



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS – RIO CLARO



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
MICROBIOLOGIA APLICADA

**Caracterização e Identificação Taxonômica de Fungos do Gênero
Cladosporium Isolados de Amostras Marinhas e Terrestres da
Antártica**

FLÁVIO LOURENÇÃO SIMONETTI

**Rio Claro – SP
2023**



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS – RIO CLARO



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
MICROBIOLOGIA APLICADA

Caracterização e Identificação Taxonômica de Fungos do Gênero *Cladosporium* Isolados de Amostras Marinhas e Terrestres da Antártica

FLÁVIO LOURENÇÃO SIMONETTI

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 – Microbiologia Aplicada.

Orientador: Profa. Dra. Lara Durães Sette (UNESP/Rio Claro)
Coorientadora: Dra. Lucélia Cabral

**Rio Claro – SP
2023**

S598c	Simonetti, Flávio Lourenção Caracterização e Identificação Taxonômica de Fungos do Gênero Cladosporium Isolados de Amostras Marinhas e Terrestres da Antártica / Flávio Lourenção Simonetti. -- Rio Claro, 2023 57 f. : il., tabs., fotos Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro Orientadora: Lara Durães Sette Coorientadora: Lucélia Cabral 1. Antártica. 2. Cladosporium. 3. Taxonomia. 4. Biomoléculas. 5. Resistência. 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: Caracterização e Identificação Taxonômica de Fungos do Gênero *Cladosporium* Isolados de Amostras Marinhas e Terrestres da Antártica

AUTOR: FLÁVIO LOURENÇÃO SIMONETTI

ORIENTADORA: LARA DURÃES SETTE

COORIENTADORA: LUCÉLIA CABRAL

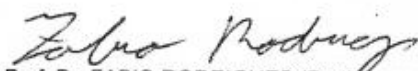
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas (Microbiologia Aplicada), área: Microbiologia Aplicada pela Comissão Examinadora:



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



Profa. Dra. JULIANA APARECIDA DOS SANTOS (Participação Virtual)
Univás / Universidade do Vale do Sapucaí



Prof. Dr. FABIO RODRIGUES (Participação Virtual)
Departamento de Química Fundamental / Universidade de São Paulo

Rio Claro, 02 de março de 2023

Dedico esse trabalho aos meus pais, Antonio Flavio Simonetti e Mirian Claudia Lourenção. Eu sempre amei, e sempre amarei vocês.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer à minha orientadora, professora Lara Durães Sette, por ter me aceitado como aluno, por toda a orientação dada e pela consideração de me atribuir um gênero tão interessante de fungos para estudar.

Gostaria de agradecer à minha coorientadora, Lucélia Cabral, por toda a paciência e conhecimento que me passou.

Aos amigos e colegas do LAMAI, os quais sempre estavam disponíveis para me ajudar e orientar.

Ao pessoal do LESF, que também participaram e auxiliaram no desenvolvimento desse trabalho.

A todos os docentes, técnicos do Departamento de Bioquímica e Microbiologia que auxiliaram e que também estavam sempre dispostos a ajudar.

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

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), processo 407986/2018-9.

À UNESP, e a todos que ajudam a financiar a UNESP, pela possibilidade de continuar estudando.

À minha família, sem vocês eu não teria tido essa oportunidade.

Resumo

O reino Fungi apresenta uma ampla diversidade de organismos, encontrados em praticamente todos os ecossistemas conhecidos do planeta. De acordo com especialistas, o número de espécies conhecidas é apenas uma fração do número estipulado de espécies existentes. Os fungos desenvolvem adaptações para colonizarem e lidarem com as condições adversas dos ambientes considerados extremos, como o ambiente antártico. Algumas dessas adaptações possuem potencial para aplicação biotecnológica, incluindo enzimas que são adaptadas ao frio e substâncias bioativas, como a melanina, que protege esses organismos contra uma alta incidência de radiação UV. O presente estudo teve como objetivo avaliar o crescimento em diferentes temperaturas (5, 10, 15, 20, 25 e 30°C), salinidade (5, 10, 15, 20 e 25% NaCl), meios de cultura (MA2%, BDA, BDA1% e SNA) e sob radiação UV (UVB e UVC) de oito fungos do gênero *Cladosporium* (L.564; L.595; L.598; L.616; L.1345; L.1369; L.1800 e L.2541) isolados de amostras marinhas e terrestres do ambiente antártico, bem como a caracterização e a taxonômica molecular. Os isolados L.595, L.616 e L.1369 cresceram em uma ampla faixa de temperatura (de 5 a 30°C), podendo ser explorados quanto a produção de enzimas adaptadas ao frio. Esses mesmos isolados apresentaram uma boa tolerância a concentrações elevadas de NaCl (15%). Em adição, os isolados L.564, L.595 e L.1800 apresentaram uma alta resistência contra os dois tipos de radiação UV testados e são promissores quanto a produção de substâncias fotoprotetoras. Dentre todos os *Cladosporium* estudados, o isolado L.595 se destacou, apresentando um bom crescimento em todas as temperaturas testadas, todos os meios de cultura avaliados, uma boa tolerância quando exposto a elevadas concentrações salinas e uma maior resistência contra radiação UVB e UVC. Com base nos estudos de taxonomia molecular (sequenciamento do gene marcador *act* e análises filogenéticas deste gene concatenado com a região ITS) foi possível avaliar as relações entre os isolados antárticos e as espécies mais próximas. Os isolados L.595 e L.616 são filogeneticamente próximos e fisiologicamente semelhantes podendo pertencer à mesma espécie de *Cladosporium*. O mesmo ocorreu para os isolados L.564 e L.1800. Os isolados L.598 e L.1369 se

mostraram filogeneticamente próximos, porém, divergiram quanto ao crescimento nos diferentes parâmetros testados. Por outro lado, os isolados L.1345 e L.2541 não se assemelharam com nenhum dos outros isolados antárticos, apresentando proximidade filogenética com espécies distintas de *Cladosporium*. Análises moleculares adicionais (usando o marcador *tefl*) são necessárias para a caracterização taxonômica mais acurada desses isolados. Os resultados desse estudo destacam os *Cladosporium* antárticos como novos recursos microbianos com potencial aplicação biotecnológica e abrem novas perspectivas no campo da microbiologia aplicada de fungos extremófilos.

Palavras-chave: Antártica, *Cladosporium*, taxonomia, biomoléculas, resistência.

Abstract

The fungi kingdom harbors a huge diversity of organisms, which can be found in virtually all environments on the planet. According to experts, the number of known species is just a fraction of the estimated existing species. Fungus developed many different adaptations to colonize and resist environments considered extreme, like the Antarctic environment. Some of these adaptations have the potential to be exploited for biotechnology purposes, including cold-adapted enzymes and bioactive substances, such as melanin, which is able to protect these microorganisms against high dosages of UV radiation. The present study aimed at the evaluation of growth at different temperatures (5, 10, 15, 20, 25 and 30°C), salinity (5, 10, 15, 20 and 25% NaCl), culture media (MA2%, BDA, BDA1% and SNA), and under UV radiation (UVB and UVC) of eight fungi belonging to the genus *Cladosporium* (L.564; L.595; L.598; L.616; L.1345; L.1369; L.1800 e L.2541) isolated from marine and terrestrial samples from the Antarctic environment, as well as the molecular taxonomic characterization. The isolates L.595, L.616 and L.1369 were able to grow in a wide range of temperatures (5 to 30°C), showing promising results for the bioprospection of cold-adapted enzymes. These same isolates showed good tolerance to high concentrations of NaCl (15%). In addition, isolates L.564, L.595 and L.1800 showed high resistance against the two types of UV radiation tested, being promising for the production of photoprotective substances. Among all *Cladosporium* studied, isolate L.595 stood out, growing at all temperatures tested, showing good growth in all culture media evaluated, tolerance when exposed to high saline concentrations, in addition to having demonstrated the highest resistance against radiation UVB and UVC. Based on molecular taxonomy (sequencing of the *act* marker gene and phylogenetic analyzes of this gene concatenated with the ITS region) it was possible to assess the relationships between the Antarctic isolates and the closest species. Isolates L.595 and L.616 are phylogenetically close and physiologically similar, and may be from the same species of *Cladosporium*. The same occurred for isolates L.564 and L.1800. The isolates L.598 and L.1369 were phylogenetically similar, however, they differed in terms of growth in the different

parameters tested. Furthermore, isolates L.1345 and L.2541 did not resemble any of the other Antarctic isolates, showing phylogenetic proximity to different species of *Cladosporium*. Additional molecular analyzes (using the marker *tef1*) are necessary for more accurate taxonomic characterization of these isolates. The results of the present study highlight Antarctic *Cladosporium* as new microbial resources with potential biotechnological application and open new perspectives in the field of applied microbiology of extremophile fungi.

Keywords: Antarctica, *Cladosporium*, taxonomy, biomolecules, resistance.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mapa ilustrando as três sub-regiões antárticas.....	16
Figura 2: Identificação taxonômica através do uso de técnicas moleculares.....	20
Figura 3: Características fenotípicas dos oito isolados antárticos.....	26
Figura 4: Gráficos demonstrando o crescimento dos isolados em diferentes meios.....	36
Figura 5: Gráfico demonstrando a resistência dos isolados contra radiação UVB.....	41
Figura 6: Gráfico demonstrando a resistência dos isolados contra radiação UVC.....	42
Figura 7: Árvore filogenética gerada a partir da sequência da região ITS.....	47
Figura 8: Árvore filogenética gerada a partir dos marcadores concatenados ITS- <i>act</i> ...	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Informações acerca dos oito isolados utilizados nesse trabalho.....	25
Tabela 2: Primer utilizados para amplificação de DNA.....	29
Tabela 3: Reação de amplificação para isolados L.595; L.616 e L.1345.....	29
Tabela 4: Reação de amplificação para isolados L.564 e L.2541.....	29
Tabela 5: Reação de amplificação para isolados L.598 e L.1369.....	30
Tabela 6: Reação de amplificação para isolado L.1800.....	30
Tabela 7: Crescimento dos oito isolados em diferentes temperaturas.....	33
Tabela 8: Crescimento dos oito isolados em diferentes concentrações de NaCl.....	38

ABREVIATURA E SINGLAS

BDA: batata desxtrose agar

BDA1%: batata dextrose agar 1%

MA2%: malt extract 2%

SNA: synthetic poor nutriente agar

mm: milímetros

UVB: radiação ultravioleta B

UVC: radiação ultravioleta C

SUMÁRIO

1. Introdução.....	15
2. Revisão Bibliográfica.....	16
2.1 O Ambiente Antártico.....	16
2.2 <i>Cladosporium</i> : Taxonomia e Aspectos Gerais.....	18
2.3 <i>Cladosporium</i> : Possíveis Aplicações Biotecnológicas.....	22
3. Objetivos.....	24
3.1 Objetivos Específicos.....	24
4. Materiais e Métodos.....	24
4.1 Microrganismos.....	24
4.2 Crescimento em Diferentes Temperaturas.....	27
4.3 Ensaio de Resistência a Radiação UV.....	27
4.3.1 Seleção de isolados resistentes a radiação UVB e UVC.....	27
4.4 Crescimento em Meios de Cultura BDA, MA2%, BDA1% e SNA.....	27
4.4 Crescimento em Diferentes Concentrações Salinas.....	28
4.6 Taxonomia Molecular.....	28
4.6.1 Extração, quantificação e verificação da integridade de DNA.....	28
4.6.2 Amplificação de DNA por PCR.....	28
4.6.3 Purificação e Quantificação dos Produtos de Amplificação por PCR.....	31
4.6.4 Clonagem e Sequenciamento.....	31
4.6.5 Montagem dos Contigs e Análises das Sequências.....	31
5. Resultados e Discussão.....	32
5.1 Crescimento em diferentes temperaturas.....	32
5.2 Crescimento em Meios de Cultura BDA, MA2%, BDA1% e SNA.....	34
5.3 Crescimento em Diferentes Concentrações Salinas.....	37
5.4. Seleção de isolados resistentes à radiação UVB e UVC.....	40
5.5. Taxonomia Molecular.....	45
6. Conclusões.....	51
7. Referências Bibliográficas.....	52

1. Introdução

Estima-se que existam entre 2 e 3,8 milhões de espécies distintas de fungos (HAWKSWORTH; LÜCKING, 2017), das quais muitas são consideradas como possíveis fontes de recursos naturais (biomoléculas) que podem ser explorados e transformados em uma série de produtos comercializáveis. Fungos são conhecidos por serem os principais decompositores de matéria orgânica no ambiente onde vivem, além de várias espécies serem causadoras de doenças em humanos, plantas e animais. A identificação correta, em nível de espécie é de suma importância para o aperfeiçoamento dos estudos desse grupo de organismos, tanto para a geração de conhecimento básico em ecologia e taxonomia, quanto para as possíveis aplicações biotecnológicas (RAJA et al., 2017).

Dentre os vários gêneros de fungos conhecidos, *Cladosporium* se destaca por ser um grupo generalista e cosmopolita, encontrado em diversos ecossistemas, possuindo uma grande facilidade de se dispersar, colonizar e se adaptar a novos habitats (BENSCH et al., 2012). Diversas características morfofisiológicas permitem que espécies desse clado sobrevivam em ambientes e condições consideradas extremas para a maioria dos seres vivos, gerando adaptações (LOPERENA et al., 2012), as quais podem ser exploradas devido ao seu alto potencial de aplicação biotecnológica (RAJA et al., 2017).

O ambiente antártico se caracteriza por apresentar algumas das condições mais inóspitas para a existência de seres vivos, tanto que organismos vivendo nesse ecossistema são usados como modelo para estudos astrobiológicos acerca da possibilidade de vida em outros planetas (ONOFRI et al., 2008). Para sobreviverem, as espécies biológicas encontradas nesse ambiente desenvolveram adaptações que as permitem prosperar, apesar das condições adversas. Essas adaptações podem resultar na produção de biomoléculas com propriedades específicas para aplicação biotecnológica (LOPERENA et al., 2012), o que faz do ambiente antártico uma fonte de recursos genéticos microbianos diferenciados (WENTZEL et al., 2019).

Com base nesses aspectos, o ambiente antártico se torna atrativo do ponto de vista científico. Atualmente sabe-se que existe uma variada gama de microrganismos capazes de sobreviver nesse ambiente, incluindo representantes do gênero *Cladosporium*. Do ponto de vista biotecnológico, isso representa uma grande oportunidade de se buscar novas biomoléculas e substâncias bioativas de interesse industrial e farmacêutico, ainda desconhecidas. A caracterização, ou seja, a realização

de experimentos direcionados que visam acionar ou não mecanismos do organismo estudado sobre diferentes condições para estimular uma resposta, dos fungos aqui estudados, ajuda a direcionar essa busca. O grupo de pesquisa coordenado pela Profa. Dra. Lara Sette vem estudando os fungos da Antártica desde 2010 com foco na diversidade e aplicação biotecnológica desses organismos. Esse trabalho busca gerar e ampliar o conhecimento acerca de microrganismos dessa localidade do planeta.

2. Revisão Bibliográfica

2.1 O Ambiente Antártico

A antártica pode ser dividida em três sub-regiões (Figura 1). A primeira região, conhecida como antártica continental, é uma massa de terra, coberta por gelo, e que impõe aos organismos ali presentes as condições mais adversas, dentre as três. A segunda é a zona marítima, ou antártica marítima que se delimita claramente na área contendo a Península Antártica, o seu entorno e ilhas próximas, apresentando condições climáticas mais brandas do que a continental, com verões mais quentes e gelo cobrindo uma grande parte da superfície do mar nos invernos. A terceira e última parte, a zona subantártica, é formada por um grupo de ilhas, espalhadas numa grande massa oceânica, sendo a mais amena, com temperaturas mais quentes ao longo de todo o ano e, justamente por essas condições, apresenta a maior diversidade biológica (BÖLTER; BEYER; STONEHOUSE, 2002).

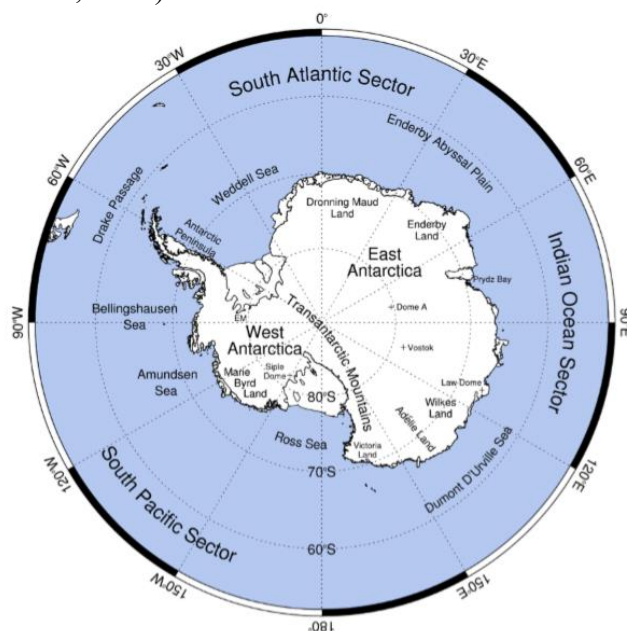


Figura 1. Mapa que engloba as três sub-regiões, que juntas, formam a Antártica. A grande massa terrestre representa a antártica continental. A zona marítima pode ser claramente

delimitada pelo entorno da Península Antártica. A zona subantártica contém diversas ilhas, espalhadas sobre uma grande massa oceânica que circunda as outras duas subregiões (Fonte: adaptado de Turner et al., 2009).

O ecossistema antártico, tanto continental, quanto marítimo, é considerado um dos ambientes mais extremos conhecidos pelo ser humano. Nessa localidade do planeta, a grande maioria da água presente na área continental (aproximadamente 99,68%) está indisponível por encontrar-se na forma de gelo e neve (SINGH; DUBEY; SINGH, 2011). Além disso, a Antártica também se caracteriza por temperaturas baixas, podendo chegar a -40°C (TINDALL, 2004), alta incidência de raios UV, ciclos de congelamento e descongelamento, alta salinidade, baixa quantidade de nutrientes disponíveis e longos períodos de escuridão (WENTZEL et al., 2019).

Apesar das condições climáticas e ecológicas extremas, o ecossistema antártico suporta uma variedade de organismos. Entre os microrganismos encontrados na Antártica destacam-se bactérias, fungos e microalgas. Entre as plantas, os representantes mais comuns são líquens e briófitas, além de duas espécies de angiospermas: *Colobanthus quitensis* e *Deschampsia antarctica*. Na Antártica também são encontrados diversos invertebrados, incluindo insetos, aracnídeos e crustáceos, bem como espécies de animais marinhos como esponjas, anêmonas e corais. Entre os animais considerados mais complexos, se destacam pinguins e outras aves marinhas, como mandriões e pardelas e alguns mamíferos marinhos, como focas e baleias (TURNER et al., 2009).

Os microrganismos que habitam o ambiente antártico apresentam adaptações que os permitem prosperar, apesar das condições extremas presentes nesse ambiente (DUARTE et al. 2018). Em baixas temperaturas, a membrana plasmática se torna menos fluida, mais rígida. Por causa disso, esses microrganismos possuem alterações na membrana que a permite reter a sua fluidez, como, por exemplo, uma proporção maior de lipídios insaturados, de cadeia menor (LOPERENA et al., 2012). Também já foi observada a presença de proteínas anticongelantes e enzimas que possuem o seu ponto máximo de atividade enzimática em baixas temperaturas (WENTZEL et al., 2019). Além disso, alguns possuem pigmentos, os quais concedem proteção contra a radiação ultravioleta (KOSTADINOVA et al., 2009).

Vários gêneros de fungos filamentosos já foram isolados a partir de amostras de solo, ar, sedimento marinho e em associação com plantas e animais. Dentre eles, destacamos representantes dos gêneros *Acremonium*, *Cadophora*, *Cladosporium*,

Chrysosporium, *Verticillium*, *Penicillium*, *Phoma*, *Pseudogymnoascus*, *Thelebolus*, *Geomyces*, *Mortierella* e *Mucor* (BÖLTER; BEYER; STONEHOUSE, 2002; DUARTE et al., 2018; SANTOS; MEYER; SETTE, 2020). Muitos desses grupos pertencem a fungos considerados cosmopolitas, como *Cladosporium*, que são encontrados em outras regiões do planeta (TOSI et al., 2002). Contudo, sabe-se que existem grupos e espécies endêmicas, como, por exemplo, a levedura *Cryptococcus vishniacii* encontrada apenas no Dry Valleys, um local na antártica continental que se caracteriza pela ausência de neve (VISHNIAC; HEMPFLIN, 1979). Wentzel e colaboradores (2019) mencionam a existência de possíveis novas espécies de fungos, endêmicas da Antártica, isoladas de sedimentos marinhos e de amostras de solo, resultantes de análises moleculares e filogenéticas.

Muitos desses fungos acabam chegando no ambiente antártico através de animais, como aves ou invertebrados (TOSI et al., 2002), ou simplesmente trazidos pelo vento, uma vez que alguns gêneros, como *Cladosporium*, liberam uma grande quantidade de conídios que são carregados pelo ar (MARSHALL, 1997). A atividade humana pode também contribuir para a dispersão de fungos, nos ambientes antárticos. Alguns grupos são encontrados apenas nas proximidades de estações ocupadas ou abandonadas. A introdução desses microrganismos se torna preocupante do ponto de vista ecológico. Um exemplo disso é o caso de um ascomiceto, *Aspergillus fumigatus*, conhecido por causar aspergilose aviária. Esse fungo foi isolado de amostras de solo de uma colônia, aonde se encontram aproximadamente 150.000 pinguins da espécie *Pygoscelis adeliae*. Acredita-se que essa espécie fúngica tenha sido introduzida pela ocupação humana na área (BÖLTER; BEYER; STONEHOUSE, 2002).

2.2 *Cladosporium*: Taxonomia e Aspectos Gerais

O gênero *Cladosporium* pertence ao filo Ascomycota e foi descrito pela primeira vez em 1816, por Link, o qual usou *Cladosporium herbarum* como espécie tipo (CROUS et al., 2007). Por muito tempo, o gênero *Cladosporium* foi reconhecido como sendo um dos maiores e mais heterogêneo grupo de fungos, contendo mais de 772 espécies. No entanto, estudos mais recentes apenas reconhecem 170 espécies verdadeiras de *Cladosporium* (BENSCH et al., 2015), as quais encontram-se distribuídas em três grandes complexos de espécies reconhecidos principalmente com base na morfologia: *C. herbarum*, *C. sphaerospermum* e *C. cladosporioides* (BENSCH et al., 2018). Esses fungos estão distribuídos de forma cosmopolita, e podem ser

encontrados e isolados de vários substratos, incluindo plantas, outros fungos, solo, alimentos, produtos têxteis, entre outros (CROUS et al., 2007). A grande maioria das espécies de *Cladosporium* são sapróbias, mas também existem espécies endófitas; parasitas de plantas e outros fungos e patógenas de animais, incluído seres humanos (ITURRIETA-GONZÁLEZ; GARCÍA; & GENÉ, 2021).

O uso de informações moleculares para a identificação de fungos começou há mais de duas décadas, quando White e colaboradores (1990) descreveram os *primers* usados para sequenciar regiões distintas do RNA ribossomal desses organismos. Esses *primers* foram usados para formar sequências a partir da subunidade maior (nrLSU-26S), da subunidade menor (nrSSU-18S) e de toda a região ITS (ITS1, 5.8S, ITS2). A porção SSU possui as menores taxas de evolução e de variação, sendo, portanto, mais útil para estudar organismos distantemente relacionados. Já a porção ITS apresenta as maiores taxas de evolução e variação, sendo melhor para comparar organismos mais próximos (WHITE et al., 1990). Por exemplo, a região SSU é usada principalmente na identificação de fungos em níveis taxonômicos mais elevados, como classe e ordem. Para os níveis de família e gênero, é usada a região LSU, que possui taxas de evolução e variação genética intermediárias. Já a região ITS é usada preferencialmente na identificação no nível de espécie. Além disso, a região ITS possui certas vantagens, como facilidade de amplificação e uso disseminado na literatura e, por ser o marcador com a maior probabilidade de identificação correta para uma ampla variedade de fungos, acabou sendo escolhida como o marcador taxonômico oficial (*barcode*) para esses organismos (RAJA et al., 2017).

Apesar de apresentar um bom desempenho na identificação de fungos, a região ITS possui certa limitação. Esse marcador taxonômico não apresenta uma resolução clara quando usado com gêneros altamente diversos, como *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium* e *Trichoderma* devido a alta conservação. Uma maneira de contornar esse problema é o uso de marcadores secundários, como, por exemplo, regiões de genes que codificam proteínas (RAJA et al., 2017). Um esquema ilustrado do processo de identificação taxonômica usando a abordagem molecular está apresentado na figura 2.

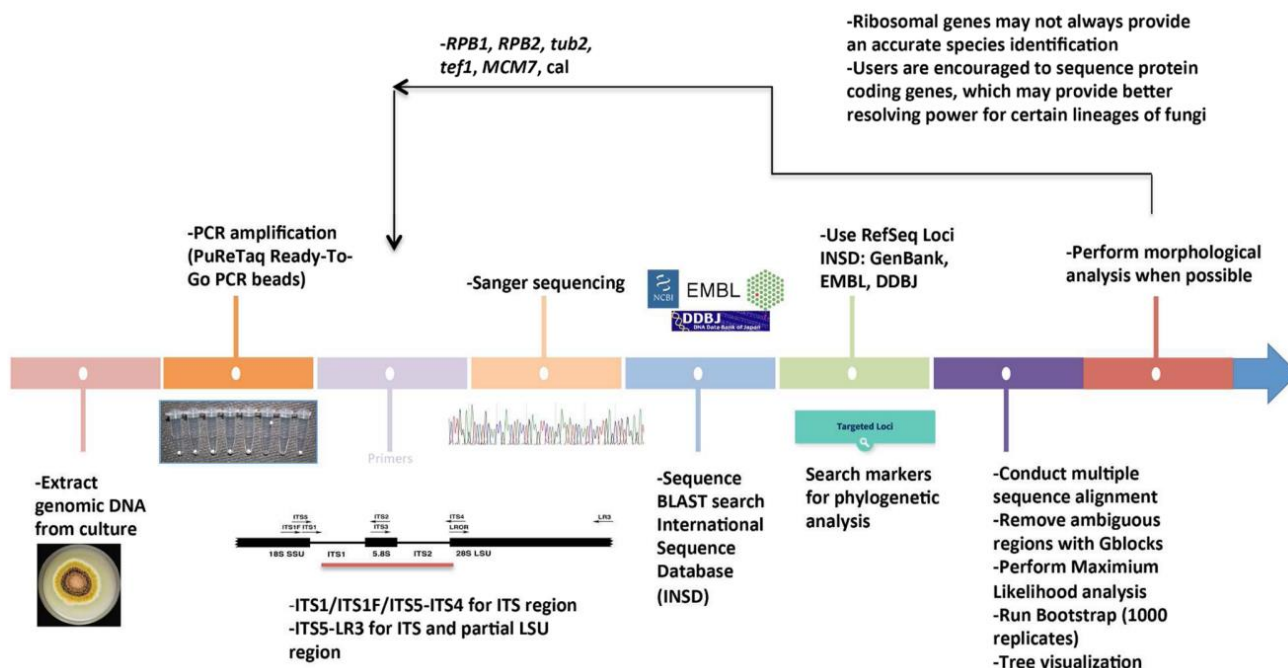


Figura 2: Esquema ilustrativo do processo de identificação taxonômica com base em técnicas moleculares (Fonte: adaptado de Raja et al., 2018).

Tratando-se de *Cladosporium* existem vários exemplos de como estudos com base em informações moleculares ajudaram a aprimorar o conhecimento desse gênero. Wirsal et al. (2002) analisaram amostras de *Cladosporium* associadas a planta *Phragmites australis*, usando o marcador ITS. As sequências geradas foram comparadas com sequências depositadas no *GenBank* e com culturas pertencentes à CBS-KNAW, resultando na classificação taxonômica de três espécies distintas. Além dessas sequências baseadas no marcador ITS, também foram geradas duas outras filogenias, uma baseada na capacidade dos fungos para metabolizar diferentes fontes de carbono e outra baseada em sequências originadas de um gene que codifica proteínas de actina. A filogenia baseada nessa proteína codificadora demonstrou uma melhor resolução, quando comparada a filogenia gerada apenas a partir do marcador ITS.

Schubert e colaboradores (2007) mostraram a importância de se usar diversos marcadores taxonômicos para gerar filogenias mais confiáveis, principalmente em grupos altamente diversos como *Cladosporium*, ao utilizarem marcadores oriundos de cinco genes distintos, para a análise no nível de espécie. Entre esses cinco marcadores, estavam o marcador ACT, derivado de um gene responsável por expressar proteínas de

actina, e o marcador EF-1, originado de um gene que expressa proteínas responsáveis por auxiliar no processo de síntese proteica. Além desses dois, também foram usados o marcador ITS, o marcador calmodulina (CAL) e o marcador de histonas H3 (HIS).

Fungos do gênero *Cladosporium*, ao longo dos anos, foram extensivamente estudados e revisados, com a finalidade de clarificar a complexa estrutura filogenética e taxonômica do grupo. Bensch e colaboradores (2018) fizeram uma análise molecular usando o marcador ITS e os marcadores secundários *act* e *tef1*, a fim de aprofundar o conhecimento de espécies de *Cladosporium* encontradas em ambientes fechados. Os pesquisadores foram capazes de discernir dezesseis novas espécies, das quais seis são pertencentes ao complexo *C. cladosporioides*; quatro pertencendo ao complexo *C. herbarum* e seis ao complexo *C. sphaerospermum*. O estudo reporta que, apenas a identificação puramente morfológica para membros desse grupo de fungos não é mais possível. Em estudos passados, espécies distintas pertencentes ao complexo *C. cladosporioides* apresentaram características morfológicas indistinguíveis entre si. O uso de informações moleculares se tornou indispensável para a identificação correta de novas espécies.

Cladosporium formam conídios pequenos, em grandes quantidades, e que se desprendem facilmente, tornando-os bem-adaptados e permitindo que se espalhem por longas distâncias. Entre todos os gêneros de fungos, os conídios de *Cladosporium* são os mais comumente isolados a partir do ar de qualquer ambiente onde se encontram (BENSCH et al., 2012).

Outra adaptação interessante do gênero é a presença de pigmentos de melanina em sua parede celular, os quais concedem uma cor mais escura, acastanhada, aos fungos desse gênero, e que, em parte, são responsáveis pelo sucesso adaptativo em *Cladosporium* (SAN-BLAS et al., 1996; LLORENTE et al., 2012). Melaninas são pigmentos hidrofóbicos, de alto peso molecular, compostos principalmente de vários monômeros fenólicos e indólicos, normalmente associados com carboidratos e proteínas (WONG et al., 2019). Em fungos, se conhece três tipos diferentes de melaninas: eumelaninas, as quais concedem uma cor escura ou marrom; feomelaninas, as quais concedem uma cor amarelada e avermelhada e alomelaninas (WONG et al., (2019). Esses pigmentos concedem ação fotoprotetora ao organismo, além de os protegerem de outras condições ambientais inóspitas, incluindo temperaturas extremas, exposição a metais pesados, alterações de pH, radiação ionizante e UV e mudanças osmóticas bruscas (GESSLER; EGOROVA; BELOZERSKAYA, 2014).

3.3 *Cladosporium*: Possíveis Aplicações Biotecnológicas

Cladosporium spp. são especialmente atrativos do ponto de vista de produção e comercialização de biomoléculas, com o potencial de produção de substâncias de interesse, incluindo biossurfactantes, enzimas, proteínas, compostos biocondutores, entre outras. Espécies do gênero *Cladosporium* encontradas no ambiente antártico foram reportados como capazes de produzir enzimas adaptadas a temperaturas baixas, como as xilanases (DUARTE et al., 2018). No âmbito industrial, enzimas adaptadas ao frio apresentam alta atividade em temperaturas de operação baixas e moderadas, resultando em economia de energia, além disso, também são estáveis em temperaturas mais elevadas e necessitam de uma energia de ativação menor (WENTZEL et al., 2019).

Representantes do gênero *Cladosporium* foram reportados como produtores de L-asparaginase, uma enzima usada na indústria de alimento, para reduzir a formação de acrilamida em alimentos a base de amido. Essa enzima também é usada no tratamento contra leucemia linfóide aguda e linfoma não-Hodgkin. Essa terapia anticancerígena se baseia na capacidade da L-asparaginase de quebrar L-asparagina, um aminoácido essencial para o desenvolvimento e crescimento de linfoblastos. Um dos problemas enfrentados por pacientes que se submetem a esse tratamento é o surgimento de alergias, devido ao tipo de microrganismo usado para produzir a enzima. *E. coli* é um dos organismos utilizados na manufatura dessa enzima, e isso pode acarretar em problemas de toxicidade em certos indivíduos. Uma maneira de contornar esse problema é encontrar novos organismos capazes de sintetizar essa enzima. De acordo com Mohan Kumar e Manonmani (2013) fungos do gênero *Cladosporium* se mostraram promissores nesses aspectos, tanto para a indústria alimentícia, quanto para o tratamento de câncer.

Outra aplicação dos representantes desse grupo é na produção de substâncias biossurfactantes, que possuem propriedades capazes de reduzir a tensão superficial de líquidos, estabilizar emulsificações e promover a formação de espuma. Biossurfactantes, diferentemente de surfactantes químicos, normalmente não apresentam toxicidade, além de serem biodegradáveis, o que torna o seu uso ainda mais atrativo. Por causa disso, o seu uso na produção de cosméticos, na indústria de alimentos e na medicina, se torna mais acessível. No estudo realizado por Muriel et al. (1996) a produção de surfactantes

por *Cladosporium resinae* foi satisfatória e se tornou uma alternativa aos surfactantes químicos comumente utilizados.

A produção de melanina é outra adaptação explorada em *Cladosporium* spp. Esses pigmentos são um importante fator adaptativo e de sobrevivência para esse grupo, que atuam na defesa do organismo contra diversos fatores de estresse ambiental, que vão desde barrar a radiação ultravioleta, até a proteção contra radioisótopos (GESSLER; EGOROVA; BELOZERSKAYA, 2014). Dados da literatura demonstram que pigmentos de melanina apresentam propriedades radioprotetoras, sendo que várias espécies de fungos, incluindo representantes do gênero *Cladosporium*, foram encontradas nos arredores do reator destruído de Chernobyl (SHUNK; GOMEZ; AVERESCH, 2020). Alguns desses fungos apresentaram radiotropismo, com hifas crescendo em direção às fontes de radiação. A partir dessas evidências, e outras, foi teorizado que os pigmentos de melanina são capazes de auxiliar na integração da energia radioativa circundante em processos metabólicos, transformando, assim, energia radioativa em energia química. Hoje, sabe-se que pigmentos melanizados possuem propriedades semicondutoras, sendo capazes de auxiliar na transferência de elétrons, e na condutividade de íons. Essas características tornam essa substância de especial interesse na área de bioeletrônicos (GESSLER; EGOROVA; BELOZERSKAYA, 2014).

Em adição, a melanina tem sido estudada como uma possível solução para os efeitos adversos que as substâncias dos protetores solares vêm causando na saúde humana e no ambiente devido a sua capacidade fotoprotetora (WONG et al., 2019). Nos últimos anos, o uso de compostos químicos que compõem os protetores solares vem gerando certas preocupações, devido a citotoxicidade e acúmulo em ecossistemas aquáticos, provocando um desregulamento no sistema endócrino de vários organismos (NARLA; LIM, 2020). A melanina produzida pelo fungo *Cladosporium resinae* foi estudada por Oh et. al., (2021) quanto a capacidade de atuar como um protetor solar; sua citotoxicidade e quanto a atividade antioxidante. Os autores reportaram que a melanina derivada desse fungo atendia aos parâmetros estabelecidos para ser considerado um bom protetor solar, além de possuir uma alta capacidade antioxidante e não apresentar nenhuma citotoxicidade nas condições estudadas.

Um dos principais problemas enfrentados por astronautas em viagens espaciais é a quantidade de radiação cósmica a qual eles se encontram expostos, continuamente. Várias tecnologias estão sendo estudadas, a fim de amenizar os possíveis efeitos

deletérios dessa exposição, sendo uma delas a biotecnologia. *Cladosporium sphaerospermum*, um fungo melanizado e radiotrófico, foi testado quanto a sua capacidade de absorver radiação cósmica. O experimento foi conduzido na Estação Espacial Internacional. O estudo conclui que o fungo não apenas prosperou nesse ambiente, como também demonstrou uma alta capacidade de absorver radiação. O uso de biomassa melanizada apresenta ótimas oportunidades no auxílio da exploração espacial, uma vez que funciona como uma proteção que se replica constantemente e de forma eficiente (SHUNK; GOMEZ; AVERESCH, 2020).

3. Objetivos

O presente projeto tem como objetivo a avaliação de parâmetros de crescimento em diferentes temperaturas, salinidade e após radiação UV, bem como a caracterização taxonômica de fungos do gênero *Cladosporium* isolados de amostras marinhas e terrestres provenientes do ambiente antártico.

3.1 Objetivos Específicos

- Avaliar o crescimento dos isolados em diferentes temperaturas (entre 5 a 30°C);
- Avaliar o crescimento dos isolados em meios de cultivos específicos na temperatura ótima de crescimento;
- Avaliar o crescimento dos isolados em diferentes concentrações salinas;
- Caracterizar a resistência à radiação UV (UVB e UVC) desses isolados;
- Classificar taxonomicamente as espécies do gênero *Cladosporium* a partir de análises moleculares.

4. Material e Métodos

4.1 Microrganismos

Um total de 20 fungos filamentosos previamente identificados como pertencentes ao gênero *Cladosporium* e isolados pelo grupo de pesquisa da Profa. Lara Sette a partir de amostras marinhas e terrestres do ambiente antártico foram inicialmente selecionados. Dentre esses, oito estavam viáveis e foram utilizados no presente estudo (Tabela 1 e Figura 3), além de um isolado da costa brasileira (*Cladosporium cladosporioides* LAMAI 446) que foi utilizado como modelo comparativo nos experimentos de caracterização. Esses fungos estão sendo mantidos e curados na

coleção de pesquisa do Laboratório de Micologia Ambiental e Industrial (LAMAI), a qual é associada ao biobanco Central de Recursos Microbianos da UNESP (CRM–UNESP).

Tabela 1. Dados dos fungos do gênero *Cladosporium* utilizados no presente estudo referentes a códigos, fontes de isolamento e local de coleta das amostras.

Código Original	Fonte de Isolamento (Origem)	Referência	Código LAMAI	Código CRM-UNESP
ITAE4	Solo ornitogênico (terrestre Antártica)	(DUARTE et al., 595 2018)		28
S3	<i>Salpa</i> sp. (marinho Antártica)	(DUARTE et al., 564 2018)		29
ITAE3	Solo ornitogênico (terrestre Antártica)	(DUARTE et al., 616 2018)		-
MB9	Madeira (terrestre Antártica)	(DUARTE et al., 598 2018)		26
11P-3.10 II-15C	Solo associado a raiz de <i>D. antarctica</i> (terrestre Antártica)	(WENTZEL et al., 1800 2019)		1737
4D-3C1II	Sedimento marinho (marinho Antártica)	(WENTZEL et al., 1345 2019)		1510
4B-1C115III	Sedimento marinho (marinho Antártica)	(WENTZEL et al., 1369 2019)		1534
B0.346	Solo de recuo da Geleira Collins (terrestre Antártica)	(SANTOS et al., 2541 2020)		2363
78.1 (CBMAI 857)	<i>Palythoa caribaeorum</i> (marinho Brasil)	(da SILVA et al., 446 2008)		354

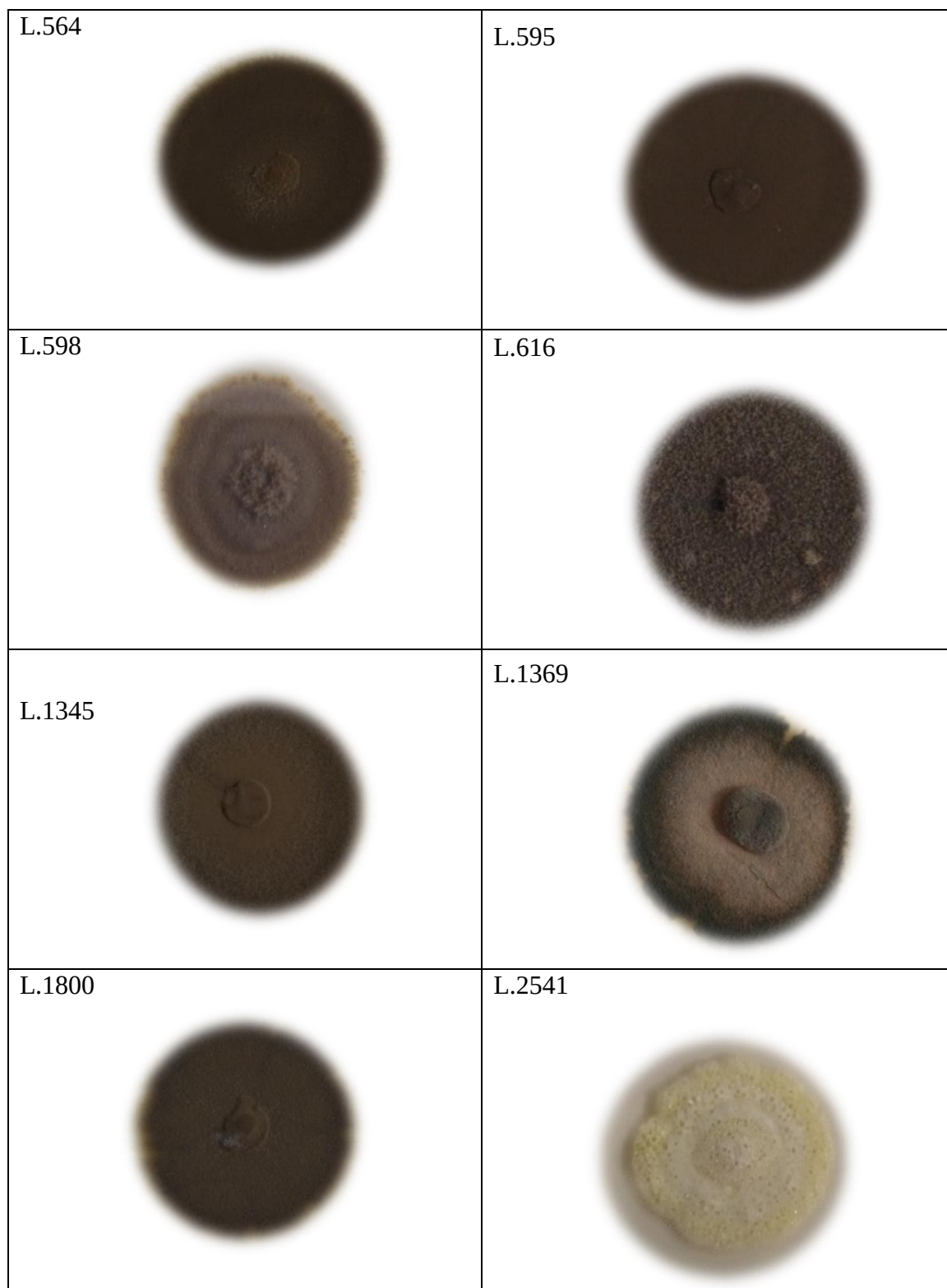


Figura 3: Características fenotípicas dos 8 isolados antárticos após cultivo em meio MA2%, na temperatura ótima de crescimento após 28 dias (fonte: Autor).

4.2 Crescimento em Diferentes Temperaturas

A metodologia para definição do crescimento em diferentes temperaturas e das melhores temperaturas de crescimento (temperatura ótima) foi adaptada de Da Silva Junior e colaboradores (2018). A partir do cultivo monospórico de 5 dias a 15°C em meio MA2% foram retirados cilindros (5 mm de diâmetro), os quais foram depositados no centro de placas de Petri (1 cilindro por placa) contendo meio de cultivo MA2%. Posteriormente, as placas foram incubadas em diferentes temperaturas (5, 10, 15, 20, 25 e 30°C) em BOD. Após 10 dias de crescimento, o diâmetro de cada fungo foi medido em milímetros, com o auxílio do programa *ImageJ*. O experimento foi conduzido em quadruplicata.

4.3 Ensaios de Resistência a Radiação UV

4.3.1 Seleção de isolados resistentes a radiação UVB e UVC

Para a pré-seleção dos isolados de *Cladosporium* resistentes à radiação UV, foi utilizado um fluxo laminar com lâmpadas de Hg de baixa pressão, específicas para cada tipo de radiação, UVB (15W, 305nm, 2.54 W/m², G15T8E, Ushio) e UVC (15W, 254 nm, 3.39 W/m², G13T8, Osram). Placas de Petri com meio MA2% (KASVI) foram inoculadas com 0,1 mL de solução salina 0,9%, contendo 10⁶ esporos/mL, em triplicata, e foram expostas em tempos distintos sobre a irradiação de cada lâmpada: UVB (90, 100, 110, 120 e 130 minutos), UVC (10, 15, 20, 25 e 30 minutos). Um *screening* foi feito anteriormente para se determinar esses tempos de exposição. Após esse período de exposição, todas as placas foram incubadas em BOD, na temperatura ótima de crescimento de cada isolado. A determinação dos isolados mais resistentes foi feita pela contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC). Essa metodologia foi adaptada de Selbmann e colaboradores (2011).

4.4 Crescimento em Meios de Cultura BDA, MA2%, BDA1% e SNA

A metodologia para se mesurar o crescimento de cada isolado em diferentes meios de cultura foi adaptada de Da Silva Junior e colaboradores (2018). A partir do cultivo monospórico de 5 dias na temperatura ótima de crescimento em meio MA2% foram retirados cilindros (5 mm de diâmetro), os quais foram depositados no centro de placas de Petri (1 cilindro por placa) contendo meio BDA; MA2%; BDA1% e SNA (todos marca KASVI), as quais foram incubadas em BOD na temperatura ótima de

crescimento de cada isolado. Após 10 dias de crescimento, o diâmetro de cada fungo foi medido em milímetros, com o auxílio do programa *ImageJ*. Os experimentos de crescimento em distintos meios de cultura foram conduzidos em quadruplicata.

4.5 Crescimento em diferentes concentrações salinas

A metodologia para mensuração do crescimento na presença de estresse osmótico foi adaptada de Onofri e colaboradores (2007). A partir do cultivo monospórico de 5 dias na temperatura ótima de crescimento em meio MA2% foram retirados cilindros (5 mm de diâmetro), os quais foram depositados no centro de placas de Petri (1 cilindro por placa) contendo meio MA2% (marca KASVI), suplementado com diferentes concentrações de NaCl (5%; 10%; 15%; 20% e 25% w/v). Essas placas foram incubadas em BOD na temperatura ótima de crescimento de cada isolado. Após 10 dias de crescimento, o diâmetro de cada fungo foi medido em milímetros, com o auxílio do programa *ImageJ*. Os experimentos em diferentes concentrações salinas foram conduzidos em quadruplicata.

4.6 Taxonomia Molecular

4.6.1 Extração, quantificação e verificação da integridade de DNA

A extração de DNA dos fungos foi realizada utilizando o método CTAB (cetiltrimetil brometo de amônio) modificado de Moller et al. (1992) e Gerardo et al. (2004). A visualização da integridade e presença de DNA nas amostras foi feita por meio de gel de agarose a 0,7% em cuba de eletroforese, em tampão TBE 1X (Tris, ácido Bórico, EDTA) e voltagem de 80 V, por um período de 40 minutos. As quantificações das extrações foram obtidas utilizando o espectrofotômetro para ácidos nucleicos Thermo Scientific™ NanoDrop 2000.

4.6.2 Amplificação de DNA por PCR

Para avançar na caracterização dos *Cladosporium* spp. da Antártica, foi utilizado o marcador taxonômico ITS e o marcador secundário ACT (Tabela 2), adaptado a partir de Carbone e Kohn (1999). As reações de PCR foram otimizadas para cada isolado, visando evitar a formação de bandas inespecíficas. Para os isolados L.595; L.616 e L.1345 as condições do PCR estão apresentadas na Tabela 3, para os isolados L.564 e L.2541 na Tabela 4, para os isolados L.598 e L.1369 na Tabela 5 e para o isolado L.1800 na Tabela 6. As sequências do marcador taxonômico ITS utilizadas foram as

geradas em estudos anteriores do grupo de pesquisa, cujas referências estão citadas na Tabela 1. A eletroforese em gel de agarose foi realizada para verificar se o DNA-alvo foi amplificado pelos primers ACT-512F e ACT-783R. Para tanto, foi preparado gel de agarose 1% em tampão TBE 1X (Tris, ácido Bórico, EDTA).

Tabela 2. Primers usados e suas sequências.

Nome do Primer	Sequência (5' - 3')
ACT-512F	ATGTGCAAGGCCGGTTTCGC
ACT-783R	TACGAGTCCTTCTGGCCCAT

Tabela 3. Reagentes e quantidades usadas na amplificação dos isolados L.595; L.616 e L.1345, para o primer ACT.

Reagentes	Quantidade (µL)
Água Mili-Q estéril	12,25
Primer ACT-512F (10 mM)	1,0
Primer ACT-783R (10mM)	1,0
Buffer 5x	5,0
MgCl ₂ (25 mM)	2,0
dNTPs (1,25 mM cada)	1,5
Taq (5 U/ µL)	2,25
DNA (1:10)	2,0
Volume final do mix	25

Tabela 4. Reagentes e quantidades usadas na amplificação dos isolados L.564 e L.2541, para o primer ACT.

Reagentes	Quantidade (µL)
Água Mili-Q estéril	11,75
Primer ACT-512F (10 mM)	1,0
Primer ACT-783R (10mM)	1,0
Buffer 5x	5,0

MgCl ₂ (25 mM)	2,0
dNTPs (1,25 mM cada)	2,0
Taq (5 U/ μ L)	2,25
DNA (1:10)	2,0
Volume final do mix	25

Tabela 5. Reagentes e quantidades usadas na amplificação dos isolados L.598 e L.1369, para o primer ACT.

Reagentes	Quantidade (μL)
Água Mili-Q estéril	12,75
Primer ACT-512F (10 mM)	1,0
Primer ACT-783R (10mM)	1,0
Buffer 5x	5,0
MgCl ₂ (25 mM)	1,0
dNTPs (1,25 mM cada)	2,0
Taq (5 U/ μ L)	0.25
DNA (1:10)	2,0
Volume final do mix	25

Tabela 6. Reagentes e quantidades usadas na amplificação do isolado L.1800, para o primer ACT.

Reagentes	Quantidade (μL)
Água Mili-Q estéril	12,75
Primer ACT-512F (10 mM)	1,0
Primer ACT-783R (10mM)	1,0
Buffer 5x	5,0
MgCl ₂ (25 mM)	2,0
dNTPs (1,25 mM cada)	1,0
Taq (5 U/ μ L)	0,25
DNA (1:10)	2,0
Volume final do mix	25

4.6.3 Purificação e Quantificação dos Produtos de Amplificação por PCR

Para a purificação dos produtos de amplificação foi utilizado o PureLink™ PCR Purification Kit – (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific), seguindo as instruções fornecidas pelo fabricante. Em seguida, para verificar se a purificação foi bem sucedida, foi realizada a eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TBE 1X (Tris, ácido Bórico, EDTA). A quantificação do DNA foi realizada por meio do uso de espectrofotômetro para ácidos nucleicos Thermo Scientific™ NanoDrop 2000.

4.6.4 Clonagem e Sequenciamento

O produto de DNA amplificado e purificado para o gene ACT de cada isolado foi inserido no vetor pGEM-T Easy (Promega, Madison, EUA), conforme protocolo do fabricante. O vetor com o inserto foi inserido nas células competentes *E. coli* JM109 fornecidas no kit, por meio de transformação via choque térmico. As células competentes foram misturadas ao vetor, com permanência de exatamente 50 segundos a 42°C, seguida de 2 minutos em gelo. Posteriormente, foram cultivadas em meio Luria Bertani (LB) suplementado com ampicilina (100 µg/mL-1); X-gal (40 µg/mL) e IPTG (0,5 mM) e incubadas a 37°C, por 16-18 horas, para a seleção de possíveis clones contendo o fragmento de interesse. Colônias brancas normalmente possuem o inserto. A confirmação da presença do fragmento nos clones considerados positivos foi feita através de PCR de colônia, seguida de eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TBE 1X (Tris, ácido Bórico, EDTA).

As colônias brancas foram cultivadas em meio LB líquido, durante 16-18 a 37°C, sobre agitação 150 rpm. As colônias foram preservadas em meio LB + glicerol 40% a -80°C. Os vetores de clonagem foram extraídos utilizando o *GeneJET Plasmid Miniprep Kit* (ThermoFisher). A eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TBE 1X (Tris, ácido Bórico, EDTA) foi realizada para confirmar se o plasmídeo foi extraído com sucesso. Os vetores extraídos foram sequenciados pelo Método Sanger pela empresa MacroGen Inc. (Coreia do Sul) utilizando os oligonucleotídeos M13 (M13F – GTAAACGACGGCCAGT e M13R – CAGGAAACAGCTATGAC).

4.6.5 Montagem dos contigs e análises das sequências

Os *contigs* foram gerados com o software *Bioedit Sequence Alignment Editor* (Versão 7.0.5.3). Com os *contigs* obtidos com iniciadores senso e antisenso após a remoção das sequências do vetor, as sequências foram comparadas com o banco de

dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) com o auxílio da ferramenta *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST). Após a seleção de sequências relevantes (linhagens tipo), o alinhamento foi feito com o CLUSTALX (Versão 2.1) e editadas manualmente no software *Bioedit Sequence Alignment Editor* (Versão 7.0.5.3). A história evolutiva foi inferida usando o método de Máxima Verossimilhança e modelo Kimura de 2 parâmetros (Kimura 1980). As árvores iniciais para a busca heurística foram obtidas automaticamente aplicando os algoritmos Neighbor-Join e BioNJ a uma matriz de distâncias pareadas estimadas usando a abordagem Maximum Composite Likelihood (MCL) e bootstrap de 1000 réplicas. As análises evolutivas foram realizadas no MEGA-X (Versão 10.2.6). As árvores foram produzidas usando o aplicativo da web iTOL (Letunic & Bork, 2021).

5. Resultados e Discussão

5.1. Crescimento em diferentes temperaturas

As seis temperaturas testadas para os nove isolados apresentaram diferença estatisticamente significativa de acordo com o teste estatístico de Kruskal-Wallis ($P < 0.001$), como pode ser observado na tabela 7, indicando ser esta uma variável importante para o crescimento dos fungos estudados. Dentre as temperaturas testadas, a temperatura ótima mais frequente foi a de 25°C e 20°C, sendo que cinco dos oito isolados antárticos (L.595, L.598, L.616, L.1345 e L.1369) cresceram melhor nessas temperaturas. Os isolados L.564 e L.2541 apresentaram melhores crescimento a 15°C e 20°C, sem diferenças significativas entre essas duas temperaturas (Tabela 7). Para os isolados L.564 e L.1800 a melhor temperatura de crescimento foi a de 15°C. O *Cladosporium* de região tropical (L.446) utilizado como comparativo, apresentou melhor crescimento a 25°C. No geral, este isolado não antártico apresentou crescimento micelial menor nas temperaturas em que foi capaz de crescer (de 10 a 30°C). Os isolados antárticos L.564; L.1800 e L.2541 não cresceram acima de 20°C, e os isolados L.564; L.598 e L.1800 não apresentaram crescimento abaixo de 10°C. Quando submetidos à temperatura de 30°C, os isolados L.564; L.1345; L.1800 e L.2541 não cresceram e os outros isolados apresentaram baixo crescimento (Tabela 7).

Tabela 7. Crescimento dos isolados fúngicos (mm) em cinco temperaturas distintas (5, 10, 15, 20, 25 e 30°C) para determinação da temperatura ótima de crescimento. Médias seguidas por letras distintas na linha diferem entre si pelo teste não paramétrico Kruskal-Wallis ($P < 0.001$).

Isolados	Temperatura					
	5°C	10°C	15°C	20°C	25°C	30°C
L.446	0,0 ^f	9,06±2,1 ^e	13,43±0,4 ^d	16,34±0,5 ^b	21,27±4,1 ^a	10,43±0,7 ^c
L.564	0,0 ^c	15,87±0,5 ^b	21,46±4,2 ^a	20,89±1,5 ^a	0,0 ^c	0,0 ^c
L.595	8,51±0,3 ^e	18,77±0,2 ^c	29,67±1,3 ^b	42,22±2,6 ^a	42,10±0,8 ^a	15,15±0,7 ^d
L.598	0,0 ^f	9,02±0,7 ^e	16,45±0,5 ^d	23,41±0,9 ^b	29,67±2,3 ^a	21,38±1,7 ^c
L.616	9,74±0,7 ^f	22,83±1,2 ^d	30,41±1,5 ^c	35,24±0,5 ^b	40,61±2,2 ^a	13,46±1,6 ^e
L.1345	8,85±0,5 ^d	22,03±1,4 ^c	31,39±1,1 ^b	42,63±0,9 ^a	20,76±1,2 ^c	0,0 ^c
L.1369	9,43±0,7 ^d	21,01±2,5 ^c	26,9±1,7 ^b	28,78±1 ^{ab}	29,7±0,31 ^a	11,98±0,6 ^d
L.1800	0,0 ^d	11,2±1 ^b	16,21±0,8 ^a	9,3±0,9 ^c	0,0 ^d	0,0 ^d
L.2541	4,65±0,7 ^c	10,59±0,2 ^b	16,68±1,5 ^a	16,82±2,1 ^a	0,0 ^d	0,0 ^d

A faixa ótima de temperatura para o crescimento de todos os isolados de *Cladosporium* variou entre 15 e 25°C. Esses resultados condizem com dados encontrados na literatura, que relataram crescimento de fungos provenientes do ambiente antártico. Azmi e Seppelt (1997) estudaram vários fungos isolados de amostras coletadas na Antártica continental, e todos demonstraram faixa ótima de crescimento que variavam entre 15 e 25°C. Robinson (2001) relata uma ampla variedade de fungos adaptados a climas frios (isolados do ambiente antártico) que apresentaram crescimento em temperaturas de 0 a 30°C, sendo que a grande maioria demonstrou temperatura ótima de crescimento entre 15 e 25°C.

Essa variação de temperatura também condiz com dados de outras pesquisas com o gênero *Cladosporium*, uma vez que esse grupo é ativo em temperaturas baixas (OGÓREK et al., 2012), devido a facilidade desses organismos de produzirem uma grande quantidade de esporos que se dispersam facilmente pelo vento, cobrindo grandes distâncias (BENSCH et al., 2002). Sendo assim, pressupõe-se que possam ter chegado

ao ecossistema antártico dessa forma, e ao longo dos anos foram se adaptando para sobreviver nesse ambiente.

Os mares no entorno da península Antártica, de forma geral, apresentam temperaturas menores que a porção terrestre, com temperaturas frequentemente abaixo de -20°C. Os organismos marinhos, principalmente os encontrados no fundo do mar, onde apenas uma pequena fração da radiação solar alcança, evoluíram para suportar as temperaturas extremas desse habitat (THOMAS; DIECKMANN, 2002). Ambos os isolados L.1345 e L.1369 apresentaram crescimento a 5°C. Esses dois fungos foram isolados a partir de amostras de sedimento marinho coletados em Punta Ulman a 20,3 m de profundidade e temperatura média de 0,3°C (WENTZEL et al., 2019), isso sugere que esses fungos estão adaptados a temperaturas mais baixas. O fungo L.564, apesar de ter sido isolado a partir do organismo marinho *Salpa* sp. não apresentou crescimento abaixo de 10°C, porém a amostra do espécime marinho foi coletada em águas rasas na Antártica, cujas temperaturas são menos frias do que a 20 m de profundidade. Cabe destacar que o *Cladosporium* da região tropical (L.446) utilizado como comparativo neste estudo, também não apresentou crescimento a 5°C. Este fungo foi isolado do cnidário marinho *Palythoa caribaeorum* coletado na Praia Preta (São Sebastião) no litoral norte do estado de São Paulo (da SILVA et al., 2008), onde as temperaturas médias (24°C) são mais altas do que na antártica marítima (RODRIGUES; BULHÕES, 2017). Contudo, esse *Cladosporium* não antártico foi capaz de crescer em 10°C apesar de não estar adaptado a climas extremamente frios como os da Antártica.

De acordo com os dados obtidos, os isolados L.564; L.1800 e L.2541 foram classificados como psicrófilos, enquanto que os isolados L.446; L.595; L.598; L.616; L.1345 e L.1369 foram classificados como psicrotolerantes. Organismos psicrófilos possuem sua temperatura ótima de crescimento em 15°C ou inferior, com temperatura tolerável máxima abaixo de 20°C, e temperatura mínima em 0°C ou inferior. Psicrotolerantes são organismos com temperatura ótima de crescimento entre 20 e 40°C, mas capazes de crescer a 0°C (MADIGAN et al., 2016).

5.2. Crescimento em Meios de Cultura BDA, MA2%, BDA1% e SNA

A análise de variância (ANOVA) e o teste de médias de Duncan (no nível de 5% de probabilidade) demonstraram que o crescimento dos isolados antárticos L.564; L.595; L.598; L.616; L.1345; L.1369 e L.2541 nos diferentes meios de cultura foram estatisticamente significativos ($P < 0.05$). No entanto, para o isolado antártico L.1800 e o

isolado L446 (origem marinha tropical), não foi observada uma variação significativa no crescimento quando cultivados nos meios MA2%, PDA e PDA1% ($P>0.05$) (Figura 4). Dentre os nove fungos, o isolado L.1345 foi o que apresentou maior crescimento em MA2% (42,6 mm) e em BDA (48,2 mm) (Figura 4). Os isolados L.595 e L616 apresentaram um bom crescimento em meio MA2% (42,1 mm e 40,6 mm, respectivamente) e no meio BDA (43,3 mm e 35,6 mm, respectivamente). Com crescimento menor de 20 mm de diâmetro, ambos os isolados L.1800 e L.2541 apresentaram crescimento bem inferior aos demais fungos, para os meios MA2% (16,23 e 16,21, respectivamente) e BDA (16,5 e 10,25, respectivamente). Para o meio BDA1%, o isolado L.595 foi o que apresentou maior crescimento entre todos os isolados testados (28,9 mm) e os isolados L. 1345 e L.2541 apresentaram os menores crescimentos (14,22 e 13,69, respectivamente). Em geral, no meio SNA todos os isolados fúngicos testados apresentaram os menores crescimentos (<20mm de diâmetro) quando comparado aos outros meios, exceto para o isolado L.2541 que apresentou o melhor crescimento em meio SNA (18,78 mm).

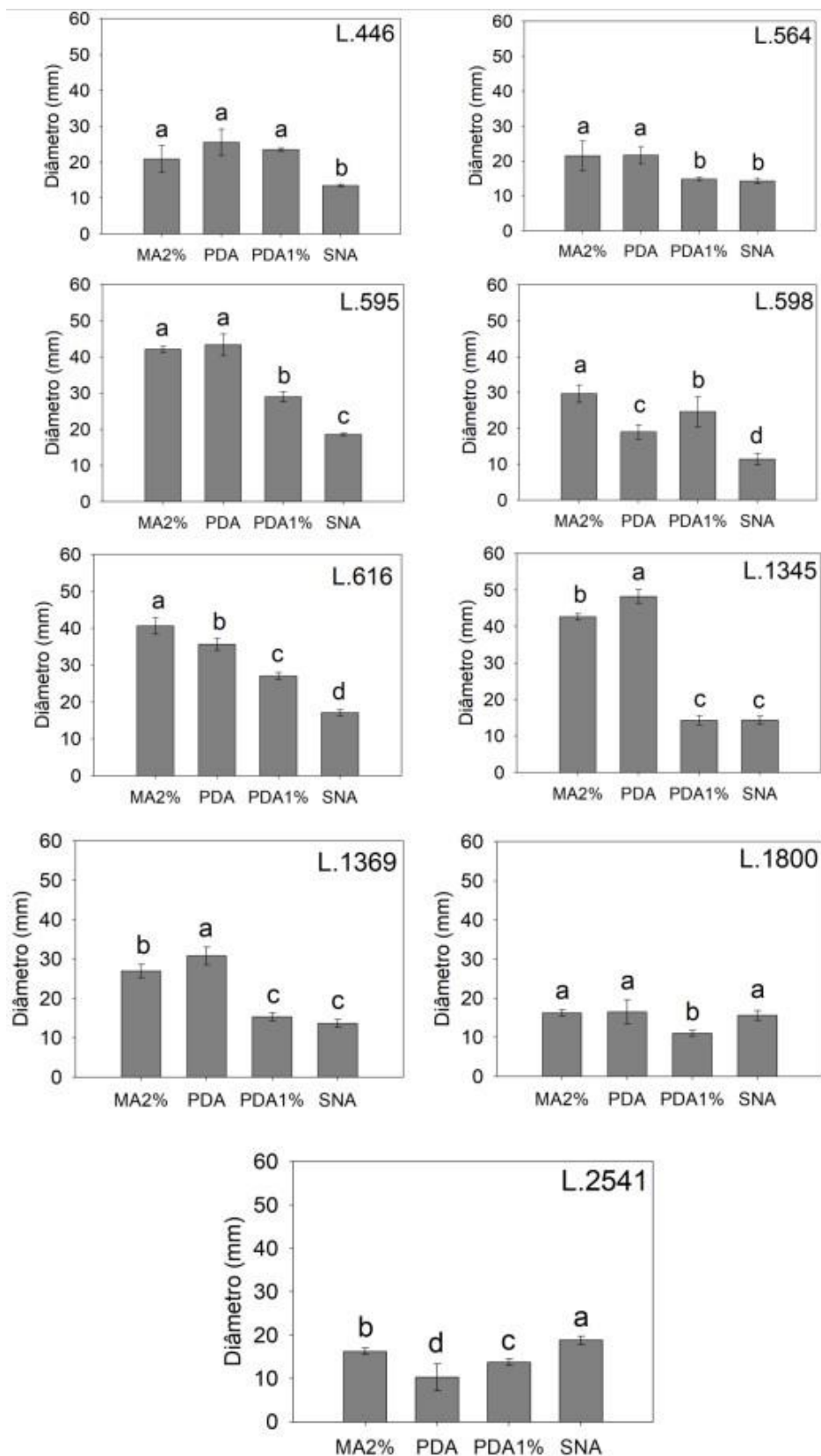


Figura 4: Diâmetro em milímetros dos 9 fungos em meios de cultura MA2%; BDA; BDA1% e SNA. Os isolados cresceram durante 10 dias, em temperatura ótima de crescimento. Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Duncan ($\alpha = 5\%$).

Os isolados L.595 e L.616 foram obtidos a partir de amostras de solo ornitogênico, e os mesmos apresentaram um bom crescimento em todos os meios testados, inclusive nos meios mais pobres, como SNA e BDA1%. Dessa forma, pressupõe-se que esses fungos estejam adaptados a metabolizar uma ampla gama de nutrientes, e conseguem crescer mesmo em meios mais pobres, aproveitando ao máximo qualquer fonte de energia e carbono disponíveis. Essa adaptação pode ter surgido devido ao meio em que se encontravam, solo ornitogênico, o qual é enriquecido pelo guano, principal excreta de pinguins e rico em nutrientes (SIMAS et al., 2007).

O fungo L.1345, isolado a partir de sedimento marinho, apresentou um ótimo crescimento em meio MA2% e BDA. No entanto, sedimentos marinhos, de forma geral, são locais pobres em nutrientes (GONÇALVES et. al., 2013). De acordo com Wentzel et al. (2019) o sedimento marinho coletado em Punta Ulman na Baía do Almirantado de onde foi processado o isolamento desse fungo possui uma quantidade de carbono muito baixa, o que correlaciona com a pobreza de nutrientes do local. Cabe destacar que o sedimento marinho pode não ser o reservatório natural desse fungo, o qual pode ter chegado ali de alguma forma e se mantido inerte como esporo ou propágulo. Se levarmos em consideração a alta eficácia com a qual fungos do gênero *Cladosporium* são capazes de se disseminar, é possível que isso tenha ocorrido.

O isolado L.2541, recuperado a partir de solo de recuo da geleira Collins, apresentou um melhor crescimento no meio mais pobre, o SNA. Com exceção dos solos ornitogênicos, outros solos encontrados na antártica marítima são geralmente muito pobres em nutrientes (SIMAS et al., 2007). Microrganismos oriundos do ambiente antártico precisam lidar com a escassez de nutrientes disponíveis, fazendo com que esse aspecto se torne um fator seletivo importante nesse ambiente. Pode ser que esse fungo esteja melhor adaptado a metabolizar nutrientes mais simples de forma mais eficiente.

5.3. Crescimento em Diferentes Concentrações Salinas

De acordo com os resultados da análise de variância (ANOVA) observou-se que houve diferença estatística entre as diferentes concentrações de NaCl (%) testadas para cada isolado fúngico ($P < 0.05$) (Tabela 8). Os oito fungos antárticos e o fungo tropical apresentaram os maiores crescimentos na concentração de NaCl de 5%, sendo que o os isolados L.616 e L.595 apresentaram o maior crescimento (35 mm e 31,2 mm, respectivamente) diferindo estaticamente das demais concentrações de NaCl (%)

($P < 0.05$). O isolado tropical L.446 também apresentou um bom crescimento a 5% de NaCl (27,8 mm). Os demais isolados apresentaram crescimento inferior à 20 mm nessa concentração, contudo ainda apresentaram os maiores crescimentos entre todas as concentrações de NaCl (%) testadas ($P < 0.05$) (Tabela 8). Na concentração salina de 10%, apenas os isolados antárticos L.564; L.595; L.616 e L.1369 e o isolado tropical L.446 conseguiram crescer, sendo que o L.616 apresentou o maior crescimento nesta concentração (24,8 mm) ($P < 0.05$). Para a concentração de 15%, apenas os isolados antárticos L.595; L.616 e L.1369 e o isolado tropical L.446 apresentaram algum crescimento, sendo que o isolado L.1369 apresentou o maior crescimento (14,6 mm) ($P < 0.05$). Os isolados L.2541, L.1345, L.598 e L.1800 não apresentaram crescimento significativo nas concentrações de 10, 15, 20 e 25% de NaCl ($P > 0.05$). Para as concentrações de 20 e 25%, nenhum dos fungos testados conseguiu crescer (Tabela 8).

Tabela 8. Crescimento dos isolados fungicos (mm) em diferentes concentrações de NaCl (5, 10, 15, 20 e 25 %). Médias seguidas por letras distintas na linha diferem entre si pelo teste de Duncan ($\alpha = 5\%$).

Isolados	Concentração de NaCl				
	5%	10%	15%	20%	25%
L.446	27,83±0,9 ^a	19,77±1,3 ^b	8,37±0,7 ^c	0,0 ^d	0,0 ^d
L.564	13,18±1 ^a	8,82±0,5 ^b	0,0 ^c	0,0 ^c	0,0 ^c
L.595	31,24±1 ^a	17,13±1,1 ^b	11,40±1,5 ^c	0,0 ^d	0,0 ^d
L.598	18,60±0,6 ^a	0,0 ^b	0,0 ^b	0,0 ^b	0,0 ^b
L.616	35,04±2,9 ^a	24,85±1,3 ^b	12,13±1,3 ^c	0,0 ^d	0,0 ^d
L.1345	7,36±0,5 ^a	0,0 ^b	0,0 ^b	0,0 ^b	0,0 ^b
L.1369	17,69±0,4 ^a	15,58±0,8 ^b	14,66±0,5 ^c	0,0 ^d	0,0 ^d
L.1800	8,79±2,2 ^a	0,0 ^b	0,0 ^b	0,0 ^b	0,0 ^b
L.2541	8,11±1 ^a	0,0 ^b	0,0 ^b	0,0 ^b	0,0 ^b

Os fungos L.595 e L.616 que apresentaram os melhores desempenhos de crescimento a 5% de NaCl e que também conseguiram se desenvolver bem até 15% de NaCl foram isolados a partir de solo ornitogênico. O solo dessa localidade possui

concentrações salinas notavelmente mais elevadas que outros solos da antártica marinha, devido o acúmulo de guano nesses locais, derivado da atividade dos pinguins que escolhem partes costeiras da península antártica para fazerem seus ninhos (SIMAS et al., 2007). Esse resultado pode explicar a tolerância demonstrada por esses isolados em concentrações mais elevadas de NaCl. Os outros fungos de origem terrestre da Antártica L.598 (isolado de madeira), L.1800 (isolado de solo associado a raiz de *D. antarctica*) e L.2541 (isolado de solo de recuo da geleira Collins) não foram capazes de crescer em concentrações acima de 5% de NaCl e o crescimento não foi tão expressivo quanto o dos outros fungos estudados.

Em adição, o fungo L.1369, que também apresentou bom crescimento de 5 a 15% de NaCl foi isolado a partir de sedimentos marinhos. Possivelmente esse isolado é mais adaptado a elevados teores de salinidade existentes do seu habitat de isolamento, uma vez que, os mares circundantes da antártica possuem concentrações de sal que podem variar entre 35 à 150 ppm (THOMAS; DIECKMANN, 2002). Por outro lado, o fungo L.1345, isolado a partir de sedimento marinho proveniente de Punta Ulman na Baía do Almirantado, apresentou uma baixa tolerância à alta salinidade, crescendo pouco na concentração salina mais baixa testada. Cabe destacar que a salinidade na Baía do Almirantado em janeiro/fevereiro de 2015 (mês e ano da amostragem) foi de cerca de 3,4% como reportado por Farias et al. (2022), que estudou a tolerância a salinidade de uma levedura isolada desta mesma amostra de sedimento marinho. Uma possível explicação para esse comportamento está relacionada aos ciclos de congelamento e descongelamento desse habitat. Ao mesmo tempo em que a água marinha congela, o sal dissolvido é expelido e forma uma mistura salobra nos poros do gelo. Isso aumenta consideravelmente a concentração salina desses locais. O inverso também ocorre, pois ao mesmo tempo em que está ocorrendo o descongelamento desse gelo, o sal começa a se dissolver numa grande quantidade de água, às vezes fazendo com que as concentrações salinas baixem tanto que se tornam comparáveis aos níveis de água doce (THOMAS; DIECKMANN, 2002). A baixa tolerância a salinidade deste isolado reforça a hipótese de que o mesmo não pertence ao ambiente marinho, tendo chegado ali de alguma forma.

Quanto ao fungo marinho tropical L.446, os resultados mostraram que o mesmo se mostrou bem adaptado aos teores de salinidade testados, sendo capaz de crescer bem em até 15% de NaCl. Essa tolerância, também observada em alguns dos isolados antárticos, pode estar relacionada ao ambiente do qual o fungo foi isolado

5.4. Seleção de isolados resistentes à radiação UVB e UVC

A Figura 5 apresenta as unidades formadoras de colônias em função do tempo, para cada isolado quando submetidos à radiação UVB, os resultados demonstraram que a irradiação com UVB foi um agente seletivo importante para a sobrevivência dos oito fungos antárticos. O isolado L.595 demonstrou de forma estatisticamente significativa ($P < 0,05$), a maior resistência contra radiação UVB em comparação com os outros isolados estudados, em todos os tempos de exposição testados, e com o maior número de colônias sobreviventes. Os isolados antárticos L.564, L.616 e L.1800 também apresentaram resistência à UVB em todos os tempos de exposição, porém, com uma quantidade de colônias sobreviventes menor do que a quantidade do isolado L.595. Desses três, o isolado L.564 foi o que apresentou maior número de colônias sobreviventes após 130 minutos de exposição (121,3 UFC/mL), seguido pelo isolado L.616 (115 UFC/mL) e pelo isolado L.1800 (33,3 UFC/mL) (Figura 5).

O isolado L.1369 sobreviveu de 90 à 120 min de exposição, entretanto, com uma quantidade baixa de colônias sobreviventes em todos os tempos testados (Figura 5). Já o isolado L.1345 apresentou colônias sobreviventes de 90 à 110 min de exposição, com colônias sobreviventes em 90 min, mas que caí rapidamente em 100 e 110 min. O isolado L.2541 também apresentou colônias sobrevivente nos três primeiros tempos de exposição, entretanto, numa quantidade muito baixa.

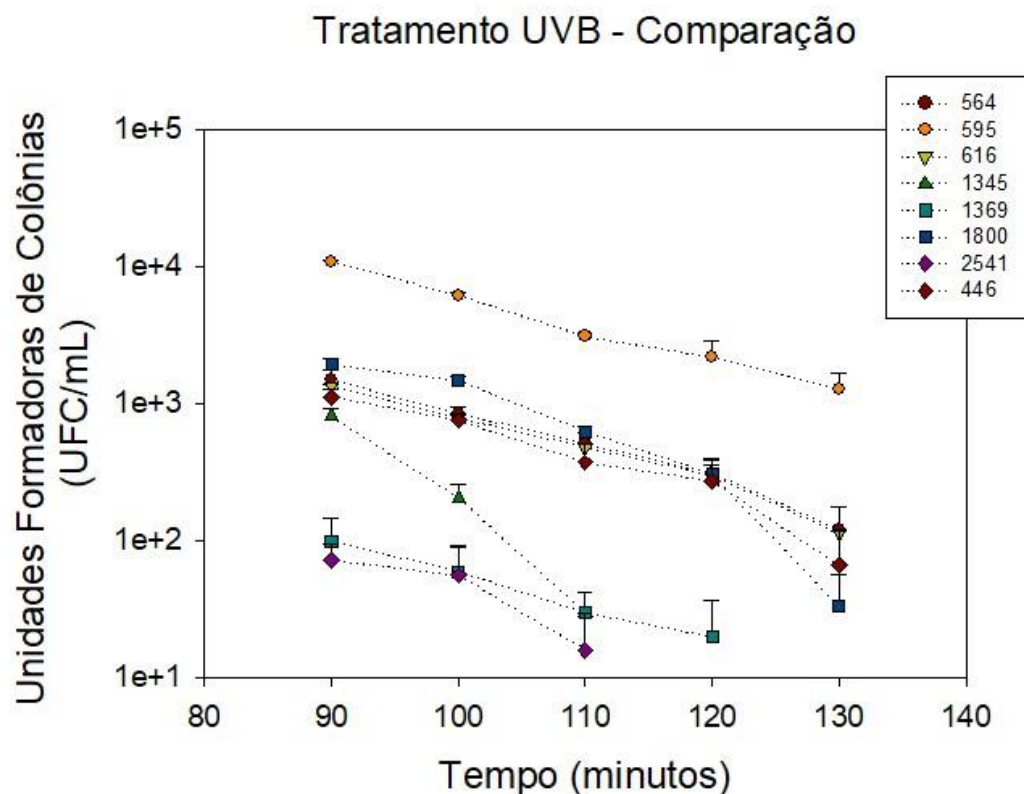


Figura 5. Unidades Formadoras de Colônias em função do tempo, para cada isolado quando submetidos a radiação UVB.

O único isolado a não sobreviver em nenhum tempo testado para UVB foi o L.598. Pode-se observar que em 130 min de exposição todos os isolados demonstraram significativamente menor resistência contra radiação UVB em todos os tempos de exposição testados e com o menor número de colônias sobreviventes ($P < 0,05$).

O fungo marinho tropical L.446 também apresentou resistência à UVB em todos os tempos de exposição com 66,6 UFC/mL sobreviventes após 130 min.

Na Figura 6, são apresentados os resultados de unidades formadoras de colônias em função do tempo, para cada isolado quando submetidos à radiação UVC. Os resultados demonstraram que a irradiação com UVC foi um agente seletivo importante para a sobrevivência dos fungos estudados. O isolado L.595, de maneira semelhante ao tratamento com UVB, demonstrou significativamente maior resistência contra radiação UVC em 10 min de exposição (5029,8 UFC/mL) entre todos os tempos testados pelo teste de Duncan ($P < 0,05$). Os outros isolados antárticos L.564, L.616, L.1345 e L.1800 também apresentaram resistência contra UVC em todos os tempos de exposição ($P < 0,05$). Desses quatro, o isolado L.564 foi o que apresentou o maior número de colônias sobreviventes após 30 min de exposição (104 UFC/mL), seguido pelo isolado L.1345 (64 UFC/mL). O isolado L.616 apresentou 41,6 UFC/mL de colônias sobreviventes em 30 min de exposição, e o isolado L.1800 apresentou 28 UFC/mL. O

isolado L.1369 apresentou colônias sobreviventes apenas em 10, 15 e 20 min de exposição, com quantidades muito baixas para os três tempos. O isolado L.2541 não resistiu a tempos de exposição superiores a 10 min e, mesmo com apenas 10 min de exposição, apresentou uma quantidade de colônias sobreviventes baixa. O isolado L.598 não apresentou colônias sobreviventes em nenhum dos tempos testados para UVC. Também pode-se observar que em 30 min de exposição, todos os isolados demonstraram significativamente menor resistência contra radiação UVC em todos os tempos de exposição testados ($P < 0,05$).

O fungo marinho tropical L.446 apresentou resistência a UVC em todos os tempos de exposição ($P < 0,05$), com 83,3 UFC/mL de colônias sobreviventes após 30 min.

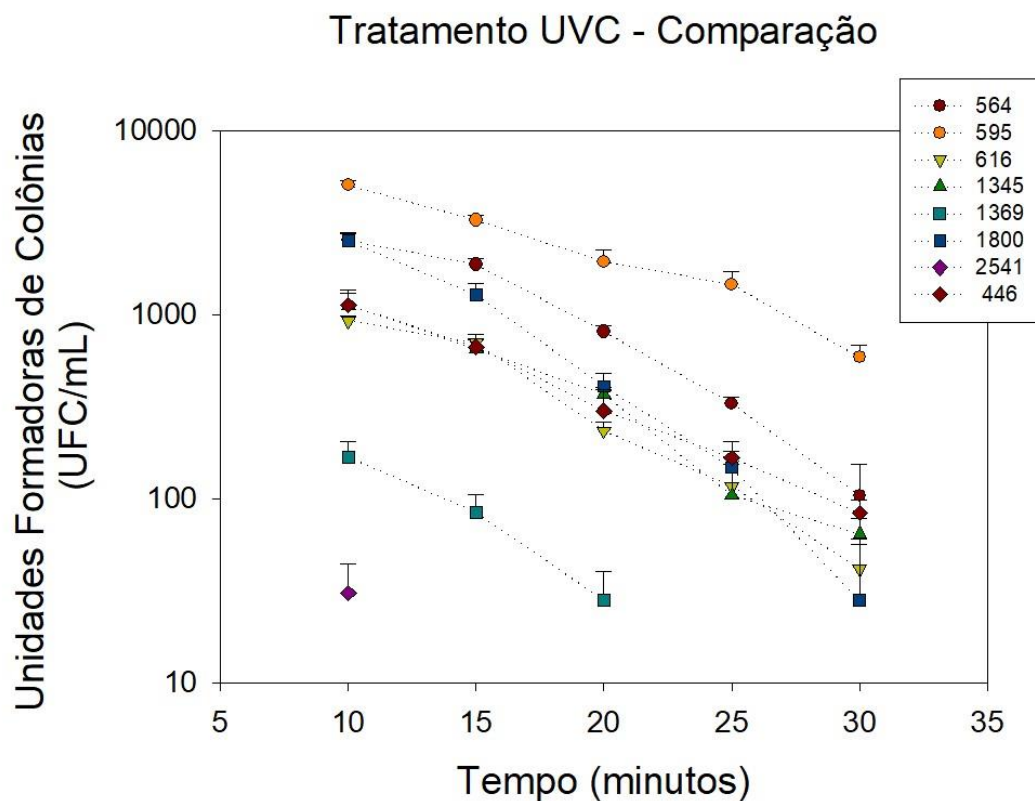


Figura 6. Unidades Formadoras de Colônias em função do tempo, para cada isolado quando submetidos a radiação UVC.

Todos os isolados, com exceção do L.598, demonstraram alguma resistência aos tratamentos de radiação UVB e UVC. Isso aponta para adaptações contra a irradiação

solar, um importante fator seletivo no ambiente antártico. Um maior tempo de exposição resultou numa menor quantidade de colônias sobreviventes para todos os isolados submetidos à radiação UVB e UVC. Onofri e colaboradores (2007) observaram esse mesmo padrão em fungos antárticos melanizados, quando tratados com UVB. Para tratamentos com UVC, Monyethabeng e Krugel (2016) observaram esse padrão em uma variedade de fungos melanizados, no qual uma espécie de *Cladosporium* demonstrou ser a mais resistente. O fungo L.595, isolado a partir de solo ornitogênico, foi o que mais se destacou quanto a sua resistência, em ambos os tratamentos, demonstrando uma capacidade fotoprotetora muito superior aos demais fungos. Por outro lado, o isolado L.598 não apresentou ser resistente em nenhum tratamento, nem mesmo durante o *screening* inicial para se definir os tempos de exposição, no qual com 60 min de exposição sobre radiação UVB; e 10 min de exposição sobre radiação UVC, não houve formação de colônias. Outros dois fungos, L.1369 e L.2541, apesar de sobreviverem em tempos menores de exposição, não resistiram ao aumento contínuo de exposição.

Tanto UVB, quanto UVC agem de forma semelhante nas estruturas celulares desses microrganismos, porém, com intensidades diferentes. Células expostas a essas radiações geram dímeros de pirimidina, substância orgânica pode reagir com o DNA, impedindo a replicação fidedigna do mesmo durante o processo de replicação, o que acarreta a subsequente morte celular. A radiação UVC é mais eficiente na geração desses compostos, portanto, mais danosa que a UVB (REIS-MANSUR et al., 2019). A radiação UVB é mais eficiente que a radiação UVC em gerar espécies reativas de oxigênio, compostos químicos os quais reagem danificando o DNA, além de reagirem com outros componentes da célula, como lipídeos e proteínas (PULSCHEN et al., 2015).

Outra diferença importante que é observada em microrganismos resistentes a radiação ultravioleta é a quantidade de duas substâncias encontradas nas células desses organismos, melanina e carotenoides. Melaninas são pigmentos hidrofóbicos, normalmente encontrados na parede celular, capazes de absorver uma ampla gama do comprimento de onda visível, protegendo principalmente contra danos diretos causados ao DNA do organismo. Já os carotenoides encontrados nas células de fungos estão mais proximamente associados com reduzir a formação de espécies reativas de oxigênio (WONG et al., 2019).

Essas diferenças podem explicar a variação ocorrida entre os isolados, em ambos os tratamentos com radiação UVB e UVC. Enquanto o fungo L.595 aparenta possuir

mecanismos fotoprotetores bem adaptados, o isolado L.598 se demonstrou pouco equipado para lidar com a irradiação solar do ambiente antártico. É possível que o isolado L.598 tenha sido introduzido recentemente no ambiente antártico, resultante da presença de pessoas no local. A madeira, substrato do qual o fungo L.598 foi isolado, não é encontrada de forma natural na Antártica, sendo que as principais fontes desse material existem devido a atividade humana (BÖLTER; BEYER; STONEHOUSE, 2002). Além disso, o isolado L.598 também não foi capaz de crescer na temperatura mais baixa testada (5°C). Temperatura e radiação solar são dois fatores de seleção importantes no ambiente antártico (THOMAS; DIECKMANN, 2002).

A baixa resistência do isolados L.1369 pode ser explicada devido às características fenotípicas desse fungo, como a ausência de melanina (Figura 3). Uma possível explicação para a baixa resistência à UV para o isolado L.2541 seria o seu local de origem, o solo de recuo da geleira Collins. Esse fungo foi isolado de amostra de solo coletada a 0 metros da geleira (parte recentemente exposta). Sulbach; Fassoni-Andrade & Andrade (2021) observaram o recuo da geleira Collins nos últimos 30 anos e notaram que essa tendência pode estar associada ao aumento da temperatura do ar antártico, entre outros fatores. Pressupõe-se que, por muito tempo, o isolado L.2541 esteve protegido da irradiação solar devido a vasta massa de gelo, que possivelmente cobria esse local e, conseqüentemente, protegia o fungo das ações nocivas da radiação UV.

Com relação aos isolados L.1345 e L.1369 a baixa resistência contra UVB e UVC pode estar relacionada ao habitat de origem. Ambos os fungos foram isolados a partir de sedimento marinho coletado a 20 m de profundidade (WENTZEL et al., 2019). A coluna de água, bem como o congelamento dos mares antárticos por longo período de tempo gera uma proteção contra a radiação solar, impedindo que grande parte da luz UV chegue os sedimentos (THOMAS; DIECKMANN, 2002). Porém, o isolado L.1345 apresentou uma resistência bem superior, quando comparado ao isolado L.1369, tendo sobrevivido em todos os tempos de exposição testados para UVC (Figura 6), além de um número maior de colônias terem sobrevivido no tratamento com UVB, nos tempos de exposição de 90 à 110 minutos (Figura 5).

Em contrapartida, o fungo L.564, isolado de amostra do organismo marinho *Salpa* sp. coletada em águas rasas, apresentou uma das maiores resistências contra radiação UV. As *Salpa* são tunicados planctônicos que se alimentam principalmente de zooplâncton (HUNTLEY; SYKES; MARIN, 1989). Na Antártica, esse zooplâncton se encontra próximo a superfície, na coluna d'água (PHLEGER; NICHOLS; VIRTUE,

1998). Considerando o fato de que esses tunicados estão mais próximos da superfície, a radiação UV provavelmente exerce maior influência do que nos sedimentos dos fundos oceânicos.

O isolado marinho de origem tropical L.446 também apresentou uma boa resistência contra radiação, tanto UVB, quanto UVC, sendo mais resistente do que alguns dos fungos antárticos testados. Da mesma forma que o isolado L.564 a amostra da qual este fungo foi isolado foi coletada em águas rasas. Além disso, este é um fungo melanizado de coloração escura (marrom olivácea) como pode ser observado na Figura 3.

5.5. Taxonomia Molecular

A caracterização taxonômica com o marcador ITS já havia sido realizada em estudos prévios do grupo de pesquisa da Profa. Lara Sette para todos os isolados antárticos analisados, tendo sido identificados como *Cladosporium* sp. Os estudos moleculares mais recentes acerca de *Cladosporium* reconhecem três complexos de espécies para o gênero: *C. cladosporioides*, *C. herbarum* e *C. sphaerospermum* (Bensch et al., 2018). Com base nas sequências de ITS e *act* utilizadas por Bensch et al. (2018) foi possível verificar após a construção das árvores filogenéticas com o marcador ITS (Figura 6) e com o marcador ITS concatenado com o marcador secundário *act* (Figura 7) que os 8 isolados antárticos se distribuem dentro de dois, desses três complexos: *C. cladosporioides* (isolados L.564, L.595, L.598, L.616, L.1345, L.1369 e L.1800) e *C. sphaerospermum* (isolado L.2541).

Quanto aos fungos antárticos representantes do complexo *C. cladosporioides*, o isolado L.564 formou um clado, a partir da árvore gerada com as sequências do marcador ITS, juntamente com os isolados L.598; L.1345 e L.1800, além de várias outras espécies de *Cladosporium* (Figura 7). Na árvore gerada a partir do uso concatenado dos marcadores (ITS-*act*) é possível observar que o isolado L.564 agrupou com o isolado L.1800 e com o representante da espécie *C. varians* (Figura 8). *C. varians* não possui uma ecologia muito clara. Esse fungo já foi isolado de folhas mortas, mas ainda presas na planta, podendo ser um fungo sapróbio, ou possivelmente endofítico. Representantes dessa espécie já foram reportados em diferentes regiões do mundo, como Alemanha, Índia, Rússia e Eslovênia, sempre a partir de material vegetal. Esse fungo apresenta crescimento de 17-22 milímetros de diâmetro em meio MA2%, após 14 dias, com uma coloração olivácea acinzentada (BENSCH et al., 2010). A árvore

gerada pelo uso dos marcadores ITS-*act*, agrupou o isolado L.1345 com a espécie *C. bambusicola* (Figura 8). O fungo *C. bambusicola* foi isolado de folhas de bambu em decomposição, em um fragmento da Floresta Atlântica, no “Parque Estadual da Serra do Brigadeiro”, Minas Gerais (COSTA; ROSADO; PEREIRA, 2022). Já o isolado L.598, com base nessa mesma análise, formou um clado juntamente com o isolado L.1369 e com a espécie *C. magnoliigena* (Figura 8). Os fungos identificados como *C. magnoliigena* são sapróbios e foram isolados de cones apodrecidos da planta terrestre *Magnolia grandiflora*, na província de Yunnan, China. Esse fungo apresenta crescimento de 50-60 milímetros de diâmetro após duas semanas, em meio de cultura MA2%, na temperatura de 18°C, com uma coloração olivácea acinzentada (JAYASIRI, S. et al. 2019). Cabe destacar que o isolado L.1369 na árvore filogenética gerada com o marcador ITS formou um agrupamento com a espécie *C. alboflavescens* (Figura 7). *C. alboflavescens* foi isolado de líquido broncoalveolar animal, Califórnia, Estados Unidos e apresenta crescimento de 34-36 milímetros de diâmetro em meio BDA, a 25°C, após 14 dias, com uma cor amarelada e acinzentada. A temperatura ótima de crescimento é na faixa de 20-25°C, sendo o máximo de 30°C e o mínimo de 15°C (SANDOVAL-DENIS, 2016).

Os dados derivados da análise filogenética do isolado L.595 a partir da árvore gerada com o marcador ITS (Figura 7), revelou que o mesmo formou um clado com o isolado L.616 e três espécies distintas do gênero estudado: *C. bambusicola*; *C. devikae* e *C. anthropophilum*. Contudo, de acordo com o resultado da análise dos marcadores concatenados ITS-*act* esses dois isolados antárticos se agruparam entre eles e apresentaram proximidade com a espécie *C. anthropophilum* (Figura 9). Representantes dessa espécie já foram isolados várias vezes do líquido broncoalveolar de seres humanos. É considerado um fungo sapróbio e, por ser comumente isolado de amostras clínicas humanas, tem uma relevância do ponto de vista da saúde importante. Essa espécie apresenta crescimento de 17-23 milímetros de diâmetro em meio BDA, a 25°C após 14 dias. A temperatura ótima de crescimento é de 25°C, com máximo em 35°C e mínimo em 5°C (SANDOVAL-DENIS, 2016).

O isolado L.2541, o único dentre os 8 a pertencer a um complexo diferente (*C. sphaerospermum*), quando analisado a partir da árvore gerada pelo marcador ITS, se mostrou mais próximo da espécie *C. halotolerans* (Figura 7). Gonçalves e colaboradores (2017) foram capazes de isolar, a partir de rochas encontradas na antártica continental, e identificar várias colônias de fungos que pertenciam à espécie *C.*

halotolerans. No entanto, a partir da árvore gerada pelo uso concatenado dos marcadores ITS-*act*, o isolado L.2541 se aproximou mais da espécie *C. endophyticum* (Figura 8). Cabe destacar que para a espécie *C. endophyticum* foi incluída na árvore do marcador ITS-*act*, apenas a sequência do gene ITS, visto que, não há sequência do marcador secundário *act* para essa espécie em bases de dados públicas. *C. endophyticum* é um fungo endófito isolado de folhas saudáveis de *Pandanus* sp., uma planta terrestre, na Tailândia e que apresenta crescimento de 9 milímetros de diâmetro em meio BDA, após seis semanas à 25°C, com uma coloração acinzentada e esverdeada. Usando informação molecular das sequências dos genes ITS, LSU, SSU e *tef1* combinados, a espécie formou um clado com *C. halotolerans* (TIBPROMMA, et al, 2018).

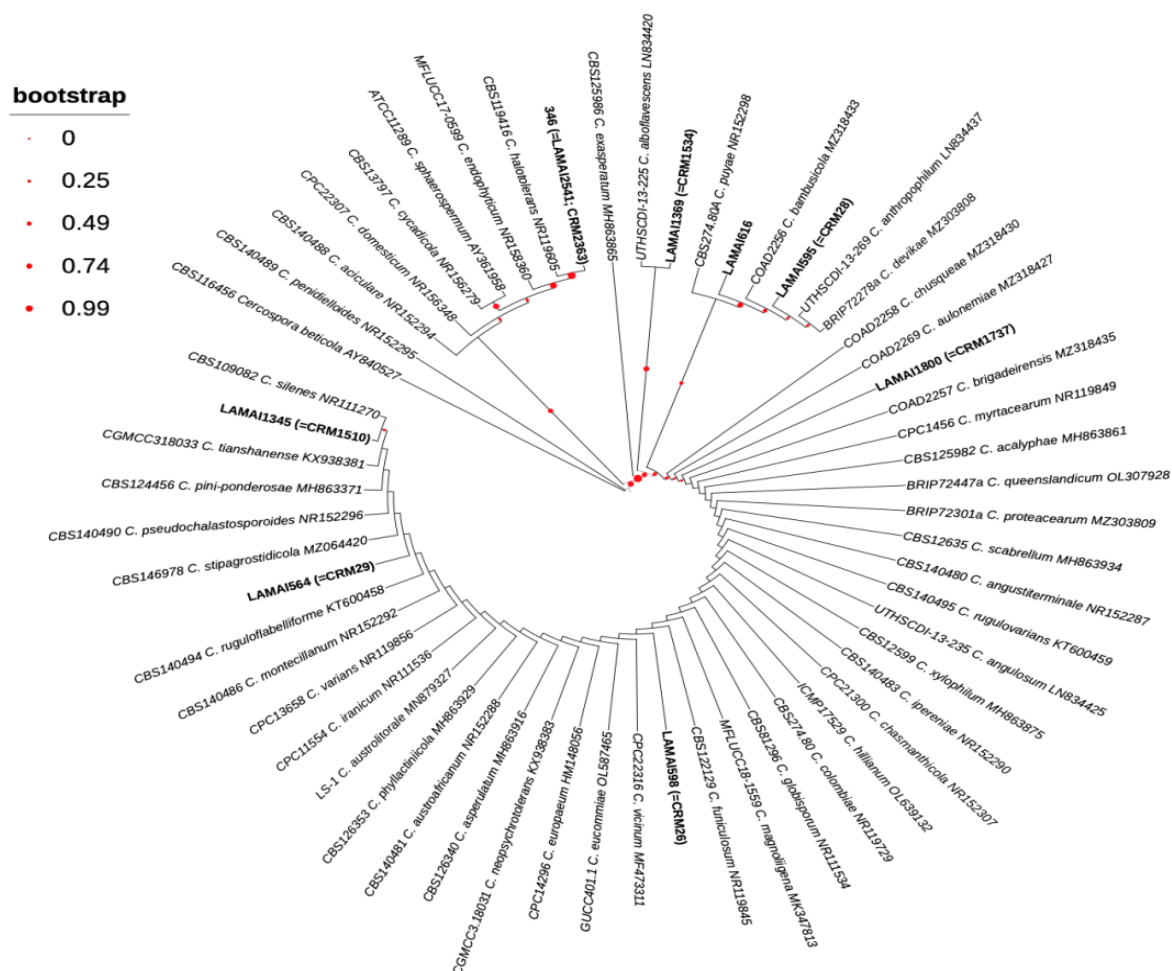
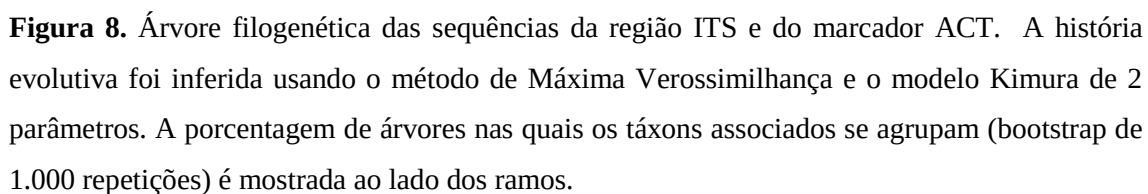


Figura 7. Árvore filogenética das sequências parciais da região ITS. A história evolutiva foi inferida usando o método de Máxima Verossimilhança e o modelo Kimura de 2 parâmetros. A porcentagem de árvores nas quais os táxons associados se agrupam (bootstrap de 1.000 repetições) é mostrada ao lado dos ramos.



48

de caracterização semelhantes, em conjunto com a filogenia, reforçam a ideia de que esses dois isolados podem pertencer a mesma espécie de *Cladosporium*.

A análise filogenética também revelou uma proximidade entre os isolados L.564 (recuperado de amostra do organismo marinho *Salpa* sp.) e L.1800 (isolado a partir de solo associado a raiz de *D. antarctica*). Apesar deles terem sido isolados de ambientes diferentes, esses dois isolados apresentam características morfológicas semelhantes (Figura 3), bem como similaridade nos parâmetros de crescimento em diferentes temperaturas (Tabela 7), meios de cultura (Figura 4) e resistência a radiação UVB e UVC (Figuras 5 e 6, respectivamente). Em contrapartida, esses dois isolados apresentaram alguma diferença no teste de estresse osmótico. O fungo L.564 apresentou uma tolerância maior do que a apresentada pelo fungo L.1800, sendo capaz de crescer nas concentrações salinas de 5 e 10%, enquanto que o fungo L.1800 cresceu apenas em 5%. De acordo com as análises filogenéticas e os dados de similaridade acima apresentados esses dois isolados podem pertencer a mesma espécie de *Cladosporium*.

Os isolados L.598 (recuperado de amostra de madeira) e L.1369 (isolado a partir de sedimento marinho), também apresentaram uma relação próxima, porém com uma distância evolutiva maior do que a das duplas de fungos acima citados. Levando em consideração as características morfológicas (Figura 3), os testes de crescimento em diferentes temperaturas (Tabela 7), salinidade (Tabela 8), meios de cultura e resistência a radiação UV (Figuras 4, 5 e 6, respectivamente), esses fungos apresentam distinções. O fungo L.1369 apresentou uma boa tolerância em concentrações mais elevadas de NaCl, sendo capaz de crescer nas concentrações de 5; 10 e 15%, o fungo L.598, apresentou uma baixa tolerância, apenas crescendo em 5%. O teste de temperatura também difere entre os dois fungos, sendo que o L.598 não foi capaz de crescer na temperatura de 5°C, enquanto que o fungo L.1369 cresceu em todas as temperaturas testadas. No teste de resistência contra radiação UV, o isolado L.1369 apresentou uma baixa resistência, enquanto que o isolado L.598, não conseguiu sobreviver em nenhum dos tempos de exposição testados, tanto para UVB, quanto para UVC. Apenas no experimento do cultivo nos diferentes meios de cultura (Figura 4), os dois fungos não diferiram tanto em relação ao crescimento.

O isolado L.1345 (recuperado de amostra de sedimento marinho) formou um clado juntamente com a espécie de *Cladosporium* recentemente descoberta *C. bambusicola* e separado dos outros isolados antárticos (Figura 7). Apesar de ser um fungo isolado a partir de amostra do ambiente marinho, o L.1345 apresentou uma

tolerância muito baixa a concentrações salinas mais elevadas, conseguindo crescer apenas em 5% de NaCl (Tabela 8). Além disso, os testes de resistência UV, tanto para UVB, quanto UVC, mostraram que esse fungo possui certa tolerância aos tempos de exposição testados, quando comparado ao outro isolado marinho L.1369 (Figuras 5 e 6). Além disso, o crescimento em milímetros apresentado por esse fungo nos meios de cultura MA2% e BDA (Figura 4), não condiz com o ambiente do qual foi isolado (sedimento marinho), além de superar todos os outros isolados antárticos em crescimento nesses dois meios de cultura. Levando em consideração as divergências apresentadas por esse isolado, nos testes de tolerância a salinidade, crescimento em diferentes meios de cultura e de resistência UV, é possível que esse isolado tenha chegado no ambiente marinho através de dispersão de um ambiente terrestre.

O isolado L.2541 (recuperado de amostra de solo de recuo da geleira Collins) foi o único que agrupou com espécie de *Cladosporium* pertencente ao complexo *C. sphaerospermum*, ficando mais distante dos outros fungos estudados. Esse isolado foi o que apresentou as características morfológicas mais distinta dos outros (Figura 3). Esse isolado também apresentou resultados de caracterização bem distintos dos demais fungos antárticos. Esse isolado cresceu muito pouco em todos os meios de cultura testados e foi o único que apresentou crescimento na faixa de temperatura entre 5 a 20°C. No experimento de estresse osmótico, esse isolado conseguiu crescer apenas na concentração de 5% de NaCl. Para os tratamentos com radiação UVB e UVC, o isolado L.2541 apresentou uma resistência muito baixa para ambos. Os resultados indicam que a temperatura ótima de crescimento é o parâmetro fisiológico que mais se encaixa no padrão observado para fungos isolados ambiente antártico.

Os resultados das análises moleculares e filogenéticas demonstraram que os 8 fungos antárticos estudados representam pelo menos 5 espécies distintas. O uso de um marcador secundário juntamente com o marcador ITS claramente revelou uma melhor resolução das relações filogenéticas entre os isolados estudados e as espécies de *Cladosporium* mais próximas. Porém, para a certificação da identificação taxonômica no âmbito de espécie e sugestão de possíveis novas espécies são necessárias análises taxonômicas adicionais utilizando outros marcadores concatenados (e.g. marcador secundário *tef1*), bem como a taxonomia convencional.

6. Conclusões

- Os isolados L.595, L.616 e L.1369 cresceram em uma ampla faixa de temperatura (5 a 30°C), podendo ser estudados quanto à produção de enzimas adaptadas ao frio. Esses mesmo isolados também apresentaram a maior tolerância a concentrações elevadas de NaCl, podendo ser explorados em situações de biorremediação que necessitam de microrganismos adaptados ao estresse osmótico.
- Os isolados L.564, L.595, L.616 e L.1800 apresentaram uma boa resistência contra radiação UVB e UVC, podendo ser testados mais a fundo quanto à produção de moléculas biotivas, capazes de absorver a irradiação solar.
- Dentre os oito isolados antárticos estudados, o L.595 foi o que mais se destacou em todos os experimentos de caracterização. Esse fungo foi o que apresentou a maior resistência contra radiação UVB e UVB, além de apresentar uma tolerância alta contra concentrações elevadas de NaCl, crescer em uma ampla faixa de temperatura e apresentar um bom crescimento em todos os meios de cultura testados.
- Dos oito fungos estudados nesse trabalho, os isolados L.564, L.595, L.616, L.1369 e L.1800 são os mais interessantes do ponto de vista de exploração biotecnológica, uma vez que apresentaram bons resultados nos testes de caracterização, sendo ótimos candidatos para estudos mais aprofundados e aplicados, com destaque para o isolado L.595, que apresentou as melhores características de resistência a condições adversas dentre esses cinco fungos antárticos.
- Em grupos altamente diversos, como no caso de *Cladosporium*, o uso de marcadores secundários para a identificação correta no âmbito de espécie é necessária. Como foi possível observar, a metodologia utilizada para a análise filogenética se beneficiou do uso do marcador *act*, o que permitiu avanços na identificação dos oito isolados aqui estudados. No entanto, o uso de outro marcador secundário (*tef1*), bastante usado para a identificação de *Cladosporium* se faz necessário para uma filogenia mais confiável.

7. Referencias Bibliográficas

ARENZ, B. E., et. al. Fungal diversity in soils and historic wood from the Ross Sea Region of Antarctica. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 38, p. 3057–3064, 2006.

AZMI, O. R.; SEPPELT, R. D. Fungi of the Windmill Islands, continental Antarctica. Effect of temperature, pH and culture media on the growth of selected microfungi. **Polar Biology**. Vol. 18. p. 128–134, 1997.

BENSCH, K. et al. Species and ecological diversity within the *Cladosporium cladosporioides* complex (Davidiellaceae, Capnodiales). **Studies in Mycology**, v. 67, p. 1–94, 2010.

BENSCH, K. et al. The genus *Cladosporium*. **Studies in Mycology**, v. 72, p. 1–401, 2012.

BENSCH, K. et al. Common but different: The expanding realm of *Cladosporium*. **Studies in Mycology**, v. 82, p. 23–74, 2015.

BENSCH, K. et al. *Cladosporium* species in indoor environments. **Studies in Mycology**, v. 89, p. 177–301, 2018.

BÖLTER, M.; BEYER, L.; STONEHOUSE, B. Antarctic Coastal Landscapes: Characteristics, Ecology and Research. In: BEYER, L.; BÖLTER, M. **Geocology of Antarctic Ice-free coastal landscapes**. Berlín: Springer-Verlag, v. 154, pp. 5-21, 2002.

BRAUN, U. et al. Phylogeny and taxonomy of *Cladosporium*-like hyphomycetes, including *Davidiella* gen. nov., the teleomorph of *Cladosporium* s. str. **Mycological Progress**, v. 2, n. 1, p. 3–18, 2003.

CARBONE, I.; KOHN, L. M. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. **Mycologia**, v. 91, n. 3, p. 553–556, 1999.

CROUS, P. W.; KANG, J.-C.; BRAUN, U. A phylogenetic redefinition of anamorph genera in *Mycosphaerella* based on ITS rDNA sequence and morphology. **Mycologia**, v. 93, n. 6, p. 1081–1101, 2001.

CROUS, P. W. et al. Delimiting *Cladosporium* from morphologically similar genera. **Studies in Mycology**, v. 58, p. 33–56, 2007.

- DA SILVA JÚNIOR, F. M. R. et. al. Growth of the fungus *Chaetomium aureum* in the presence of lead: implications in bioremediation. **Environmental Earth Sciences**, v. 77, p. 275, 2018.
- DA SILVA, M. et al. Cnidarian-derived filamentous fungi from Brazil: isolation, characterisation and RBBR decolourisation screening. **Environmental Technology**, v. 29, p. 1331–1339, 2008.
- DUARTE, A. W. F. et al. Production of cold-adapted enzymes by filamentous fungi from King George Island, Antarctica. **Polar Biology**, v. 41, n. 12, p. 2511–2521, 2018.
- FARIAS, G. S.; SANTOS, J. A., GIOVANELLA, P.; SETTE, L. D. Antarctic-derived yeasts: taxonomic identification and resistance to adverse conditions. **Anais Da Academia Brasileira de Ciências**, v. 94, 2022.
- GERARDO, N. M. et al. Exploiting a mutualism: parasite specialization on cultivars within the fungus–growing ant symbiosis. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, v. 271, n. 1550, p. 1791–1798, 2004.
- GESSLER, N. N.; EGOROVA, A. S.; BELOZERSKAYA, T. A. Melanin pigments of fungi under extreme environmental conditions (Review). **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 50, n. 2, p. 105–113, 2014.
- GONÇALVES, V. N. et al. Antarctic rocks from continental Antarctica as source of potential human opportunistic fungi. **Extremophiles**, v. 21, p. 851–860, 2017.
- GONÇALVES, V. N., et. al. *Penicillium solitum*: a mesophilic, psychrotolerant fungus present in marine sediments from Antarctica. **Polar Biology**, v. 36, p. 1823–1831, 2013.
- HAWKSWORTH, D. L.; LÜCKING, R. Fungal Diversity Revisited: 2.2 to 3.8 Million Species. **Microbiology Spectrum**, v. 5, n. 4, 2017.
- HUNTLEY, M. E.; SYKES, P. F.; MARIN, V. Biometry and Trophodynamics of *Salpa thompsoni* foxton (Tunicata: Thaliacea) Near the Antarctic Peninsula in Austral Summer, 1983-1984. **In Polar Biology**, v. 10, 1989.
- ITURRIETA-GONZÁLEZ, I.; GARCÍA, D.; & GENÉ, J. Novel species of *Cladosporium* from environmental sources in Spain. **MycoKeys**, v. 77, p.1–25, 2021.
- JAYASIRI, S. et al. Diversity, morphology and molecular phylogeny of Dothideomycetes on decaying wild seed pods and fruits. **Mycosphere**, v. 10, p. 1–186, 2019.

- KIMURA, M. A Simple Method for Estimating Evolutionary Rates of Base Substitutions Through Comparative Studies of Nucleotide Sequences. **In J. Mol. Evol.** v. 16, p. 111-120, 1980.
- KOSTADINOVA, N. et al. Isolation and identification of filamentous fungi from island livingston, antarctica. **Biotechnology and Biotechnological Equipment**, v. 23, p. 267–270, 2009.
- LETUNIC, I.; BORK, P. Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation. **Nucleic Acids Research**, v. 49, p.293–296, 2021.
- LOPERENA, L. et al. Extracellular enzymes produced by microorganisms isolated from maritime Antarctica. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 5, p. 2249–2256, 2012.
- LLORENTE, C. et. al. Cladosporium cladosporioides LPSC 1088 Produces the 1,8-Dihydroxynaphthalene-Melanin-Like Compound and Carries a Putative pks Gene. **Mycopathologia**, v. 174, p. 397–408, 2012.
- MADIGAN, Michael T. et al. **Microbiologia de Brock**. 14. ed. rev. Porto Alegre: Artmed, p. 985, 2016. ISBN 978-85-8271-298-6.
- MARSHALL, W. A. Seasonality in Antarctic airborne fungal spores. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 6, p. 2240–2245, 1997.
- MOHAN KUMAR, N. S.; MANONMANI, H. K. Purification, characterization and kinetic properties of extracellular l-asparaginase produced by Cladosporium sp. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 29, n. 4, p. 577–587, 2013.
- MÖLLER, E. M. et al. A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, and infected plant tissues. **Nucleic acids research**, v. 20, n. 22, p. 6115–6, 1992.
- MONYETHABENG, M. M., KRUGEL, M. The effect of UV-C treatment on various spoilage microorganisms inoculated into Rooibos iced tea. **LWT**, v. 73, p. 419–424, 2016.
- MURIEL, J. et al. Production of biosurfactants by Cladosporium resinae. **Biotechnology Letters**, v. 18, n. 3, p. 235–240,1996.

NARLA, S.; LIM, H. W. Sunscreen: FDA regulation, and environmental and health impact. **Photochemical & Photobiological Sciences: Official Journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology**, v. 19, p. 66–70, 2020.

OGÓREK, R. et al. Characteristics and taxonomy of Cladosporium fungi. **Mikologia Lekarska**, v. 19, n. 2, p. 80–85, 2012.

OH, J. et. al., 2021. Fungal melanin as a biocompatible broad-spectrum sunscreen with high antioxidant activity. **RSC Advances**. v.11, p. 19682–19689, 2021.

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

ONOFRI, S. et al. Resistance of Antarctic black fungi and cryptoendolithic communities to simulated space and Martian conditions. **Studies in Mycology**, v. 61, p. 99–109, 2008.

PHLEGER, C. F., NICHOLS, P. D., VIRTUE, P. Lipids and trophodynamics of Antarctic zooplankton. In **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**, v. 120, 1998.

RAJA, H. A. et al. Fungal Identification Using Molecular Tools: A Primer for the Natural Products Research Community. **Journal of Natural Products**, v. 80, n. 3, p. 756–770, 2017.

PULSCHEN, A. et. al., Resistant yeasts isolated from a high-altitude volcanic area on the Atacama Desert as eukaryotic models for astrobiology. **Microbiology Open**, v. 58, p. 574-578, 2015.

REIS-MANSUR, M. C. P. P. et. al. Carotenoids from UV-resistant Antarctic Microbacterium sp. LEMMJ01. **Scientific Reports**, v. 9, p. 9554, 2019.

ROBINSON, C. H. Cold adaptation in Arctic and Antarctic fungi. **New Phytologist**, 151(2), p. 341–353, 2001.

RODRIGUES, T. N.; BULHÕES, E. M. R. Análise de séries históricas de dados de temperatura e precipitação no litoral brasileiro. In **Os Desafios da Geografia Física na Fronteira do Conhecimento**, p.1679–1684, 2017.

SAN-BLAS, G. et. al. *Cladosporium carrionii* and *Hormoconis resinae* (C. resinae): Cell Wall and Melanin Studies. **An International Journal**, v.32, p. 11-16, 1996.

SANDOVAL-DENIS, M. New species of *Cladosporium* associated with human and animal infections. **Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, v. 36, p. 281–298, 2016.

SANTOS, J. A. dos, MEYER, E., SETTE, L. D. Fungal Community in Antarctic Soil Along the Retreating Collins Glacier (Fildes Peninsula, King George Island). **Microorganisms**, v. 8, p. 1145, 2020.

SCHOCH, C. L. et al. A multigene phylogeny of the Dothideomycetes using four nuclear loci. **Mycologia**, v. 98, n. 6, p. 1041–1052, 2006.

SCHUBERT, K. et al. Biodiversity in the *Cladosporium* herbarum complex (Davidiellaceae, Capnodiales), with standardisation of methods for *Cladosporium* taxonomy and diagnostics. **Studies in Mycology**, v. 58, n. 1998, p. 105–156, 2007.

SELBMANN, L. et. al. Resistance to UV-B induced DNA damage in extreme-tolerant cryptoendolithic Antarctic fungi: detection by PCR assays. **Fungal Biology**, 115(10), 937–944, 2011.

SHUNK G. K.; GOMEZ, X. R.; AVERESCH, N. J. H. Growth of the Radiotrophic Fungus *Cladosporium sphaerospermum* aboard the International Space Station and Effects of Ionizing Radiation. **BioRxiv**, 2020.

SIMAS, F. N. B., et al. Ornithogenic cryosols from Maritime Antarctica: Phosphatization as a soil forming process. **Geoderma**, v. 138, p. 191–203, 2007.

SINGH, J.; DUBEY, A. K.; SINGH, R. P. Antarctic terrestrial ecosystem and role of pigments in enhanced UV-B radiations. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 10, n. 1, p. 63–77, 2011.

SISLER, H. D.; SIEGEL, M. R. Cycloheximide and Other Glutarimide Antibiotics. In: **Mechanism of Action**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, p. 283–307, 1967.

SULZBACH, F. M.; FASSONI-ANDRADE, A. C.; ANDRADE, A. M. de. Mapeamento das Variações na Área da Frente da Geleira Collins (Antártica) e Relações com a Temperatura do Ar entre 1986 e 2017. **Anuário Do Instituto de Geociências**, v. 44, 2021.

THOMAS, D. N., & DIECKMANN, G. S. Antarctic Sea Ice--a Habitat for Extremophiles. **Science**, v. 295, p. 641–644, 2002.

TIBPROMMA, S. et al. Identification of endophytic fungi from leaves of Pandanaceae based on their morphotypes and DNA sequence data from southern Thailand. **MycoKeys**, v. 33, p. 25–67, 2018.

TINDALL, B. J. Prokaryotic Diversity in the Antarctic: The Tip of the Iceberg. **Microbial Ecology**, v. 47, n. 3, p. 271–283, 2004.

TOSI, S. et al. Fungi isolated from Antarctic mosses. **Polar Biology**, v. 25, n. 4, p. 262–268, 2002.

TURNER, J. et al. Antarctic Climate Change and the Environment, a Contribution to the International Polar Year 2007–2008. In: **Scientific Committee on Antarctic Research**, v. 1, p. 1-26, 2009.

VISHNIAC, H. S.; HEMPFLING, W. P. Evidence of an Indigenous Microbiota (Yeast) in the Dry Valleys of Antarctica. **Journal of General Microbiology**, v. 112, n. 2, p. 301–314, 1979.

WENTZEL, L. C. P. et al. Fungi from Admiralty Bay (King George Island, Antarctica) Soils and Marine Sediments. **Microbial Ecology**, v. 77, n. 1, p. 12–24, 2019.

WHITE, T. J. et al. Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics. In: **PCR Protocols**. [s.l.] Elsevier, p. 315–322, 1990.

WIRSEL, S. G. R. et al. Four or more species of Cladosporium sympatrically colonize Phragmites australis. **Fungal Genetics and Biology**, v. 35, n. 2, p. 99–113, 2002.

WONG, H. J. et. al. Protective mechanisms and responses of micro-fungi towards ultraviolet-induced cellular damage. **Polar Science**, v. 20, p. 19–34, 2019.