FURBINO, Laura E. *et al.* Isolation of fungi associated with macroalgae from maritime Antarctica and their production of agarolytic and carrageenolytic activities. **Polar Biology**, v. 41, n. 3, p. 527-535, 2018.

GARAY, LA, *et al.* Extracellular fungal polyol lipids: a new class of potential high value lipids. **Biotechnol Adv**, v. 36, p. 397–414, 2018.

GARCÍA-CALVO, Laura, *et al.* *Penicillium chrysogenum* as a fungal factory for feruloyl esterases. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 107, p. 691–717, 2023.

GARG, Mayank *et al.* Isolation, characterization and antibacterial effect of biosurfactant from *Candida parapsilosis*. **Biotechnology Reports**, v. 18, p. 1-24, 2018.

GAUTAM, Gunjan *et al.* A Cost-Effective Strategy for Production of Bio-surfactant from Locally Isolated *Penicillium chrysogenum* SNP5 and Its Applications. **Journal Of Bioprocessing & Biotechniques**, v. 04, n. 06, p. 1-7, 2014.

GEETHA SJ, *et al.* Biosurfactants: Production and potential applications in microbial enhanced oil recovery (MEOR). **Biocatal Agric Biotechnol** v. 14, p. 23–32, 2018.

GEOFFRY, Kiptoo; ACHUR, Rajeshwara N. Optimization of novel halophilic lipase production by *Fusarium solani* strain NFCCL 4084 using palm oil mill effluent. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 16, p. 327–334, 2018.

GERDAY, Charles *et al.* Psychrophilic enzymes: a thermodynamic challenge. *Biochimica Et Biophysica Acta (Bba) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, v. 1342, n. 2, p. 119–131, 1997.

GERMEC, Mustafa *et al.* Medium optimization and kinetic modeling for the production of *Aspergillus niger* inulinase. **Bioprocess Biosyst Eng**, v. 43, p. 217–232, 2020.

GHASEMI, Younes *et al.* Experimental design of medium optimization for invertase production by *Pichia* sp. **Journal of Food Science and Technology**, v. 51, n. 2, p. 267–275, 2014.

GIBSON, John A.; ZALE, Rolf. Holocene development of the fauna of Lake Boeckella, northern Antarctic Peninsula. **The Holocene**, v. 16, n. 5, p. 625–634, 2006.

GODINHO, Valéria M *et al.* Diversity and bioprospection of fungal community present in oligotrophic soil of continental Antarctica. **Extremophiles** v. 19, p. 585–596, 2015.

GODINHO, Valéria Martins *et al.* Diversity and distribution of hidden cultivable fungi associated with marine animals of Antarctica. **Fungal biology**, v. 123, n. 7, p. 507–516, 2019.

GONÇALVES, Vívian Nicolau *et al.* Diversity and distribution of fungal communities in lakes of Antarctica. **Fems Microbiology Ecology**, v. 82, n. 2, p. 459–471, 2012.

GONÇALVES, Vívian Nicolau *et al.* Antibacterial, antifungal and antiprotozoal activities of fungal communities present in different substrates from Antarctica. **Polar Biol** v. 38, p. 1143–1152, 2015.

GONÇALVES, Vívian Nicolau *et al.* *Penicillium solitum*: a mesophilic, psychrotolerant fungus present in marine sediments from Antarctica. *Polar Biol* v. 36, p. 1823–1831, 2013.

GOTO, Shoji *et al.* A Taxonomic Study of Antarctic Yeasts. **Mycologia**, v. 61, n. 4, p. 748–774, 1969.

GUFFOGG, S.P. *et al.* A novel psychrotolerant member of the hymenomycetous yeasts from Antarctica: *Cryptococcus waticus* sp. nov. **Int J Syst Evol Micr** v. 54, p. 275–277, 2004.

GUO, Hailun, *et al.* Cloning, expression and characterization of a novel cold-active and organic solvent-tolerant esterase from *Monascus ruber* M7. **Extremophiles**, v. 20, p. 451–459, 2016.

GUO, Zilong *et al.* Carrageenan oligosaccharides: A comprehensive review of preparation, isolation, purification, structure, biological activities and applications. **Algal Research**, v. 61, ISSN 2211-9264, 2022.

- GURUNG, Neelam *et al.* A broader view: microbial enzymes and their relevance in industries, medicine, and beyond. **Biomed Research International**, p. 1-18, 2013.
- HAILE, Setegn; AYELE, Abate. Pectinase from Microorganisms and Its Industrial Applications. **The Scientific World Journal**, v. 2022, p. 1-15, 2022.
- HALBWACHS, H.; BÄSSLER, C. No bull: Dung-dwelling mushrooms show reproductive trait syndromes different from their non-coprophilous allies. **Mycol. Prog.** v. 19, p. 817–824, 2020.
- HAMMER, Oyvind. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. **Palaeontol electron**, v. 4, p. 9, 2001.
- HANDA, Shristi *et al.* Pharmaceutical prospects of biosurfactants produced from fungal species. **Journal Of Basic Microbiology**, p. 1-5, 2022.
- HANKIN, Lester; ANAGNOSTAKIS, S. L. The Use of Solid Media for Detection of Enzyme Production by Fungi. **Mycologia**, v. 67, n. 3, p. 597-607, 1975.
- HELD, BW *et al.* Assessment of fungal diversity and deterioration in a wooden structure at New Harbor, Antarctica. **Polar Biol** v. 29, p. 526–531, 2006.
- HENRÍQUEZ, M. *et al.* Diversity of cultivable fungi associated with Antarctic marine sponges and screening for their antimicrobial, antitumoral and antioxidant potential. **World J. Microbiol. Biotechnol.** v. 30, p. 65–76, 2014.
- HOMMEL, R. K. *et al.* Production of sophorose lipid by *Candida (Torulopsis) apicola* grown on glucose. **J Biotechnol** v. 33, n. 2, p. 147 -155, 1994.
- HOUBRAKEN, J *et al.* New penicillin-producing *Penicillium* species and an overview of section Chrysogena. **Persoonia** v. 29, p. 78–100, 2012.
- HUA, MX. *et al.* Production of a novel and cold-active killer toxin by *Mrakia frigida* 2E00797 isolated from sea sediment in Antarctica. **Extremophiles** v. 14, p. 515–521 2010.
- HYDE, Kevin D. *et al.* Fungal diversity notes 603–708: taxonomic and phylogenetic notes on genera and species. **Fungal Diversity** v. 87, p. 1–235, 2017.
- ISHAQ, U. *et al.* Production and characterization of novel self-assembling biosurfactants from *Aspergillus flavus*. **Journal Of Applied Microbiology**, v. 119, n. 4, p. 1035-1045, 2015.
- IZAGUIRRE, I. *et al.* Temporal and spatial variations of phytoplankton from Boeckella Lake (Hope Bay, Antarctic Peninsula). **Antarctic Science**, v. 5, n. 2, p. 137-141, 1993.
- IZAGUIRRE, Irina *et al.* Phytoplankton communities in relation to trophic status in lakes from Hope Bay (Antarctic Peninsula). **Hydrobiologia**, v. 369/370, p. 73-87, 1998.

IZAGUIRRE, Irina *et al.* Phytoplankton in Antarctic lakes: biodiversity and main ecological features. **Hydrobiologia**, v. 848, n. 1, p. 177-207, 2020.

JESKE, Lisa. *et al.* BRENDA in 2019: A European ELIXIR core data resource. **Nucleic Acids Research**. v. 47, p. 542-549, 2019.

JIMOH, Abdullahi Adekilekun; LIN, Johnson. Biosurfactant: a new frontier for greener technology and environmental sustainability. **Ecotoxicology And Environmental Safety**, v. 184, p. 109607, 2019.

JOSHI, Swati; SATYANARAYANA, Tulasi. Biotechnology of Cold-Active Proteases. **Biology**, v. 2, n. 2, p. 755-783, 2013.

KASANA, Ramesh C.; GULATI, Arvind. Cellulases from psychrophilic microorganisms: a review. **Journal Of Basic Microbiology**, v. 51, n. 6, p. 572-579, 2011.

KASHYAP, D.R. *et al.* Applications of pectinases in the commercial sector: a review. **Bioresource Technology**, v. 77, n. 3, p. 215-227, 2001.

KHAIRNAR, Yogesh *et al.* Study of pectinase production in submerged fermentation using different strains of *Aspergillus niger*. **Int. J. Microbiol. Res.**, v. 1, p. 13–17, 2009.

KHANNA, A. *et al.* Biosurfactant from *Candida*: sources, classification, and emerging applications. **Arch Microbiol** v. 205, 2023.

KHOKHAR, Ibatsam *et al.* Isolation and Screening of Amylolytic Filamentous Fungi. **Journal of Applied Sciences and Environmental Management**, v. 15, n. 1, p. 203-206, 2011.

KIRAN, G. *et al.* Optimization and production of a biosurfactant from the sponge-associated marine fungus *Aspergillus ustus* MSF3. **Colloids And Surfaces B: Biointerfaces**, v. 73, n. 2, p. 250-256, 2009.

KIRK, Ole *et al.* Industrial enzyme applications. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, n. 4, p. 345-351, 2002.

KITAMOTO, D *et al.* Remarkable antiagglomeration effect of a yeast biosurfactant, Diacylmannosylerythritol, on ice-water Slurry for cold thermal storage. **Biotechnol Prog** v. 17, p. 362–365, 2001.

KOCHKINA, G *et al.* Ancient fungi in Antarctic permafrost environments. **FEMS Microbiol Ecol** v. 82, p. 501–509, 2012.

KOZLOVSKY, A.G. *et al.* Secondary metabolites of the genus *Penicillium* from undisturbed and anthropogenically altered Antarctic habitats. **Folia Microbiol** v. 65, p. 95–102, 2020.

KUHAD, R. C. *et al.* Microbial Cellulases and Their Industrial Applications. **Enzyme Research**, v. 2011, p. 1-10, 2011.

KULSHRESTHA, S. et al. Invertase and its applications – A brief review. **Journal of Pharmacy Research**, v. 7, n. 9, p. 792-797, 2013.

KUMARI, Megha *et al.* Biotechnological potential of psychrophilic microorganisms as the source of cold-active enzymes in food processing applications. **3 Biotechnology**, v. 11, n. 479, 2021.

LACHANCE, Marc-André *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.

LARIOS, Araceli *et al.* Synthesis of flavor and fragrance esters using *Candida antarctica* lipase. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 65, n. 4, p. 373–376, 2004.

LIECKFELDT, Elke *et al.* Rapid identification and differentiation of yeasts by DNA and PCR fingerprinting. **Journal Of Basic Microbiology**, v. 33, n. 6, p. 413-425, 1993.

LIU, Yu *et al.* Biochemical Characterization of a First Fungal Esterase from *Rhizomucor miehei* Showing High Efficiency of Ester Synthesis. **Plos One**, v. 8, n. 10, 2013.

LONGWELL, C.K. *et al.* High-throughput screening technologies for enzyme engineering. **Curr. Opin. Biotechnol.** v. 48, p. 196–202, 2017.

LOOSE, Fabrício Ferreira. **Bioprospeção na Antártida**. 2011. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Relações Internacionais) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2011.

LUDLEY, K.E.; ROBINSON C.H. ‘Decomposer’ basidiomycota in Arctic and Antarctic ecosystems. **Soil Biol Biochem** v. 40, p.11–29, 2008.

LUFT, Luciana *et al.* An overview of fungal biopolymers: bioemulsifiers and biosurfactants compounds production. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 40, n. 8, p. 1059-1080, 2020.

MADHAVAN, Aravind *et al.* Strategies for design of improved biocatalysts for industrial applications. **Bioresource Technology**, v. 245, p. 1304-1313, 2017.

MAHARANA, Abhas Kumar; RAY, Pratima. Screening of psychrotrophic micro-fungi for cold active extracellular enzymes isolated from Jammu city, India. **Journal of Pure Applied Microbiology**, v. 8, p. 2369–75, 2014.

MAKKAR, Randhir *et al.* Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production. **Amb Express**, v. 1, n. 1, p. 5, 2011.

MALKUS, A. *et al.* RNA polymerase II gene (RPB2) encoding the second largest protein subunit in *Phaeosphaeria nodorum* and *P. avenaria*. **Mycol. Res.**, v. 110, n. 10, p. 1152-1164, 2006.

MARCHETTA, Alessia *et al.* A Deep Insight into the Diversity of Microfungal Communities in Arctic and Antarctic Lakes. **J. Fungi**, v. 9, 1095, 2023.

MARTINEZ, A. *et al.* Yeasts from sub-Antarctic region: biodiversity, enzymatic activities and their potential as oleaginous microorganisms. **Extremophiles**, v. 20, n. 5, p. 759-769, 2016.

MARTORELL, María Martha *et al.* Bioprospection of cold-adapted yeasts with biotechnological potential from Antarctica. **Journal Of Basic Microbiology**, v. 57, n. 6, p. 504-516, 2017.

MCRAE, CF *et al.* *Penicillium* species from terrestrial habitats in the Windmill Islands, East Antarctica, including a new species, *Penicillium antarcticum*. **Polar Biol** v. 21, p. 97–111, 1999.

MICHETTI, Davide *et al.* A comparative study of cold- and warm-adapted Endonucleases A using sequence analyses and molecular dynamics simulations. **Plos One**, v. 12, n. 2, 2017.

MIMEE, B *et al.* Catabolism of flocculosin, an antimicrobial metabolite produced by *Pseudozyma flocculosa*. **Glycobiology** v. 19, p. 995–1001, 2009.

MOBINI-DEHKORDI, Mohsen; JAVAN, Fahime Afzal. Application of α -amylase in biotechnology. **Journal Of Biology and Today'S World**, p. 39-50, 2012.

MOKHTARNEJAD, L. *et al.* Characterization of basidiomycetous yeasts in hypersaline soils of the Urmia Lake National Park, Iran. **Extremophiles** v. 20, p. 915–928, 2016.

MORITA, Tomotake *et al.* Analysis of expressed sequence tags from the anamorphic basidiomycetous yeast, *Pseudozyma antarctica*, which produces glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids. **Yeast**, v. 23, n. 9, p. 661-671, 2006.

MORITA, Tomotake *et al.* Production of mannosylerythritol lipids and their application in cosmetics. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 11, p. 4691-4700, 2013.

NADEEM, H. *et al.* Microbial invertases: a review on kinetics, thermodynamics, physiochemical properties. **Process Biochemistry**, v. 50, n. 8, p. 1202-1210, 2015.

NARDO, Victor G. *et al.* Biobank of fungi from marine and terrestrial Antarctic environments. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 95, n. 3, 2023.

NECAS, J.; BARTOSIKOVA, L. Carrageenan: a review. **Veterinarni Medicina**, p. 187-205, 2013.

NEVALAINEN, Helena. Grand Challenges in Fungal Biotechnology. **Springer**, 2020.

NIELSEN, J. Production of biopharmaceutical proteins by yeast: advances through metabolic. **Bioengineered**, 2013.

NITSCHKE, Marcia; PASTORE, Gláucia Maria. Biossurfactantes: propriedades e aplicações. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 772-776, 2002.

NIZOVOY, Paula *et al.* Unique genomic traits for cold adaptation in *Naganishia vishniacii*, a polyextremophile yeast isolated from Antarctica. **Yeast Research**, 2021.

NURFARAHIN, A.H. *et al.* Culture medium development for microbial-derived surfactant production-An overview. **Molecules**, v. 23, p. 1049, 2018.

OGAKI, Mayara B. *et al.* Fungi present in Antarctic deep-sea sediments assessed using DNA metabarcoding. **Microb. Ecol.** p. 1–8, 2021.

OGAKI, Mayara B. *et al.* Diversity and bioprospecting of cultivable fungal assemblages in sediments of lakes in the Antarctic Peninsula. **Fungal Biology**, [S.L.], v. 124, n. 6, p. 601-611, 2020a.

OGAKI, Mayara B. *et al.* Diversity and Ecology of Fungal Assemblages Present in Lakes of Antarctica. **Fungi Of Antarctica**, p. 69-97, 2019.

OGAKI, Mayara B. *et al.* Diversity, ecology, and bioprospecting of culturable fungi in lakes impacted by anthropogenic activities in Maritime Antarctica. **Extremophiles**, v. 24, n. 4, p. 637-655, 2020b.

OGÓREK, Rafał *et al.* Characteristics and taxonomy of *Cladosporium* fungi. *Mikologia lekarska*, v. 19, n. 2, p. 80-85, 2012.

ONOFRI, S. *et al.* Evolution and adaptation of fungi at boundaries of life. **Advances In Space Research**, v. 40, n. 11, p. 1657-1664, 2007.

OYELEKE, Solomon Bankole. *et al.* Production of protease and amylase from *Bacillus subtilis* and *Aspergillus niger* using *Parkia biglobosa* (Africa Locust Beans) as substrate in solid state fermentation, **Advances in Life Sciences**, v. 1, n. 2, p. 49–53, 2011.

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

PAPANIKOLAOU, S. *et al.* Single cell oil production by *Yarrowia lipolytica* growing on an industrial derivative of animal fat in batch cultures. **Applied. Microbiology Biotechnology**, v.58, p. 308-312, 2002.

PARK, Si Hyoung *et al.* Implications of agar and agarase in industrial applications of sustainable marine biomass. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, n. 7, p. 2815-2832, 2020.

PARVIZPOUR, Sepideh *et al.* Psychrophilic enzymes: structural adaptation, pharmaceutical and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 105, n. 3, p. 899-907, 2021.

PATHAN, Akbar Ali Khan *et al.* Diversity of Yeasts from Puddles in the Vicinity of Midre Lovénbreen Glacier, Arctic and Bioprospecting for Enzymes and Fatty Acids. **Current Microbiology**, p. 307-314, 2010.

PEKKARINEN, Anja. *et al.* Production of Proteases by *Fusarium* Species Grown on Barley Grains and in Media Containing Cereal Proteins. **Journal of Cereal Science**, v. 31, p. 253–261, 2000.

PERFUMO, Amedea *et al.* Going Green and Cold: biosurfactants from low-temperature environments to biotechnology applications. **Trends In Biotechnology**, v. 36, n. 3, p. 277–289, 2018.

POLIAKOVA, A.V. *et al.* Yeast biodiversity in hydromorphic soils with reference to grass-Sphagnum swamp in Western Siberia and the hammock tundra region (Barrow, Alaska). **Mikrobiologija**, p. 714-720, 2001.

POVEDA, Gabriela *et al.* Cold-active pectinolytic activity produced by filamentous fungi associated with Antarctic marine sponges. **Biological Research**, v. 51, n. 1, 2018.

PU, Shunchang; YAN, Shoubao. Fungal Diversity Profiles in Pit Mud Samples from Chinese Strong-Flavour Liquor Pit. **Foods**, v. 11, n. 22, p. 3544, 2022.

QUIJADA, Luis *et al.* Apothecial Ancestry, Evolution, and Re-Evolution in *Thelebolales* (Leotiomycetes, Fungi). **Biology**, v. 11, n. 4, p. 583, 2022.

RAO, Mala B. *et al.* Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. **Microbiology And Molecular Biology Reviews**, v. 62, n. 3, p. 597-635, 1998.

RAAIJMAKERS, J.M *et al.* Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: more than surfactants and antibiotics. *FEMS Microbiol Rev* 34:1037–1062, 2012.

REINOSO, Samira *et al.* Selection of Autochthonous Yeasts Isolated from the Intestinal Tracts of Cobia Fish (*Rachycentron canadum*) with Probiotic Potential. **Journal Of Fungi**, v. 9, n. 2, p. 274, 2023.

REIS, Cristiane Bianchi Loureiro dos *et al.* First report of the production of a potent biosurfactant with α,β -trehalose by *Fusarium fujikuroi* under optimized conditions of submerged fermentation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 49, p. 185-192, 2018.

ROSA, Luiz Henrique *et al.* DNA metabarcoding high-throughput sequencing uncovers cryptic fungal diversity in soils of protected and non-protected areas on Deception Island, Antarctica. **Sci Rep**, 2020.

ROSA, Luiz Henrique *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 *et al.* Fungal diversity in a sediment core from climate change impacted Boeckella Lake, Hope Bay, north-eastern Antarctic Peninsula assessed using metabarcoding. **Extremophiles**, v. 26, n. 2, 2022.

ROVATI, JI, *et al.* Polyphenolic substrates and dyes degradation by yeasts from 25 de Mayo/King George Island (Antarctica). **Yeast** v. 30, p.459–470, 2013.

RUFINO, R.D. *et al.* Enhancement of stability of biosurfactant produced by *Candida lipolytica* using industrial residue as substrate. **World J Microbiol Biotechnol** v. 23, p. 729–734, 2007.

RUFINO, R.D. *et al.* Experimental design for the production of tension-active agent by *Candida lipolytica*. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, v. 35, p. 907-914, 2008.

RUISI, S. *et al.* Fungi in Antarctica. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 6, n. 1-3, p. 127-141, 2007.

SABOTIC, Jerica; KOS Janko. Microbial and fungal protease inhibitors—current and potential applications. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 93, p. 1351–1375, 2012.

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

SANTIAGO, Iara F. *et al.* Leishmanicidal and antitumoral activities of endophytic fungi associated with the Antarctic angiosperms *Deschampsia antarctica* Desv. and *Colobanthus quitensis* (kunth) bartl. **Extremophiles** v. 16, p. 95–103, 2012.

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

SANTIAGO, Margarita *et al.* Discovery, Molecular Mechanisms, and Industrial Applications of Cold-Active Enzymes. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1-2, 9 set. 2016.

SANTOS, Danielle KF, *et al.* Biosurfactant production from *Candida lipolytica* in bioreactor and evaluation of its toxicity for application as a bioremediation agent. **Process BioChem** v. 54, p. 20–27, 2017.

SANTOS, Danyelle *et al.* Biosurfactants: multifunctional biomolecules of the 21st century. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 3, p. 401, 2016.

SANYAL, A. *et al.* Metabolic activity and bioweathering properties of yeasts isolated from different supraglacial environments of Antarctica and Himalaya. **Antonie van Leeuwenhoek** v. 113, p. 2243–2258, 2020.

SARUBBO, L.A. *et al.* Co-utilization of canola oil and glucose on the production of a surfactant by *Candida lipolytica*. **Curr. Microbiol.**, v. 54, p. 68-73, 2007.

SAYALI, Kulkarni *et al.* Microbial Esterases: An overview. **Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci**, Maharashtra, p. 135-146, 2013.

SCAMBOS, T. A. *et al.* Ultra-low surface temperatures in East Antarctica from satellite thermal infrared mapping: the coldest places on Earth. **Geophysical Research Letters**, p. 6124-6133, 2018.

SCHMIDT, Steven K *et al.* *Naganishia* in high places: functioning populations or dormant cells from the atmosphere. **Mycology**, p. 153-163, 2017.

SELBMANN, L. *et al.* Production and structural characterization of the exopolysaccharide of the Antarctic fungus *Phoma herbarum* CCFEE 5080. **Res Microbiol** v. 153, p. 585–592, 2002.

SELBMANN, Laura *et al.* Potential extinction of Antarctic endemic fungal species as a consequence of global warming. **Science of the Total Environment**, v. 438, p. 127-134, 2012.

SENA, Hellen Holanda *et al.* Production of Biosurfactants by Soil Fungi Isolated from the Amazon Forest. **International Journal of Microbiology**, v. 2018, p. 1-8, 2018.

SHARMA, Deepansh. *et al.* Isolation and functional characterization of novel biosurfactant produced by *Enterococcus faecium*. **Springerplus**, v. 4, n. 1, p. 1-14, 2015.

SHEARER, Carol A. *et al.* Fungal biodiversity in aquatic habitats. **Biodiversity And Conservation**, v. 16, n. 1, p. 49-67, 2007.

SHEKHAR, Sudhanshu *et al.* Biosurfactant Producing Microbes and their Potential Applications: a review. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 45, n. 14, p. 1522-1554, 2014.

SHESHAM, Vaishnavi *et al.* Comparison of two diphenyl polyenes as acid-sensitive additives during the biodegradation of a thermoset polyester polyurethane coating. **Journal Of Applied Microbiology**, v. 132, n. 1, p. 351-364, 2021.

SILVA, MET, *et al.* Biosurfactant production of *Piper hispidum* endophytic fungi. **J Appl Microbiol** v. 2022, p. 1–9, 2019.

SIMÕES, Felipe Lorenz *et al.* Fungus-invertebrate interactions in Antarctica. In: Fungi of Antarctica. **Springer, Cham**, p. 201-219, 2019.

SINGH, P. *et al.* Biosurfactant production: emerging trends and promising strategies. **Journal Of Applied Microbiology**, v. 126, n. 1, p. 2-13, 2018.

SINGH, R *et al.* Updates on inulinases: structural aspects and biotechnological applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, n. 164, p. 193-210, 2020.

SINGH, R.; SINGH, R.P. Inulinases. **Current Developments in Biotechnology and Bioengineering**, p. 423-446, 2017.

SKOWRONEK, Marcin *et al.* Invertase activity of psychrotrophic fungi. **Annales Universitatis Mariae Curie**, p. 1-2, 2003.

SOLANKI, Preeti *et al.* Microbial proteases: ubiquitous enzymes with innumerable uses. **3 Biotech**, v. 11, n. 428, 2021.

SONJAK, S *et al.* *Penicillium mycobiota* in Arctic subglacial ice. **Microbial Ecol** v. 52, p. 207–216, 2006.

SRIVASTAVA, Neha *et al.* Applications of fungal cellulases in biofuel production: advances and limitations. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 82, p. 2379-2386, 2018.

STCHIGEL, Alberto M. *et al.* *Antarctomyces psychrotrophicus* gen. et sp. nov., a new ascomycete from Antarctica. **Mycol. Res.**, v. 105, p. 377-382, 2001.

STRAT, Yoran Le *et al.* Marine fungal abilities to enzymatically degrade algal polysaccharides, proteins and lipids: a review. **Journal of Applied Phycology**, v. 34, n. 3, p. 1131-1162, 2022.

SUDEEP, K.C. *et al.* Production, Characterization, and Industrial Application of Pectinase Enzyme Isolated from Fungal Strains. **Fermentation**, v. 6, n. 2, p. 59, 2020.

SUGANO, Y *et al.* Purification and characterization of a new agarase from a marine bacterium, *Vibrio* sp. strain JT0107. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 5, p. 1549-1554, 1993.

SUKUMARAN, Rajeev K. *et al.* Addressing challenges in production of cellulases for biomass hydrolysis: Targeted interventions into the genetics of cellulase producing fungi. **Bioresource Technology**, v. 329, ISSN 0960-8524, 2021.

SUNDARRAM, Ajita; MURTHY, Thirupathihalli P. Krishna. α -amylase production and applications: a review. **Journal of Applied & Environmental Microbiology**, v. 2, n. 4, p. 166- 175, 2014.

THOMAS-HALL, S.R., *et al.* Cold-adapted yeasts from Antarctica and the Italian Alps—description of three novel species: *Mrakia robertii* sp. nov., *Mrakia blollopis* sp. nov. and *Mrakiella niccombsii* sp. nov.. **Extremophiles** v. 14, p. 47–59, 2010.

TOLEDO, Luis E. Trujillo *et al.* Fructosyltransferases and Invertases: Useful Enzymes in the Food and Feed Industries. **Academic Press**, p. 451-469, 2019.

TRONCOSO, Evelin *et al.* Identification and characterization of yeasts isolated from the South Shetland Islands and the Antarctic Peninsula. **Polar Biology**, v. 40, n. 3, p. 649-658, 2017.

TSUJI M, Yokota Y, *et al.* Comparative analysis of milk fat decomposition activity by *Mrakia* spp. isolated from Skarvsnes ice-free area, East Antarctica. **Cryobiology** v. 70, p. 293–296, 2015.

TSUJI, M. Genetic diversity of yeasts from East Ongul Island, East Antarctica and their extracellular enzymes secretion. **Polar Biology**, v. 41, n. 2, p. 249-258, 2018.

TSUJI, Masaharu *et al.* Cold adaptation of fungi obtained from soil and lake sediment in the Skarvsnes ice-free area, Antarctica. **Fems Microbiology Letters**, p. 121-130, 2013.

TSUJI, Masaharu *et al.* Ethanol productivity of cryophilic basidiomycetous yeast *Mrakia* spp. correlates with ethanol tolerance. **Mycoscience**, v. 57, n. 1, p. 42-50, 2016.

TURKIEWICZ, Marianna *et al.* Invertase and α -glucosidase production by the endemic Antarctic marine yeast *Leucosporidium antarcticum*. **Polish polar research**, p. 125-136, 2005.

TURKIEWICZ, Marianna *et al.* A cold-adapted extracellular serine proteinase of the yeast *Leucosporidium antarcticum*. **Extremophiles** v. 7, p. 435–442, 2003.

UZUNER, S. Enzymes in the beverage industry. In: KUDDUS, M. **Enzymes in food biotechnology. Production, applications, and future prospects**. Londres: Elsevier. p. 29-43, 2019.

VACA, I. *et al.* Cultivable psychrotolerant yeasts associated with Antarctic marine sponges. **World J Microbiol Biotechnol** v. 29, p. 183–189, 2013.

VAN BRUMMELEN, J. *Ramgea*, a new genus of Pezizales from the Netherlands. **Persoonia** v. 14, p.577–582, 1992.

VAN HAMME, JD *et al.* Physiological aspects Part 1 in a series of papers devoted to surfactants in microbiology and biotechnology. **Biotechnol Adv**, v. 24, p. 604–620, 2006.

VASILEVA-TONKOVA, Evgenia, *et al.* Ecophysiological properties of cultivable heterotrophic bacteria and yeasts dominating in phytocenoses of Galindez Island, maritime Antarctica. **World J Microbiol Biotechnol**, v. 30, p. 1387–1398, 2014.

VAZ, Aline B. M *et al.* The diversity, extracellular enzymatic activities and photoprotective compounds of yeasts isolated in Antarctica. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, n. 3, p. 937-947, 2011.

VEANA, Fabiola. Invertase: An Enzyme with Importance in Confectionery Food Industry. In: KUDDUS, Mohammed. **Enzymes in Food Technology (Improvements and Innovations)**. Springer Nature Singapore, p. 1-26, 2018.

VELIOGLU, Zulfiye; UREK, Raziye Ozturk. Optimization of cultural conditions for biosurfactant production by *Pleurotus djamor* in solid state fermentation. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 120, n. 5, p. 526-531, 2015.

VILLANUEVA, Pablo *et al.* Description of the First Four Species of the Genus *Pseudogymnoascus* from Antarctica. **Frontiers In Microbiology**, v. 12, p. 1-2, 2021.

VILLARREAL, P. *et al.* Antarctic yeasts: analysis of their freeze-thaw tolerance and production of antifreeze proteins, fatty acids and ergosterol. **BMC Microbiol** v. 18, n. 66, 2018.

VINCENT, Warwick F. Evolutionary origins of Antarctic microbiota: invasion, selection and endemism. **Antarctic Science**, v. 12, n. 3, p. 374-385, 2000.

VISHNIAC, HS. A multivariate analysis of soil yeasts isolated from a latitudinal gradient. **Microb Ecol** v. 52, p. 90–103, 2006.

WAKAMATSU, Yoko *et al.* Mannosylerythritol lipid induces characteristics of neuronal differentiation in PC12 cells through an ERK-related signal cascade. **Eur J Biochem**, v. 268, p. 374–83, 2001.

WHITE, Thomas J. *et al.* Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. **Pcr Protocols: A Guide to Methods and Applications**, p. 315-322, 1990.

WILLUMSEN, Pia A.; KARLSON, Ulrich. Screening of bacteria, isolated from PAH-contaminated soils, for production of biosurfactants and bioemulsifiers. **Biodegradation**, v. 7, p. 415-423, 1996.

YAO, Guangshan *et al.* Production of a high-efficiency cellulase complex via β -glucosidase engineering in *Penicillium oxalicum*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 9, n.78, 2016.

YARZÁBAL, Luis Andrés. Antarctic Psychrophilic Microorganisms and Biotechnology: history, current trends, applications, and challenges. **Microbial Models: From Environmental to Industrial Sustainability**, p. 83-118, 2016.

YUSOF, Nur Athirah *et al.* Cold Adaptation Strategies and the Potential of Psychrophilic Enzymes from the Antarctic Yeast, *Glaciozyma antarctica* PI12. **Journal Of Fungi**, v. 7, n. 7, p. 528, 2021.