
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGIA CELULAR, MOLECULAR E MICROBIOLOGIA)**

***PSEUDOGYMNOASCUS* DA ANTÁRTICA: TAXONOMIA E
PROSPECÇÃO DE ENZIMAS QUERATINOLÍTICAS**

MORGANA FERREIRA TURUNDAY

**Rio Claro - SP
2022**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGIA CELULAR, MOLECULAR E MICROBIOLOGIA)**

***PSEUDOGYMNOASCUS* DA ANTÁRTICA: TAXONOMIA E
PROSPECÇÃO DE ENZIMAS QUERATINOLÍTICAS**

MORGANA FERREIRA TURUNDAY

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do
Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista,
como parte dos requisitos para obtenção do título de
Mestre em Ciências Biológicas (Biologia Celular,
Molecular e Microbiologia).

Orientadora: Profa. Dra. Lara Durães Sette

Rio Claro - SP

2022

T962p Turunday, Morgana Ferreira
Pseudogymnoascus da Antártica: taxonomia e prospecção de
enzimas queratinolíticas / Morgana Ferreira Turunday. -- Rio Claro,
2022
53 f. : tabs., fotos, mapas

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Instituto de Biociências, Rio Claro
Orientadora: Lara Durães Sette

1. Microbiologia. 2. Ambientes extremos. 3. Biologia molecular. I.
Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de
Biociências, Rio Claro. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: PSEUDOGYMNOSCUS: TAXONOMIA E PROSPECÇÃO DE ENZIMAS QUERATINOLÍTICAS

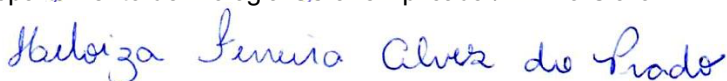
AUTORA: MORGANA FERREIRA TURUNDAY

ORIENTADORA: LARA DURÃES SETTE

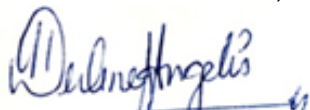
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA CELULAR, MOLECULAR E MICROBIOLOGIA), área: Estrutura, Função e produção de Biomoléculas pela Comissão Examinadora:



Profa. Dra. LARA DURÃES SETTE (Participação Virtual)
Departamento de Biologia Geral e Aplicada / IB Rio Claro



Profa. Dra. HELOIZA FERREIRA ALVES DO PRADO (Participação Virtual)
Departamento de Fitotecnia, Tecnologia de Alimentos e Sócio Economia / UNESP/Câmpus de Ilha Solteira



Profa. Dra. DERLENE ATTILI DE ANGELIS (Participação Virtual)
Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas / Universidade Estadual de Campinas - SP

Rio Claro, 04 de março de 2022

Título alterado para: "Pseudogymnoscus da Antártica: taxonomia e prospecção de enzimas queratinolíticas"

Estendemos as teias e desejamos que o outro faça parte delas, não para devorá-lo, mas para que sinta a perplexidade e faça a pergunta.

Hilda Hilst

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

Agradeço ao Lucas Mangili Esteves, meu companheiro, que nas horas mais sombrias se fez presente para me mostrar que ainda havia uma chance de encontrar a luz.

Á Caroline Jonas, Charles Freire e Thais Tiemi por tornarem a experiência do mestrado mais leve, pela amizade que construímos, por todo o apoio, por me compreenderem quando estive ausente e mesmo assim estarem lá por mim quando eu precisava e principalmente por não me deixarem desistir.

Aos meus amigos, parceiros de laboratório e presentes que Rio Claro me deu, Rodolfo Bizarria, Tatiane Pietrobon e Enzo Sorrentino por todos os momentos que passamos dentro e fora da Universidade, pelas conversas, auxílio nos experimentos e por serem minha calma e alegria sem ao menos saberem.

Á Família Mangili Esteves por toda a rede de apoio e pelo amor que eu nem sabia que merecia.

Á minha dinda Isabel Garcia por todas as ligações, auxílio psicológico e amor.

Ao meu pai, Enrique Turunday pelo carinho, amor e por nunca desistir de mim.

Á Profa. Dra. Lara Durães Sette pela orientação, profissionalismo e todo o suporte que me proporcionou.

Á minha amiga e colega Elisa Pelizzer por toda a paciência e empatia, por me auxiliar e me ensinar magnificamente no âmbito profissional além de me estender a mão em um dos momentos que mais precisei.

Á Vanessa Galvão pela nossa amizade, por todo o apoio de sempre, por tentar me ajudar de diversas formas, pelo incentivo contínuo e por enaltecer meu trabalho.

Á Dra. Lucélia Cabral por todo o ensinamento e auxílio durante os experimentos.

Á Dra. Daniela Lisboa pela parceria, paciência e por toda a ajuda com as análises de dados.

Á todos os meus amigos que torceram mesmo longe por mim durante esta longa e árdua jornada.

Á Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, câmpus de Rio Claro e ao Departamento de Bioquímica e Microbiologia pela infraestrutura oferecida.

Ao Laboratório de Micologia Ambiental e Industrial (LAMAI) e ao Laboratório de Ecologia e Sistemática de Fungos (LESF) pela infraestrutura fornecida para a realização deste trabalho.

Ao processo nº 2018/12098-9, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq pelo auxílio no projeto de pesquisa ao qual este trabalho faz parte.

RESUMO

A Antártica é considerada o continente dos extremos devido as suas condições climáticas. No entanto alguns micro-organismos desenvolveram adaptações que os permitem colonizar este habitat, como é o caso dos fungos dos gêneros *Geomyces* e *Pseudogymnoascus*. Representantes desses gêneros são capazes de secretar uma grande variedade de enzimas, incluindo as queratinases que são proteases capazes de degradar a queratina. No presente trabalho foram examinados 86 fungos filamentosos do acervo de pesquisa da Central de Recursos Microbianos da UNESP (CRM-UNESP) obtidos a partir de diferentes amostras coletadas na Baía do Almirantado, Ilha Rei George (Antártica) e previamente identificados como pertencentes a esses dois gêneros, com o objetivo de autenticar a caracterização taxonômica dos mesmos e investigar a capacidade de produção de enzimas queratinolíticas. Os fungos foram submetidos à checagem de purificação através de culturas monospóricas, análises macromorfológicas baseadas na observação da área da placa de Petri e análises filogenéticas, as quais foram realizadas com o marcador ITS e MCM7 através de Inferência Bayesiana no *software* MrBayes v. 3.1.1. Um representante de cada um dos 9 morfotipos foi submetido as análises enzimáticas. Para a análise enzimática qualitativa os isolados foram cultivados por 15 dias a 15 °C em placas de Petri contendo meio mínimo sólido com adição de penas de frango como fonte de nutrientes. Todos os isolados apresentaram crescimento em meio sólido com penas de frango e foram submetidos a quantificação da atividade enzimática. Para tanto, os fungos foram cultivados em meio caldo de pena por 7 dias a 15°C e 120 rpm. Os 9 isolados apresentaram atividade de queratinase com destaque para o fungo LAMAI 539 e LAMAI 1777 que produziram 4,11 U ml⁻¹ e 2,8 U ml⁻¹ da enzima, respectivamente. As análises filogenéticas revelaram que todos os isolados são pertencentes ao gênero *Pseudogymnoascus*, sendo possível chegar no nível de espécie (*Pseudogymnoascus sinensis*, *P. roseus* e *P. verrucosus*) com um valor de probabilidade significativo para 27 dos 52 isolados analisados. Os dados de filogenia demonstraram que os morfotipos não necessariamente agruparam em clados diferentes. Em relação a distribuição do gênero, os resultados revelaram que estes são capazes de colonizar substratos distintos além de regiões geográficas diferentes e distantes. Além disso, diferentes espécies podem ser encontradas em um mesmo substrato de um mesmo local.

Palavras-chave: Ambientes extremos. Enzimas queratinolíticas. Queratinase. Autenticação taxonômica. Filogenia.

ABSTRACT

Antarctica is considered the continent of extremes due to its climatic conditions. However, some microorganisms have developed adaptations that allow them to colonize this habitat, such as the fungi of the genera *Geomyces* and *Pseudogymnoascus*. Representatives of these genera are capable of secreting a wide variety of enzymes, including keratinases, which are proteases capable of degrading keratin. In this work, 86 filamentous fungi from the research collection of the UNESP Microbial Resources Center (CRM-UNESP) obtained from different samples collected in Admiralty Bay, King George Island (Antarctica) and previously identified as belonging to these two genera were examined. The aim of this work was to authenticate the taxonomic characterization of these genera and investigate the production of keratinolytic enzymes. For that, these fungi were submitted to a purification check through monosporic cultures, macromorphological analysis based on the observation of the Petri dish area, and phylogenetic analysis, which were performed with the ITS and MCM7 marker through Bayesian Inference in *software* MrBayes v. 3.1.1. One representative of each 9 morphotypes was submitted to enzymatic analysis. For qualitative enzymatic analysis, the isolates were cultured for 15 days at 15 °C in Petri dishes containing minimal solid medium with the addition of chicken feathers as a source of nutrients. All isolates showed growth on solid medium with chicken feathers and were submitted to quantification of enzymatic activity. For this, the fungi were cultivated in feather broth medium for 7 days at 15°C and 120 rpm. The 9 isolates showed keratinase activity, especially the fungus LAMAI 539 and LAMAI 1777, which produced 4.11 U ml⁻¹ and 2.8 U ml⁻¹ of the enzyme, respectively. Phylogenetic analyzes revealed that all isolates belong to the genus *Pseudogymnoascus*, and it was possible to reach the species level with a significant probability value (*Pseudogymnoascus sinensis*, *P. roseus* and *P. verrucosus*) for 27 of the 52 isolates analyzed. The phylogeny data showed that the morphotypes did not necessarily group into different clades. Regarding the distribution of this genus, our study showed that they are able to colonize very different substrates in addition to different and distant geographic regions. Besides, different species can be found in the same substrate in the same place.

Keywords: Extremophilic environments. Keratinolytic enzymes. Keratinase. Taxonomic authentication. Phylogeny.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Ascósporos esféricos de <i>Pseudogymnoascus appendiculatus</i>	16
Figura 2- Conidióforos ramificados com conídios piriformes de <i>Geomyces</i> sp.....	16
Figura 3- Conídio assimétrico de <i>Pseudogymnoascus destructans</i>	17
Figura 4 - <i>Pseudogymnoascus destructans</i> colonizando focinho e asas de morcegos.....	17
Figura 5 – Local de coleta das amostras na Baía do Almirantado, Ilha Rei George, Antártica.....	23
Figura 6 – Coleção de trabalho mantida a em meio MA2% a 15 °C.....	24
Figura 7– Limpeza manual das penas cedidas pela Empresa Fricock.....	27
Figura 8– Imersão das penas em solução com clorofórmio e metanol.....	28
Figura 9 – Morfotipos encontrados neste trabalho. A. Morfotipo 1; B. Morfotipo 2; C. Morfotipo 3; D. Morfotipo 9; E. Morfotipo 5. F. Morfotipo 6; G. Morfotipo 7; H. Morfotipo 8; I. Morfotipo 4.	35
Figura 10 - Posição filogenética dos isolados baseada no marcador ITS.....	36
Figura 11- Posição filogenética dos isolados baseada nos marcadores ITS e MCM7.....	38
Figura 12– Crescimento dos morfotipos em meio sólido com farinha de penas. A. Morfotipo 1; B. Morfotipo 2; C. Morfotipo 3; D. Morfotipo 4; E. Morfotipo 5. F. Morfotipo 6; G. Morfotipo 7; H. Morfotipo 8; I. Morfotipo 9.....	41
Figura 13 – Valores de atividade enzimática dos isolados representantes de morfotipos distintos a 15 e a 37 °C após cultivo em meio farinha de penas por 7 dias a 15°C e 120 rpm.....	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Isolados analisados e seus respectivos dados de viabilidade, coleta e identificação após análises filogenéticas.	30
---	----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	11
	2.1. O ambiente Antártico	11
	2.2. Microrganismos no ambiente Antártico	12
	2.3. Geomyces e Pseudogymnoascus	14
	2.4. Queratinas e queratinases	18
	2.5. Aplicações das queratinases	20
3	OBJETIVOS.....	22
	3.1. Objetivo geral.....	22
	3.2. Objetivos específicos.....	22
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
	4.1. Origem e reativação dos isolados.....	23
	4.2. Purificação e manutenção dos isolados.....	24
	4.3. Análise macromorfológica	24
	4.4. Análise molecular: extração de DNA, amplificação e sequenciamento.....	25
	4.5. Análises filogenéticas.....	26
	4.6. Avaliação da produção de queratinases.....	27
	4.6.1. Farinha de penas	27
	4.6.2. Avaliação qualitativa da produção de queratinase.....	28
	4.6.3. Determinação da atividade enzimática	29
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
	5.1. Análise macromorfológica	30
	5.2. Análises filogenéticas.....	35
	5.3. Distribuição e ecologia.....	39
	5.4. Produção de queratinase: análise qualitativa e quantitativa	41
6	CONCLUSÃO	45
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46

1 INTRODUÇÃO

Durante anos, estudiosos acreditaram na inexistência de vida microbiana na Antártica. Baixas temperaturas, altos níveis de radiação ultravioleta, solos pobres em nutrientes, ventos fortes, alta salinidade e clima seco, são alguns dos fatores que colocam a Antártica como um dos locais mais extremos do mundo (ARENZ; BLANCHETTE, 2011; CONVEY, 2011; DUARTE et al., 2018a; GOMES et al., 2018; WENTZEL et al., 2019). Por outro lado, o ecossistema Antártico abriga uma diversidade de ambientes, desde desertos polares, até áreas recobertas por briófitas e angiospermas (CONVEY et al., 2014). Por serem ambientes extremos não são todos os organismos que conseguem colonizá-los, no entanto, vários microrganismos adaptaram-se a essas condições adversas e adquiriram características que os permitiram sobreviver e colonizar estes ambientes (DE MAAYER et al., 2014; MARGESIN; FELLER, 2010). Uma riqueza de espécies de fungos foi reportada na Antártica a medida que as pesquisas foram avançando, com destaque para os gêneros *Geomyces* e *Pseudogymnoascus*, os quais foram isolados a partir de diversas amostras, incluindo sedimentos terrestres e marinhos, e em associação com outros organismos (ARENZ; BLANCHETTE, 2011; DEL FRATE; CARETTA, 1990; DUARTE et al., 2018a; GILICHINSKY et al., 2005; GOMES et al., 2018; KOCHKINA et al., 2012; POVEDA et al., 2018; RUISI et al., 2007; VIEIRA et al., 2018; VISHNIAC, 1996; WENTZEL et al., 2019).

Estudos prévios realizados pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Micologia Ambiental e Industrial (LAMAI) do Departamento de Biologia Geral e Aplicada (UNESP, Câmpus de Rio Claro), resultaram em uma coleção de cerca de 2.500 isolados de fungos filamentosos e leveduriformes da Antártica, a qual está associada à Central de Recursos Microbianos da UNESP (CRM-UNESP) (BARATO, 2014; INFORSATO, 2017; WENTZEL, 2017).

Os gêneros *Geomyces* e *Pseudogymnoascus* são caracterizados como psicrófilos e no geral, existem poucos estudos sobre esses dois gêneros, a maioria dos trabalhos está concentrada em *Pseudogymnoascus pannorum*, devido à importância clínica, e em *Pseudogymnoascus destructans*, que ocasiona uma doença fatal em morcegos (*White Nose Syndrome*) (VILLANUEVA et al., 2021).

No âmbito taxonômico, a história desses dois gêneros é bastante complexa. Apesar de diversos estudos relatarem a presença desses microrganismos no ambiente Antártico, há muitas lacunas a serem preenchidas, o que torna necessário a realização de estudos mais críticos em

relação à diversidade destes gêneros, principalmente *Pseudogymnoascus*, por terem maior ocorrência no ambiente Antártico do que *Geomyces* (LUESCHOW et al., 2019; MARTORELL et al., 2018; NEWSHAM et al., 2021; VARRELLA et al., 2021).

No que se refere à prospecção de enzimas, estudos com microrganismos que apresentam adaptações a baixas temperaturas vem aumentando, o que tornou possível o conhecimento da produção de queratinases por fungos dos gêneros *Geomyces* e *Pseudogymnoascus*. No entanto, ainda não foi possível atingir a esfera comercial (FRIEDRICH et al., 1999; GUPTA; RAMNANI, 2006; VIDMAR; VODOVNIK, 2018).

A queratina é uma proteína insolúvel e de difícil hidrólise, encontrada compondo estruturas especializadas, tais como: cabelo, penas, cerdas, cascos de animais, unhas, entre outras. Esta proteína é um dos principais resíduos da indústria de carne e aves, que por sua vez, são setores em posição de destaque no cenário nacional, os quais vêm aumentando substancialmente devido ao crescimento populacional (BOHACZ et al., 2020; DUFFECK, 2020; PRECZESKI et al., 2020). Junto a isso, o aumento dos resíduos é proporcional fazendo-se necessário a degradação dos mesmos. Entretanto, no cenário atual, esses compostos são degradados a partir de processos químicos ou físico-químicos, que demandam um alto grau de energia, além de muitas vezes, acabarem degradando aminoácidos essenciais, impedindo que estes subprodutos possam ser utilizados em outros setores industriais, como o de fabricação de rações animais (GONG et al., 2020). Uma alternativa biotecnológica promissora para a degradação destes resíduos é a aplicação de enzimas queratinolíticas, pois além de ser mais viável economicamente, também é considerada uma opção ecológica e mais segura, evitando o uso de reagentes químicos e geração de gases nocivos a saúde (GONG et al., 2020; GUPTA; RAMNANI, 2006).

Dada a relevância dos microrganismos dos gêneros *Geomyces* e *Pseudogymnoascus* em diversas áreas de importância socioeconômica, o presente trabalho busca responder as seguintes perguntas: Os isolados de *Geomyces* e *Pseudogymnoascus* preservados no acervo de pesquisa da CRM-UNESP estão identificados corretamente? Os isolados aqui estudados possuem atividade queratinolítica com potencial biotecnológico?

Os resultados do presente projeto poderão auxiliar em futuros trabalhos sobre a taxonomia desses dois gêneros de microrganismos adaptados a baixas temperaturas, proporcionar possíveis indicações de novas espécies, bem como servir de base para estudos futuros de otimização, caracterização e aplicação de enzimas queratinolíticas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. O ambiente Antártico

A Antártica é a terra dos extremos. Considerada um dos menores continentes do mundo localizada na região polar austral e com características climáticas que a difere substancialmente de outros lugares do planeta. O continente Antártico é um dos últimos locais selvagens restantes na terra e está subdividido em três sub-regiões: Antártica continental, marítima e zona subantártica (DÍAZ et al., 2019; RUISI et al., 2007). A primeira apresenta condições mais extremas, quando comparada com as demais. Foi na Antártica continental, onde a Estação Vostok está localizada, que se registrou a menor temperatura já observada no planeta, -89,2 °C. Apesar desta sub-região apresentar condições desfavoráveis a vida, não é um ambiente totalmente inóspito e é colonizado por musgos, algas e líquens. Na zona marítima encontra-se as ilhas Shetlands do Sul, um grupo de aproximadamente mais de 20 ilhas e onde está localizada a Ilha do Rei George com aproximadamente 1.250 km². Nesta zona as condições são mais amenas, o que possibilita a presença de plantas superiores como *Deschampsia antarctica* e *Colobanthus quitensis*. A zona subantártica inclui também algumas ilhas, e, em comparação com as demais sub-regiões, apresenta temperaturas mais elevadas (BÖLTER et al., 2002; MENEZES et al., 2021; TURNER et al., 2009).

Durante a maior parte do ano, o continente Antártico permanece recoberto por uma camada de gelo. No entanto, existem áreas como “Os Vales Secos de McMurdo”, localizados na Terra de Vitória, que fogem desse padrão, sendo uma das poucas áreas livres de gelo no ambiente Antártico. Locais diferenciados como esse, ainda foram pouco explorados, sabendo-se pouco em relação as espécies ali presentes (ARENZ; BLANCHETTE, 2011; CONVEY, 2010).

O ambiente Antártico por ser um local extremo se diferencia em diversos aspectos quando comparado a outros territórios (RUISI et al., 2007). As condições ambientais como, alta incidência de radiação ultravioleta, alto nível de salinidade, pouca disponibilidade de nutrientes, ciclos constantes de congelamento e descongelamento, baixa disponibilidade de água, ventos fortes e variações de pH colaboram para a singularidade desse habitat e a limitação no desenvolvimento de várias formas de vida (ARENZ; BLANCHETTE, 2011; GOSTINCAR, 2010; RUISI et al., 2007). Desse modo, é baixa a diversidade tanto da fauna, quanto da flora. A fauna do continente Antártico se limita ao ambiente terrestre a alguns vertebrados como os pássaros do gênero *Chionis*, passeriformes insetívoros e patos presentes nas ilhas Sul da

Geórgia e Kerguelen. Não existem mamíferos, répteis ou anfíbios nativos, e o ambiente terrestre sofre forte influência do meio marinho que, ao contrário do primeiro, abriga vários vertebrados como; pinguins, baleias, peixes, aves marinhas e focas (CONVEY, 2017; VARELLA et al., 2021).

Habitats como a Antártica são difíceis de manter uma comunidade diversa de organismos (ARENZ; BLANCHETTE, 2011). Por outro lado, fatores climáticos já mencionados aqui, acrescidos do isolamento geográfico, baixo impacto humano e competição tornam este ambiente único e propício para o desenvolvimento de novas espécies, visto que as que ali habitam apresentam mecanismos e adaptações diferenciadas para suportarem tais condições. A busca pelo entendimento dessas adaptações tem direcionado cada vez mais pesquisas nessa região, nos permitindo compreender melhor sobre a evolução dos mecanismos de resistência a baixas temperaturas (ARENZ; BLANCHETTE, 2011; VARELLA et al., 2021).

2.2. Microrganismos no ambiente Antártico

Anteriormente acreditava-se que ambientes como a Antártica eram inabitados, mesmo por microrganismos. Entretanto, uma grande variedade destes indivíduos vem sendo descritas todos os anos, com o avanço das técnicas moleculares este número tem aumentado cada vez mais, demonstrando outro cenário, bem diferente daquele que se imaginava (GOSTINCAR et al., 2010; HOGG et al., 2006; RUISI et al., 2007; SANTOS et al., 2020; VARELLA et al., 2021; ZUCCONI et al., 2020). Quando pesquisas revelaram indícios de vida microbiana nesse habitat, estudos partiram em busca de bactérias, arqueias e microalgas, acreditando não ser possível o desenvolvimento de fungos nesse local (RUISI et al., 2007). Atualmente, sabemos que a diversidade microbiana permanente desse local compreende bactérias, protistas e fungos, sendo este último o grupo mais diverso no ambiente antártico (CONG et al., 2020; HOGG et al., 2006; MENEZES et al., 2021; VARELLA et al., 2021). Os fungos desempenham um papel fundamental neste habitat, principalmente para o funcionamento dos ciclos biogeoquímicos e da teia alimentar marinha, e isso se deve ao sucesso reprodutivo e sobrevivência desses microrganismos que por sua vez ocorre graças às adaptações fisiológicas às baixas temperaturas (URBINA et al., 2021; VARELLA et al., 2020).

Aumento de componentes intracelulares, como a trealose (açúcar envolvido na prevenção da formação de cristais de gelo) ajudam na resistência do microrganismo ao frio. Também são adaptações que contribuíram para o sucesso dos microrganismos no ambiente

Antártico o aumento de poliois, produção de melanina, estabilidade e fluidez da membrana plasmática, enzimas adaptadas a baixas temperaturas e maiores concentrações de lipídios insaturados na membrana, (BARATO, 2014; D'ELIA et al., 2009; DUARTE et al., 2018b; WENTZEL et al., 2019)

Os fungos ganham destaque entre os microrganismos adaptados à baixas temperaturas por terem desenvolvido uma extraordinária resistência a todas as características peculiares deste habitat, sendo frequentemente encontrados nos mais diversos locais, desde áreas com clima mais brando até os mais extremos. Estes microrganismos, já foram descritos em amostras de neve, solo, rochas, plantas e animais (MENEZES et al., 2021; SHI et al., 2021).

Organismos que vivem nessas condições de temperatura podem ser considerados psicrófilos ou psicrotolerantes. Os dois grupos sobrevivem a temperaturas abaixo de 0 °C, mas o primeiro tem sua faixa de temperatura ótima de crescimento em até 15 °C. Já os psicrotolerantes apresentam temperaturas ótimas de crescimento que variam de 25 °C a 30 °C, sendo amplamente distribuídos na natureza (PESCIAROLI et al., 2012; SUYAL et al., 2021). No caso dos fungos psicrófilos e psicrotolerantes, esses ocorrem na Antártica, seja na porção terrestre, marinha ou associados a outros organismos, como invertebrados e plantas (DUARTE et al., 2018a; UPSON, 2009; WENTZEL et al., 2019). É possível que esses fungos desempenhem um papel importante na ciclagem de nutrientes e mineralização da matéria orgânica nesses ecossistemas (MARTORELL et al., 2019).

A maior parte dos fungos reportados na Antártica pertence ao filo Ascomycota (ARENZ; BLANCHETTE, 2011; DING et al., 2016; DUARTE et al., 2018; GONÇALVES et al., 2012; HENRÍQUEZ et al., 2014; LOQUE et al., 2010; MENEZES et al., 2021; ROSA et al., 2010; SHI et al., 2021; WENTZEL et al., 2019). Entretanto, outros filos também já foram reportados, como Chytridiomycota, Mucoromycota e Basidiomycota (DURÁN et al., 2019; GOMES et al., 2018; JOHNSON et al., 2013; ROSA et al., 2010; RUISI et al., 2007). Essa diversidade se deve a capacidade dos fungos de suportarem condições extremas, algo que muitos eucariotos não conseguem (RUISI et al., 2007; GOSTINCAR et al., 2010). Embora fungos filamentosos ganharam destaque, ainda faltam estudos sobre a abundância de alguns desses grupos na Antártica (STERFLINGER; TESSEI; ZAKHAROVA, 2012). Os mais frequentemente encontrados são: *Cadophora*, *Cladosporium*, *Geomyces*, *Mortierella*, *Penicillium* e *Pseudogymnoascus*. O último gênero e *Geomyces* foram isolados em maior abundância em diferentes amostras da Antártica, o que sugere que esses fungos provavelmente

apresentam diferentes mecanismos para suportar ambientes extremos (ARENZ e BLANCHETTE, 2011; DEL FRATE; GILICHINSKY et al., 2005; GOMES et al., 2018; KOCHKINA et al., 2012; POVEDA et al., 2018; RUISI et al., 2007; SANTOS et al., 2020; VIEIRA et al., 2018; VISHNIAC, 1995; WENTZEL et al., 2019).

2.3. *Geomyces* e *Pseudogymnoascus*

Ambos os gêneros são fungos filamentosos pertencentes ao filo Ascomycota, considerados saprotróficos e frequentemente encontrados em solos, sedimentos marinhos, algas, invertebrados, angiospermas, insetos, mamíferos entre outros (DUARTE et al., 2018; HUEBSCHMAN et al., 2019; URBINA et al., 2021; VERANT et al., 2017; WENTZEL et al., 2019). São caracterizados como psicrotolerantes (*Geomyces*) e psicrófilos (*Pseudogymnoascus*) no entanto, no caso dos *Pseudogymnoascus*, estudos mais recentes observaram que nem todas as espécies desse gênero apresentam essa característica (SHI et al., 2021). Raramente foram observados em ambientes subtropical e tropical (LUESCHOW et al., 2019; VERANT et al., 2017).

Representantes desses gêneros vêm sofrendo desde sua descoberta inúmeras alterações na sua classificação. Inicialmente eram membros da família Myxotrichaceae e após análises de Minnis e Lindner (2013), as quais corroboraram a estreita relação entre os dois gêneros, ambos foram alocados na família Pseudeurotiaceae. Estudos recentes apontam a possibilidade da família Thelebolaceae e Pseudeurotiaceae serem sinônimos, mas até o momento permanecem distintas (EKANAYAKA et al., 2019; ZHANG et al., 2020). A classificação quanto à ordem era incerta, mas atualmente fazem parte da ordem Thelebolales e classe Leotiomyces (MINNIS; LINDNER, 2013; ROYAL BOTANIC GARDENS KEW, 2019; ZHANG et al., 2020). É importante destacar que a família Thelebolaceae tem grande relevância na ordem Thelebolales por compreender várias espécies capazes de produzir proteínas anticongelantes, proteínas de ligação ao gelo e alguns metabólitos secundários com alto potencial para a exploração biotecnológica.

Anteriormente a classe Leotiomyces era caracterizada por compreender microrganismos que possuíam ascomas em forma de apotécio, mas conforme os avanços das técnicas moleculares, atualmente sabe-se que as estruturas reprodutivas dos fungos compreendidos nesta classe podem ser muito mais diversificadas (JOHNSTON et al., 2019).

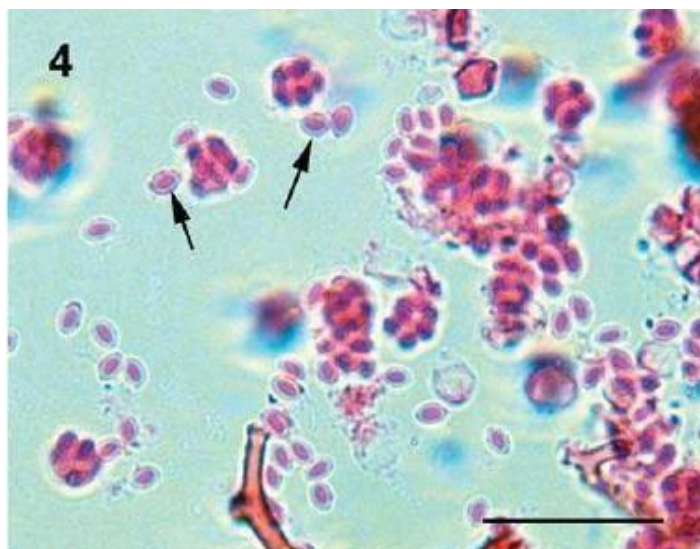
Fungos situados nesta classe são ecologicamente diversos visto que essa é uma das classes mais amplas do subfilo Pezizomycotina, que por sua vez, é um dos grupos mais diversificados dentro do filo Ascomycota. Os microrganismos compreendidos nesta classificação, distribuem-se nos mais variados habitats com temperaturas baixas e predominam em ambientes extremos, como o da Antártica. Corroborando com este estudo que demonstra a grande diversidade ecológica dos gêneros *Geomyces* e *Pseudogymnoascus* (HAYES, 2012). Até o presente momento, a classe Leotiomycetes compreende 19 ordens e 54 famílias (JOHNSTON et al., 2019; ZHANG et al., 2020).

Além da problemática em relação a família, a história taxonômica destes grupos é complexa e ocorreu de forma vagarosa, até o final do século XX apenas quatro espécies eram conhecidas. Espécies descritas hoje como *Pseudogymnoascus destructans* e *Pseudogymnoascus pannorum*, também pertenceram ao gênero *Geomyces*. No entanto, mesmo sendo filogeneticamente próximos, análises genéticas baseadas na espécie tipo de *Geomyces* (*Geomyces auratus*) revelaram que ainda existem espécies de *Geomyces* que não se agrupam com *Pseudogymnoascus*, portanto, são grupos distintos e não podem ser considerados congêneros. Essas questões tornaram difícil a compreensão desses grupos de fungos, sendo necessária a realização de mais estudos acerca das relações de parentesco dos mesmos (MINNIS; LINDNER, 2013).

Pseudogymnoascus é um gênero diverso, com vinte e três espécies descritas. *Pseudogymnoascus alpinus*, *P. antarcticus*, *P. australis*, *P. appendiculatus*, *P. bhattii*, *P. carnis*, *P. catenatus*, *P. caucasicus*, *P. destructans*, *P. fujianensis*, *P. griseus*, *P. guizhouensis*, *P. lanuginosus*, *P. lindneri*, *P. palmeri*, *P. pannorum*, *P. roseus*, *P. shaanxiensis*, *P. sinensis*, *P. turneri* e *P. verrucosus*, *P. yunnanensis* e *P. zhejiangensis* (CROUS et al., 2019; CROUS et al., 2020; MINNIS; LINDNER, 2013; RICE; CURRAH, 2006; SAMSON, 1972; VILLANUEVA et al., 2021; ZHANG et al., 2020; ZHANG et al., 2021). A espécie tipo do gênero é *P. roseus*, e possivelmente várias outras espécies aguardam a descrição (MINNIS; LINDNER, 2013).

Alguns membros desse gênero são caracterizados como psicrófilos com máxima temperatura de crescimento a 20 °C e ótima de 15 °C. Possuem aspecto filamentoso e hifa hialina. Podem apresentar tanto a fase sexuada, quanto a assexuada. A primeira é caracterizada pela presença de ascósporos fusiformes a esféricos (Figura 1), de coloração inicialmente branca e, conforme o tempo de cultivo, a coloração varia de espécie para espécie.

Figura 1- Ascósporos esféricos de *Pseudogymnoascus appendiculatus*. Fonte: Rice e Currah (2006)



A fase assexuada é representada por conidióforos ramificados, espiralados, suportando conídios hialinos que variam de subglobosos a piriformes (Figura 2). A textura da parede do conídio varia de lisa a rugosa. Esses fungos também apresentam hifas de coloração hialina e de parede fina que dão origem aos artroconídios (outra característica do gênero). Os conidióforos são ramificados e apresentam conídios de origem blástica. Uma característica diagnóstica de *P. destructans* é o conídio assimétrico, curvado, similar a uma vírgula e de parede lisa (Figura 3) (BLEHERT et al., 2009; CAMPBELL et al., 2020; CHATURVEDI et al., 2010; GARGAS et al., 2009; MINNIS; LINDNER, 2013; RICE; CURRAH, 2006; VERANT et al., 2017; VILLANUEVA et al., 2021).

Figura 2- Conidióforos ramificados com conídios piriformes de *Geomyces* sp. Fonte: Rice e Currah (2006)

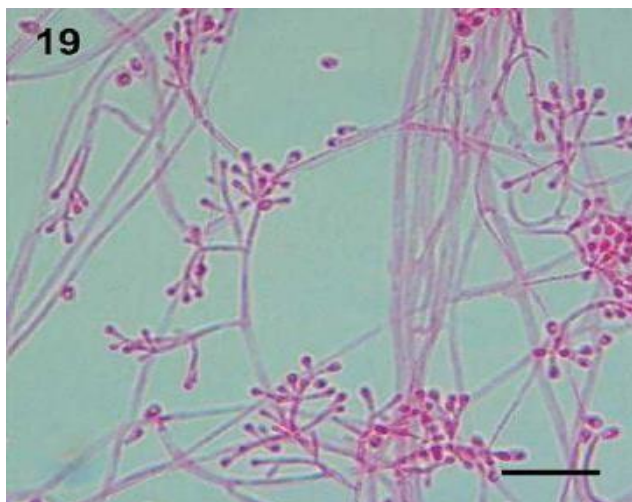
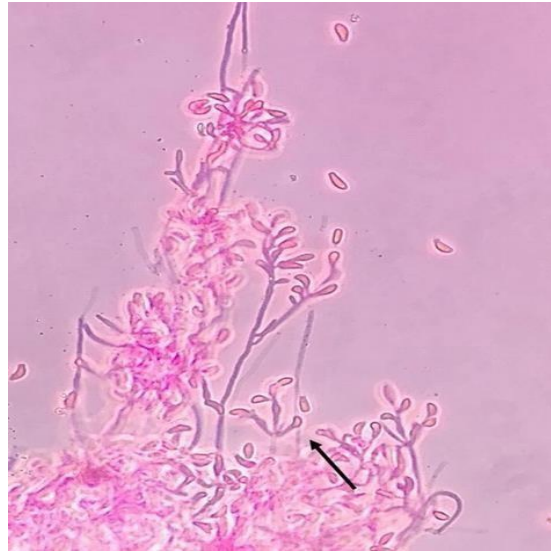


Figura 3- Conídio assimétrico de *Pseudogymnoascus destructans*. Fonte: Garzoli et al. (2019)



Pseudogymnoascus destructans é a espécie onde existe maior conhecimento sobre suas características, devido à patogenicidade e importância ecológica que ela possui como agente etiológico da “Síndrome do Nariz Branco” (*White Nose Syndrome – WNS*), uma doença emergente letal que ataca as áreas cutâneas de morcegos, mais especificamente as orelhas, focinhos e asas (Figura 4). A primeira vez que este fungo foi detectado foi no ano de 2006 no estado de Nova York. A partir de então começou-se a observar a dispersão deste micro-organismo pela América do Norte causando o declínio de várias espécies de morcegos enquanto hibernavam (BLEHERT et al., 2009; CAMPBELL et al., 2020; LANGWIG et al., 2016; LUESHOW 2019; MINNIS; LINDNER, 2013; RICE; CURRAH, 2006).

Figura 4 - *Pseudogymnoascus destructans* colonizando focinho e asas de morcegos. Fonte: Frick et al. (2010 e 2016)



Um ponto interessante a se destacar sobre esses microrganismos, é que apesar de ainda serem caracterizados como psicrófilos, estudos recentes que buscam compreender a dispersão deste fungo entre morcegos, mostraram *in vitro* que conídios viáveis conseguem sobreviver até 150 dias entre 25°C e 30°C, e em cavernas onde há umidade elevada e temperaturas baixas, até dois anos. No entanto, ainda não se pode afirmar se estes fungos conseguem sobreviver em morcegos ativos (CAMPBELL et al., 2020).

O gênero *Geomyces* compreende cinco espécies, a espécie tipo *Geomyces auratus* e as espécies, *G. pulvereus*, *G. laevis*, *G. guiyangensis* e *G. fujianensis*. Apresenta fase assexuada, assim como *Pseudogymnoascus*. Os conídios podem variar dependendo da espécie, mas no geral apresentam hifas hialinas, formando ramificações que comportam os conídios também hialinos. Esses geralmente são ovóides (HAYES, 2012; MINNIS; LINDNER, 2013; VERANT et al., 2017). Devido a realocação de algumas espécies desse gênero para *Pseudogymnoascus*, muitas características se confundem na literatura e, provavelmente, não compreendem o gênero em si, dificultando as descrições e conhecimento das espécies (HAYES, 2012). Assim, estudos da morfologia e filogenia desses gêneros são necessários para que se possa compreender as diferenças entre eles e as relações de parentesco.

2.4. Queratinas e queratinases

A queratina é uma importante proteína natural do grupo das escleroproteínas com funções estruturais e protetoras. É a principal constituinte de unhas, chifres, escamas, penas e bicos de aves, cascos, cabelo, lã e pele de mamíferos. Possui conformação complexa, é fibrosa, insolúvel e de alta estabilidade (BOHACZ et al., 2020; CORTEZI, 2009; DUFFECK, 2020; HASSAN et al., 2020; PRECZESKI et al., 2020; SHARMA et al., 2018). É o terceiro polímero natural de degradação mais difícil no mundo depois da celulose e quitina, além de ser o principal componente de estruturas como; penas, calos, unhas, conchas, chifres, cascos de animais, cerdas, bico de pássaros, cabelo, lã e camada epidérmica (BOHACZ et al., 2020; CORTEZI, 2009; DUFFECK, 2020; GONG et al., 2020; GUNES et al., 2018; PENG et al., 2019).

A estrutura da queratina é mantida por múltiplas interações como interação hidrofóbica, ligações dissulfeto extensas, ligações de hidrogênio e ligações cruzadas, além de possuírem fibrilas contorcidas de maneira paralela que formam micro e macro fibrilas, conferindo assim a estabilidade à fibra (GONG et al., 2020; GUPTA; RAMNANI, 2006).

Com base na estrutura secundária das cadeias polipeptídicas, a queratina é dividida em dois grupos, α -queratinas (cabelo e lâ) e β -queratinas (penas), que por sua vez também são divididos em ácidos e básicos com pesos moleculares distintos (GUNES et al., 2018; HASSAN et al., 2020; MARTINEZ et al., 2020). Em relação ao conteúdo de cisteína e enxofre, podem ser classificadas em *soft* queratina (<10% de cisteína) (pele e cabelo) cuja sua resistência a agentes químicos é menor, assim como o teor de ligações dissulfeto, gerando maior flexibilidade para a proteína, e *hard* queratina (10-14% de queratina) (pena, cabelo e unha) possuindo um alto teor de ligação dissulfeto, conferindo maior rigidez (DUFFECK, 2020; GUNES et al., 2018; JIN et al., 2017).

A α -queratina, principal proteína das unhas, cascos e chifres de mamífero é rica em resíduos de cisteína e possui conformação estrutural em α -hélice, estabilizada por pontes de hidrogênio que juntamente com esses aminoácidos formam pontes dissulfeto, concedendo assim, uma das propriedades biológicas mais importantes da α -queratina, a insolubilidade e resistência a estiramento. Em comparação com outras queratinas, esta possui um baixo teor de enxofre na sua estrutura e seu peso molecular varia entre 60-80 kDa (MARTINEZ et al., 2020).

Devido à conformação complexa da queratina, sua estrutura, composição, configuração molecular, recalcitrância e fortes ligações químicas e interações hidrofóbicas, a degradação pelas enzimas proteolíticas comumente conhecidas como a tripsina, pepsina e papaína não ocorrem de forma satisfatória. Por outro lado, apesar da complexidade e rigidez desta molécula, resíduos queratinosos podem ser degradados por micro-organismos, incluindo os fungos (CORTEZI et al., 2009; GONG et al., 2020; GUPTA; RAMNANI, 2006).

As queratinases (EC 3.4.4.25) são um importante grupo de enzimas queratinolíticas robustas, com variadas propriedades bioquímicas, pertencentes em sua maioria, à família das serinas, cisteínas e melato proteases (VIDMAR; VODOVNIK, 2018). São sintetizadas principalmente por fungos filamentosos, leveduras, actinomicetos e por algas marinhas (EMERSON, 2011; GUNES et al., 2018; SRIVASTAVA et al., 2020). São principalmente extracelulares com um peso molecular variando entre 30 e 90 kDa (SRIVASTAVA et al., 2020). A maioria destas enzimas é monomérica, embora haja exceções, e responsáveis pela catalisação da hidrólise das ligações peptídicas nas queratinas (EMERSON, 2011; VIDMAR; VODOVNIK, 2018).

As queratinases pertencem ao único grupo de proteases com ampla faixa de temperatura e pH que permite a degradação completa de proteínas complexas e recalcitrantes,

tornando seu papel fundamental na desestabilização dos arranjos de queratina (PRECZESKI et al., 2020; VIDMAR; VODOVNIK, 2018). O mecanismo que envolve estas enzimas é complexo e compreende sistemas sulfitolíticos e proteolíticos (GUPTA; RAMNANI, 2006).

Em relação às outras proteases, estas enzimas possuem alguns avanços em termos de estabilidade, ampla faixa de pH em condição alcalina, e de temperatura. São predominantemente ativas na presença de substratos queratinosos, quando então agem na quebra das ligações peptídicas presentes na estrutura da queratina, convertendo-a em formas simplificadas e liberando aminoácidos simples e livres que podem ser utilizados em diversos segmentos industriais (ABIRAMI et al., 2020; SRIVASTAVA et al., 2020).

2.5. Aplicações das queratinases

O aumento da população global levou a uma demanda crescente de produtos como carne e aves, consequentemente seus resíduos, como a queratina, estão se acumulando cada vez mais no ambiente, principalmente sob a forma de pelos e cabelos (PENG et al., 2019).

Dentro desta demanda, a indústria de aves ganha destaque pois vem colocando nos últimos anos o Brasil entre os países que mais exportam a carne de frango em todo o mundo (BERRES, 2021). No último trimestre de 2021 houve um aumento de 7,8% em comparação com o mesmo período do ano anterior em relação a exportação. Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), no 4º trimestre de 2021 foram abatidos 1,54 bilhões de frangos, 2,8% a mais que no ano de 2020, isso resultou no segundo melhor 4º trimestre desde 1997. Esses dados demonstram o crescente aumento do setor aviário no país, e como consequência deste processo há a geração em altas quantidades de subprodutos da indústria aviária, que consiste em penas, vísceras, ossos, efluentes e resíduos que possuem uma lenta degradação e acabam por serem prejudiciais ao ambiente (BERRES, 2021; LIMA et al., 2020).

Considerando que as penas de aves representam cerca de 8% do peso total do animal vivo, ela é um dos principais resíduos agroindustriais deste crescente setor. Toneladas destes resíduos são descartados por dia e como sua composição é quase que exclusivamente por queratina, aproximadamente 90%, a degradação deste resíduo é mais lenta, cara e difícil (BERRES, 2021; DUFFECK, 2020).

Atualmente as indústrias ainda tratam estes resíduos a partir de processos químicos e físico-químicos, que além de possuírem um alto custo energético, são processos que produzem

gases nocivos à saúde e ao ambiente. No entanto, a aplicação de enzimas tem se destacado como uma técnica promissora capaz de reduzir os custos do processo, aumentar a digestibilidade e biodisponibilidade de aminoácidos essenciais que são degradados nas outras formas de tratamento, agregando valor econômico e nutricional, visto que os resíduos são convertidos muitas vezes em farinhas de penas para complementação de ração animal. Além disso, a utilização de enzimas queratinolíticas é sustentável e já tem se mostrado eficiente em diferentes campos melhorando a eficiência catalítica e reduzindo a poluição ambiental (BERRES, 2021; GUPTA; RAMNANI, 2006; GONG et al., 2020).

Além disso, as queratinases destacam-se entre as proteases pela capacidade de hidrolisar a queratina e gerar subprodutos que podem ser aplicados em vários segmentos. Também se sobressaem por possuírem atividade biológica, biocompatibilidade, biodegradabilidade e durabilidade mecânica, além da capacidade de facilitar a adesão e proliferação celular. Propriedades essas que contribuíram para o desenvolvimento de diversos materiais à base dessa proteína e que podem ser empregados nos setores médicos, agrícolas, de cosméticos, produção de rações animais, indústria de detergentes, couro, farmacêutica, bem como na fabricação de colas e limpeza de lã e seda (GUPTA; RAMNANI, 2006; SINKIEWICZ et al., 2017).

Alguns estudos reportam a queratinase como uma enzima promissora no desenvolvimento de tecnologias verdes para utilização na reciclagem de resíduos têxteis, indústrias de couro e produção de aditivos para detergentes (GUPTA; RAMNANI, 2006; GONG et al., 2020). No entanto, segundo Gong et al. (2020) a otimização e produção em larga escala dessa enzima ainda é um desafio.

3 OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Autenticar e avançar na taxonomia dos fungos dos gêneros *Geomyces* e *Pseudogymnoascus* que fazem parte do acervo CRM-UNESP previamente identificados como pertencentes a estes gêneros, bem como investigar a capacidade dos isolados representantes de morfotipos distintos para produção de enzimas queratinolíticas.

3.2. Objetivos específicos

- Identificar os morfotipos distintos dos isolados identificados como *Geomyces* e *Pseudogymnoascus*;
- Autenticar e avançar na taxonomia dos isolados identificados como *Geomyces* e *Pseudogymnoascus* com base no sequenciamento dos marcadores ITS e MCM7;
- Avaliar qualitativamente a produção de queratinase em meio contendo resíduos avícolas (penas de frango);
- Avaliar quantitativamente a atividade de queratinase em meio contendo resíduos avícolas (penas de frango).

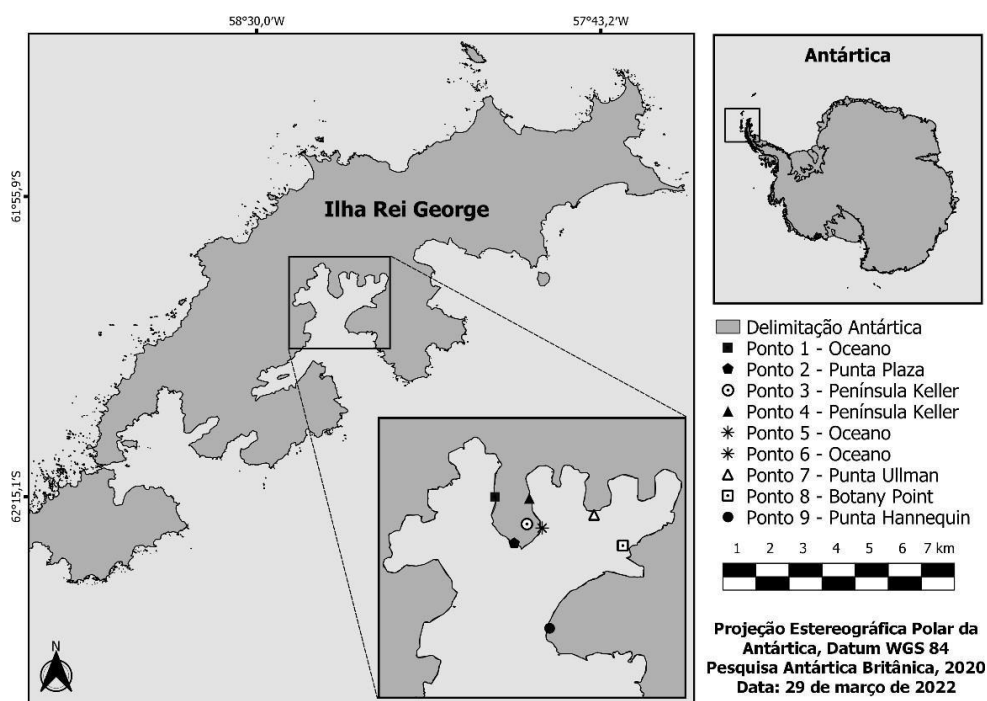
4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Origem e reativação dos isolados

Foram avaliados no presente estudo um total de 86 fungos filamentosos previamente identificados como pertencentes aos gêneros *Geomyces* (n = 19 isolados) e *Pseudogymnoascus* (n = 67), os quais foram isolados em trabalhos prévios do grupo de pesquisa a partir de diferentes substratos marinhos e terrestres coletados em nove pontos distribuídos pela Baía do Almirantado na Ilha Rei George (Figura 5) (DUARTE et al., 2018; WENTZEL et al., 2019). Os isolados estão depositados na coleção de pesquisa do Laboratório de Micologia Industrial e Ambiental (LAMAI), a qual está associada à CRM-UNESP (Instituto de Biociências Câmpus de Rio Claro, SP) e estão preservados em dois métodos distintos: água destilada esterilizada (mantidos a 8 °C) e criopreservação em glicerol 10% a -80 °C.

Para o desenvolvimento do presente estudo, os isolados foram reativados em Ágar Malte 2 % [(MA2%: extrato de malte 20 g L⁻¹ (Acumedia) e ágar 15 g L⁻¹ (Acumedia)]. O processo de reativação compreendeu a transferência de fragmentos e conídios dos fungos preservados para placas de Petri contendo meio MA2% suplementado com 150 µg mL⁻¹ de cloranfenicol (Sigma). Os fungos foram incubados a 15 °C, durante 15 dias no escuro.

Figura 5 – Local de coleta das amostras na Baía do Almirantado, Ilha Rei George, Antártica. Fonte: Elaborado por Elisa P. Pellizer e Iago Nepomuceno Duarte.



4.2. Purificação e manutenção dos isolados

Após o processo de reativação, o método de cultura monospórica em meio MA2% foi utilizado para a checagem de pureza das culturas. Essas por sua vez, foram transferidas para tubos inclinados contendo o mesmo meio, formando a coleção de trabalho mantida a 15 °C com repiques realizados de seis em seis meses (Figura 6). Todas as culturas consideradas axênicas foram novamente preservadas nos métodos descritos no item 3.1 (para renovação da coleção).

Figura 6 – Coleção de trabalho mantida a em meio MA2% a 15 °C. Fonte: Arquivo pessoal.



4.3. Análise macromorfológica

A triagem morfológica foi realizada para um total de 83 isolados, onde foram analisados a forma, a coloração e os diferentes estágios de crescimento destes microrganismos. Este último aspecto foi analisado de forma visual considerando o diâmetro (VALOR) da placa de Petri. A partir disso, os estágios foram divididos em três: lento, médio e acelerado. O primeiro compreendeu aqueles microrganismos que cresceram abaixo da metade da placa de Petri, durante o período de 15 dias. Para o médio foi considerado um crescimento de até metade da placa, e o acelerado compreendeu os isolados que conseguiram crescer acima da metade da placa de Petri, no período de incubação. Os fungos que apresentaram características semelhantes foram agrupados no mesmo morfotipo.

4.4. Análise molecular: extração de DNA, amplificação e sequenciamento

Para a extração do DNA genômico dos fungos foi utilizado o método CTAB (Brometo de cetrimônio), como descrito em Lacerda et al. (2018). Para tanto, o micélio dos fungos, crescidos previamente durante 15 dias em meio MA2%, foi submetido a maceração para o rompimento das células utilizando microesferas de vidro em solução de lise e incubação a 65 °C durante 30 min. Em seguida, a fase orgânica foi separada utilizando clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 14.000 g durante 10 min para obtenção do extrato bruto do DNA genômico na parte superior da amostra. O DNA foi então precipitado com acetato de sódio 3M e isopropanol 100% e, posteriormente purificado com sucessivas lavagens em etanol 100% e 70%. Por fim, foi adicionado 30 µL de solução Tris-EDTA (TE) para a suspensão do DNA, o qual foi armazenado a -20 °C.

O DNA genômico foi utilizado para a amplificação de dois marcadores taxonômicos: região ITS (*Internal Transcribed Spacer*) e a proteína de manutenção do minicromossomo 7 (MCM7). Foram utilizados os pares de *primers* ITS5 (5'GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG3') e ITS4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3') (WHITE et al., 1990) e Mcm7-709for (5'ACI MGI GTI TCV GAY GTH AAR CC3') e Mcm7-1348rev (5'GAY TTD GCI ACI CCI GGR TCW CCC AT3') (SCHMITT et al., 2009). A reação de amplificação com o marcador ITS foi elaborada com um volume final de 25 µL, sendo 8,8 µL de água ultrapura estéril; 5 µL de tampão 5X; 4 µL de dNTPs [1.25 mm cada]; 2µL de MgCl₂ [25 mm]; 1 µL de BSA [1 mg mL⁻¹]; 1 µL de cada *primer* [10 µm]; 0,2 µL de Taq polimerase [5 U µL⁻¹] e 2 µL do DNA genômico diluído [1:100]. As condições de amplificação foram: 94 °C/3 min, seguido de 35 ciclos de 94 °C/1 min, 55 °C/1 min e 72 °C/2min (SCHÖCH et al., 2012). A reação de amplificação com o marcador MCM7 sofreu algumas alterações após testes realizados no laboratório em busca de um melhor aproveitamento do processo. O volume final utilizado permaneceu 25 µL, sendo 8,3 µL de água ultrapura estéril; 5 µL de tampão 5X; 4 µL de dNTPs [1.25 mm cada]; 3 µL de MgCl₂ [25 mm]; 1 µL de BSA [1 mg mL⁻¹]; 1,25 µL de cada *primer* [10 µm]; 0,2 µL de Taq polimerase [5 U µL⁻¹] e 1 µL do DNA genômico diluído [1:100]. As condições de amplificação para este marcador foram: 94 °C/10 min, seguido por 38 ciclos de 94 °C/45 s, 56 °C/50 s, 72 °C/1 min e 72 °C/5 (SCHMITT et al., 2009).

Os *amplicons* foram purificados utilizando o *Kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-up System* (Promega), seguindo o protocolo do fabricante. Para a confirmação da presença do

DNA, foi preparado um gel de agarose 1% em tampão TBE e a eletroforese foi realizada com o mesmo tampão. A solução inserida nos poços do gel compreendeu 2 µL de DNA genômico e 2 µL de Loading Dye, suplementado com solução de GelRed (diluída 1:500). Após a inserção dos *amplicons* nos poços, foi realizada a eletroforese e os resultados foram observados no transluminador, sob luz ultravioleta. Para quantificar e verificar a pureza, os produtos de amplificação foram analisados no NanoDrop 2000 (ThermoFisher).

As sequências *forward* e *reverse* foram amplificadas com *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing* (Thermo Fisher Scientific), geradas no sequenciador automático ABI 3500 (Life Technologies) e reunidas em sequências consenso utilizando o *software* BioEdit v.7.1.3 (HALL, 1999). As condições das reações de sequenciamento foram: 95 °C/1min, seguidos de 28 ciclos a 95 °C/15s, 50 °C/45s e 60 °C/4min.

4.5. Análises filogenéticas

Regiões consenso foram adicionadas ao conjunto de sequências utilizados por Minnis; Lindner (2013), Lueschow et al. (2019) e Zhang et al. (2020) via Genbank e alinhadas no programa MUSCLE (EDGAR, 2004) implementado no software MEGA v. 7 (KUMAR et al.; 2016). O conjunto de dados compreendeu, portanto, as sequências obtidas da literatura, e as geradas pelo presente estudo.

A análise multigene de Inferência Bayesiana (BI) com o auxílio do método da cadeia de Markov Monte Carlo (MCMC) foi realizada. MrMODELTEST (NYLANDER, 2004) foi utilizado para selecionar o modelo de substituição de nucleotídeos para análise de BI. Os modelos foram estimados separadamente para cada região gênica. Os valores de verossimilhança foram calculados e o modelo selecionado de acordo com Akaike Information Criterion (AIC). Os modelos de evolução selecionados para cada região gênica foram SYM+I+G para ITS e SYM+G para mcm7. A análise de BI foi concluída com MrBayes v.3.1.1 (RONQUIST et al. 2012). As quatro cadeias MCMC foram conduzidas simultaneamente, iniciando as árvores aleatoriamente até 107 de gerações. As árvores foram amostradas a cada 1000 gerações, resultando em 10000 árvores. As primeiras 2500 árvores foram descartadas da análise. Os valores de probabilidade posterior (RANNALA; YANG, 1996) foram determinados a partir da árvore consenso através das 7500 árvores remanescentes. A convergência dos logs de verossimilhança foi analisada com o software TRACER v. 1.4.1 (RAMBAUT; DRUMMOND, 2013). A árvore foi visualizada e editada via iTOL v.4.0 (LETUNIC; BORK,

2019). *Pseudeurotium hygrophilum* foi utilizado como grupo externo (outgroup) para a análise com o marcador ITS e isolados de *Solomyces* sp. foram utilizados como grupo externo (outgroup) na análise concatenada.

4.6. Avaliação da produção de queratinases

4.6.1. Farinha de penas

As penas de aves utilizadas neste estudo foram coletadas e cedidas pela Empresa Fricok, localizada em Rio Claro, São Paulo. Estas por sua vez passaram por um processo de limpeza com algumas modificações, descrito por Haq et al. (2020). Inicialmente as penas foram lavadas em água destilada morna repetidas vezes, os resíduos remanescentes foram retirados de forma manual e as penas cortadas em pequenos pedaços (Figura 7).

Figura 7– Limpeza manual das penas cedidas pela Empresa Fricock. Fonte: Arquivo pessoal



Posteriormente, as penas foram imergidas em uma solução mista contendo clorofórmio:metanol (1: 1) por um dia (Figura 8), e depois em outra solução de acetona: clorofórmio:metanol (1: 4: 3) pelo período de mais um dia. As penas foram lavadas diversas vezes com água destilada para a remoção de todos os resíduos dos solventes, autoclavadas e

secas em estufa a 50 °C. Em seguida foram processadas em um liquidificador industrial e armazenadas em recipientes estéril a -20 °C.

Figura 8– Imersão das penas em solução com clorofórmio e metanol. Fonte: Arquivo pessoal.



4.6.2. Avaliação qualitativa da produção de queratinase

Uma triagem inicial em meio sólido foi realizada para detectar a produção de queratinase. Para tanto, foi utilizado o meio mínimo contendo (g/l); NaCl 0,5; KH_2PO_4 0,7; K_2HPO_4 1,4; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1; pH 7,0; Ágar bacteriológico, 15 g e Farinha de penas 10 g (FATTAH et al., 2018). O preparo foi autoclavado a 121 °C por 15 minutos. Este mesmo meio foi vertido em placas de Petri e um cilindro (0,5 mm de diâmetro) de cada fungo representante de cada morfotipo, foi transferido para estas mesmas placas e incubados a 15 °C por 15 dias. A presença de queratinase foi determinada com base no crescimento das colônias nas placas após o período de incubação.

4.6.3. Determinação da atividade enzimática

Para a produção enzimática, cinco cilindros (0,5 mm de diâmetro) de cada isolado com resultado positivo na análise qualitativa foram inoculados em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL do meio líquido mínimo com adição de penas, previamente autoclavado (g/l): NaCl 0,5; KH_2PO_4 0,7; K_2HPO_4 1,4; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1; pH 7,0; e Farinha de penas 10 g. Os experimentos foram realizados em triplicata e incubados por 7 dias a 15 °C, sob agitação de 120 rpm.

A atividade enzimática foi determinada de acordo com Anbu et al. (2007) onde 0,2 mL do caldo bruto (filtrado) foi adicionado a uma solução contendo farinha de penas (20 mg) e 3,8 mL de Tampão TrisHCl 100 mM (pH 7,8). A reação foi incubada por 2 h a 15 e a 37 °C. Após este período as amostras foram refrigeradas a 4 °C por 10 min e centrifugadas a 4 °C por 10 min a 10.000 g. A quantificação da atividade enzimática foi realizada em espectrofotômetro a 280 nm, comparando os resultados dos experimentos com o branco que continha farinha de penas e tampão. O aumento de 0,100 na absorbância foi considerado como uma unidade de atividade enzimática (1 KU = 0,100 absorbância). A atividade enzimática foi expressa em U mL^{-1} .

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Análise macromorfológica

Do total de 86 isolados presentes no acervo de pesquisa do Laboratório de Micologia Ambiental e Industrial - LAMAI (CRM-UNESP), 83 estavam viáveis e cresceram em meio de cultivo MA2%. Apenas três isolados não cresceram, a saber: LAMAI 530, LAMAI 1776 e LAMAI 1987 (Tabela 1).

Com base nos critérios macromorfológicos dos 83 isolados recuperados, 80 foram considerados como pertencentes aos gêneros *Geomyces* e *Pseudogymnoascus* e apenas três isolados (LAMAI 570, LAMAI 1347 e LAMAI 1904) apresentaram características distintas destes gêneros, como estruturas reprodutivas, textura e coloração das colônias. Tal resultado nos indicou que esses isolados pertencem a outros gêneros e que possivelmente foram identificados erroneamente no passado ou provavelmente ocorreu uma contaminação durante o processo de preservação.

Tabela 1 – Isolados analisados e seus respectivos dados de viabilidade, coleta e identificação após análises filogenéticas.

Código LAMAI	ID inicial	Viabilidade	Ponto de coleta	Local de coleta	Substrato	Identificação atual
503	<i>Geomyces</i> sp.	Sim	P3- Península Keller (62°05'S 58°24'W)	Punta Plaza	Líquen	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.
507	<i>Geomyces</i> sp.	Sim	P3- Península Keller (62°05'S 58°24'W)	Punta Plaza	Líquen	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.
508	<i>Geomyces</i> sp.	Sim	P3- Península Keller (62°05'S 58°24'W)	Punta Plaza	Líquen	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.
512	<i>Geomyces</i> sp.	Sim	P3- Península Keller (62°05'S 58°24'W)	Punta Plaza	Líquen	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.
524	<i>Geomyces</i> sp.	Sim	P3- Península Keller (62°05'S 58°24'W)	Punta Plaza	Líquen	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.
525	<i>Geomyces</i> sp.	Sim	P3- Península Keller (62°05'S 58°24'W)	Punta Plaza	Líquen	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.
530	<i>Geomyces</i> sp.	Não	P6- Oceano (62°05'130"S 58°23'536"W)	EACF ¹	Estrela do mar	NI
539	<i>Geomyces</i> sp.	Sim	P3- Península Keller (62°05'S 58°24'W)	Punta Plaza	<i>Salpa</i> sp.	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.
541	<i>Geomyces</i> sp.	Sim	P3- Península Keller (62°05'S 58°24'W)	Punta Plaza	Líquen	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.
548	<i>Geomyces</i> sp.	Sim	P3- Península Keller (62°05'S 58°24'W)	Punta Plaza	<i>Salpa</i> sp.	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.
560	<i>Geomyces</i> sp.	Sim	P6- Oceano (62°05'130"S 58°23'356"W)	EACF	<i>Nacella concina</i>	<i>Pseudogymnoascus verrucosus</i>
567	<i>P.destructans</i>	Sim	P3- Península Keller (62°05'S 58°24'W)	Punta Plaza	Líquen	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.
570	<i>Geomyces</i> sp.	Sim	P3- Península Keller (62°05'S 58°24'W)	Punta Plaza	Anfípode	NP
575	<i>Geomyces</i> sp.	Sim	P3- Península Keller (62°05'S 58°24'W)	Punta Plaza	Madeira	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.
580	<i>Geomyces</i> sp.	Sim	P3- Península Keller (62°05'S 58°24'W)	Punta Plaza	<i>Salpa</i> sp.	<i>Pseudogymnoascus verrucosus</i>
589	<i>Geomyces</i> sp.	Sim	P3- Península Keller	Punta Plaza	Líquen	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.

			(62°05'S 58°24'W)			
601	<i>Geomyces</i> sp.	Sim	P6- Oceano	EACF	Estrela do mar	<i>Pseudogymnoascus verrucosus</i>
608	<i>Geomyces</i> sp.	Sim	P3- Península Keller (62°05'S 58°24'W)	Punta Plaza	Líquen	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.
1347	<i>P.destructans</i>	Sim	P7- Punta Ullman (62° 05.015'S 58° 20.987'W)	Refúgio2 entre marés	Sedimento marinho	NP
1348	<i>Geomyces</i> sp.	Sim	P1- Oceano (62° 04.341'S 58° 25.233'W)	Península Keller	Sedimento marinho	<i>Pseudogymnoascus verrucosus</i>
1382	<i>Geomyces</i> sp.	Sim	P7- Punta Ullman (62° 05.015'S 58° 20.987'W)	Refúgio2 entre marés	Sedimento marinho	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.
1383	<i>Pseudogymnoascus destructans</i>	Sim	P5- Oceano (62° 05.130'S 58° 23.356'W)	EACF	Sedimento marinho	<i>Pseudogymnoascus sinensis</i>
1384	<i>Pseudogymnoascus verrucosus</i>	Sim	P1- Oceano (62° 04.341'S 58° 25.233'W)	Península Keller	Sedimento marinho	<i>Pseudogymnoascus verrucosus</i>
1385	<i>Pseudogymnoascus destructans</i>	Sim	P5- Oceano (62° 05.130'S 58° 23.356'W)	EACF	Sedimento marinho	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.
1386	<i>Pseudogymnoascus destructans</i>	Sim	P7- Punta Ullman (62° 05.015'S 58° 20.987'W)	Refúgio2 entre marés	Sedimento marinho	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.
1388	<i>Pseudogymnoascus destructans</i>	Sim	P8- Botany Point (62° 05.734'S 58° 19.919'W)	Botany Point	Sedimento marinho	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.
1700	<i>Pseudogymnoascus destructans</i>	Sim	P4-Península Keller (62° 04.479'S 58° 23.726'W)	Yellow Point	Solo	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.
1701	<i>Pseudogymnoascus destructans</i>	Sim	P4-Península Keller (62° 04.479'S 58° 23.726'W)	Yellow Point	Solo	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.
1702	<i>Pseudogymnoascus destructans</i>	Sim	P9-Punta Hannequin (62° 07.216'S 58° 23.677'W)	Punta Hannequin	Solo de raiz <i>C. quitensis</i>	<i>Pseudogymnoascus verrucosus</i>
1761	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	Sim	P4-Península Keller (62° 04.479'S 58° 23.726'W)	Yellow Point	Solo	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.
1762	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	Sim	P9-Punta Hannequin (62° 07.216'S 58° 23.677'W)	PuntaHannequin	Solo de raiz <i>C. quitensis</i>	<i>Pseudogymnoascus verrucosus</i>
1763	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	Sim	P9-Punta Hannequin (62° 07.216'S 58° 23.677'W)	Punta Hannequin	Solo de raiz <i>C. quitensis</i>	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.
1764	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	Sim	P2-Punta Plaza (62° 05.363'S 58° 24.691'W)	Punta Plaza	Solo de raiz <i>C. quitensis</i>	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.
1769	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	Sim	P4-Península Keller (62° 04.479'S 58° 23.726'W)	Yellow Point	Solo	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.
1770	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	Sim	P4-Península Keller (62° 04.479'S 58° 23.726'W)	Yellow Point	Solo	<i>Pseudogymnoascus roseus</i>
1771	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	Sim	P4-Península Keller (62° 04.479'S 58° 23.726'W)	Yellow Point	Solo	<i>Pseudogymnoascus roseus</i>
1773	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	Sim	P4-Península Keller (62° 04.479'S 58° 23.726'W)	Yellow Point	Solo	<i>Pseudogymnoascus verrucosus</i>
1774	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	Sim	P4-Península Keller (62° 04.479'S 58° 23.726'W)	Yellow Point	Solo	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.
1775	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	Sim	P9-Punta Hannequin (62° 07.216'S 58° 23.677'W)	Punta Hannequin	Solo de raiz <i>C. quitensis</i>	<i>Pseudogymnoascus verrucosus</i>
1776	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	Não	P9-Punta Hannequin (62° 07.216'S 58° 23.677'W)	Punta Hannequin	Solo de raiz <i>C. quitensis</i>	NI

1777	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	Sim	P9-Punta Hannequin (62° 07.216'S 58° 23.677'W)	Punta Hannequin	Solo de raiz <i>C. quitensis</i>	<i>Pseudogymnoascus</i> verrucosus
1778	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	Sim	P9-Punta Hannequin (62° 07.216'S 58° 23.677'W)	Punta Hannequin	Solo de raiz <i>C. quitensis</i>	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.
1779	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	Sim	P2-Punta Plaza (62° 05.363'S 58° 24.691'W)	Punta Plaza	Solo de raiz <i>D. antarctica</i>	<i>Pseudogymnoascus</i> verrucosus
1780	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	Sim	P4-Península Keller (62° 04.479'S 58° 23.726'W)	Yellow Point	Solo	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.
1781	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	Sim	P9-Punta Hannequin (62° 07.216'S 58° 23.677'W)	Punta Hannequin	Solo de raiz <i>C. quitensis</i>	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.
1782	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	Sim	P9-Punta Hannequin (62° 07.216'S 58° 23.677'W)	Punta Hannequin	Solo de raiz <i>C. quitensis</i>	<i>Pseudogymnoascus</i> verrucosus
1783	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	Sim	P9-Punta Hannequin (62° 07.216'S 58° 23.677'W)	Punta Hannequin	Solo de raiz <i>C. quitensis</i>	<i>Pseudogymnoascus</i> verrucosus
1784	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	Sim	P2-Punta Plaza (62° 05.363'S 58° 24.691'W)	Punta Plaza	Solo de raiz <i>C. quitensis</i>	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.
1785	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	Sim	P2-Punta Plaza (62° 05.363'S 58° 24.691'W)	Punta Plaza	Solo de raiz <i>C. quitensis</i>	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.
1786	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	Sim	P4-Península Keller (62° 04.479'S 58° 23.726'W)	Yellow Point	Solo	<i>Pseudogymnoascus</i> verrucosus
1787	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	Sim	P4-Península Keller (62° 04.479'S 58° 23.726'W)	Yellow Point	Solo	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.
1788	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	Sim	P9-Punta Hannequin (62° 07.216'S 58° 23.677'W)	Punta Hannequin	Solo de raiz <i>C. quitensis</i>	<i>Pseudogymnoascus</i> verrucosus
1804	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	Sim	P9-Punta Hannequin (62° 07.216'S 58° 23.677'W)	Punta Hannequin	Solo de raiz <i>C. quitensis</i>	<i>Pseudogymnoascus</i> verrucosus
1805	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	Sim	P9-Punta Hannequin (62° 07.216'S 58° 23.677'W)	Punta Hannequin	Solo de raiz <i>D. antarctica</i>	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.
1820	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	Sim	P9-Punta Hannequin (62° 07.216'S 58° 23.677'W)	Punta Hannequin	Solo de raiz <i>C. quitensis</i>	<i>Pseudogymnoascus</i> verrucosus
1821	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	Sim	P9-Punta Hannequin (62° 07.216'S 58° 23.677'W)	Punta Hannequin	Solo de raiz <i>C. quitensis</i>	<i>Pseudogymnoascus</i> verrucosus
1822	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	Sim	P9-Punta Hannequin (62° 07.216'S 58° 23.677'W)	Punta Hannequin	Solo de raiz <i>C. quitensis</i>	<i>Pseudogymnoascus</i> verrucosus
1823	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	Sim	P9-Punta Hannequin (62° 07.216'S 58° 23.677'W)	Punta Hannequin	Solo de raiz <i>C. quitensis</i>	<i>Pseudogymnoascus</i> verrucosus
1824	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	Sim	P9-Punta Hannequin (62° 07.216'S 58° 23.677'W)	Punta Hannequin	Solo de raiz <i>D. antarctica</i>	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.
1825	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	Sim	P2-Punta Plaza (62° 05.363'S 58° 24.691'W)	Punta Plaza	Solo de raiz- <i>D. antarctica</i>	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.
1837	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	Sim	P4-Península Keller (62° 04.479'S 58° 23.726'W)	Yellow Point	Solo	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.
1838	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	Sim	P4-Península Keller (62° 04.479'S 58° 23.726'W)	Yellow Point	Solo	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.
1839	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	Sim	P4-Península Keller (62° 04.479'S 58° 23.726'W)	Yellow Point	Solo	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.
1840	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	Sim	P2-Punta Plaza (62° 05.363'S 58° 24.691'W)	Punta Plaza	Solo de raiz <i>C. quitensis</i>	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.

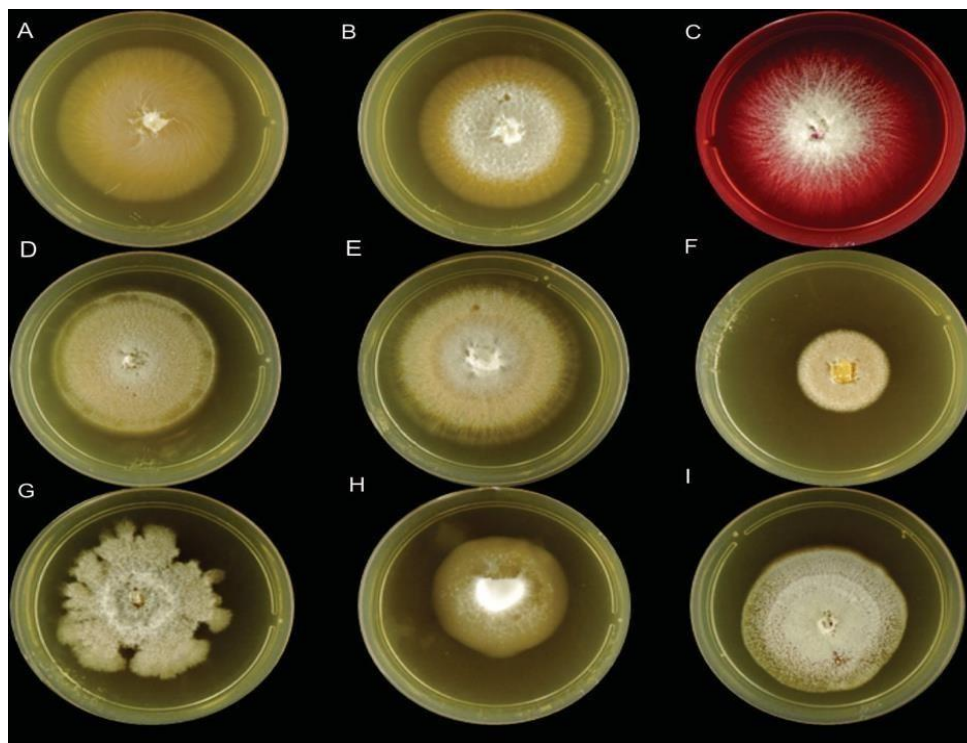
1841	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	Sim	P2-Punta Plaza (62° 05.363'S 58° 24.691'W)	Punta Plaza	Solo de raiz <i>C. quitensis</i>	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.
1842	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	Sim	P4-Península Keller 962° 04.479'S 58° 23.726'W)	Yellow Point	Solo	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.
1847	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	Sim	P4-Península Keller (62° 04.479'S 58° 23.726'W)	Yellow Point	Solo	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.
1848	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	Sim	P9-Punta Hannequin (62° 07.216'S 58° 23.677'W)	Punta Hannequin	Solo de raiz <i>D. antarctica</i>	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.
1852	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	Sim	P2-Punta Plaza (62° 05.363'S 58° 24.691'W)	Punta Plaza	Solo de raiz <i>D. antarctica</i>	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.
1858	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	Sim	P9-Punta Hannequin (62° 07.216'S 58° 23.677'W)	Punta Hannequin	Solo de raiz <i>D. antarctica</i>	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.
1863	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	Sim	P9-Punta Hannequin (62° 07.216'S 58° 23.677'W)	Punta Hannequin	Solo de raiz <i>C. quitensis</i>	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.
1870	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	Sim	P2-Punta Plaza (62° 05.363'S 58° 24.691'W)	Punta Plaza	Solo de raiz <i>D. antarctica</i>	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.
1885	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	Sim	P9-Punta Hannequin (62° 07.216'S 58° 23.677'W)	Punta Hannequin	Solo de raiz <i>D. antarctica</i>	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.
1888	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	Sim	P2-Punta Plaza (62° 05.363'S 58° 24.691'W)	Punta Plaza	Solo de raiz <i>C. quitensis</i>	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.
1904	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	Sim	P9-Punta Hannequin (62° 07.216'S 58° 23.677'W)	Punta Hannequin	Solo de raiz <i>C. quitensis</i>	NP
1924	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	Sim	P9-Punta Hannequin (62° 07.216'S 58° 23.677'W)	Punta Hannequin	Solo de raiz <i>C. quitensis</i>	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.
1966	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	Sim	P2-Punta Plaza (62° 05.363'S 58° 24.691'W)	Punta Plaza	Solo de raiz- <i>D.antarctica</i>	<i>Pseudogymnoascus verrucosus</i>
1977	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	Sim	P9-Punta Hannequin (62° 07.216'S 58° 23.677'W)	Punta Hannequin	Solo de raiz <i>C. quitensis</i>	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.
1979	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	Sim	P2-Punta Plaza (62° 05.363'S 58° 24.691'W)	Punta Plaza	Solo de raiz- <i>Deschampsia</i>	<i>Pseudogymnoascus verrucosus</i>
1981	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	Sim	P2-Punta Plaza (62° 05.363'S 58° 24.691'W)	Punta Plaza	Solo de raiz <i>C. quitensis</i>	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.
1987	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	Não	P2-Punta Plaza (62° 05.363'S 58° 24.691'W)	Punta Plaza	Solo de raiz- <i>D.antarctica</i>	NI
1991	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	Sim	P9-Punta Hannequin (62° 07.216'S 58° 23.677'W)	Punta Hannequin	Solo de raiz <i>C. quitensis</i>	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.
1993	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	Sim	P9-Punta Hannequin (62° 07.216'S 58° 23.677'W)	Punta Hannequin	Solo de raiz <i>C. quitensis</i>	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.

¹ EACF: Estação Antártica Comandante Ferraz; NI = não identificado; NP = não pertencente aos gêneros estudados

A partir da análise macromorfológica, os 80 isolados foram separados em nove morfotipos (Figura 9). Dentro do morfotipo 1 foram incluídos nove isolados (LAMAI 601, LAMAI 1762, LAMAI 1769, LAMAI 1775, LAMAI 1783, LAMAI 1786, LAMAI 1825, LAMAI 1852 e LAMAI 1966), os quais apresentaram hifas delgadas, de coloração branca e que cresceram adjacentes ao meio de cultivo (Figura 9A). Dentro do morfotipo 2, foram

incluídos aqueles isolados que apresentaram colônias de coloração branca e crescimento acelerado em relação aos demais morfotipos (Figura 9B). Esse morfotipo, foi o que teve um maior número de representantes (52 isolados). Dentro do morfotipo 3, foram incluídos três isolados (LAMAI 560, LAMAI 580 e LAMAI 1384), os quais também apresentaram colônias de coloração branca, porém secretaram um pigmento que altera a coloração do meio de cultivo, tornando-o rosa (Figura 9C). Os morfotipos 4 (LAMAI 507, LAMAI 508 e LAMAI 548), 5 (LAMAI 1763, LAMAI 1777, LAMAI 1781 e LAMAI 1848) e 9 (LAMAI 1770) apresentaram características bem semelhantes quanto a coloração e forma da colônia. Todos apresentam colônias de coloração branca, mas diferem na característica de possuírem micélio mais ou menos pulverulento. O morfotipo 4 é o que mais se destaca dentre os três (4, 5 e 9), apresentando uma maior pulverulência (Figura 9I). O morfotipo 5 (Figura 9E) diferiu do 9 (Figura 9D) por apresentar crescimento mais rápido. O morfotipo 6 agrupou três isolados (LAMAI 1701, LAMAI 1771 e LAMAI 1837) de coloração mais amarelada e de crescimento lento (Figura 9F). O morfotipo 7 agrupou outros quatro isolados (LAMAI 1773, LAMAI 1779, LAMAI 1823 e LAMAI 1924) de colônias brancas e com crescimento irregular (Figura 9G). Por fim, apenas um isolado foi incorporado ao morfotipo 8 (LAMAI 1383), o qual apresentou um micélio branco e denso, concentrado na parte central da placa e com hifas delgadas nas partes periféricas (Figura 9H).

Figura 9 – Morfotipos encontrados neste trabalho. A. Morfotipo 1; B. Morfotipo 2; C. Morfotipo 3; D. Morfotipo 9; E. Morfotipo 5. F. Morfotipo 6; G. Morfotipo 7; H. Morfotipo 8; I. Morfotipo 4.
Fonte: Elaborado pela autora.



5.2. Análises filogenéticas

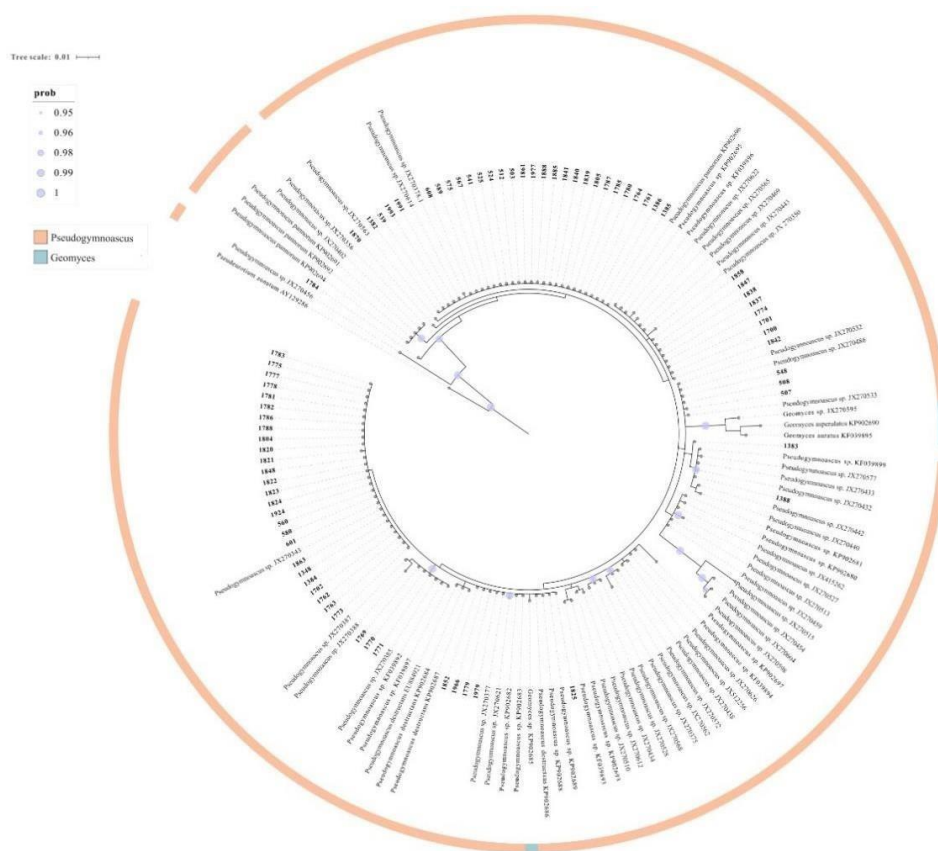
Devido a problemas técnicos no percurso do estudo, foi necessário a redução do número de isolados para as análises filogenéticas de cada marcador, portanto, para uma primeira análise a partir de Inferência Bayesiana (BI) com apenas o marcador ITS foram utilizados 77 isolados, os quais agruparam no clado pertencente ao gênero *Pseudogymnoascus* (PP= 0,95, Figura 10). Este resultado indicou que todos os isolados antes identificados como *Geomyces*, na realidade são representantes do gênero *Pseudogymnoascus* (Tabela 1).

Considerando o clado do gênero *Pseudogymnoascus*, os isolados ainda foram subdivididos em dois clados distintos com espécies associadas. Os isolados LAMAI 1784 e LAMAI 1870 foram agrupados no clado representado por *Pseudogymnoascus appendiculatus* (PP= 0,94) e os isolados LAMAI 1769, LAMAI 1770 e LAMAI 1771 foram agrupados no clado representado por *Pseudogymnoascus roseus* (PP=1). Todos os outros isolados permaneceram no nível de gênero e com valores de probabilidade posterior menores. Além disso, muitos isolados foram distribuídos ao longo da árvore e seus clados não foram bem definidos. Isso ocorreu provavelmente devido ao uso apenas do marcador ITS, o qual não consegue resolver

sozinho os clados de *Pseudogymnoascus* (LUESCHOW et al., 2019; MINNIS; LINDNER, 2013).

A partir da análise Bayesiana realizada com o marcador ITS (Figura 10), podemos inferir que os fungos do acervo da coleção de pesquisa LAMAI (associada à CRM-UNESP) identificados como *Geomyces* sp., na verdade pertencem ao gênero *Pseudogymnoascus* e que alguns dos fungos identificados como *Pseudogymnoascus verrucosus* e *Pseudogymnoascus destructans* não pertenciam a estas espécies, e acabaram sendo alocados por enquanto, somente no gênero *Pseudogymnoascus*.

Figura 10 - Posição filogenética dos isolados baseada no marcador ITS. Fonte: Elaborado pela autora e Dr. Pedro Henrique Dias dos Santos.



Em um segundo momento foi realizada a análise Bayesiana com os marcadores ITS e MCM7 para 52 isolados (Figura 11), sendo que dentro deste grupo havia representantes dos diferentes morfotipos. Todos os isolados analisados permaneceram no clado de *Pseudogymnoascus* com alto valor de probabilidade posterior. Além disso, nenhum isolado foi alocado no clado de *Pseudogymnoascus destructans*. Por outro lado, o isolado representante do clado de *Pseudogymnoascus verrucosus* a partir da BI apenas com o marcador ITS (Figura 10), foi novamente inserido nesse clado com um alto valor de probabilidade após esta segunda filogenia, indicando que este isolado pertence a esta espécie.

O isolado LAMAI 1870 não entrou nesta segunda análise filogenética, mas o LAMAI 1784 que assim como o isolado citado anteriormente foi agrupado no clado representado por *Pseudogymnoascus appendiculatus* com o marcador ITS (Figura 10), apresentou um resultado distinto nesta outra filogenia, sendo agrupado em um clado sem espécie associada (PP=1).

No clado de *Pseudogymnoascus roseus* inicialmente agruparam três isolados: LAMAI 1769, LAMAI 1770 e LAMAI 1771. Este primeiro não foi incluso na segunda análise, mas os outros dois isolados sim e permaneceram no mesmo clado (PP=1).

O isolado LAMAI 1383 foi agrupado no clado de *Pseudogymnoascus sinensis* (PP= 1), enquanto 23 isolados (LAMAI 560, LAMAI 580, LAMAI 601, LAMAI 1348, LAMAI 1384, LAMAI 1702, LAMAI 1762, LAMAI 1773, LAMAI 1775, LAMAI 1777, LAMAI 1778, LAMAI 1779, LAMAI 1782, LAMAI 1783, LAMAI 1786, LAMAI 1788, LAMAI 1804, LAMAI 1820, LAMAI 1821, LAMAI 1822, LAMAI 1823, LAMAI 1966 e LAMAI 1979) agruparam-se no clado de *Pseudogymnoascus verrucosus* (PP= 1). O restante, 25 isolados, foram agrupados no clado de *Pseudogymnoascus* sem nenhuma espécie associada.

Nenhum dos isolados avaliados neste estudo agrupou com os clados de *Pseudogymnoascus appendiculatus*, *P. bhattii*, *P. destructans*, *P. guizhouensis*, *P. lindneri*, *P. shaanxiensis* e *P. turneri* (ZHANG, et al., 2020).

A partir da análise Bayesiana realizada com os marcadores ITS e MCM7, podemos inferir que os fungos analisados neste trabalho e pertencentes ao acervo da coleção de pesquisa LAMAI (associada à CRM UNESP) identificados como *Geomyces* sp. pertencem ao gênero *Pseudogymnoascus*. Além disso, a maioria dos fungos identificados como *Pseudogymnoascus destructans* não pertenciam a estas espécies, como é o caso do isolado LAMAI 1383 que se agrupou com *P. sinensis* e dos isolados LAMAI 560 e LAMAI 1384 que agruparam com *P. verrucosus*. Os demais isolados identificados como *P. destructans* acabaram sendo alocados

Figura 11- Posição filogenética dos isolados baseada nos marcadores ITS e MCM7. Fonte: Elaborado pelo Dr. Pedro Henrique Dias dos Santos.



5.3. Distribuição e ecologia

Os resultados obtidos demonstram que em um mesmo local de coleta é possível encontrar diferentes espécies de *Pseudogymnoascus*, tanto colonizando o mesmo substrato, como substratos distintos. Outro ponto, é que em um mesmo clado, seja ele definido ou indefinido, há isolados provenientes de diferentes substratos.

Fungos deste gênero são bem conhecidos em ambientes frios e já foram isolados a partir de amostras de unhas humanas, tecido de morcego, fezes de animais, sedimentos marinhos, solo com diferentes propriedades, associação com invertebrados, entre outros substratos, além de ambientes e territórios geográficos completamente diferentes (CARVALHO et al., 2020; CONG et al., 2020; DUARTE et al., 2018a; LUESCHOW et al., 2019; ROSA et al., 2021).

A colonização variada de *Pseudogymnoascus* foi reportada por diversos estudos corroborando com os dados deste trabalho e indicando uma ampla capacidade de colonização e distribuição dos representantes desse gênero (DUARTE et al., 2018a; LUESCHOW et al., 2019; MINNIS; LINDNER, 2013; URBINA et al., 2021; XIA et al., 2021).

Além disso *Pseudogymnoascus* faz parte do filo Ascomycota, um dos mais abundantes descritos no ambiente antártico (HENRÍQUEZ et al., 2014; MENEZES et al., 2021; ROSA et al., 2021; ROSA et al., 2010; SHI et al., 2021; WENTZEL et al., 2019).

Alguns dos isolados deste trabalho agruparam no clado de *P. verrucosus*, uma espécie capaz de colonizar sedimentos marinhos e solos antárticos a solos de caverna no Hemisfério Norte (GOMES et al., 2018; OGAKI et al., 2020).

Os isolados LAMAI 1770 e LAMAI 1771 provenientes (P4), agruparam em um clado definido, *Pseudogymnoascus roseus*, onde se encontra os fungos provenientes de solo de hibernáculo de morcegos e de turfa amorfa do estudo de Minnis e Lindner (2013). Esses resultados sugerem que esta espécie consegue colonizar ambientes com faixas de temperatura e características físico-químicas de solo, bastante distintas. Além de nos mostrar que em um mesmo ponto de coleta podemos encontrar espécies diferentes, como é o caso deste mesmo ponto P4, de onde foi possível recuperar isolados que se agruparam tanto com o clado de *P. roseus* (LAMAI 1771 e 1770) como o de *P. verrucosus* (LAMAI 1786 E 1773) e com um clado distante destes dois, mas sem espécie associada. (LUESCHOW et al., 2019; MINNIS; LINDNER, 2013; WENTZEL et al., 2019).

O isolado LAMAI 1383 foi o único deste estudo que se agrupou com uma espécie descrita recentemente, *P. sinensis*, isolada a partir de solo Chinês, corroborando mais uma vez com a ampla distribuição geográfica deste gênero (ZHANG et al., 2020).

O isolado LAMAI 548 mesmo agrupando em um clado sem espécie conhecida assim como os isolados LAMAI 512, LAMAI 524, LAMAI 525, LAMAI 541, LAMAI 567, LAMAI 575, LAMAI 589, e LAMAI 608 provenientes do mesmo ponto de coleta (P3) ficaram bastante distantes filogeneticamente, mostrando que um mesmo local, com as mesmas características pode abrigar espécies distintas.

A maioria dos isolados do ponto P3 agrupou com isolados dos pontos P2, P4, P5, P7 e P9, porém em um clado indefinido. Além disso os isolados de P3 (LAMAI 512, LAMAI 524, LAMAI 525, LAMAI 541, LAMAI 567, LAMAI 575, LAMAI 589 e LAMAI 608). ficaram muito próximos no mesmo clado, o que sugere que provavelmente esses oito isolados sejam da mesma espécie e que possuem a capacidade de colonizar diferentes substratos.

Em relação aos morfotipos e sua distribuição nas duas árvores filogenéticas, esperávamos um agrupamento dos mesmos morfotipos nos mesmos clados ou próximos, visto que todos os isolados cresceram nas mesmas condições, entretanto, na árvore filogenética com o marcador ITS (Figura 10) assim como na árvore concatenada (Figura 11), observamos uma distribuição destes morfotipos em diferentes clados. Analisando a árvore que elucidou melhor os dados taxonômicos (ITS junto com MCM7), vimos que alguns isolados como o LAMAI 560, LAMAI 580 e LAMAI 1384 provenientes de pontos de coleta distintos mas alocados no morfotipo 3, ficaram próximos na árvore e no mesmo clado, o de *Pseudogymnoascus verrucosus*. No entanto, outros isolados pertencentes ao morfotipo 1 (LAMAI 1966, LAMAI 1786, LAMAI 1783, LAMAI 1775, LAMAI 1762, e LAMAI 601), morfotipo 2 (LAMAI 1348, LAMAI 1702, LAMAI 1778, LAMAI 1782, LAMAI 1788, LAMAI 1804, LAMAI 1820, LAMAI 1821, LAMAI 1822, LAMAI 1823 e LAMAI 1979), morfotipo 5 (LAMAI 1777) e morfotipo 7 (LAMAI 1773 e LAMAI 1779) também agruparam neste mesmo grupo. Esta distribuição foi também verificada para outros morfotipos.

Sendo assim, as análises filogenéticas permitiram agrupar alguns isolados de *Pseudogymnoascus* provenientes da Antártica com espécies conhecidas com alto valor de probabilidade posterior. No entanto, muitos outros permanecem indefinidos e podem representar potenciais novas espécies. Para refinar a taxonomia destes isolados, se faz necessário a utilização de marcadores moleculares adicionais, como por exemplo, o gene fator

de elongação 1 alfa (TEF1), gene que codifica à segunda subunidade da RNA polimerase II (RPB2) e a subunidade maior do ribossomo (LSU). Esses marcadores vêm apresentando avanços na compreensão da taxonomia dos gêneros *Pseudogymnoascus* e *Geomyces* (MINNIS; LINDNER, 2013; VILLANUEVA et al., 2021; ZHANG et al., 2020 e 2021).

5.4. Produção de queratinase: análise qualitativa e quantitativa

A triagem qualitativa demonstrou que todos os 9 isolados representantes dos morfotipos distintos, são potenciais produtores de queratinase devido a capacidade de crescimento em meio contendo farinha de penas como fonte de nutrientes, apesar de não terem sido observados halos de degradação (Figura 12).

Figura 12– Crescimento dos morfotipos em meio sólido com farinha de penas. A. Morfotipo 1; B. Morfotipo 2; C. Morfotipo 3; D. Morfotipo 4; E. Morfotipo 5. F. Morfotipo 6; G. Morfotipo 7; H. Morfotipo 8; I. Morfotipo 9.
Fonte: Elaborado pela autora.

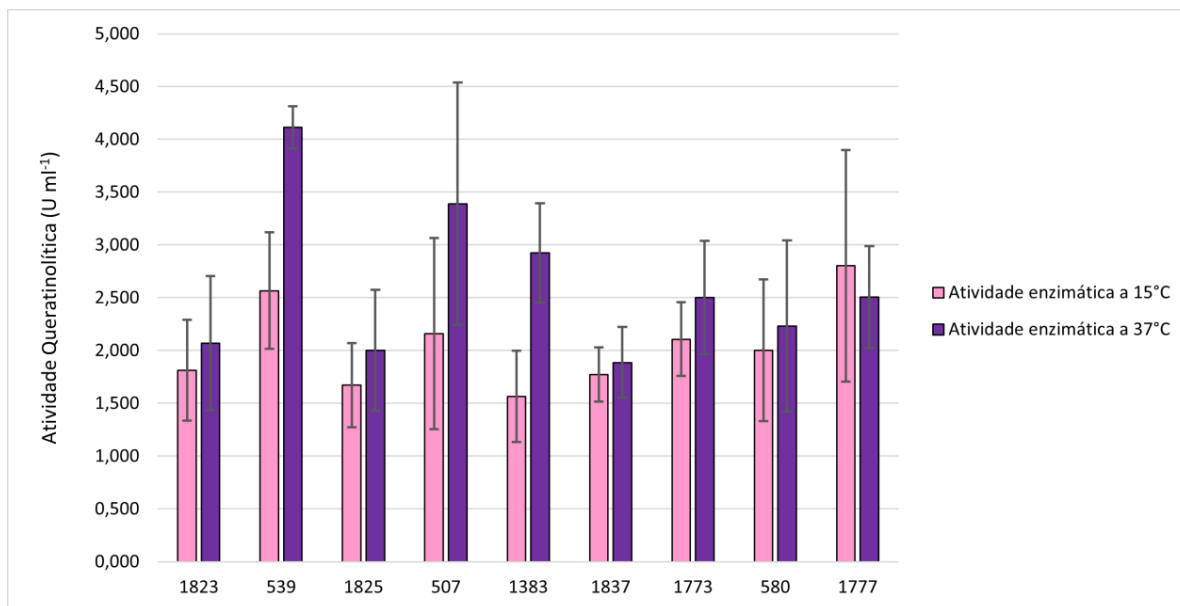


O morfotipo 4, representado aqui pelo isolado LAMAI 507, foi o único que apresentou as mesmas características na colônia em meio com malte e meio farinha de penas, apresentando micélio bastante pulverulento e com textura densa (Figura 12D). O morfotipo 8 (LAMAI 1383) apresentou crescimento mais acelerado no meio farinha de penas (Figura 12H) e o morfotipo 3 (LAMAI 580) caracterizado principalmente pela secreção de pigmento deixando a coloração do meio bastante rosada, acabou não apresentando este traço (Figura 12C). Em meio com farinha de penas o isolado teve um bom crescimento, no entanto não foi observada a pigmentação que em 15 dias era bem alta em meio malte. Os outros morfotipos cresceram em meio com penas de frangos, mas assim como os citados acima, apresentaram algumas diferenças, como já se espera visto que são dois meios de cultura bastante distintos do ponto de vista nutricional.

Os fungos representantes dos 9 morfotipos distintos (Figura 12) foram submetidos aos experimentos de quantificação da atividade de queratinase em meio líquido com farinha de penas em duas temperaturas distintas (15 e 37 °C). Todos os isolados apresentaram atividade de queratinase (Figura 13) com destaque para o LAMAI 1777 que produziu 2,8 U ml⁻¹ a 15 °C e LAMAI 539 que produziu 4,11 U ml⁻¹ a 37 °C e 2,56 U ml⁻¹ a 15 °C. No geral, as médias das atividades enzimáticas determinadas a 37°C foram um pouco maiores do que as médias das atividades enzimáticas determinadas a 15 °C (Figura 13). Porém, considerando as barras de erro que representam o desvio padrão, essas diferenças só podem ser confirmadas para os isolados LAMAI 539 e LAMAI 1383. Apesar da dificuldade para se estabelecer esse comparativo para os outros isolados, os resultados indicam o potencial desses fungos adaptados ao frio de produzir enzimas ativas em temperaturas mais amenas. No estudo de Sousa (2011) os fungos *Aspergillus sulphureus* e *Trichoderma aureoviride* apresentaram 7,35 e 7,20 U ml⁻¹ de atividade de queratinase, respectivamente, a 37°C.

Figura 13 – Valores de atividade enzimática dos isolados representantes de morfotipos distintos a 15 e a 37 °C após cultivo em meio farinha de penas por 7 dias a 15°C e 120 rpm.

Fonte: Elaborada pela autora.



Outros táxons de fungos foram reportados como produtores de queratinase em meio contendo penas como substrato: *Microsporium gypseum* (8,48 U ml⁻¹); *Scopulariopsis brevicaulis* (6,2 U ml⁻¹), *Myrothecium verrucaria* (48,9 U ml⁻¹) e *Aspergillus flavus* (0,781 U ml⁻¹) (ANBU et al., 2007; FRIEDRICH et al., 1999; GIOPPPO et al., 2009; GIUDICE, M. C, 2008).

Presceski et al. (2020) reportaram atividade de queratinase de 112,25 U ml⁻¹ para o fungo *Aspergillus* sp. e de 23,25 U ml⁻¹ para o fungo *Fusarium oxysporum* após cultivo em diferentes fontes de queratina, sendo que a maior atividade se deu em substrato acrescido de pelos suínos, corroborando com a literatura o fato de que as atividades enzimáticas podem variar de forma ampla dependendo dos parâmetros nutricionais e de cultivo estabelecidos.

Cabe destacar que os valores obtidos no presente estudo foram referentes a uma triagem inicial da produção de queratinases pelos fungos adaptados ao frio do gênero *Pseudogymnoascus*. Estudos posteriores associados a aplicação de planejamento experimental, onde há utilização de diversos fatores como pH, temperatura, fontes de queratina, quantidade de inóculo, fontes adicionais de nutrientes, entre outros, poderão resultar em aumento substancial da quantidade de enzima produzida.

Enzimas adaptadas ao frio provenientes de micro-organismos psicrófilos ou psicrotolerantes podem ser mais vantajosos em processos industriais que requerem

temperaturas baixas e moderadas. Além disso, essas enzimas podem ser produzidas em maior quantidade em temperaturas moderadas (25 a 40°C) quando comparadas com a produção por micro-organismos termofílicos e mesofílicos, reduzindo os gastos relacionados com o aquecimento do processo de produção (DUARTE et al., 2018b).

Desde o primeiro relato de fungos capazes de colonizar substratos queratinosos, estudos acerca deste assunto vêm sendo conduzidos, principalmente após a descoberta do potencial para aplicações biotecnológicas (ZHANG et al., 2021). Fungos queratinolíticos estão presentes em diferentes regiões do planeta e colonizam uma ampla variedade de substratos, além de compreenderem diversas ordens, famílias e gêneros, incluindo dermatófitos e fungos saprotróficos, como é caso de *Geomyces* e *Pseudogymnoascus* (ZHANG 2021).

O gênero *Pseudogymnoascus* parece ter uma plasticidade metabólica além de tolerância e mecanismos que os fazem capazes de colonizar ambientes frios e substratos diversos, incluindo os queratinosos como tecidos de morcego, unhas humanas e penas de frango, o que é muito interessante do ponto de vista biotecnológico (BLEHERT et al., 2009; CAMPBELL et al., 2020; DAVY et al., 2020; LANGWIG et al., 2016; LUESHOW 2019; MINNIS; LINDNER, 2013; RICE; CURRAH, 2006.; OUT et al., 2016; ROBICHEAU et al., 2019; ZHANG et al., 2021).

No entanto, até o presente momento há poucos trabalhos que avaliam de forma quantitativa a produção destas enzimas nestes gêneros, a maioria apresenta dados qualitativos, demonstrando a capacidade de degradar, colonizar e usar como fonte de nutriente substratos queratinosos, como é o caso dos estudos realizados por Robicheau et al. (2019), Out et al. (2016), Zhang et al. (2020) e (2021) que apresentou resultados de crescimento satisfatório de fungos dos gêneros *Geomyces* e *Pseudogymnoascus* em meios acrescidos de penas de aves. Desta forma, o presente estudo traz informações inovadoras a respeito da atividade enzimática de fungos do gênero *Pseudogymnoascus* em duas diferentes temperaturas.

6 CONCLUSÃO

A Antártica é um ecossistema único que possivelmente abrange uma variedade de fungos dos gêneros *Geomyces* e *Pseudogymnoascus*. A metodologia utilizada para a autenticação dos 86 isolados inicialmente identificados como pertencentes a esses dois gêneros foi aplicada com sucesso e permitiu inicialmente com base na morfologia, descartar os isolados que não pertenciam a estes gêneros. As análises filogenéticas foram realizadas com 77 isolados (marcador ITS) e depois com 52 isolados (marcador ITS e MCM7) e apresentaram eficácia no processo de autenticação e aprofundamento da identificação de alguns dos micro-organismos aqui estudados. Todos os isolados foram identificados como pertencentes ao gênero *Pseudogymnoascus*, com a inferência de espécies para os isolados LAMAI 1383 (*Pseudogymnoascus sinensis*), LAMAI 1770 e LAMAI 1771 (*Pseudogymnoascus roseus*) e para os isolados LAMAI 1378, LAMAI 1384, LAMAI 1784, LAMAI 560, LAMAI 580, LAMAI 601, LAMAI 1702, LAMAI 1762, LAMAI 1773, LAMAI 1775, LAMAI 1777, LAMAI 1778, LAMAI 1782, LAMAI 1783, LAMAI 1786, LAMAI 1788, LAMAI 1804, LAMAI 1820, LAMAI 1821, LAMAI 1822, LAMAI 1823, LAMAI 1779, LAMAI 1979 e LAMAI 1966 (*Pseudogymnoascus verrucosus*). Além disso, os dados de distribuição revelam que os representantes de *Pseudogymnoascus* estudados possuem a capacidade de colonizar substratos muito distintos e regiões geográficas distintas e distantes, e que diferentes espécies podem ser encontradas em um mesmo substrato, de um mesmo local.

Representantes do gênero *Pseudogymnoascus* são reportados como sendo capazes de produzir queratinases, e este estudo mostra que os *Pseudogymnoascus* de origem Antártica são micro-organismos queratinolíticos. Os isolados investigados (representantes de diferentes morfotipos) apresentam capacidade de produção de queratinase com destaque para o LAMAI 539 que produziu 4,11 U ml⁻¹ da enzima a 37° C e 2,56 U ml⁻¹ a 15 °C e o LAMAI 1777 que produziu 2,8 U ml⁻¹ da enzima a 37 °C. O isolado LAMAI 539 pode ser considerado como um bom candidato para estudos posteriores de produção e aplicação biotecnológica de queratinase em temperaturas baixas e moderadas.

Os resultados obtidos com a condução do presente estudo permitiram avanços na taxonomia de fungos do gênero *Pseudogymnoascus* mantidos na coleção de pesquisa do LAMAI (associada à CRM-UNESP), bem como revelam o potencial queratinolítico dos mesmos, abrindo novas perspectivas no campo da biotecnologia de microrganismos de ambientes extremos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUILETA, G.; MARTEY, S.; CHIAPELLO, H.; LEBRUN, M. H.; RODOLPHE, F.; FOURNIER, E.; GENDRAULT-, JACQUEMARD, A.; GIRAUD, T. Assessing the Performance of Single-Copy Genes for Recovering Robust Phylogenies. **Systematic Biology**, v. 57, p. 613-627, 2008.
- ARENZ, B.E., BLANCHETTE, R.A. Distribution and abundance of soil fungi in Antarctica at sites on the Peninsula, Ross Sea Region and McMurdo Dry Valleys. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 43, n. 2, p. 308–315, 2011.
- BACH, E. **Seleção, Identificação e Caracterização de Bactérias Queratinolíticas provenientes de solos Brasileiros**. 2010. 134 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) - Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.
- BARATO, M. B. **Fungos derivados da Antártica: biodiversidade e produção de enzimas lignocelulóticas a baixas e médias temperaturas**. 2014. 73 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas, Microbiologia Aplicada) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 2014.
- BERRES, P. H. D. **Utilização de resíduo da indústria de avicultura como substrato para a produção de hidrolisado enzimático com alto teor de proteína**. 2021. 40 f. Monografia Dissertação (Bacharelado em Engenharia de Alimentos) – Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos do Centro de Tecnologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2021.
- BLEHERT, D. S.; HICKS, A. C.; BEHR, M.; METEYER, U. C.; BERLOWSKI, M. B.; ELIZABETH, L.; BUCKLES, H. T. J.; COLEMAN, R. S.; GARGAS, D. A.; NIVER, R.; JOSEPH, C.; OKONIEWSKI, J. R.; RUDD, B. W.; STONE, B. Bat White-Nose Syndrome: An Emerging Fungal Pathogen? **Brevia**, v. 9, p. 227, 2009.
- BOHACZ, J.; KOWALSKA, T.; KITOWSKI, I; CIESIELSKA, A. Degradation of chicken feathers by *Aphanoascus keratinophilus* and *Chrysosporium tropicum* strains from pellets of predatory birds and its practical aspect. **International Biodeteriorant & Biodegradation**, v. 151, p. 964-968, 2020.
- CAMPBELL, J. L.; WALSH, P. D.; BLEHERT, S. D.; LORCH, M. J. Long-term survival of pseudogymnoascus destructans at elevated temperatures. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 56, p. 278-287, 2020.
- CARVALHO, C. R.; FERREIRA, M. C.; GONÇALVES, V. N.; OLIVEIRA, A. R. S.; SILVA, M. C.; CÂMARA, P. E. A. S.; ROSA, C. A.; ROSA, L. H. Cultivable fungi associated with bryosphere of bipolar mosses *Polytrichum alpinum* and *Polytrichum juniperinum* in King George Island South Shetland Islands Maritime Antarctica. **Polar Biology**, v. 43, p. 545-553, 2020.
- CHATURVEDI, V.; SPRINGER, J. D.; BEHR, J. M.; RAMANI, R.; LI, X.; PECK, K. M.; REN, P.; BOPP, J. D.; WOOD, B.; SAMSONOFF, A. W.; CALVIN M.; BUTCHKOSKI, C. A.; ALAN, C. H.; B. WARD, S. B.; RUDD, J. R.; CHATURVEDI, S. Morphological and Molecular

- Characterizations of Psychrophilic Fungus *Geomyces destructans* from New York Bats with White Nose Syndrome (WNS). **PLoS ONE**, v. 5, n.p, 2010.
- CONG, B.; XIAOFEI, Y.; AIFANG, D.; JIHONG, S.; YONGQI, T.; SHAOYUN, W.; HUANGHAO, Y. Diversity of Cultivable Microbes From Soil of the Fildes Peninsula, Antarctica, and Their Potential Application. **Frontier in Microbiology**, v. 11, n.p, 2020.
- CONVEY, P. Terrestrial biodiversity in Antarctica e Recent advances and future challenges. **Polar Science**, v. 4, p. 135-147, 2010.
- CONVEY, P. Antarctic terrestrial biodiversity in a changing world. **Polar Biology**, v. 34, p. 1629-1641, 2011.
- CORTEZI, M. **Isolamento de Microrganismos Produtores de Queratinase: Estudo da Biodegradação da Queratina oriunda de penas de abatedouro de frangos**. 2009. 138 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas, Microbiologia Aplicada) – Insituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 2009.
- CROUS, P. W.; COWAN, D. A.; MAGGS-KÖLLING, G.; YILMAZ, N.; LARSSON, E.; ANGELINI, C.; BRANDRUD, T. E.; DEARNALEY, J. D. W.; DIMA, B.; DOVANA, F.; FECHNER, N.; GARCÍA1, D.; GENÉ, J.; HALLING, R.E.; HOUBRAKEN, J.; LEONARD, P.; LUANGSARAD, J. J.; NOISRIPOOM, W.; REA-IRELAND, A. E.; ŠEVČÍKOVÁ, H.; SMYTH, C. W.; VIZZINI, A.; ...& GROENEWALD, J. Z. Fungal Planet description sheets: 951–1041. **Persoonia**, v. 43, p. 392-395, 2019.
- CROUS, P.W.; COWAN, D. A.; MAGGS-KÖLLING, G.4.; YILMAZ, N.; LARSSON, E.; ANGELINI, C.; BRANDRUD, T.E.; DEARNALEY, J. D. W.; DIMA, B.; DOVANA, F.; FECHNER, N.; GARCÍA, D.; GENÉ, J.; HALLING, R. E.; HOUBRAKEN, J.; LEONARD, P.; LUANGSARAD, J. J.; NOISRIPOOM, W.; REA-IRELAND, A. E.; ŠEVČÍKOVÁ, H.; SMYTH, C. W.; VIZZINI, A.; ...& GROENEWALD, J. Z. Fungal Planet description sheets: 1112–1181. **Personia**, v. 45, p. 354-355, 2020.
- CUNHA, G. A. M.; CÂMARA, P. E. A. S.; BEZERRA, O. H. P.; CONVEY, P.; CARVALHO, M. S.; SIMÕES, J. C.; ROSA, L. H. Fungi in the Antarctic Cryosphere: Using DNA Metabarcoding to Reveal Fungal Diversity in Glacial Ice from the Antarctic Peninsula Region. **Environmental Microbiology**, n. p, 2021.
- DEL FRATE, G.; CARETTA, G. Fungi isolated from Antarctic material. **Polar Biology**, v. 11, p.1-7, 1990.
- DE MAAYER, P.D.; ANDERSON, D.; CARY, C.; A COWAN, D. Some like it cold: understanding the survival strategies of psychrophiles. **EMBO Reports**, v. 15, n. 5, p.508-517, 2014.
- DÍAZ, A.; VILLANUEVA, P.; OLIVA, V.; DURÁN, C.; FIERRO, F.; CHÁVEZ, R.; VACA, I. Genetic Transformation of the Filamentous Fungus *Pseudogymnoascus verrucosus* of Antarctic Origin. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, 2019.

- DUARTE, A. W. F.; BARATO, M. B.; NOBRE, F. S.; POLEZEL, D. A.; DE OLIVEIRA, T. B.; DOS SANTOS, J. A.; RODRIGUES, A.; SETTE, L.D. Production of cold-adapted enzymes by filamentous fungi from King George Island, Antarctica. **Polar Biology**, v. 41, n. 12, p.2511-2521, 2018a.
- DUARTE, A. W. F.; SANTOS, J. A.; VIANNA, M. V.; VIEIRA, J. M. F.; MALLAGUTTI, V. H.; INFORSATO, F. J.; WENTZEL, L. C. P.; LARIO, L. D.; RODRIGUES, A.; PAGNOCCA, F. C.; PESSOA, A.; SETTE, L. D. Cold-adapted enzymes produced by fungi from terrestrial and marine Antarctic environments. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 38, p. 600- 619, 2018b.
- DUFFECK, C. E. **Prospecção de queratinases microbianas: produção e caracterização bioquímica funcional**. 2020. 57 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas, Microbiologia) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, 2020.
- EKANAYAKA, A. H.; HYDE, K. D.; GENTEKAKI, E.; MCKENZIE, E. H. C.; ZHAO, Q.; BULGAKOV, T.; CAMPORESI, E. Preliminary classification of Leotiomycetes. **Mycosphere**, v. 10, p. 310-489, 2019.
- FATTAH, A. M. A.; GAMAL, M. S.; ISMAIL, S. A.; EMRAN, M. A.; HASHEM, A.M. Biodegradation of feather waste by keratinase produced from newly isolated *Bacillus licheniformis* ALW1. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 16, p. 311-318, 2018.
- FERREIRA, A.; KUNH, S. S.; CREMONEZ, P. A.; DIETER, J.; TELEKEN, J. G.; SAMPAIO, S. C.; KUNH, P. D. Brazilian poultry activity waste: Destinations and energetic potential. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 81, p. 3081-3089, 2018.
- FRICK, W. F.; POLLOCK, J. F.; HICKS, A. C.; LANGWIG, K. E.; REYNOLDS, D. S.; TURNER, G. G.; BUTCHKOSKI, C. M.; KUNZ, T. H.; A emerging disease causes regional population collapse of a common north American bat species. **Science**, v. 329, p. 679-682, 2010.
- FRICK, W. F.; PUECHMAILLE, S. J.; WILLIS, C. K. R. **Bats in the Anthropocene: Conservation of Bats in a Changing World**, Chapter 9: Whine-nose syndrome in Bats, p. 245-262, 2016.
- FRIEDRICH, J.; GRADISAR, H.; MANDIN D.; CHAUMONT, J. P. Screening fungi for synthesis of keratinolytic enzymes. **Letters in Applied Microbiology**, v. 28, p. 127-130, 1999.
- FRIEDRICH, J.; GRADISAR, H.; MANDIN, D.; CHAUMONT, J. P. Screening fungi for synthesis of keratinolytic enzymes. **Letters in Applied Microbiology**, v. 28, n. 2, p. 127-130, 2002.
- GARGAS, A.; TREST, M. T.; CHRISTENSEN, M.; VOLK, T. J.; BLEHER, D. S. *Geomyces destructans* sp. nov. associated with bat white-nose syndrome. **Mycotaxon**, v. 108, p. 147-154, 2009.
- GARZOLI, L.; RICCUCCI, M.; PATRIARCA, E.; DEBERNARDI, P.; BOGGERO, A.; PECORARO, L.; PICCO, A. M. First isolation of *Pseudogymnoascus destructans*, the fungal causative agent of White-nose disease, in bats from Italy. **Mycopathologia**, v. 184, p. 637-644, 2019.

- GILICHINSKY, D.; RIVKINA, E.; BAKERMANS, C.; SHCHERBAKOVA, V.; PETROVSKAYA, L.; OZERSKAYA, S.; IVANUSHKINA, N.; KOCHKINA, G.; LAURINAVICHUIS, K.; PECHERITSINA, S.; FATTAKHOVA, R.; TIEDJE, J. M. Biodiversity of cryopegs in permafrost. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 53, n. 1, p. 117-128, 2005.
- GIUDICE, M. C. **Avaliação das atividades enzimáticas (queratinase e elastase) e biotipagem molecular de amostras de *Microsporum gypseum* isolados de diferentes fontes e regiões geográficas do Brasil**. 2008. 119 f. Tese (Doutorado em Ciências, Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.
- GOMES, E.C.Q.; GODINHO, V.M.; SILVA, D.A.S.; DE PAULA, M.T.R.; VITORELI, G.A.; ZANI, C.L.; ALVES, T.M.A.; JUNIOR, P.A.S.; MURTA, S.M.F.; BARBOSA, E.C.; OLIVEIRA, J.G.; OLIVEIRA, F.S.; CARVALHO, C.R.; FERREIRA, M.C.; ROSA, C.A.; ROSA, L.H. Cultivable fungi present in Antarctic soils: taxonomy, phylogeny, diversity, and bioprospecting of antiparasitic and herbicidal metabolites. **Extremophiles**, v.22, n.3, p.381-393, 2018.
- GONG, J.; YE, J.; TAO, L.; SU, C.; QIN, J.; ZHANG, Y.; LI, H.; XU, Z.; SHI, J. Efficient keratinase expression via promoter engineering strategies for degradation of feather wastes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 137, p. 1-8, 2020.
- GUPTA, R.; RAMNANI, P. Microbial Keratinases and their prospective applications: an overview. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 70, n. 1, p. 21-33, 2006.
- HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95–98, 1999.
- HAQ, I.; AKRAM, F.; JABBAR, Z. Keratinolytic enzyme-mediated biodegradation of recalcitrant poultry feathers waste by newly isolated *Bacillus* sp. NKSP-7 under submerged fermentation. **Folia Microbiologica**, v. 65, p. 823-834, 2020.
- HASSAN, A.; MOHAMED, A.; TAREK, H.; TAHA, B.; GAMAL, M.; HAMAD, C.; MOHAMED, H.; HASHEM.; ALAMRI, S.; YASSER, S.; MOSTAFA, D. Biochemical characterisation and application of keratinase from *Bacillus thuringiensis* MT1 to enable valorisation of hair wastes through biosynthesis of vitamin B-complex. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 153, p. 561-572, 2020.
- INFORSATO, F. J. **Fungos de sedimentos marinhos da Antártica: diversidade e prospecção de enzimas**. 2017. 134 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Microbiologia Aplicada) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 2017.
- KATOH, K.; ROZEWICKI, J.; YAMADA, K. D. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. **Briefings in Bioinformatics**, v. 18, n. 1, p.1-7, 2017.

- KOCHKINA, G.; IVANUSHKINA, N.; OZERSKAYA, S.; CHIGINEVA, N.; VASILENKO, O.; FIRSOV, S.; SPIRINA, E.; GILICHINSKY, D. Ancient fungi in Antarctic permafrost environments. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 82, n. 2, p. 501-509, 2012.
- LACERDA, L. T.; GUSMÃO, L. F. P.; RODRIGUES, A. Diversity of endophytic fungi in *Eucalyptus microcorys* assessed by complementary isolation methods. **Mycological Progress**, v. 17, n. 6, p. 719-727, 2018.
- LANGWIG, K. E.; FRICK, W. F.; HOYT, J. R.; PARISE, K. L.; DREES, K. P.; KUNZ, T. H.; FOSTER, J. T.; KILPATRICK, A. M. Drivers of variation in species impacts for a multi-host fungal disease of bats. **Philosophical Transactions B**, v. 371, n.p, 2016.
- LIMA, G.S.; FRANÇA, E. S.; ANDRADE, R. F. S.; LUNA, M. A. C.; LINS, U. M. B. L.; LIMA, R. A.; SYNGRED, M.; OKADA, K. Detection of keratinolytic activity by *Aspergillus* sp. and *Penicillium* sp. species using Chicken feather residue as alternative médium. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, p. 92063-92072, 2020.
- LUESCHOW, S. R.; JOHNSON, L. J. A. N.; WILLIAMS, T. F.; McCLEER, R.; ALFARO, A. P. Opportunistic *Pseudogymnoascus* and *Geomyces* species isolated from humans and bats. **Sydowia**, v. 71, p. 25-33, 2019.
- MARGESIN, R.; FELLER, G. Biotechnological applications of psychrophiles. **Environmental Technology**, v. 31, n. 8-9, p.835-844, 2010.
- MARTINEZ, J. P. O.; CAI, G.; NACHTSCHATT, M.; NAVONE, L.; ZHANG, Z.; ROBINS, K.; SPEIGHT, R. Challenges and Opportunities in Identifying and Characterising Keratinases for Value-Added Peptide Production. **Catalysts**, v. 10, n.p, 2020.
- MARTORELL, M. M.; RUBERTO, L. A. M.; FERNÁNDEZ, P. M.; DE FIGUEROA, L. I. C.; MAC COMARCK, W. P. Biodiversity and enzymes bioprospection of Antarctic filamentous fungi. *Antarctic Science*, v. 31, p. 3-12, 2018.
- MINNIS, A. M.; LINDNER, D. L. Phylogenetic evaluation of *Geomyces* and allies reveals no close relatives of *Pseudogymnoascus destructans*, comb. nov., in bat hibernacula of eastern North America. **Fungal Biology**, v. 117, n. 9, p. 38-649, 2013.
- NEWSHAM, K. K.; DAVEY, M. L.; HOPKINS, D. W.; DENNIS, P. G. Regional Diversity of maritime Antarctic soil fungi and predicted responses of guilds and growth forms to climate change. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, n.p, 2021.
- OGAKI, M. B.; COELHO, L. C.; VIEIRA, R.; NET, A. A.; ZANI, C. L.; ALVES, T. M. A; JUNIOR, P. A. S.; ...& ROSA, L. H. Cultivable fungi present in deep-sea sediments of Antarctica: taxonomy, diversity, and bioprospecting of bioactive compounds. **Extremophiles**, v. 24, p. 227-238, 2020.

- OUT, B.; BOYLE, S.; CHEEPHAM, N. Identification of fungi from soil in the Nakimu caves of Glacier National Park. **The Journal of Experimental Microbiology & Immunology**, v. 2, p. 26-32, 2016.
- PETER R. J.; LUIS, Q.; CHRISTOPHER, A. S.; HANS-OTTO, B.; TSUYOSHI, H.; CHRISTIANE, B.; KADRI, P.; WEN-YING, Z.; DANNY, H.; DUCKCHUL, P.; STEFFEN, C.; FRANCESC, L. G.; ZHENG, W.; JEFFREY, P. T. A multigene phylogeny toward a new phylogenetic classification of Leotiomycetes. **IMA Fungus**, v. 10, n.p, 2019.
- POVEDA, G.; GIL-DURÁN, C.; VACA, I.; LEVICÁN, G.; CHÁVEZ, R. Cold-active pectinolytic activity produced by filamentous fungi associated with Antarctic marine sponges. **Biological Research**, v. 51, n. 28, p. 2-6, 2018.
- PRECZESKI, K. P.; DALASTRA, C.; CZAPELA, F. F.; KUBENECK, S.; SCAPINI, T.; CAMARGO, A. F.; ZANIVAN, J.; BONATTO, C.; STEFANSKI, F. S.; VENTURIN, B.; FONGARO, G.; TREICHEL, H. *Fusarium oxysporum* and *Aspergillus* sp. As Keratinase Producers Using Swine Hair From Agroindustrial Residues. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, n. 71, p. 1-8, 2020.
- RICE, A. V.; CURRAH, R. S. Two new species of *Pseudogymnoascus* with Geomycesanamorphs and their phylogenetic relationship with *Gymnostellatospora*. **Mycologia**, v. 98, n. 2, p. 307-318, 2006.
- ROBICHEAU, B. M.; ADAMS, S.J.; PROVENCHER, J. F.; ROBERTSON, G. J.; MALLORY, M. K.; WALKER, A. K. Diversity and Keratin Degrading Ability of Fungi Isolated from Canadian Arctic Marine Bird Feathers. **Arctic Institute of North America**, v. 72, p. 347-359, 2019.
- RONQUIST, F.; TESLENKO, M.; van der Mark, P.; AYRES, D. L.; DARLING, A.; HÖHNA, S.; LARGET, B.; LIU, L.; SUCHARD, M. A.; HUELSENBECK, J. P. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. **Systematic Biology**, v. 61, n. 3, p. 539–542, 2012.
- ROSA, L. H.; PINTO, O. H. B.; CONVEY, P.; SILVA, M. C.; ROSA, C. A.; CÂMARA, P. E. A. S. DNA Metabarcoding to Assess the Diversity of Airborne Fungi Present over Keller Peninsula, King George Island, **Antarctica. Microbial Ecology**, v. 82, p. 165-172, 2021.
- RUISI, S.; BARRECA, D.; SELBMAN, L.; ZUCCONI, L.; ONOFRI, S. Fungi in Antarctica. **Reviews in Environmental Science and BioTechnology**, v. 6, n. 1, p. 127-141, 2007.
- SALES, M. R.; CAVALCANTI, M. T. H.; LIMA, J. L. F.; MOTTA, C. M. S.; PORTO, A. L. F. Utilização de penas de galinha para produção de queratinase por *Aspergillus carbonarius*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, p. 285-288, 2008.
- SANTOS, E. **Produção e Avaliação das aplicações de enzimas quitinolíticas e queratinolíticas**. 2011. 133 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2011.

- SANTOS, J. A. **Fungos de solos de recuo de geleiras Antárticas: Avaliação da diversidade e ecologia**. 2020. 185 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas, Microbiologia Aplicada) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 2020.
- SCHMITT, I.; CRESPO, A.; DIVAKAR, P. K.; FANHAUSER, J. D.; HERMAN-SACKETT, E.; KALB, K.; NELSEN, M. P.; NELSON, N. A.; RIVAS-PLATA, E.; SHIMP, A. D.; WIDHELM, T.; LUMBSCH, H. T. New primers for promising single-copy genes in fungal phylogenetics and systematics. **Persoonia**, v. 23, p. 35-40, 2009.
- SHI, T.; YU, Y.; DAI, J.; ZHANG, Y. T.; HU, W. P.; ZHENG, L.; SHI, Y. New Polyketides from the Antarctic Fungus *Pseudogymnoascus* sp. HSX2#-11. **Marine Drugs**, v. 19, n.p, 2021.
- SOUSA, M. A. **Otimização da Produção, Caracterização enzimática e Purificação de queratinases de fungos procedentes do solo, estocados na micoteca URM**. 2011. 143 f. Tese (Doutorado em Biologia de Fungos) – Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2011.
- SUYAL, C. D.; SONI, R.; YADAV, A. N.; GOEL, R. COLD Adapted Microorganisms Survival Mechanisms and Applications. **Microbiomes of Extreme Environments**, v. 1, p. 177-179, 2021.
- TURNER, J.; ANDERSON, P.; COPE, T. L.; COLWELL, S.; PHILLIPS, T.; KIRCHGAESSNER, A.; MARSHALL, G. J.; KING, J. C.; BRACEGIRDLE, T.; VAUGHAN, D. G.; LAGUN, V.; ORR1, A. Record low surface air temperature at Vostok station, Antarctica. **Journal of Geophysical Research**, v. 114, n.p, 2009.
- URBINA, J.; CHESTNUT, T.; ALLEN, J. M.; LEVI, T. *Pseudogymnoascus destructans* growth in wood, soil and guano substrates. **Nature Research**, v. 11, n.p, 2021.
- VARRELLA, S.; BARONE, G.; TANGHERLINI, M.; RASTELLI, E.; DELL’ANNO, A.; CORINALDESI, C. Diversity, Ecological Role and Biotechnological Potential of Antarctic Marine Fungi. **Journal of Fungi**, v. 7, n.p, 2021.
- VIDMAR, B.; VODOVNIK, M. Microbial Keratinases: Enzymes with Promising Biotechnological Applications. **Food Technology e Biotechnology**, v. 56, n. 3, p. 312-328, 2018.
- VIEIRA, G.; PURÍC, J.; MORÃO, L. G.; DOS SANTOS, J. A.; INFORSATO, F. J.; SETTE, L. D.; FERREIRA, H.; SASS, D. C. Terrestrial and marine Antarctic fungi extracts active against *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 67, n. 1, p. 64-71, 2018.
- VILLANUEVA, P.; VÁSQUEZ, G.; DURÁN, C.G.; OLIVA1, V.; DÍAZ, A.; HENRÍQUEZ, M.; ÁLVAREZ, E.; LAICH, F.; CHÁVEZ, R.; VACA, I. Description of the First Four Species of the Genus *Pseudogymnoascus* From Antarctica. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, n.p, 2021.
- VISHNIAC, H. S. Biodiversity of yeasts and filamentous microfungi in terrestrial Antarctic ecosystems. **Biodiversity and Conservation**, v. 5, p. 1365-1378, 1996.
- WENTZEL, L. C. P. **Diversidade de fungos de solos antárticos e prospecção de enzimas ligninolíticas**. 2017. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas, Microbiologia Aplicada) -

Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 2017.

WHITE, T. J. et al. PCR Protocols: a guide to method and applications In: INNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; SNINSKY, J. J.; WHITE, T. J. (ed.) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal rRNA genes for phylogenetics. San Diego: Academic Press, p. 315-352, 1990.

XIA, Q.; RUFTY, T.; SHI, W. Predominant Microbial Colonizers in the Root Endosphere and Rhizosphere of Turfgrass Systems: *Pseudomonas veronii*, *Janthinobacterium lividum*, and *Pseudogymnoascus* spp. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, n.p, 2021.

ZHANG, Z.; DONG, C.; CHEN, W.; MOU, Q.; LU, X.; HAN, Y.; HUANG, J.; LIANG, Z. The Enigmatic Thelebolaceae (Thelebolales, Leotiomycetes): One New Genus *Solomyces* and Five New Species. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, n.p, 2020.

ZHANG, Z. Y.; SHAO, Q. Y.; LI, X.; CHEN, W. H.; LIANG, J. D.; HAN, Y. F.; HUANG, J. Z.; LIANG, Z. Q. Culturable Fungi from Urban Soils in China I: Description of 10 New Taxa. **Microbiology Spectrum**, v. 9, n.p, 2021.

ZUCCONI, L.; CANINI, F.; TEMPORITI, M. E.; TOSI, S. Extracellular Enzymes and Bioactive Compounds from Antarctic Terrestrial Fungi for Bioprospecting. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 17, n.p, 2020.