



**FABIANA REINIS FRANCA PASSAMANI**

**FUNGAL DIVERSITY OF ANTARCTIC AND POTENTIAL  
DEGRADATION OF DIESEL FUEL ARCTIC**

**LAVRAS – MG**

**2021**

**FABIANA REINIS FRANCA PASSAMANI**

**FUNGAL DIVERSITY OF ANTARCTIC AND POTENTIAL  
DEGRADATION OF DIESEL FUEL ARTIC**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de Doutor.

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Cristina Ferreira Silva e Batista

Orientadora

Prof. Dr. Luis Roberto Batista

Coorientador

Prof. Dr. Juliano de Carvalho Cury

Coorientador

**LAVRAS - MG**

**2021**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Passamani, Fabiana Reinis Franca.

Fungal Diversity of Antarctic and Potential Degradation of  
Diesel Fuel Arctic / Fabiana Reinis Franca Passamani. - 2021.  
76 p. : il.

Orientador(a): Cristina Ferreira Silva Batista.

Coorientador(a): Luis Roberto Batista, Juliano de Carvalho  
Cury.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2021.  
Bibliografia.

1. Fungos Antártica. 2. Degradação. 3. Hidrocarbonetos. I.  
Batista, Cristina Ferreira Silva. II. Batista, Luis Roberto. III. Cury,  
Juliano de Carvalho. IV. Título.

**FABIANA REINIS FRANCA PASSAMANI**

**DIVERSIDADE DE FUNGOS DA ANTÁRTICA E POTENCIAL DE  
DEGRADAÇÃO DO ÓLEO DIESEL ÁRTICO**

**FUNGAL DIVERSITY OF ANTARCTIC AND POTENTIAL DEGRADATION  
OF DIESEL FUEL ARTIC**

Tese apresentada à  
Universidade Federal de  
Lavras, como parte das  
exigências do Programa de  
Pós-Graduação em  
Microbiologia Agrícola, para a  
obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 28 de outubro de 2021.

Dra. Kelly Cristina da Silva Brabes – UFGD

Dra. Kelly Cristina dos Reis – UFC

Dra. Luciana Silva Ribeiro Martins – UFLA

Dr. Victor Satler Pylro – UFLA

Profª Drª. Cristina Ferreira Silva e Batista

Orientadora

Prof. Dr. Luis Roberto Batista

Coorientador

Prof. Dr. Juliano de Carvalho Cury

Coorientador

**LAVRAS - MG**

**2021**

Aos meus pais Emilson e Sonia, por ainda acreditarem em mim.

A meu esposo Marcelo, por todo amor, apoio e compreensão.

Aos meus filhos Bruno e Clara, por me ensinarem o verdadeiro significado do amor.

Vocês são tudo pra mim.

Dedico

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Instituto de Ciências Naturais, pela oportunidade concedida para a realização do doutorado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig) pela concessão da bolsa de estudos.

A minha orientadora Dra Cristina Ferreira Silva e Batista, por ter aceitado o desafio em me orientar neste doutorado. Você pra mim é um exemplo de mulher, mãe e profissional.

Ao Dr. Luis Roberto Batista, por ainda confiar e acreditar em mim. Você é um grande amigo.

Ao Dr. Juliano de Carvalho Cury, por dividir o seu conhecimento sobre esse fascinante continente Antártico.

Ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, por ter me dado a oportunidade de aprender muito mais sobre esse mundo microbiano.

Ao NEMAI por ter me dado a oportunidade de aprender e também de ensinar um pouco do que sei sobre os microrganismos.

Ao Laboratório de Micologia e Micotoxinas de Alimentos por todo o suporte e apoio na execução dos experimentos.

Aos colegas da pós-graduação, Lilian, Carlos, Nathasha, Renan, Thalissa e Maysa, por terem feito os momentos mais leves e agradáveis.

A Dra. Suzana Reis Evangelista, por ter dividido seus conhecimentos e me apoiado em momentos angustiantes durante a execução dos experimentos.

A Dra. Taís Teixeira das Neves, pela amizade e por estar sempre disponível em me auxiliar na execução dos experimentos e na análise dos resultados.

**MUITO OBRIGADA!**

## RESUMO

O solo antártico é considerado oligotrófico, com baixa umidade, alta salinidade, elevada incidência de radiação ultravioleta e submetido a períodos prolongados de baixa temperatura. Por essas condições extremas, é atribuído baixa abundância e diversidade da comunidade microbiana, quando comparado a solos tropicais e temperados. Dentre os microrganismos isolados e identificados até o momento na Antártica, os fungos são os que apresentam maior diversidade sendo identificados como simbiontes (líquens), micorrízicos e saprófitas. Acidentes com derramamento de óleo, durante o transporte e estocagem, têm despertado a atenção de pesquisadores em busca de alternativas para remediação, e o uso de microrganismos é uma prática viável, barata e ambientalmente correta. Conhecer os microrganismos capazes de degradar esses poluentes orgânicos é de extrema relevância para auxiliar no estabelecimento de protocolos de processos de remediação, assim como no aumento do conhecimento da diversidade desses organismos em um ambiente extremo como o da Antártica. Nesse sentido, o presente estudo teve como objetivos gerais avaliar a diversidade de fungos cultiváveis do solo da Antártica, bem como avaliar a capacidade de degradação de tolueno, xileno, hexadecano, heptano e dodecano por espécies autóctones e ainda, caracterização do perfil proteico dos isolados na presença destes hidrocarbonetos.

**Palavras-chave:** Diversidade, Biorremediação, Hidrocarbonetos, Fungos

## ABSTRACT

Antarctic soil is considered oligotrophic, with low humidity, high salinity, high incidence of ultraviolet radiation and subjected to prolonged periods of low temperature. Due to these extreme conditions, low abundance and diversity of the microbial community is attributed when compared to tropical and temperate soils. Among the microorganisms isolated and identified so far in Antarctica, fungi are the ones with the greatest diversity, being identified as symbionts (lichens), mycorrhizals and saprophytes. Accidents with oil spills, during transport and storage, have attracted the attention of researchers in search of alternatives for remediation, and the use of microorganisms is a viable, cheap and environmentally correct practice. Knowing the microorganisms capable of degrading these organic pollutants is extremely important to help establish protocols for remediation processes, as well as to increase knowledge of the diversity of these organisms in an extreme environment such as Antarctica. In this sense, the present study had as general objectives to evaluate the diversity of cultivable fungi in the soil of Antarctica, as well as to evaluate the degradation capacity of toluene, xylene, hexadecane, heptane and dodecane by autochthonous species and also to characterize the protein profile of the isolates in the presence of these hydrocarbons.

**Keywords:** Diversity, Bioremediation, Hydrocarbons, Fungi.



## SUMÁRIO

	<b>PRIMEIRA PARTE</b>	
1	<b>INTRODUÇÃO</b>	1
2	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b>	3
3	<b>CONCLUSÃO</b>	11
	<b>REFERÊNCIAS</b>	12
	<b>SEGUNDA PARTE - ARTIGOS</b>	
	<b>ARTIGO 1 – CULTIVABLE FUNGAL COMMUNITY OF THE RHIZOSPHERE SOIL OF <i>Deschampsia antarctica</i> AND THEIR PROMISING SPECIES FOR DIESEL OIL DEGRADATION</b>	17
	<b>ARTIGO 2 – DEGRADAÇÃO DE HIDROCARBONETOS DERIVADOS DO ÓLEO DIESEL (DFA) POR DUAS ESPÉCIES AUTÓCTONES DA ANTÁRTICA</b>	39
1	<b>INTRODUÇÃO</b>	41
2	<b>DESENVOLVIMENTO</b>	42
3	<b>CONCLUSÃO</b>	57
	<b>REFERÊNCIAS</b>	58

## 1. INTRODUÇÃO

A Antártica é considerado um ambiente extremo, e por essa condição, se encontra preservado, portanto, qualquer alteração climática do planeta Terra é percebido nesse continente. Atualmente, existem cerca de 30 estações de pesquisas permanentes, pertencentes a diversos países que fazem parte do tratado da Antártica, inclusive o Brasil, e que realizam pesquisas relacionadas aos fenômenos de alterações climáticas, camada de ozônio, efeito estufa, inventários de fauna e flora terrestres e marinhos e diversidade e bioprospecção de microrganismos desses ecossistemas. Essas atividades tem causado um impacto ambiental nas áreas do entorno da estação, devido ao fluxo de pesquisadores e do transporte de todo o material necessário para a manutenção e funcionamento da mesma (JESUS *et al.*, 2015; CURY *et al.*, 2017; JURELEVICIUS *et al.*, 2021). Além disso, toda a energia gerada na estação de pesquisa é proveniente da queima de combustível, que fica armazenado em tanques para ser utilizada o ano inteiro. Vazamentos durante o transporte desses combustíveis e dos próprios tanques já foram constatados por meio de análises de poluentes orgânicos no solo da região do entorno da estação brasileira, a Estação Antártica Comandante Ferraz (EACF) (CURY *et al.*, 2015).

No ano de 2010, durante o OPERANTAR XXVIII, se iniciaram as atividades relacionadas ao programa de biorremediação do solo da EACF contaminado com hidrocarbonetos, que tem como principal objetivo desenvolver pesquisa envolvendo o solo da EACF contaminado com hidrocarbonetos provenientes de vazamentos de óleo diesel, como fazem países como Argentina, Austrália e Nova Zelândia. Uma das alternativas viáveis para essa remediação é através de processos biológicos, pois são considerados mais baratos, eficazes e ambientalmente correto, o que torna o seu uso bastante atrativo. Mas, para isso é necessário a realização de estudos que visam isolar e identificar microrganismos autóctones de solo antártico que tenham a capacidade de degradarem esse hidrocarbonetos derivados do óleo diesel.

O solo da Antártica representa um habitat extremo para a colonização e sobrevivência de vida microbiana e, por essas condições extremas, duas características são atribuídas: baixa abundância e diversidade dos micro-organismos, quando comparado a regiões de clima temperado (ARENZ E BLANCHETTE, 2011). Apesar disso, os fungos são considerados o grupo de maior diversidade encontrado, nos diferentes ecossistemas que compõem o continente antártico (GODINHO *et al.*, 2015).

ARENZ E BLANCHETTE (2011), avaliando a diversidade de fungos em amostras de solo do continente Antártico, observaram a predominância de ascomicetos filamentosos e os gêneros

mais predominantes foram *Geomyces* e *Cadophora*. GODINHO *et al.* (2015), avaliando a diversidade e a bioprospecção de fungos do solo do continente Antártico, obtiveram 115 isolados de fungos de 8 amostras de solo, representados por 11 táxon nos gêneros *Aspergillus*, *Debaryomyces*, *Cladosporium*, *Pseudogymnoascus*, *Penicillium* e *Hypocreales*. O táxon com a maior abundância foi *Hypocreales* sp., *Penicillium brevicompactum* e *Aspergillus sydowii*. HELD E BLANCHETTE (2017), isolaram 326 cepas de 218 amostras de solo antártico e 79% dos isolados pertenciam ao Filo Ascomycota, distribuídos em 53 táxon, seguido por 11 táxon (24%) do Filo Basidiomycota e 4 táxon pertencentes ao Filo Zygomycota, representando 6% do total de isolados. O gênero mais abundante do Ascomycota foi o *Cadophora* (29%), seguido do *Phialocephala* (10 %), *Lecythophorae* e *Coniochaeta* (9 %), *Cosmospora* (8 %) e *Phoma* (8 %). Pode-se observar que nos estudos realizados houve uma predominância de fungos pertencentes ao Filo Ascomycota.

Além da sua diversidade, os fungos ascomicetos parecem desempenhar uma variedade de papéis ecológicos na Antártica, mas pouca informação se tem a respeito dessa função ecológica (BRIDGE E SPOONER, 2012). Já foram isolados e identificados alguns fungos que formam simbiose com líquens, associações micorrízicas com gramínea da Antártica (*Deschampsia antarctica*), fungos capazes de produzir diferentes compostos bioativos (GODINHO *et al.*, 2015) e fungos envolvidos com a decomposição de compostos orgânicos (UPSON *et al.*, 2008). De acordo com YERGEAU *et al.* (2007), existe uma alta taxa de detecção de genes de fungos ligados à decomposição, sugerindo que eles seriam os principais decompositores na Antártica.

Nesse sentido, o presente estudo teve como objetivo caracterizar a diversidade, riqueza, dominância e similaridade da comunidade fúngica presente em solo de rizosfera de *Deschampsia antarctica* e também avaliar a capacidade desses isolados em degradar os hidrocarbonetos que fazem parte da composição do óleo diesel utilizado na estação Antártica Comandante Ferraz, visando otimizar o uso desses microrganismos em processos de biorremediação do solo contaminado com esses poluentes. Os resultados obtidos serão apresentados em dois capítulos.

## **2. REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1 Antártica**

A Antártica, também denominada por Antártida, no Brasil, é o continente mais meridional e um dos maiores, com uma superfície de 14 milhões de Km<sup>2</sup>. Localizada ao redor do polo Sul, está quase completamente coberta por enormes geleiras, com exceção a algumas zonas de elevado aclave nas cadeias montanhosas e à extremidade norte da península Antártica (NSF, 1997).

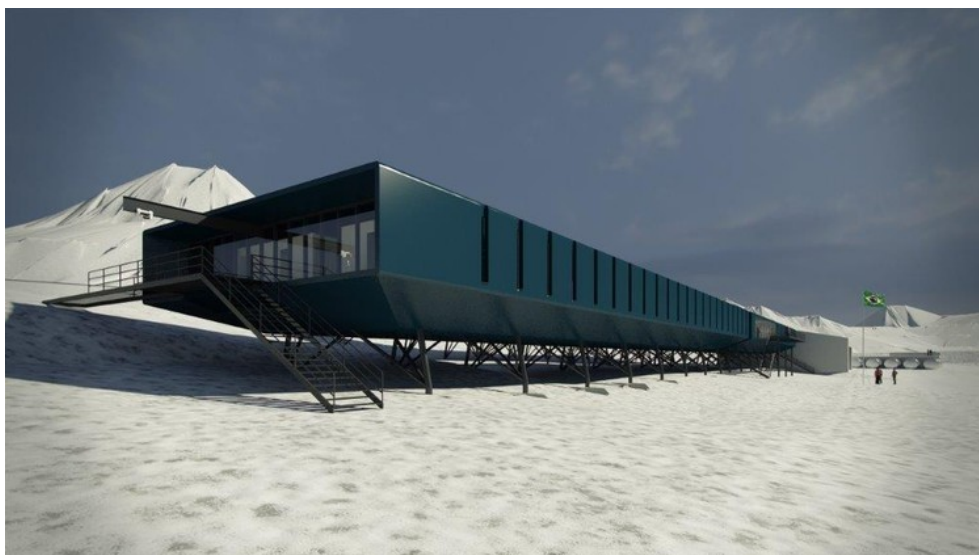
A Península Antártica é a parte continental mais setentrional da Antártica e localiza-se no Hemisfério Ocidental, próximo da América do Sul. A península é muito montanhosa, com picos podendo atingir 2.800 m de altitude. As temperaturas mínimas dos meses mais amenos (dezembro, janeiro e fevereiro) permanecem abaixo de 0°C e as máximas entre 0°C e 10°C. Nos meses de inverno, entre junho e agosto, as temperaturas mínimas atingem valores de -18°C e -15°C e as máximas entre -6°C e -10°C (NSF, 1997).

Por essas características ambientais é considerado um ambiente extremo, caracterizado por condições elevadas de estresse e perturbação que são amplificadas por alta aridez, alta incidência de radiação ultravioleta, baixa disponibilidade de nutrientes e períodos prolongados de baixas temperaturas (WU *et al.*, 2016). No entanto, a Antártica é considerada uma área de fundamental importância, pois nela estão presentes 70% das reservas de água doce do planeta. Uma vez que a península tem o clima mais ameno da Antártica, é nesse local e nas muitas ilhas próximas, que se localiza a maioria das estações de pesquisa. Um total de 30 países, todos signatários do Tratado Antártico, operam estações de pesquisa na Antártica, algumas são operadas somente no verão e outras são mantidas ativas o ano inteiro. O Brasil possui uma base científica, que é a Estação Antártica Comandante Ferraz (EACF).

### **2.2 Estação Antártica Comandante Ferraz (EACF)**

A EACF se encontra localizada na Ilha do Rei George, a 130 Km da Península Antártica, na Baía do Almirantado. A EACF começou suas atividades no ano de 1984 e foi parcialmente destruída, por um incêndio, em 2012. Em março de 2014, as pesquisas científicas foram retomadas devido a instalação de módulos emergenciais, mas a reconstrução da base científica só teve início em janeiro de 2017 e sua conclusão ocorreu em janeiro de 2020 (FIGURA 1).

Figura 1 – Estação Antártica Comandante Ferraz (EACF).



Fonte: (www.defesaaereanaval.br)

Na estação são realizadas pesquisas importantes relacionadas ao monitoramento de fenômenos da alta atmosfera, como temperatura e ondas gravitacionais, ao monitoramento da dinâmica do buraco de ozônio atmosférico e dos raios ultravioleta; de parâmetros atmosféricos de superfície; inventários de fauna e flora locais (ambos terrestres e marinhos); qualidade do ar e impactos ambientais locais, como contaminação de solos por derivados de petróleo (CURY, 2017).

Toda a energia utilizada na estação é gerada a partir de derivados de petróleo, por meio da queima de combustível estocada em tanques. O combustível mais utilizado na região é o DFA (Diesel Fuel Artic), o qual é composto principalmente por hidrocarbonetos semivoláteis derivados do petróleo. Esse combustível também é utilizado para o abastecimento dos meios de transporte utilizados na estação, tanto por via marítima como por via terrestre.

### **2.3 Contaminação ambiental com derivados de petróleo**

Os acidentes com derramamento de derivados de petróleo têm se tornado um dos problemas desse século, e uma grande preocupação está relacionada à capacidade dos hidrocarbonetos derivados de petróleo contaminarem a superfície das águas e o solo, podendo atingir o lençol freático (HEIDERSCHIEDT *et al.*, 2016). Os derramamentos de óleo, vazamento de tanques de armazenamento e disposição inadequada de águas residuárias são as principais rotas para a entrada

de toneladas de hidrocarbonetos no meio ambiente e podem ocorrer em todas as etapas de produção, transporte e manuseio de produtos petrolíferos (BARNES *et al.*, 2018).

No ano de 1986 um derramamento acidental de óleo ocorreu próximo a área da estação de pesquisa brasileira na Antártica. Como toda a energia gerada na estação é proveniente de derivados de petróleo e por meio da queima do óleo diesel estocado em tanques, a possibilidade de vazamentos de combustíveis, durante o transporte e a queima, é uma realidade e tem chamado a atenção dos órgãos ambientais responsáveis e da comunidade científica (OLIVEIRA, 2007).

O petróleo e seus derivados são uma mistura complexa de vários compostos orgânicos, como os hidrocarbonetos alifáticos (alcanos e alcenos), hidrocarbonetos aromáticos (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno), e os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs) (naftaleno, antraceno, fenantreno, fluorenteno, pireno, benzantraceno e benzopireno) (GOLDSWORTH *et al.*, 2003). Os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs) são compostos recalcitrantes e esta propriedade se deve a energia de ressonância que mantém as estruturas aromáticas, conferindo um alto potencial redox para as reações de transferência de elétrons (JOHNSEN *et al.*, 2004). Em consequência, somente enzimas específicas são capazes de clivar essas ligações. Além disso, apresentam propriedades tóxicas, mutagênicas e carcinogênicas aos seres humanos, pela presença da fração aromática (GOLDMAN, 2001; TOHON *et al.*, 2015). Devido ao impacto adverso desses compostos químicos a saúde humana, são classificados pela Agência de Proteção Ambiental Americana como poluentes ambientais prioritários, ou seja, a contaminação de ambientes com derivados de hidrocarbonetos é um dos temas que mais preocupam (US EPA, 1986). No Brasil, a Resolução CONAMA n°398 que trata da gestão de resíduos e produtos perigosos orienta e exige a elaboração de um plano de emergência quando da ocorrência de derramamentos e vazamentos de óleos em águas sob jurisdição nacional, inclusive quanto a remediação da área afetada (RDC 398, 2008).

## **2.4 Diversidade de fungos**

Os fungos apresentam ampla distribuição na natureza e ocupam os mais diferentes nichos ecológicos, sendo considerados o grupo de maior diversidade nos diferentes ecossistemas, inclusive nos que compõem o continente antártico (GODINHO *et al.*, 2015). Os fungos contribuem para a estabilidade dos ecossistemas e são os principais responsáveis pela ciclagem de nutrientes e compostos químicos, incluindo a degradação de poluentes orgânicos (MOREIRA E SIQUEIRA, 2006). De acordo com HAWKSWORTH (2017) estima-se que existam 3,5 milhões de espécies de

fungos e essa estimativa se baseia em observações do quociente entre o número de espécies de fungos e o número de espécies de plantas em ambientes selecionados.

O avanço das técnicas moleculares permitiu aumentar o conhecimento sobre a diversidade desses microrganismos, inclusive em ambientes extremos, como o solo da Antártica. ARENZ E BLANCHETTE (2011), avaliando a diversidade de fungos em amostras de solo do continente Antártico, observaram a predominância de ascomicetos filamentosos e os gêneros mais predominantes foram *Geomyces* e *Cadophora*. HELD E BLANCHETTE (2017), isolaram 326 cepas de 218 amostras e 79% dos isolados pertenciam ao Filo Ascomycota, distribuídos em 53 taxa, seguido por 11 taxa (24%) do Filo Basidiomycota e 4 taxa pertencentes ao Filo Zygomycota, representando 6% do total de isolados. O gênero mais abundante de Ascomycota foi o *Cadophora* (29%), seguido do *Phialocephala* (10 %), *Lecythophorae* e *Coniochaeta* (9 %), *Cosmospora* (8 %) e *Phoma* (8 %). GODINHO *et al.* (2015) ao avaliarem a diversidade e a bioprospecção de fungos do solo do continente Antártico, obtiveram 115 isolados de fungos de 8 amostras de solo, representados por 11 taxa dos gêneros *Aspergillus*, *Debaryomyces*, *Cladosporium*, *Pseudogymnoascus*, *Penicillium* e *Hypocreales*. O táxon com a maior abundância foi *Hypocreales* sp., *Penicillium brevicompactum*, e *Aspergillus sydowii*.

## **2.5 Técnicas para avaliação da diversidade de microrganismos**

### **2.5.1 Técnicas dependentes de cultivo**

Apesar de laboriosas e demoradas, as técnicas dependentes de cultivo são essenciais para os estudos de diversidade microbiana em qualquer tipo de ambiente (DITTAMI E EDVARSEN, 2012), pois permitem a observação morfológica, caracterização e contagem das colônias crescidas sob a superfície do meio de cultura.

As técnicas dependentes de cultivo requerem uma etapa de enriquecimento seguida de isolamento e identificação dos microrganismos que foram capazes de crescer naquelas condições nutricionais, de temperatura e pH a que foram submetidos. Assim, os microrganismos obtidos a partir de amostras naturais são isolados de modo altamente seletivo, pela manipulação dos nutrientes e das condições de incubação. Dessa forma, aqueles que não possuem habilidade para crescer nessas condições de cultivo selecionadas, não são considerados em estudos de diversidade, o que torna subestimado os resultados obtidos . Por isso, a importância do uso de diferentes meios

de cultura e diferentes condições de parâmetros físicos (temperatura, umidade, pH) para o cultivo microbiano, aliado ao uso de técnicas independentes de cultivo (ARENZ E BLANCHETTE, 2011).

### **2.5.2 Técnicas independentes de cultivo**

Com o avanço da biologia molecular, as técnicas independentes de cultivo vêm sendo utilizadas para complementar os estudos de diversidade, pois permitem a identificação e caracterização de populações microbianas, tanto das cultiváveis como daquelas não cultiváveis em condições de laboratório.

As técnicas moleculares tem permitido a detecção *in situ* dos microrganismos no ambiente, dispensando o cultivo prévio (GANDRA *et al.*, 2008) e, favorecendo o entendimento estrutural e funcional de muitas comunidades microbianas, o que tem contribuído com os avanços na área biotecnológica, como na aplicação desses microrganismos em processos como, por exemplo, biorremediação de ambientes contaminados (NASRAWI, 2012; YANTO E TACHIBANO, 2014; EJECHI E OZOCHI, 2015; CURY *et al.*, 2015; JESUS *et al.*, 2015; WU *et al.*, 2016; IJOMA E TEKERE, 2017). Na Antártica, o uso dessas técnicas tem permitido ampliar o conhecimento acerca dos microrganismos associados a diferentes substratos, como solo, rochas, lagos, ambientes marinhos, sedimentos, animais e plantas, possibilitando inclusive a descoberta de novas espécies de fungos filamentosos (ROSA *et al.*, 2019).

### **2.6 Potencial uso de fungos na degradação de hidrocarbonetos aromáticos**

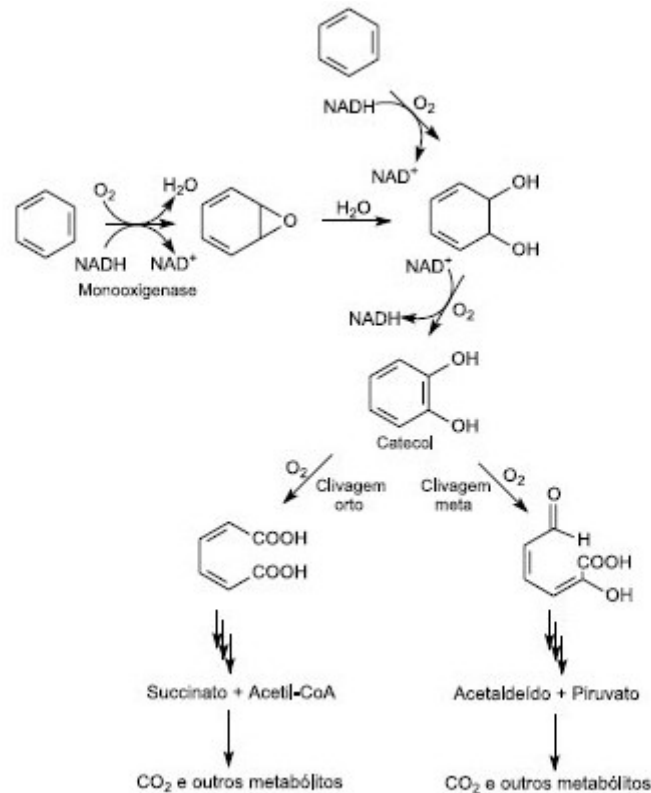
O uso dos microrganismos vem sendo considerado a principal via para a degradação de compostos orgânicos poluentes do solo e das águas subterrâneas, por ser mais econômica quando comparado aos processos físico-químicos, além de ser considerado ambientalmente correta e segura (HARITASHI E KAUSHIK, 2009, BOVIO *et al.*, 2018; LI *et al.*, 2020).

Tanto bactérias como fungos apresentam a capacidade metabólica e fisiológica de degradação desses hidrocarbonetos (KRAUSS *et al.*, 2011; CÉBRON *et al.*, 2015; LING *et al.*, 2015; MIURA E URABA, 2015; CURY *et al.*, 2015; ANDREOLLI *et al.*, 2015, BARNES *et al.*, 2018; LI *et al.*, 2020). A biodegradação de compostos aromáticos por microrganismos procarióticos aeróbios é iniciada pela ação de dioxigenases que promovem a oxidação do substrato formando dióis, seguida



de clivagem do anel e formação de catecol que, posteriormente, é degradado formando diferentes intermediários, como acetaldeído, piruvato e succinato (WENTZEL *et al*, 2007) (FIGURA 2).

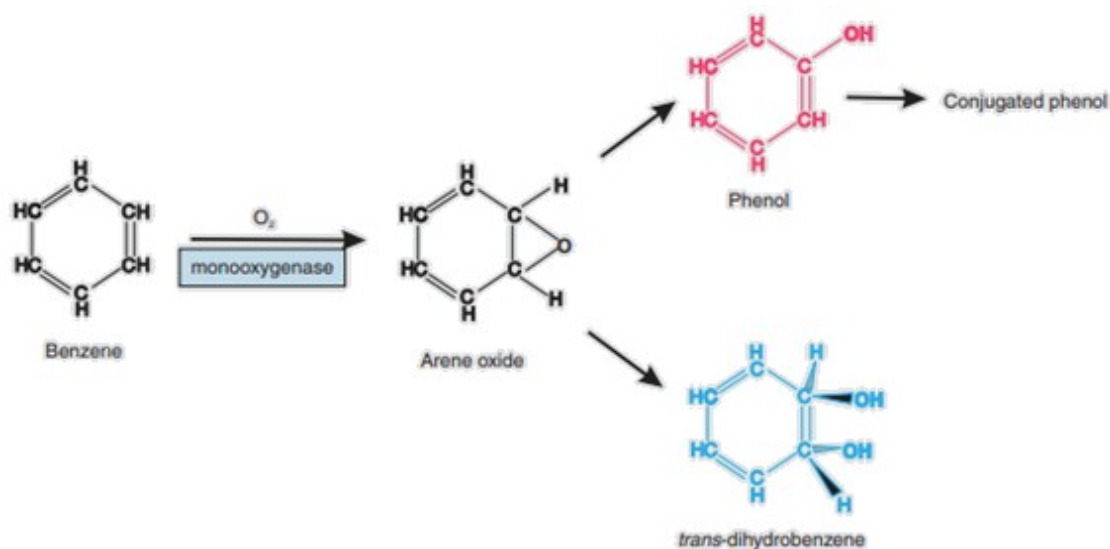
Figura 2 – Rotas metabólicas de biodegradação de hidrocarbonetos aromáticos por procariotos aeróbicos.



Fonte: CRUZ E MARSAIOLI, 2012.

Diferente do observado para os organismos procarióticos, alguns microrganismos eucarióticos não mineralizam completamente os compostos aromáticos, sendo preferencialmente processados para desintoxicação e excreção. Isto é feito por uma oxidação inicial com a citocromo P-450 monooxigenase, que incorpora um átomo de oxigênio no composto aromático e reduz o segundo a água, resultando na formação do óxido de areno. Em seguida ocorre pela adição enzimática de água para produzir um trans-di-hidrodiol (FIGURA 3).

Figura 3 – Incorporação do oxigênio no composto aromático pela ação da enzima monooxigenase em fungos.



Fonte: MAIER, 2000.

Alternativamente, o óxido de areno pode ser isomerizado para formar fenóis e esteser conjugado com sulfato, ácido glucurônico e glutatona. Esses conjugados são similares aqueles formados por organismos superiores para eliminar os compostos aromáticos (MAIER, 2000).

Entretanto, alguns fungos como os lignolíticos tem a capacidade de sintetizar enzimas extracelulares (lignases, manganês peroxidases, lacases) que podem mineralizar completamente os compostos aromáticos por um processo conhecido como degradação lignolítica. Esses fungos são os mais estudados em processos de degradação de compostos tóxicos no ambiente, pois são considerados capazes de utilizar esses compostos poluentes como fonte de carbono e energia para o seu crescimento (HARMS *et al.*, 2011). Apesar da capacidade de degradação de contaminantes, utilização desses fungos em processos de remediação tem sido questionada devido à produção de metabólitos tóxicos ou metabólitos desconhecidos em relação a sua toxicidade (TORTELLA *et al.*, 2015).

Na última década, diversas espécies de fungos do Filo Ascomycota vêm sendo isoladas de solos contaminados com hidrocarbonetos de petróleo, tanto em regiões de clima tropical, como em regiões de clima temperado e as espécies mais frequentemente encontradas pertencentes aos

gêneros *Fusarium*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Chaetomium* e *Alternaria*. Isso demonstra a capacidade dessas espécies em transformar ou remover enzimaticamente esses hidrocarbonetos, tanto os de baixo como os de alto peso molecular, aumentando assim o interesse no estudo desses fungos em processos de biodegradação (RIVILLA, ALEU E COLLADO, 2009, BARNES *et al.*, 2018; BOVIO *et al.*, 2018; LI *et al.*, 2020). PASSARINI *et al.* (2011), observaram que o fungo *Aspergillus sclerotiorum* apresentou os melhores resultados na degradação de pireno e benzopireno, com valores de 99.7% e 76.6%, após 16 dias de cultivo. Os resultados mostraram também que *A. sclerotiorum* foi capaz de metabolizar pireno ao pirenilsulfato correspondente e benzopireno em benzopirenilsulfato, sugerindo que o mecanismo de hidroxilação é mediado pela citocromo P-450 monoxigenase.

WU *et al.* (2016), ao avaliara capacidade da comunidade microbiana do solo contaminado com derivado de petróleo, observaram uma taxa de degradação de hidrocarbonetos totais de 60%. YANTO E TACHIBANA (2014), ao estudarem o potencial de uma co-cultura fúngica no processo de biorremediação de solo contaminado com derivados de petróleo, observaram degradação de 96.3%, 87.3% e 90.2% de óleo cru A, óleo cru C e asfalteno, respectivamente, em uma concentração de 1000 mg/Kg<sup>-1</sup> de solo, durante 30 dias. Os fungos *Aspergillus terreus*, *Penicillium citreonigrum* e *Trichoderma harzianum*, isolados de ambiente marinho contaminado com óleo diesel, foram capazes de degradar 88%, 70% e 70%, respectivamente do óleo, em condições *in vitro* (BOVIO *et al.*, 2017).

Interessante observar os resultados obtidos quando utilizado consórcio com mais de uma espécie de bactéria ou ou contendo bactérias e fungos. ARANI E GUNALE (2012) utilizando um consórcio fúngico de *Rhizopus sp.*, *Penicillium* e *Aspergillus*, em fermentação líquida, observaram mineralização parcial dos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos presentes no meio, enquanto MARCHAND *et al.* (2017) observaram completa mineralização do composto poluente, com a aplicação de uma cultura mista com fungos e bactérias. Esses resultados mostram que a utilização de um inóculo com uma espécie de fungo e uma espécie de bactéria podem ser considerados bastante eficientes, levando à completa mineralização do composto poluente. Estudo com consórcio de espécies bacterianas, realizado por PRAKASH *et al.*, (2014) mostraram que a degradação foi mais eficiente quando comparado ao uso de linhagens isoladas.

Apesar do avanço nos estudos sobre a capacidade de degradação de hidrocarbonetos, pelos fungos Ascomycota, as características metabólicas dessas espécies que representariam o primeiro passo para decifrar a complexa interação dos poluentes no ambiente, tem sido pouco estudada

(VILA *et al.*, 2015, MARCHAND *et al.*, 2017; LI *et al.*, 2020). Algumas das enzimas envolvidas nesse processo promovem o acúmulo de substâncias potencialmente tóxicas em determinadas organelas do fungo, num processo denominado de micoextração através de biosorção ou bioacumulação nas hifas, enquanto outras transformam o substrato em outros compostos químicos (ARANDA, 2016). Para melhor entender o papel das enzimas na degradação dos hidrocarbonetos poluentes é necessário a realização de estudos “ômicos”, que poderiam identificar as principais enzimas responsáveis por esse processo de descontaminação.

Apesar dos trabalhos existentes que comprovam o potencial de produção de enzimas degradadoras, não existe uma análise complexa do genoma desses microrganismos para se elucidar as vias de regulação e expressão de genes relacionados às enzimas com atividade degradadora.

### 3. CONCLUSÃO

Apesar da Antártica ser considerado um continente preservado, a presença e a manutenção das estações de pesquisa e o fluxo de pesquisadores nessas estações vem causando um certo impacto nesse ambiente. Praticamente toda a energia gerada para o funcionamento das estações é proveniente da queima de combustível, e vazamentos durante o transporte e armazenamento são uma das principais causas da presença desses poluentes em solo antártico. Uma das alternativas para descontaminar o solo do entorno das estações de pesquisa é através do uso de processos biológicos. Por isso, se faz necessário a busca por microrganismos autóctones que tenham a capacidade de degradar esses contaminantes, por um processo denominado de biorremediação. Diante dessa situação, os resultados obtidos nesse estudo mostraram que o solo antártico é um habitat de fungos filamentosos que tem a capacidade de se desenvolver em meio contendo o óleo diesel como única fonte de carbono e energia, indicando que essas espécies podem ser utilizadas em processos de biorremediação na Antártica. Inclusive tendo a possibilidade de uso de um consórcio microbiano, de bactérias e fungos, pois já existem estudos *in situ* com o uso de bactérias na degradação desses poluentes.

## REFERÊNCIAS

ANDREOLLI, M. *et al.* Bioaugmentation and biostimulation as strategies for the bioremediation of a burned woodland soil contaminated by toxic hydrocarbons: a comparative study. **Journal Environmental Management**, 153: 121-131. 2015.

ARANI L. G. e GUNALE V. Soil petroleum hydrocarbon bioremediation by a fungi consortium. **Environmental Science** 7(3): 23–36. 2010.

ARANDA, E. Promising approaches towards biotransformation of polycyclic aromatic hydrocarbons with *Ascomycota* fungi. **Current Opinion in Biotechnology**, 38. 1-8. 2016.

ARENZ, B. E. E BLANCHETTE, R. A. Distribution and abundance of soil fungi in Antarctica at sites on the Peninsula, Ross Sea Region and McMurdo Dry Valleys. **Soil Biology & Biochemistry**, 43, 308-315. 2011.

BARNES, N. M. *et al.* Bioremediation potential of hydrocarbon utilizing fungi from select marine niches of India. **Biotechnology**, 8:20-31. 2018.

BOVIO, E. *et al.* The culturable mycobiota of a Mediterranean marine site after an oil spill: isolation, identification and potential application in bioremediation. **Science of the Total Environment**, 576 (15). 310-318. 2018.

CÉBRON, A. *et al.* Impacto of clay mineral, wood sawdust or root organic matter on the bacterial and fungal community structures in two aged PAH-contaminated soils. **Environmental Science Pollutant Research**, 22, 13724-13738. 2015.

COX, M. M.; DOUDNA, J. A. E O'DONNELL, M. **Biologia Molecular: Princípios e Técnicas**. Porto Alegre: Armtmed. 216 p. 2012.

CRUZ, G. F E MARSAIOLI, A. J. Natural processes of petroleum biodegradation in reservoirs. **Química Nova**, Vol. 35, No. 8, 1628-1634. 2012.

CURY, J. C. *et al.* Microbial diversity and hydrocarbon depletion in low and high diesel-polluted soil samples from Keller peninsula, South Shetland Islands. **Antarctica Science**, 27:263-273. 2015.

CURY, J. C. *et al.* Programa de Biorremediação do Solo da EACF contaminado com Hidrocarbonetos. Relatório de atividade OPERANTAR. 2017.

DITTAMI, S. M. E EDVARSEN, B. Culture conditions influence cellular rna content in ichthyotoxic flagellates of the genus pseudochattonella (dictyochophyceae). **Journal of Phycology**, 48 (4). 1050-1055. 2012.

EJECHI, B. O. E OZOCHI, C. O. Assessment of the physicochemical and microbiological status of western Niger Delta soil for crude oil pollution bioremediation potential. **Environmental Monitoring Assessment**, 187: 369. 2012.

JESUS, H. E. *et al.* Evaluation of soil bioremediation techniques in an aged diesel spill at the Antarctic Peninsula. **Applied Microbiology Biotechnology** 99:10815–10827. 2015.

JURELEVICINUS, D. *et al.* Metagenomic analysis of microbial communities across a transect from low to highly hydrocarbon-contaminated soils in King George Island, Maritime Antarctica. **Geobiology**, 1-14. 2021.

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

GANDRA, E. Ávila, *et al.* Molecular techniques applied to food microbiology: a review. **Acta Scientiarum Technology**, 30(1), 109-118. 2008.

GOLDMAN, R. Smoking increase carcinogenic polycyclic hydrocarbons in human lung tissue. **Cancer Research**, 61 (17): 6367-6371. 2001.

GOLDSWORTH, P. M.; CANNING, E. A. E RIDDLE, M. J. Soil and water contamination in the Larsemann Hills, East Antarctica. **The Polar Record**, 39(4). 319-337. 2003.

HARITASHI, A. K. E KAUSHIKI, C. P. Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbon: a review. **Journal of Hazardous Materials**, 169: 1-15. 2009.

HARMS, H.; SCHLOSSER, D. E WICK, L. Y. Untapped potential: exploiting fungi in bioremediation of hazardous chemicals. **Nature Review Microbiology**, 9, 177-192. 2011.

HEIDERSCHIED, D. *et al.* Conceitos Aplicados à Poluição do Solo Decorrente do Derrame de Petróleo e seus Derivados. **Revista Maiêutica**, Indaial, v. 4, n. 1, p. 7-14. 2016.

HELD, B. W. E BLANCHETTE, R. A. Deception Island, Antarctica, harbors a diverse assemblage of wood decay fungi. **Fungal Biology**, 121 (2), 145 – 157. 2017.

IJJOMA, G. N. E TEKERE, M. Potential microbial applications of co-cultures involving ligninolytic fungi in the bioremediation of recalcitrant xenobiotic compounds. **International Journal of Environmental Science Technology**, 14:1787–1806. 2017.

JOHNSEN, A. R. E KARLSON, U. Evaluation of bacterial strategies to promote the bioavailability of polycyclic hydrocarbons aromatic. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 63 (3): 452-459. 2005.

KIM, J. D. E LEE, C. G. Microbial degradation of polycyclic aromatic compounds in soil by bacterium-fungus co-cultures. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, 12: 410-416. 2007.

KRAUSS, G. J. *et al.* Fungi in freshwaters: ecology, physiology and biochemical potential. **FEMS Microbiology Review**. 35: 620-651. 2011.

LING, J. *et al.* Fungal community successions in rhizosphere sediment of seagrasses *Enhalus acoroides* under PAHs stress. **International Journal of Molecular Science**. 2015, 16: 14039. 2015.

MAIER, R. M.; PEPPER, I. L. E Gerba, C. P. **Environmental Microbiology**. 564 p. 2000.

MARCHAND, C. *et al.* Petroleum biodegradation capacity of bacteria and fungi isolated from petroleum-contaminated soil. **International Biodeterioration and Biodegradation**, 116. 48-57. 2017.

MIURA, A. E URABE, J. Spatial and seasonal changes in species diversity of epilithic fungi along environmental gradients of a river. **Freshwater Biology**, 60: 673-685. 2015.

MORA, C. *et al.* How Many Species Are There on Earth and in the Ocean? **Plos Biology**, 9 (8) e1001127. 2011.

MOREIRA, F. M. S. E SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2ª edição. Ed. UFLA. 2011.

MORENO, A. C. **Diagnóstico Molecular na era da sequenciação de 3ª geração e da PCR digital**. Dissertação de Mestrado. Universidade Fernando Pessoa. 2013

NASRAWI, H. A. Biodegradation of Crude Oil by Fungi Isolated from Gulf of Mexico. **Journal of Biorremediation and Biodegradation**, 3(4). 1-6. 2012.

NATIONAL SCIENCE FOUNDATION (NSF). 1997, **Antarctica: Past and Present**. Disponível em <http://www.nsf.gov/pubs/1997/panel/4past.htm>. Acessado em 30 de março de 2018.

OLIVEIRA, L. M. *et al.* Hidrocarbonetos em solos e sedimentos do entorno da Estação Antártica Brasileira Comandante Ferraz. *Oecol. Bras.*, 11(1). 144-156. 2007.

PASSARINI, M. R. Z. *et al.* Marine-derived filamentous fungi and their potential application for polycyclic aromatic hydrocarbon bioremediation. **Marine Pollution Bulletin**, 62(2). 364-370. 2011.

PRAKASH, A. S. *et al.* Biodegradation potential of petroleum hydrocarbons by bacteria and mixed bacterial consortium isolated from contaminated sites. **Turkish Journal of Engineering and Environmental Sciences**, 38. 41–50. 2014.

RESOLUÇÃO CONAMA (RDC) no 398, de 11 de junho de 2008 Publicada no DOU nº 111, de 12 de junho de 2008, Seção 1, páginas 101-104. 2008.

RIVILLA, P. C.; ALEU, J.; COLLADO, I. G. Pollutants Biodegradation by Fungi. **Current Organic Chemistry**, 13 (12). 1194-1214. 2009.

TOHON, H. G. *et al.* BTEX air concentrations and self-reported common health problems in gasoline sellers from Cotonou, Benin. **International Journal of Environmental Research**, 25 (2): 149-161. 2015.

TORTELLA, G. *et al.* Are White-rot fungi a real biotechnological option for the improvement of environmental health? **Critical Review Biotechnology**, 35, 165-172. 2015.

U.S ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Test Method for Evaluating Solid Waste**, SW-846, third ed., vol 1ª. U.S. EPA, Washington, DC.1986.

VILA, J.; TAULER, M. E GROFOLL, M. Bacterial PAHx degradation in marine and terrestrial habitats. **Current Opinion Biotechnology**, 33, 95-102. 2015.



WU, M. *et al.* Bioaugmentation and biostimulation of hydrocarbon degradation and the microbial community in a petroleum-contaminated soil. **International Biodeterioration and Biodegradation**, 107: 158-164. 2016.

YANTO, D. H. Y. E TACHIBANO, S. Potential of fungal co-culturing for accelerated biodegradation of petroleum hydrocarbons in soil. **Journal of Hazardous Materials**, 278. 454–463. 2014.

WENTZEL, A. *et al.* Bacterial metabolism of long-chain *n*-alkanes. **Applied Microbiology Biotechnology**, 76, 1209. 2007.

ARTIGO 1 - elaborado conforme as normas do periódico Polar Biology

## **Cultivable fungal community of the rhizosphere soil of *Deschampsia antarctica* and their promising species for diesel oil degradation**

Fabiana Reinis Franca Passamani<sup>1</sup> ([fabireinis@gmail.com](mailto:fabireinis@gmail.com) - Orcid: 0000-0002-5652-8109), Taís Teixeira das Neves<sup>1</sup> ([tai\\_neves@yahoo.com.br](mailto:tai_neves@yahoo.com.br) – Orcid: 0000-0001-8166-966X), Nathasha de Azevedo Lira<sup>2</sup> ([nathashalira@yahoo.com.br](mailto:nathashalira@yahoo.com.br) – Orcid: 0000-0002-3593-9443), Suzana Reis Evangelista<sup>2</sup> ([suzanareise@gmail.com](mailto:suzanareise@gmail.com) – Orcid: 0000-0002-7680-0149), Juliano de Carvalho Cury<sup>3</sup> ([juliano.cury@ufms.br](mailto:juliano.cury@ufms.br) - Orcid: 0000-0002-1450-5726), Luis Roberto Batista<sup>2</sup> ([luisrb@ufla.br](mailto:luisrb@ufla.br) – Orcid: 0000-0001-8482-1161), Cristina Ferreira Silva<sup>1\*</sup> ([cristinafsb@ufla.br](mailto:cristinafsb@ufla.br) - 000-0002-3327-2980)

<sup>1</sup>Federal University of Lavras, Biology Department, Laboratory of Environmental Microbial Biotechnology, Minas Gerais, Brazil.

<sup>2</sup>Federal University of Lavras, Food Science Department, Laboratory of Mycology and Mycotoxins, Minas Gerais, Brazil.

<sup>3</sup>Federal University of Mato Grosso do Sul, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Food and Nutrition, Mato Grosso do Sul, Brazil.

\*Corresponding author: Cristina Ferreira Silva e Batista, Biology Department, Federal University of Lavras, post office box: 3037, CEP 37200-900, Lavras, MG, Brazil. E-mail address: [cristinafsb@ufla.br](mailto:cristinafsb@ufla.br)

### **Abstract**

Fungi are considered the eukaryotes with the greatest diversity and habitation in all regions of the planet, but this is based on data from temperate and tropical regions. There are few reports on diversity in polar regions. Antarctica has gained the attention of scientists worldwide for its importance to the topics of ecological diversity and microbial bioprospecting. So, we identify the cultivable fungal community of the rhizosphere soil of *Deschampsia antarctica*, establish its ecological parameters and select fungal species with the ability to use diesel fuel arctic grade (DFA) as a substrate. In all the culture media used, 489 isolates of filamentous fungi were obtained, grouped into 53 morphotypes, 14 of which were isolated only in medium supplemented with DFA (BH). The genera *Cladosporium*, *Pseudogymnoascus*, *Penicillium*, and *Aspergillus* were identified by ITS sequencing. Regarding species composition, *Cladosporium* sp.4 was the most abundant (19.64%) and most frequent species in the samples (at 100% of sampled points). *Penicillium* sp.2 was the second-most abundant specie (13.40%), followed by *Penicillium lanosum* (13.35%) and *Pseudogymnoascus* sp.2 (12.54%), occurring at 25%, 75%, and 50% of the sampled points, respectively. The species *Cladosporium subuliforme*, *Penicillium daejeonium*, and *Aspergillus neoellipticus* were isolated only from the BH medium, showing their ability to use DFA as a carbon source and thus indicating the possibility of using these species *in situ* for degradation of this pollutant, which would minimize the impact of the activities of the Brazilian research base in Antarctica.

**Keywords:** ecological parameters, bioprospecting, organic pollutants, cultivable fungi, Antarctica

**Declarations**

**Funding:** Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia Antártico de Pesquisas Ambientais (INCT-APA), Programa Antártico Brasileiro (PROANTAR) and the following Brazilian agencies: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Brasil (CNPQ), Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for providing essential financial support for this work.

**No Conflicts of interest**

**Authors' contributions:** FRF Passamani designed the study, interpreted the results and drafted the manuscript; TT Neves interpreted the results; NA Lira collected test data; SR Evangelista interpreted the results; JC Cury designed the study; LR Batista designed the study; CFS Batista guided the study

## Introduction

Filamentous fungi have a wide distribution in nature, occupy a wide variety of ecological niches, and are the microbial group of greatest diversity found in different ecosystems (Hawksworth et al. 2004; Rosa et al. 2019). According to Mora et al. (2011), 43.271 species of fungi are described and cataloged worldwide, but the total number is believed to be approximately 3.5 million species. This global biodiversity is not yet fully understood, and although they are considered the most diverse eukaryotes and dwell in all regions of the planet. Most studies on them have been conducted in temperate and tropical regions, while few have been conducted in polar regions, especially in Antarctica (Godinho et al. 2015; Figueiredo et al. 2020). Regardless of their frequency and area of occurrence, the presence of these eukaryotes is ecologically important because they contribute to the functional stability of ecosystems and are mainly responsible for the cycling of nutrients and chemical compounds, including the degradation of complex organic pollutants (Moreira and Siqueira 2006; Timling and Taylor 2012; Mair, Schinner and Margesin 2013; Taylor et al. 2016; Ameen et al. 2016, Crocker et al. 2019) and this show no diferente in Antarctica region.

Antarctica is an underexplored environment that has gained worldwide scientific attention, including for its ecological diversity and microbial bioprospecting. This scientific interest has led to an increase in the flow of people and the transport of materials and fuels to and from Antarctica, especially in the areas surrounding the research stations. Paradoxically, the presence of researchers and research bases is necessary, but natural disturbances of the environment are inevitable, including from accidental spills of diesel oil, specifically diesel fuel, arctic grade (DFA). Thus, given that the Antarctic Treaty prohibits the introduction of allochthonous organisms in the Antarctic region, it is essential to identify potential native species that can consume diesel oil.

Antarctic soil is characterized as oligotrophic with low moisture, high salinity, a high incidence of UV radiation and subjected to prolonged periods of low temperature. Given these extreme conditions, until 2019, the microbial diversity and abundance of Antarctic soils were considered low (Wu et al. 2016, Martorell et al. 2019). However, microorganisms are the most diverse in this environment, that expected, because they are adapted and able to grow in cold and oligotrophic soils (Figueiredo et al. 2020).

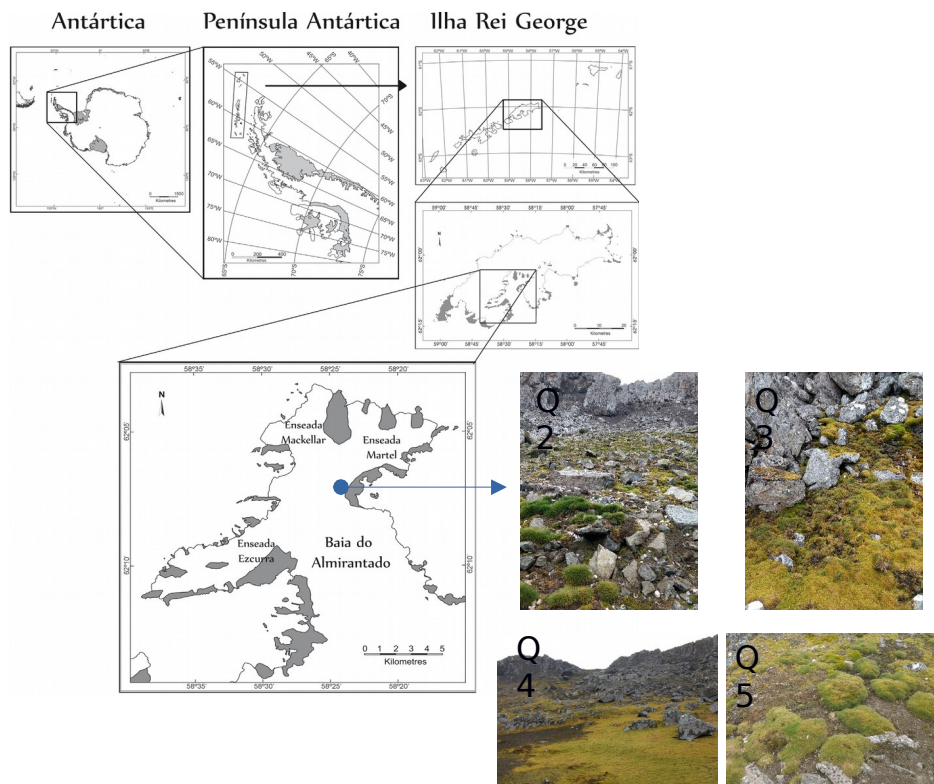
Among the cultivable microorganisms, fungi have the highest diversity in Antarctic soils and have been identified as symbionts of lichens, mycorrhizas, and decomposers of organic compounds (Arenz and Blanchette 2006). Studies on the taxonomy, diversity, ecology, and biotechnology of these fungi in Antarctica, associated with the most diverse substrates (Rosa et al. 2019), such as

soils, rocks, lakes, marine environment, sediments, animals, and plants have contributed to a growing body of knowledge of this group on this continent. However, there is a lack of data on the selection of fungi with potential use in hydrocarbon bioremediation processes in soils. In this sense, we identify the cultivable fungal community of rhizosphere soil of *Deschampsia antarctica*, in Point Hennequin, Admiralty Bay, King George Island, establish its ecological parameters and select cultivable fungi that could assimilate diesel oil as a nutrient source.

## Materials and Methods

### Study site

Admiralty Bay is located on the southeast side of King George Island, the largest of the South Shetland Islands, located near the Antarctic Peninsula. It has an area of 122 km<sup>2</sup> and is divided into three inlets: Martel, MacKellar, and Ezcurra. The samples used in the study were collected in a transect at the location known as Point Hennequin, in Admiralty Bay (Fig 1).



**Fig 1** Antarctic continent with the locations of the Antarctic Peninsula, King George Island, and Admiralty Bay (Simões, 2004). The arrow represents the region of the transect where the samples were collected.

### *Sampling*

The rhizosphere soil of *Deschampsia antarctica* was sampled in January 2017 along a transect in Point Hennequin (Admiralty Bay, King George Island, Antarctica). Four samples (Q2, Q3, Q4, Q5) were collected along the transect at points approximately 20 meters apart. Three subsamples were collected at each point (Q2R1, Q2R2, Q2R3; Q3R1, Q3R2, Q3R3; Q4R1, Q4R2, Q4R3; Q5R1, Q5R2, Q5R3). The samples were obtained from soil not contaminated with diesel oil and without anthropogenic influence to ensure the isolation of autochthonous fungi. The samples were placed in sterile 50-mL Falcon polypropylene tubes and transported, under refrigeration, to the Laboratory of Molecular Microbiology of the Department of Exact and Biological Sciences of the Sete Lagoas Campus of the Federal University of São João del-Rei, where they were stored at 1 °C. After that, to start the isolation, the samples were transported, under refrigeration, to the Mycology Laboratory of the Department of Food Science of the Federal University of Lavras and stored at 1 °C until we isolated the filamentous fungi.

### *Isolation of fungi*

For the isolation of filamentous fungi, the serial dilution technique was used, down to the  $10^{-3}$  dilution. For this purpose, 1 g of soil was added to a tube containing 9 mL of saline solution (0.85% NaCl). After successive dilutions, a 100- $\mu$ L aliquot was plated in triplicate directly on the surface of the culture medium: dichloran rose-bengal chloramphenicol (DRBC; 10 g/L glucose, 5 g/L peptone, 1 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.5 g/L  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 15 g/L agar) with  $a_w = 0.99$ ; malt extract agar with 5% NaCl (MEA 5 NaCl; 20 g/L malt extract, 1 g/L bacteriological peptone, 20 g/L glucose, 5 g/L NaCl, 15 g/L agar) with  $a_w = 0.95$ ; yeast extract agar with 35% glucose (MY35G; 20 g/L yeast extract, 1 g/L bacteriological peptone, 35 g/L glucose, 15 g/L agar) with  $a_w = 0.91$  (Sonjak, Frisvad and Gunde-Cimerman 2006; Godinho et al. 2015); modified Bushnell-Hass (BH) (0.2 g/L  $\text{MgSO}_4$ , 0.02 g/L  $\text{CaCl}_2$ , 1 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1 g/L  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0.05 g/L  $\text{FeCl}_2$ , 1 g/L  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 15 g agar, 0.1% Tween 80) with 2% (v/v) DFA (Cury et al. 2015) added as exclusive carbon source. All morphologically distinct colonies of each soil sample was counted (CFU). The subcultures were grouped into morphotypes, considering macroscopic characteristics such as color, size, margin texture, and colony reverse color (Wentzel et al. 2019). All isolated fungi were deposited in the Microbial Culture Collection of Food Science Department (CCDCA), Federal University of Lavras, Brazil.

### *Isolation and screening of DFA-degrading fungi*

The isolates grown in BH medium were transferred to a 250-mL Erlenmeyer flask containing 50 mL of BH broth: 0.2 g/L MgSO<sub>4</sub>, 0.02 g/L CaCl<sub>2</sub>, 1 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 g/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.05 g/L FeCl<sub>2</sub>, 1 g/L NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, 0.1% Tween 80, and 2% (v/v) DFA. The inoculum was standardized for all tests, and a suspension of 10<sup>6</sup> spores/mL was used, quantified by counting in a Neubauer chamber. After inoculation, the flasks were incubated at 10 °C for 21 days under static conditions. Next, the biomass was filtered on Whatman GF/C paper (47 mm), preweighed, and washed twice with deionized water and dried at 105 °C to constant weight. The tests were performed in triplicate. PAST Statistics software was used to compare the fungal biomass data of the species with the Kruskal-Wallis test and Dunn's post hoc test.

### *Identification of filamentous fungi*

#### **DNA extraction, PCR, sequencing, and phylogenetic analyses**

Only one representative of each morphotype was selected for DNA sequencing. Total DNA was extracted from the selected fungi using the manual CTAB method (Doyle and Doyle 1991). The fungi were cultured in malt agar culture medium for 21 days at 10 °C. The fungal mycelium was macerated with liquid nitrogen and transferred to microtubes (1.5 mL), added to 600 µL of nuclear lysis solution and 6 µL of β-mercaptoethanol, and vortexed. After homogenization, the microtubes were incubated at 65 °C for 40 minutes and shaken every 10 minutes. After this, the microtubes were left to rest for 5 minutes at room temperature (25 °C). After resting, 3 µL of RNase was added and incubated at 37 °C for 15 minutes. Then 200 µL of protein precipitation solution was added, and the microtubes were shaken and centrifuged for 10 minutes at 10,000 rpm. Next, 300 µL of the supernatant was transferred to a new microtube, and 100 µL of sodium acetate and 300 µL of isopropanol were added. The microtubes were then mixed by inversion and incubated at -20 °C for 30 minutes. Then, they were centrifuged again at 10,000 rpm for 15 minutes. The supernatant was discarded carefully to avoid discarding the pellet. A total of 660 µL of 70% ethanol was added and centrifuged at 10,000 rpm for 5 minutes. The ethanol was discarded, and the pellet was dried. Finally, the pellet was resuspended in 100 µL of DNA rehydration solution. The purity and concentration of all extracted DNAs were assessed in a double-beam spectrophotometer (220-750



nm) (Nanodrop 2000, Thermo Fischer). A DNA/RNA ratio of approximately 1.8 was considered pure, quantified at 260 nm and 280 nm.

The ITS region was amplified with the universal primers ITS1 and ITS4 (White et al. 1990) using GoTaq Colorless Master Mix (Promega) in a T100 Thermal Cycler (Bio-Rad). The cycle conditions were 94 °C for 3 minutes, 35 cycles of 94 °C for 30 seconds, 55 °C for 30 seconds, and 72 °C for 1 minute, and a final extension step at 72 °C for 10 minutes. The PCR generated a fragment of approximately 500 bp. The products were analyzed by electrophoresis in 2% agarose (TAE buffer). The reactions were enzymatically purified with Exol/SAP (Thermo) as recommended by the manufacturer. The isolates were sequenced at Myleus Biotecnologia and GoGenetics, Brazil. The PCR products were sequenced with BigDye v3.1 (Thermo) according to the manufacturer's instructions in a reaction containing 50 ng of DNA. A total of 35 cycles of denaturation (96 °C for 15 seconds), annealing at the annealing temperature of the respective primers (ITS and EF at 58 °C, b-tub at 56 °C, both 15 seconds), and product extension (60 °C for 4 minutes) were used for labeling with fluorescent terminators. The labeled products were precipitated with 20% 7.5 M ammonium acetate and three volumes of absolute ethanol, then resuspended in 10 µL of HiDi-formamide. These samples were sequenced in a 3500xL genetic analyzer (Thermo) using 50-cm capillaries with Pop7 polymer (Thermo) according to the manufacturer's instructions. The electrophoretograms generated were converted into base sequences using Sequencing Analysis v5.4 (Thermo).

### **Molecular characterization and phylogenetic analyses**

Molecular identification was performed with BLASTN software (Altschul et al. 1997) to compare the sequences obtained from each isolate with others deposited in GenBank. These sequences were included in the analyses for comparison purposes. Multiple alignment of the nucleotide sequences was performed in GUIDANCE SERVER using the MAFFT algorithm and the standard parameters of the software. The multiple sequence alignment was manually corrected in MEGA 6.06 software (Tamura et al. 2013).

### *Diversity, richness, and dominance*

The species richness and diversity, dominance, and evenness of the sample were determined using Shannon's diversity index ( $H'$ ), Simpson's dominance index ( $D$ ), and Pielou's evenness, respectively. The species similarity between the sampled areas was evaluated using Sorensen's similarity index. All indices were calculated using PAST Statistics, version 3.8.

### *Statistical analysis*

For a better interpretation of the dataset, principal component analysis (PCA) was performed using SensoMaker software (Pinheiro et al. 2013). An  $m \times n$  matrix was built with the values of the  $n$  for the  $m$  samples, where  $n$  represents the species population of the samples and  $m$  the samples (Q1, Q2, Q3 and Q4). The data were auto scaled.

## **Results**

### *Population of filamentous fungi and identification of species*

The total population of fungi ( $\log \text{CFU} \cdot \text{g}^{-1}$ ), number of isolates as well as morphotypes from each sample was estimated (Table 1).

**Table 1** - Population of total cultivable fungi ( $\log \text{CFU} \cdot \text{g}^{-1}$ ), number of isolates, and number of morphotypes in the culture media MY, DRBC, MEA, and BH in rhizosphere soil samples from Antarctica.

Culture medium	Population of total cultivable fungi ( $\log \text{CFU} \cdot \text{g}^{-1}$ )					N° of isolates	Morphotypes
	Q2	Q3	Q4	Q5			
MY	6.24	6.11	5.83	5.15		151	13
DRBC	6.00	5.74	5.06	4.14		134	10
MEA	6.25	6.06	5.87	5.22		147	16
BH	6.13	5.20	4.99	5.06		57	14

The highest fungi population was found in Q2 sample ( $x = 6.15 \log \text{CFU} \cdot \text{g}^{-1}$ ), while decrease value in the Q3, Q4 and Q5 with media value of 5.77; 5.43 and 4.89, respectively. Regarding the morphotypes, it is interesting to note that the amount of morphotypes characterized in the BH medium did not differ from the other culture media evaluated.

Of the 39 isolates, only five were identified to the species level (*Pseudogymnoascus pannorum*, *Penicillium lanosum*, *P. thomii*, *P. pulvillorum* and *P. crustosum*). The others were identified at the

genus level because they were considered inconclusive when comparing them against the known ITS sequences deposited in the GenBank database (Table 2). In the BH medium, of the 14 isolates, only two were identified to the species level (*Cladosporium subuliforme* and *Penicillium daejeonium*). The other isolates were again inconclusive from the taxonomic point of view and were identified to the genus level (Table 3). Regardless of the culture medium used, all isolates were identified in the genera *Cladosporium*, *Pseudogymnoascus*, *Penicillium*, and *Aspergillus*, belonging to the phylum Ascomycota. As it is a little explored environment, some of these isolates may be new species, but studies of other gene regions of each of these genera must be carried out.

**Table 2** - Molecular identification, by ITS sequencing, of the fungal isolates obtained from the rhizosphere soil samples of *Deschampsia antarctica* in Point Hennequin, Admiralty Bay, Antarctica.

CCDCA	Top Blast search results (GenBank accession number)	N° of bp analyzed	Query cover (%)	Identity (%)	Proposed Taxon
11594	<i>Cladosporium</i> sp. (MK111618.1)	500	99	100	<i>Cladosporium</i> sp. 1
11595		500	99	100	
11596	<i>Cladosporium delicatulum</i> (MT548673.1)	500	99	99,8	<i>Cladosporium</i> sp. 2
11597	<i>Cladosporium</i> sp. (MK111618.1)	512	99	99,2	<i>Cladosporium</i> sp. 3
11598	<i>Cladosporium</i> sp. (MH712171.1)	507	99	99,4	<i>Cladosporium</i> sp. 4
11614	<i>Cladosporium flabelliforme</i> (KJ439170.1)	514	96	100	
11599	<i>Cladosporium</i> sp. (MK111550.1)	509	99	100	<i>Cladosporium</i> sp. 5
11600	<i>Cladosporium</i> sp. (MK111604.1)	469	99	99,1	<i>Cladosporium</i> sp. 6
11603	<i>Geomyces</i> sp. (JN30629.1)	517	99	99,6	<i>Pseudogymnoascus</i> sp. 1
11604	<i>Geomyces pannorum</i> (JF320819.1)	521	100	99	<i>Pseudogymnoascus</i> sp. 2
11609		518	99	99,6	
11605	<i>Pseudogymnoascus pannorum</i> (MH854615.1)	522	99	98,8	<i>Pseudogymnoascus</i> sp. 3
11606		516	99	99,4	
11608	<i>Pseudogymnoascus</i> sp. (MN266190.1)	511	99	99,6	<i>Pseudogymnoascus</i> sp. 4
11610	<i>Geomyces pannorum</i> (JF320819.1)	524	100	99,2	<i>Pseudogymnoascus</i> sp. 5
11612		533	98	99,2	
11601	<i>Pseudogymnoascus</i> sp. (MN265995.1)	524	99	99	<i>Pseudogymnoascus</i> sp. 6
11602	<i>Geomyces pannorum</i> (JF320819.1)	522	99	98,8	<i>Pseudogymnoascus</i> sp. 7
11613		522	99	98,8	
11607	<i>Pseudogymnoascus pannorum</i> (MH865212.1)	507	99	99,4	<i>Pseudogymnoascus</i> <i>pannorum</i>
11613	<i>Geomyces pannorum</i> (JF320819.1)	522	99	98,8	<i>Pseudogymnoascus</i> sp. 8
11622	<i>Geomyces</i> sp. (JN630629.1)	525	100	99,2	<i>Pseudogymnoascus</i> sp. 9
11626	<i>Pseudogymnoascus</i> sp. (MN265995.1)	524	97	99,8	
11611	<i>Penicillium pulvillorum</i>	537	99	99,6	<i>Penicillium</i>

	(MK450709.1)				<i>pulvillorum</i>
11615	<i>Penicillium</i> sp. (KY086222.1)	536	99	99,4	<i>Penicillium thomii</i>
11616	<i>Penicillium cairnsense</i>	521	99	99,2	<i>Penicillium</i> sp. 1
11630	(MH863991.1)	519	99	99,4	
11617	<i>Penicillium cairnsense</i>	523	99	99,4	<i>Penicillium</i> sp. 2
11625	(MH863991.1)	523	99	99,4	
11618	<i>Penicillium cairnsense</i>	522	99	99,6	<i>Penicillium</i> sp. 3
	(MH863991.1)				
11619	<i>Penicillium</i> sp. (MK951934.1)	523	99	99,8	<i>Penicillium lanosum</i>
11620	<i>Penicillium commune</i>	586	98	98,1	<i>Penicillium crustosum</i>
	(KY552638.1)				
11621	<i>Penicillium cairnsense</i>	520	99	99,6	<i>Penicillium</i> sp. 4
11631	(MH863991.1)	522	99	99,2	
11627	<i>Penicillium cairnsense</i>	523	99	99,2	<i>Penicillium</i> sp. 5
	(MH863991.1)				
11623	<i>Aspergillus</i> sp. (MN634627.1)	532	100	99,8	<i>Aspergillus</i> sp. 1
11624	<i>Aspergillus fumigatus</i>	529	100	99,6	<i>Aspergillus</i> sp. 2
	(MT160353.1)				
11628	<i>Aspergillus oerlinghausenensis</i>	531	100	99,8	<i>Aspergillus</i> sp. 3
	(MT558945.1)				
11629	<i>Aspergillus fumigatus</i>	530	100	99,8	<i>Aspergillus</i> sp. 4
	(MT160353.1)				

**Table 3** - Molecular identification, by ITS sequencing, of the fungi isolated in the BH selective medium and obtained from the rhizosphere soil samples of *Deschampsia antarctica* in Point Hennequin, Admiralty Bay, Antarctica.

CCDCA	Top Blast search results (GenBank accession number)	N° of bp analyzed	Query cover (%)	Identity (%)	Proposed taxon
11636	<i>Cladosporium subuliforme</i> (MT614367.1)	512	100	100	<i>Cladosporium subuliforme</i>
11641	<i>Cladosporium cladosporioides</i> (MN634546.1)	517	100	100	<i>Cladosporium</i> sp. 1
11643	<i>Geomyces</i> sp. (MT367233.1)	500	100	100	<i>Pseudogymnoascus</i> sp. 1
11637	<i>Pseudogymnoascus pannorum</i> (KM396373.1)	509	100	100	<i>Pseudogymnoascus</i> sp. 2
11639	<i>Pseudogymnoascus verrucosus</i> (MF467855.1)	500	99	100	<i>Pseudogymnoascus</i> sp. 3
11644	<i>Pseudogymnoascus</i> sp. (MT133933.1)	517	99	100	<i>Pseudogymnoascus</i> sp. 4
11645	<i>Pseudogymnoascus</i> sp. (MH128258.1)	500	100	100	<i>Pseudogymnoascus</i> sp. 4
11635	<i>Geomyces</i> sp. (MF326623.1)	500	99	100	<i>Pseudogymnoascus</i> sp. 5
11640	<i>Geomyces</i> sp. (MF326623.1)	500	99	100	<i>Pseudogymnoascus</i> sp. 6
11642	<i>Pseudogymnoascus</i> sp. (MH128258.1)	500	100	99	<i>Pseudogymnoascus</i> sp. 6
11633	<i>Penicillium</i> sp. (MT316360.1)	507	99	100	<i>Penicillium daejeonium</i>
11638	<i>Penicillium ochrochloron</i> (MT601879.1)	510	99	99,8	<i>Penicillium</i> sp. 1
11632	<i>Aspergillus fumigatus</i> (MT529447.1)	500	100	99,8	<i>Aspergillus neoellipticus</i>
11634	<i>Aspergillus fumigatus</i> (MT529447.1)	500	100	99,8	<i>Aspergillus</i> sp. 1

### Species diversity and dominance

Regarding species composition, *Cladosporium* sp.4 was the most abundant species in the samples, representing 19.64% of the total number of species, and the most frequent, occurring in 100% of the sampled points (Table 4). *Penicillium* sp.2 was the second-most abundant species in 13.40% of the samples, followed by *Penicillium lanosum* (13.35%) and *Pseudogymnoascus* sp.2 (12.54%). These occurred in 25%, 75%, and 50% of the sampled points, respectively. Conversely, the other species accounted for less than 10% of the total population, and most were exclusive to one or two of the sampling areas; *Aspergillus neoelipticus*, *Penicillium* sp.6 and *Cladosporium* sp.7 stood out for making up less than 0.1% of the species found and being present in only one of the sampling areas.

**Table 4** - Composition, abundance, and frequency of occurrence of species isolated from Antarctica rhizosphere soil samples.

Species	Population (log CFU·g <sup>-1</sup> )	Proportion in the population (%)	N° of samples that occur	Frequency (%)
<i>Aspergillus neoelipticus</i>	3.0	0.01	1 (Q3)	25
<i>Aspergillus</i> sp. 1	5.3	0.24	2 (Q3, Q5)	50
<i>Aspergillus</i> sp. 2	4.1	0.13	1 (Q3)	25
<i>Cladosporium</i> sp. 1	5.9	8.38	2 (Q2, Q3)	50
<i>Cladosporium</i> sp. 2	5.8	7.45	4 (Q2, Q3, Q4, Q5)	100
<i>Cladosporium</i> sp. 3	5.7	5.23	4 (Q2, Q3, Q4, Q5)	100
<i>Cladosporium</i> sp. 4	6.3	19.64	4 (Q2, Q3, Q4, Q5)	100
<i>Cladosporium</i> sp. 5	5.5	3.76	3 (Q2, Q4, Q5)	75
<i>Cladosporium</i> sp. 6	4.0	0.11	1 (Q5)	25
<i>Cladosporium</i> sp. 7	3.5	0.03	1 (Q5)	25
<i>Cladosporium subuliforme</i>	5.2	1.58	3 (Q2, Q4, Q5)	75
<i>Penicillium crustosum</i>	4.9	0.95	3 (Q2, Q4, Q5)	75
<i>Penicillium daejeonium</i>	5.0	1.19	2 (Q3, Q5)	50
<i>Penicillium lanosum</i>	6.1	13.35	3 (Q2, Q3, Q4)	75
<i>Penicillium</i> sp. 2	6.1	13.40	1 (Q5)	25
<i>Penicillium</i> sp. 3	4.5	0.39	4 (Q2, Q3, Q4, Q5)	100
<i>Penicillium thomii</i>	4.7	0.59	1 (Q2)	25
<i>Penicillium</i> sp. 5	5.2	1.80	3 (Q2, Q4, Q5)	75
<i>Penicillium pulvillorum</i>	3.3	0.02	2 (Q2, Q5)	50
<i>Penicillium</i> sp.1	4.9	0.89	1 (Q2)	25
<i>Pseudogymnoascus pannorum</i>	5.7	5.41	3 (Q3, Q4, Q5)	75
<i>Pseudogymnoascus</i> sp 1	5.4	2.93	4 (Q2, Q3, Q4, Q5)	100
<i>Pseudogymnoascus</i> sp. 2	6.1	12.54	2 (Q3, Q4)	50
		100.00		

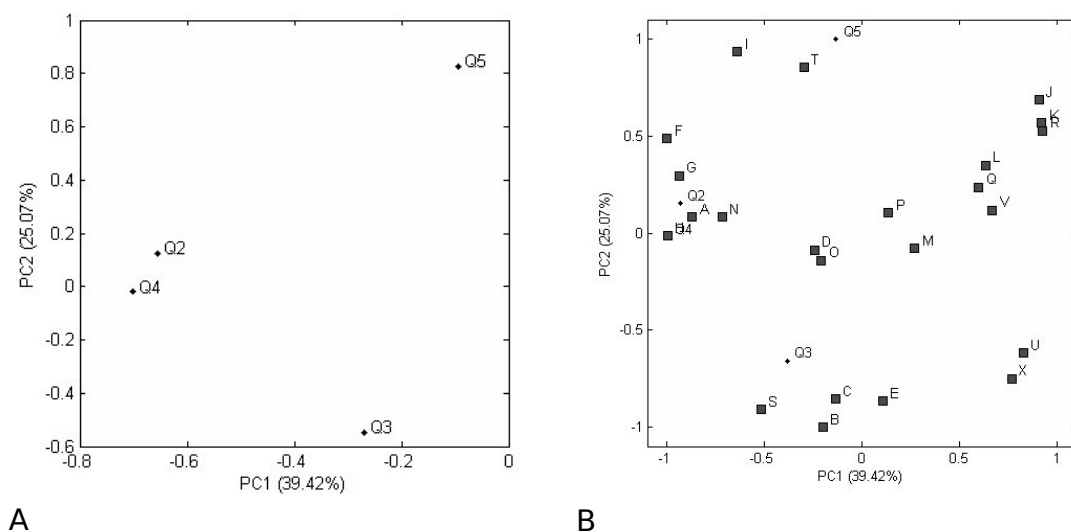
The total species richness was 23 species. Richness varied between samples, the highest richness being observed at points Q3 and Q5, with 15 species, and the lowest at point Q2, with 12 species

(Table 5). The species diversity at all points was 2.422, the point of greatest diversity being Q5, with a value of  $H' = 2.175$ , followed by Q2 with  $H' = 2.09$  and Q4 with  $H' = 1.975$ . These higher species diversity values were negatively correlated with the lower dominance of species, as observed in samples Q2 and Q5 with dominance values 0.1347 and 0.1383, respectively, which contributed to greater species uniformity in the samples.

**Table 5** - Richness, diversity and dominance indices and evenness in the sampled areas.

	Q2	Q3	Q4	Q5	Total
<b>Richness</b>	12	15	13	15	23
<b>Diversity Shannon H'</b>	2.09	1.817	1,975	2.175	2,422
<b>Dominance D</b>	0.1347	0,1923	0,1592	0,1483	0,1115
<b>Total population</b>	892500	5671100	2270620	419290	9253510
<b>Equitability J</b>	0,8412	0,6711	0,7702	0,8033	0,7726

The results of fungi diversity in all samples were submitted to principal component analysis (PCA), as shown in Figure 6, in which the first two principal components (PC) accounted 100% of the total variance, PC1 and PC2 described 39.42% and 25.07% of the variation, respectively. The samples Q2 and Q4 were similar and differed from Q3 and Q5 as shown in fig. 6A. In Q2, a greater occurrence of *Cladosporium* sp2 e *Cladosporium* sp3 was observed. *Cladosporium* sp5 e *Penicillium crustosum* were found only in Q5 and the species *Pseudogymnoascus pannorum* e *Penicillium lanosum* in Q3 (Fig. 6B).



**Fig 6** – Principal Component Analysis (PCA) of fungi diversity of samples Q1, Q2, Q3 and Q4. **Fig. (A)** Samples Q1, Q2, Q3 e Q4; **Fig. (B)** Samples and fungi diversity. Where: *Pseudogymnoascus* sp1 (A); *Pseudogymnoascus* sp2 (B); *Pseudogymnoascus pannorum* (C); *Cladosporium subuliforme* (D); *Cladosporium* sp1 (E); *Cladosporium* sp2 (F); *Cladosporium* sp3 (G); *Cladosporium* sp4 (H); *Cladosporium* sp5 (I); *Cladosporium* sp6 (J); *Cladosporium* sp7 (K); *Penicillium daejeonium* (L); *Penicillium* sp1 (M); *Penicillium* sp2 (N); *Penicillium* sp3 (O); *Penicillium* sp4 (P); *Penicillium* sp5 (Q); *Penicillium* sp6 (R); *Penicillium lanosum* (S); *Penicillium crustosum* (T); *Aspergillus neolepticus* (V); *Aspergillus* sp1 (V) and *Aspergillus* sp2 (X).

#### Screening of fungi able to grow in medium supplemented with diesel oil

The results obtained for the fungal biomass showed that the fungi with the highest mean mycelial biomass were *Pseudogymnoascus* sp.4 (0.1270 g), *Cladosporium* sp.1 (0.1183), *Penicillium daejeonium* (0.0991 g), and *Cladosporium subuliforme* (0.0829 g). The lowest values were seen for *Aspergillus* species and *Penicillium* sp.1. The statistical test showed that there was a significant difference between the mycelial biomasses of the fungi (Kruskal-Wallis,  $H=34.72$ ;  $p=0.000275$ ). The values in Table 6 that are in bold are those that were deemed different by Dunn's post hoc test.

**Table 6** - Matrix of comparisons of mycelial biomass of the fungi by Dunn's post hoc test.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1												
2	0,4854											
3	0,06117	<b>0,01463</b>										
4	0,4496	0,1461	0,323									
5	0,323	0,09183	0,4496	0,6161								
6	0,2954	0,7272	<b>0,005266</b>	0,07153	<b>0,04189</b>							
7	0,7272	0,2954	0,163	0,06841	0,5225	0,163						
8	0,163	<b>0,03637</b>	0,7272	0,5225	0,6841	<b>0,01463</b>	0,2954					
9	0,7272	0,7272	<b>0,03637</b>	0,2694	0,1612	0,4854	0,4854	0,06117				
10	<b>0,005266</b>	<b>0,000487</b>	0,2954	<b>0,04189</b>	0,07153	<b>0,000125</b>	<b>0,01463</b>	0,163	<b>0,001695</b>			
11	<b>0,03637</b>	<b>0,005266</b>	0,7272	0,1612	0,2694	<b>0,001695</b>	0,06117	0,4854	<b>0,01463</b>	0,4854		
12	<b>0,01463</b>	<b>0,001695</b>	0,4854	0,09183	0,1461	<b>0,000487</b>	<b>0,03637</b>	0,2954	<b>0,005266</b>	0,7272	0,7272	

1- *Cladosporium subuliforme*, 2- *Cladosporium* sp.1, 3- *Pseudogymnoascus* sp.1, 4- *Pseudogymnoascus* sp.2, 5- *Pseudogymnoascus* sp.3, 6- *Pseudogymnoascus* sp.4, 7- *Pseudogymnoascus* sp.5, 8- *Pseudogymnoascus* sp.6, 9- *Penicillium daejeonium*, 10- *Penicillium* sp.1, 11- *Aspergillus neolepticus*, 12- *Aspergillus* sp.1.

These differences in mycelial biomass between the fungi show that although all the isolates tested grew in the medium with DFA, some had greater mycelial growth, like *Pseudogymnoascus* sp.4 e *Cladosporium* sp.1, and are thus promising for use in the remediation of these pollutants.

## Discussion

Cultivable fungi are usually isolated from soil samples by serial dilution followed by plating in solid culture medium. The differences between the results of different studies may be associated with the choice of culture medium. A greater number of media, as well as variability in their composition, enable us to obtain more isolates associated with a given substrate. Thus, the results obtained in this study, in which we used the plate dilution method and chose solid culture media with different water activities, led to the growth of several species of cultivable filamentous fungi in the rhizosphere soil of *Deschampsia antarctica* Desv. Of the four media used, MY and MEA favored the growth of fastidious xerophilic fungi (0.91 and 0.95  $a_w$ , respectively). In contrast, DRBC favored fast-growing species with the highest demand in terms of  $a_w$  (0.99). This can enable the identification of different species, which is very important for measuring the biodiversity of an area (Hocking and Pitt 1980; Sonjak et al. 2006; Ruisi et al. 2007). In addition, the use of culture medium supplemented with diesel oil (BH) promoted the growth of fungi that could degrade this carbon source, which indicates that these isolates have bioprospecting potential for the remediation of areas contaminated with organic pollutants in the Antarctica soil.

The cultivable community of fungi from the rhizosphere of *Deschampsia antarctica* was rich. The identified species were classified into four genera: *Cladosporium* sp., *Pseudogymnoascus* sp., *Penicillium* sp., and *Aspergillus* sp., all belonging to the phylum Ascomycota. Filamentous ascomycetes are considered to be among the most abundant groups of fungi in soils of very cold regions (Frisvad et al. 2006; Arenz and Blanchette 2011; Godinho et al. 2015; Held and Blanchette 2017; Wentzel et al. 2019; Martorell et al. 2020), similar to the conditions found in the studied site.

Among the filamentous ascomycetes, the genera *Pseudogymnoascus*, *Cadophora*, *Cladosporium*, *Penicillium*, and *Aspergillus* are commonly found in Antarctic soil, differing in frequency of occurrence. For example, Arenz and Blanchette (2011) observed the predominance of fungi cultivable at 10 °C of the genus *Pseudogymnoascus*. Godinho et al. (2015) recorded other genera of ascomycetes cultivable at 10 °C, such as *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicillium*, and the genus *Pseudogymnoascus*. On the other hand, Held and Blanchette (2017) identified a predominance of *Cadophora* spp. by molecular techniques. The results obtained by culture techniques are similar to those found in this study, where *Pseudogymnoascus*, *Penicillium*, and *Cladosporium* were the most frequently found in all analyzed samples.

The genus *Pseudogymnoascus* is one of the most reported genera in soils of cold environments, not only in Antarctica (Gonçalves et al. 2012, Ding et al. 2016) but also in Arctic and alpine soils



(Hayes et al 2012). They belong to the family *Myxotrichaceae* and comprise a few known species, representing a small portion of the fungal biota (Gargas et al. 2009). According to Arenz et al. (2006), species belonging to this genus can colonize and use various carbon sources and therefore have a key role in the decomposition and cycling of nutrients in Antarctica. The species most commonly identified by cultivation and sequencing has been *Pseudogymnoascus pannorum* (Kirk et al. 2008), which is the only species of this genus that could be identified definitively in this study. Martorell et al. (2020) also identified *P. pannorum*, but as one of the most frequent species, unlike what we observed: Despite being found in almost all samples, it was not the most frequent species. The *Pseudogymnoascus* species that we most frequently isolated from rhizosphere soil was not identified to the species level by ITS sequencing (*Pseudogymnoascus* sp2.). Sequencing of other gene regions of the fungus is sometimes necessary for taxonomic identification.

The genus *Penicillium* is considered cosmopolitan, inhabiting different substrates in tropical, temperate, and extremely cold regions such as the Antarctic continent (Yadav et al. 2018), but still have unknown species. In cold regions, this genus has been reported in ice (Sonjak et al. 2003), Arctic glaciers (Sonjak et al. 2006), Indian Himalayas (Pandey et al. 2008), snow, lakes, cold soils (Margesin and Miteva 2011), and Antarctica (Kostadinovae et al. 2009; Rosa et al. 2009; Godinho et al. 2015; Figueiredo et al. 2020). Due to its enormous diversity and occurrence in extreme environments, it has great potential for use in various environmental, biotechnological, and industrial applications (Yadav et al. 2018), which makes its study very interesting for bioprospecting purposes.

Among the species most frequently found, two were identified in the genus *Penicillium* by our phylogenetic analyses, but only one was identified to the species level (*Penicillium lanosum*). *Penicillium lanosum* is a psychrotolerant species that has been one of the most frequent species isolated from soil samples from cold regions, such as Greenland and alpine areas in the United States and Slovenia (Frisvad et al. 2006). However, there are few reports on the frequency of occurrence of this species in Antarctic soil. This may be related to the culture medium used because, as it is a species that grows better in medium with water activity between 0.90 and 0.95, it would be necessary to use media with this water activity, as was the case of the medium used in this study.

Eight different species were also identified at low frequency and abundance, four of which were identified to the species level (*P. pulvillorum*, *P. crustosum*, *P. thomii*, *P. daejeonium*) and four to the genus level (*Penicillium* sp.1, *Penicillium* sp.2, *Penicillium* sp.3, *Penicillium* sp5). According to

Sonjak et al. (2006), *P. crustosum* can propagate in this extreme habitat due to its ability to withstand osmotic imbalances and nutritionally poor locations. Under cold and oligotrophic conditions, the small size of the conidia can be advantageous for a more efficient uptake of nutrients and for the occupation of microenvironments. Regarding the species *P. daejeonium*, there are no reports of the isolation of this species from Antarctic soil. This species has been reported in the soil of warmer climates and is known as a plant growth promoter (Wakeiln et al. 2007) and as a causal agent of rot of grape (Sang et al. 2013). Recently, Park et al. (2017) reported the occurrence of this species associated with marine macroalgae (*Agarum clathratum*) in Korea. This species was isolated only in the selective medium where the only source of carbon for fungal growth was diesel oil, as used in the Brazilian Research Station in Antarctica, so it could degrade this type of substrate. There are also no reports on the isolation and identification of *P. pulvillorum* and *P. thomii* in studies of fungal diversity in Antarctic soil.

The most abundant species found in this study belonged to the genus *Cladosporium* (*Cladosporium* sp.4), which occurred in all soil samples analyzed. Unfortunately, it was not possible to identify it to the species level. The same was true for seven other representatives of this genus (*Cladosporium* sp.1, *Cladosporium* sp.2, *Cladosporium* sp.3, *Cladosporium* sp.4, *Cladosporium* sp.5, *Cladosporium* sp.6, *Cladosporium* sp.7). *Cladosporium* are considered cosmopolitan and can be isolated from various substrates. Some species are saprophytes, others are endophytes, few can cause pathogenicity to humans and plants (Sandoval-Denis et al. 2015, Garcia et al. 2016), and some have the potential to be used as biological controls (Chalfoun et al. 2007). In the last decade, this genus has been re-examined and reclassified according to its morphological and phylogenetic characteristics. The species were grouped into three complexes: *Cladosporium cladosporioides*, *C. herbarum*, and *C. sphaerospermum* (Bensch et al. 2012). Godinho et al. (2015), evaluating the diversity and bioprospecting of soil fungi from Antarctica, also isolated representatives of this genus, but at low frequency, and as in this study, the identification to the species level showed low molecular identity and inconclusive information when compared against the gene sequences deposited in GenBank.

One of the species recorded in this study with lower frequency was isolated only in the selective medium BH, with DFA as the carbon source. It was identified as *C. subuliforme*, which belongs to the *C. cladosporioides* complex. Thus, *C. subuliforme* can degrade DFA and should be further evaluated in bioremediation studies of contaminated soils in Antarctica. Currently, the presence of several research stations, the flow of researchers, and the transport of all the material necessary for maintenance and operation have caused an environmental impact on the areas surrounding the

stations. In addition, all the energy generated at the research station comes from the burning of fuel, which is stored in tanks to be used throughout the year. Leaks during the transport of these fuels and from the storage tanks have already been observed through analyses of organic pollutants in the soil surrounding some stations (Oliveira et al. 2007; Dias et al. 2012; Jesus et al. 2017; Poggere et al. 2017). Despite the differences found between the studies, it is important to note that ascomycete fungi have greater diversity than others and play a variety of ecological roles in different Antarctic ecosystems (Bridge and Spooner 2012; Ogaki et al. 2020). Some fungi in symbioses with lichens, mycorrhizal associations with the Antarctic hair grass *Deschampsia antarctica* (Rosa et al. 2009), fungi capable of producing different bioactive compounds (Godinho et al. 2015, Wentzel et al. 2019; Martorell et al. 2020), and fungi involved in the decomposition of organic compounds (Yergeau et al. 2007; Upson et al. 2008) have already been isolated and identified. In addition, these studies have shown the ability of different Antarctic environments to support various forms of microbial life, especially filamentous ascomycetes, providing the possibility of new taxonomic discoveries, new ecological roles, and bioprospecting functions (Ogaki et al., 2020). In this sense, the isolation and identification of fungal species that can grow in solid culture medium supplemented with diesel oil, as found in this study, indicate the potential use of the microorganisms identified as *Cladosporium subuliforme* and *Penicillium daejeonium*, in *in situ* tests, in the degradation of these pollutants. This would minimize the impact caused by research activities in and around Admiralty Bay, Antarctica. So far, there are no reports on the use of these fungal species in bioremediation of soil contaminated with petroleum-derived hydrocarbons.

## **Acknowledgments**

The authors would like to thank for Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia Antártico de Pesquisas Ambientais (INCT-APA), Programa Antártico Brasileiro (PROANTAR) and the following Brazilian agencies: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Brasil (CNPQ), Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for providing essential financial support for this work.

## References

- Altschul SF, Madde TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25 (17): 3389 – 3402. <https://doi.org/10.1093/nar/25.17.3389>
- Ameen F, Moslem M, Hadi S, Al-Sabri, AE (2016) Biodegradation of diesel fuel hydrocarbons by mangrove fungi from Red Sea Coast of Saudi Arabia. *Saudi J Biol Sci* 23(2):211–218. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.04.005>.
- Arenz BE, Blanchette RA (2011) Distribution and abundance of soil fungi in Antarctica at sites on the Peninsula, Ross Sea Region and McMurdo Dry Valleys. *Soil Biology & Biochemistry* 43:308–315. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.10.016>.
- Arenz BE, Held BW, Jurgens JA, Farrell RL, Blanchette RA (2006) Fungal diversity in soils and historic wood from the Ross Sea region of Antarctica. *Soil Biology and Biochemistry* 38:3057–3064. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2006.01.016>.
- Bensch K, Braun U, Groenewald JZ, Crous PW (2012) The genus *Cladosporium*. *Studies in Mycology* 72:1 – 401. <https://doi.org/10.3114/sim0003>.
- Bridge PD, Spooner BM (2012) Non-lichenized Antarctic fungi: transient visitors or members of a cryptic ecosystem? *Fungal ecology* 381–394. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2012.01.007>.
- Chalfoun SM, Cunha RL, Carvalho VL, Nogueira DA (2007) Selectivity of cupric and systemic fungicides on *Cladosporium cladosporioides* in coffee plants. *Summa Phytopathologica* 33(1):93 – 95. <https://doi.org/10.1590/S0100-5452007000100016>.
- Crocker FH, Jung CM, Indest KJ, Everman SJ, Carr MR (2019) Effects of chitin and temperature on sub-Arctic soil microbial and fungal communities and biodegradation of hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine (RDX) and 2,4-dinitrotoluene (DNT). *Biodegradation* 30:415–431. <https://doi.org/10.1007/s10532-019-09884-9>
- Cury J, Jurelevicius DA, Villela HDM, Jesus HE, Peixoto RS, Schaefer CEGR, Bicego MC, Seldin L, Rosado AS (2015) Microbial diversity and hydrocarbon depletion in low and high diesel-polluted soil samples from Keller Peninsula, South Shetland Islands. *Antarctic Science* 27(3):263–273. <https://doi.org/10.1017/S0954102014000728>.
- Dias RL, Ruberto L, Hernández E, Vásquez SC, Lo Balbo A, Del Panno MT, Mac Cormack WP (2012) Bioremediation of an aged diesel oil-contaminated Antarctic soil: Evaluation of the “os site” biostimulation strategy using different nutrient sources. *International Biodeterioration & Biodegradation* 75: 96–103. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2012.07.020>.
- Ding Z, Li L, Che Q, Li D, Gu Q., Zhu T (2016) Richness and bioactivity of culturable soil fungi from the Fildes Peninsula, Antarctica. *Extremophiles* 20:425–435. <https://doi.org/10.1007/s00792-016-0833-y>
- Doyle J, Doyle J (1991) DNA protocols for plants. *Molecular Techniques in Taxonomy* 283 – 293.
- Figueiredo HM, Gonçalves VN, Godinho VM, Lopes DV, Oliveira FS, Rosa LH (2020) Diversity and ecology of cultivable fungi isolated from the thermal soil gradients in Deception Island, Antarctica. *Extremophiles* 24:219–225. <https://doi.org/10.1007/s00792-019-01146-z>
- Frisvad JC, Larsen TO, Dalsgaard PW, Seifert KA, Louis-Seize G, Lyhne EK, Jarvis BB, Fettinger JC, Overy DP (2006) Four psychrotolerant species with high chemical diversity consistently

- producing cycloaspeptide A, *Penicillium jamesonlandense* sp. nov., *Penicillium ribium* sp. nov., *Penicillium soppii* and *Penicillium lanosum*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 56(6):27-1437. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64160-0>
- Gargas A, Trest MT, Christensen M, Volk TJ, Blehert DS (2009) *Geomyces destructans* sp. nov. associated with bat white-nose syndrome. Mycotaxon 108: 147–154.
- Godinho VM, Gonçalves VN, Santiago IF, Figueredo HM, Vitoreli GA, Schaefer EGF, Barbosa EC, Oliveira JG, Alves TMA, Zani CL, Junior PAS, Murta SMF, Romanha AJ, Kroon EG, Cantrell CL, Wedge DE, Duke SO, Ali A, Rosa CA, Rosa LH (2015) Diversity and bioprospection of fungal community present in oligotrophic soil of continental Antarctica. Extremophiles 19:585–596.
- Gonçalves VN, Carvalho CR, Johann S, Mendes G, Alves TMA, Zani CL, Junior PAS, Murta SMF, Romanha AJ, Cantrell CL, Rosa CA, Rosa LH (2015) Antibacterial, antifungal and antiprotozoal activities of fungal communities present in different substrates from Antarctica. Polar Biology, 38: 1143-1152. <http://doi.org/10.1007/s00300-015-1672-5>.
- Gonçalves VN, Vaz A, Rosa CA, Rosa LH (2012) Diversity and distribution of fungal communities in lakes of Antarctica. FEMS Microbiology Ecology 82:459–471. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2012.01424.x>
- Hawksworth DL (2004) Fungal diversity and its implications for genetic resource collections. Studies in Mycology 50: 9–18.
- Hayes MA (2012) The *Geomyces* fungi: ecology and distribution. Bioscience 62:819–823. <https://doi.org/10.1525/bio.2012.62.9.7>
- Held BW, Blanchette RA (2017) Deception Island, Antarctica, harbors a diverse assemblage of wood decay fungi. Fungal Biology 121(2):145 – 157. <http://doi.org/10.1016/j.funbio.2016.11.009>.
- Hocking AD; Pit JI (1980) Dichloran-glycerol medium for enumeration of xerophilic fungi from low-moisture foods. Applied Environmental Microbiology 39:488-492.
- Jesus HE, Peixoto RS, Rosado AS (2017) Bioremediation in Antarctic Soils. J Pet Environ Biotechnol 6(6):1- 11. <http://dx.doi.org/10.4172/2157-7463.1000248>
- Kirk PM, Cannon PF, Minter DW, Stalpers JA (2008) Dictionary of the Fungi. CAB International.
- Kostadinovae N, Krumova E, Tosi S, Pashova S, Angelova M (2009) Isolation and identification of filamentous fungi from island Livingston, Antarctic. Biotechnology and Biotech. Equip 23:267-270. <https://doi.org/10.1080/13102818.2009.10818416>
- Mair J, Schinner F, Margesin R (2013) A feasibility study on the bioremediation of hydrocarbon-contaminated soil from an Alpine former military site: effects of temperature and biostimulation. Cold Reg Sci Technol 96:122–128. <https://doi.org/10.1016/j.coldregions.2013.07.006>
- Margesin R, Miteva V (2011) Diversity and ecology of psychrophilic microorganisms. Research in Microbiology, 162 (3):346-361. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2010.12.004>.
- Martorell MM, Ruberto LAM, Fernandez PM, Figueroa LIC, Mac Cormack WP (2019) Biodiversity and enzymes bioprospection of Antarctic filamentous fungi. Antarctic Science 31(1):3–12, <https://doi:10.1017/S0954102018000421>.
- Mora C, Tittensor DP, Adl S, Simpson AGB, Worm B (2011) How Many Species Are There on Earth and in the Ocean? Plos Biology,9(8):e1001127. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001127>
- Moreira FMS, Siqueira JO (2006) Microbiologia e bioquímica do solo. 2ª edição. Ed. UFPA.

- Ogaki MB, Teixeira DR, Vieira R, Lírio JM, Felizardo JPS, Abuchacra RC, Cardoso RP, Zani CL, Alves TMA, Junior PAS, Murta SMF, Barbosa EC, Oliveira JG, Ceravolo IP, Pereira PO, Rosa CA, Rosa LH (2020) Diversity and bioprospecting of cultivable fungal assemblages in sediment of lakes in the Antarctic Peninsula. *Fungal Biology* 124: 601-611. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2020.02.015>
- Oliveira LM, Mendonça ES, Jham G, Schaefer IRS, Albuquerque M (2007) Hidrocarbonetos em solos e sedimentos do entorno da Estação Antártica Brasileira Comandante Ferraz. *Oecol. Bras.* 11(1):144-156.
- Pandey A, Das N, Kumar B, Rinu K, Trivedi P (2008) Phosphate solubilization by *Penicillium* spp. isolated from soil samples of Indian Himalayan region. *World J Microbiol Biotechnol* 24:97–102. <https://doi.org/10.1007/s11274-007-9444-1>.
- Park MS, Lee S, Lim YM (2017) A New record of four *Penicillium* species isolated from Agarum clathratum in Korea. *Journal of Microbiology* 55 (4):237- 246. <https://doi.org/10.1007/s12275-017-6405-8>
- Pinheiro ACM, Nunes CA, Viçtoris V (2013) SensoMaker: A tool for sensorial characterization of food products. *Ciencia E Agrotecnologia* 37:199-201. <https://doi.org/10.1590/S1413-70542013000300001>
- Poggere GC, Melo VF, Francelino MR, Simas FNB, Schaefer CEGR (2017) Adsorption of arsenate ( $\text{HAsO}_4^{2-}$ ) by the clay fraction of soils of the Keller and Barton Peninsulas, King George Island, Maritime Antarctic. *Rev. Ciênc. Agron.* 48(1):13 – 21. <https://doi.org/10.5935/1806-6690.20170002>
- Ramos-Garcia B, Shagarodsky T, Sandoval-Denis M, Ortiz Y, Malosso E, Costa PMO, Guarro J, Minter DW, Sosa D, Perez-Martinez S, Castaneda-Rutz RF (2016) Morphology and phylogeny of *Cladosporium subulliforme*, causing yellow leaf spot of pepper in Cuba. *Mycotaxon* 131:693-702. <http://dx.doi.org/10.5248/131.693>.
- Rosa LH, Vaz ABM, Caligiorne RB, Campolina S, Rosa CA (2009) Endophytic fungi associated with the Antarctic grass *Deschampsia antarctica* Desv. (Poaceae). *Polar Biology* 32:161–167. <https://doi.org/10.1007/s00300-008-0515-z>
- Rosa LH, Zani CL, Cantrell CL, Duke SO, Van Dijck P, Desideri A, Rosa CA (2019) Fungi in Antarctica: diversity, ecology, effects of climate change, and bioprospection for bioactive compounds. In: Rosa LH (ed) *Fungi of Antarctica: diversity, ecology and biotechnological applications*. Springer International Publishing, Switzerland, pp 10–17
- Ruisi S, Barreca D, Selbmann L, Endophytic fungi associated with the Antarctic grass *Deschampsia antarctica* Desv. (Poaceae) Luiz H. Rosa · Aline B. M. Vaz · Rachel B. Caligiorne · Sabrina Campolina · Carlos A. Rosa *Polar Biol* (2009) 32:161–167. <https://doi.org/10.1007/s00300-008-0515-z>
- Ruisi S, Barreca D, Selbmann L, Zucconi L, Onofri S (2007) Fungi in Antarctica. *Reviews in Environmental Science Bio/Technology* 6:127-141. <https://doi.org/10.1007/s11157-006-9107-y>
- Sandoval-Denis M, Deanna A. Sutton, Martin-Vicente A, Cano-Lira JF, Wiederhold N, Guarro J, Gené J (2015) *Cladosporium* species recovered from clinical samples in the United States. *Journal of Clinical Microbiology* 53(9): 2990-3000. <http://doi.org/10.1128/JCM.01482-15>.
- Sang H, An TJ, Kim CS, Choi YP, Deng JX, Paul NC, Sung GH, Yu SH (2013) *Penicillium daejeonium* sp. nov., a New Species Isolated from a Grape and Schisandra Fruit in Korea. *Journal of Microbiology* 51(4):536-539. <http://doi.org/10.1007/s12275-013-3291-6>

- Simões JC, Arigony-Neto J, Bremer UF (2004) O uso de mapas antárticos em publicações. *Pesquisa Antártica Brasileira (Brazilian Antarctic Research)* 4:191-197.
- Sonjak S, Frisvad JC, Gunde-Cimerman N (2006) *Penicillium* mycobiota in arctic subglacial ice. *Microbial Ecology* 52: 2017-216. <http://doi.org/10.1007/s00248-006-9086-0>
- Sonjak S, Zalar P, Frisvad C, Diderichsen B, Plemenitas A (2003) Extremophilic fungi in arctic ice: a relationship between adaptation to low temperature and water activity. *Physics and Chemistry of the Earth, Parts A/B/C* 28(28-32):1273 – 1278. <http://doi.org/10.1016/jpce.2003.08.056>
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipinski A, Kumar S (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30(12):2725-2729. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>
- Taylor DL, Walters WA, Lennon NJ, Bochicchio J, Krohn A, Caporaso JG, Pennanen T (2016) Accurate estimation of fungal diversity and abundance through improved lineage-specific primers optimized for Illumina amplicon sequencing. *Appl Environ Microbiol* 82:7217–7226. <https://doi.org/10.1128/AEM.02576-16>
- Timling I, Taylor DL (2012) Peeking through a frosty window: molecular insights into the ecology of Arctic soil fungi. *Fungal Ecol* 5:419–429. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2012.01.009>
- Upton R, Newsham KK, Read DJ (2008) Root-Fungal Associations of *Colobanthus Quitensis* and *Deschampsia Antarctica* in the Maritime and Subantarctic. *Arctic, Antarctic and Alpine Research*, 40(3), 592 – 599. [https://doi.org/10.1657/1523-0430\(07-057\)\[UPSON\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1657/1523-0430(07-057)[UPSON]2.0.CO;2).
- Wakelin SA, Gupta VVSR, Harvey PR, Ryder MH (2007) The effect of *Penicillium* fungi on plant growth and phosphorus mobilization in neutral to alkaline soils from southern Australia. *Can. J. Microbiol.* 53:106–115. <https://doi.org/10.1139/w06-109>
- Wentzel LCP, Inforsato FJ, Montoya QV, Rossin BG, Nascimento NR, Rodrigues A, Sette LD (2019) Fungi from Admiralty Bay (King George Island, Antarctica) Soils and Marine Sediments. *Microbial Ecology* 77:12 – 24. <https://doi.org/10.1007/s00248-018-1217-x>
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor JW (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pp. 315-322 In: *PCR Proto-cols: A Guide to Methods and Applications*, eds. Innis, M.A., D.H. Gelfand, J.J. Sninsky, and T.J. White. Academic Press, Inc., New York. See the write up at the Berkeley News Center, September 14, 2012: <http://newscenter.berkeley.edu/2012/09/14/fungus-expert-celebrates-10000th-citation-for-1990-publication/>
- Wu M, Dick WA, Li W, Wang X, Yang Q, Wang T, Xu L, Zhang M, Chen L (2016) Bioaugmentation and biostimulation of hydrocarbon degradation and the microbial community in a petroleum-contaminated soil. *International Biodeterioration and Biodegradation* 107:158-164. <https://doi.org/10.1016/j.jbio.2015.11.019>
- Yadav N, Verma P, Kumar V, Sangwan P, Mishra S, Panjari N, Gupta VK, Saxena AK (2018) Biodiversity of the Genus *Penicillium* in Different Habitats. *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering* 3–18. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63501-00001-6>
- Yergeau SK, Zhili H, Zhou J, Kowalchuk GA (2007) Functional microarray analysis of nitrogen and carbon cycling genes across an Antarctic latitudinal transect. *ISME Journal* 1:163–179. <https://doi.org/10.1038/ismej.2007.24>

## **ARTIGO 2**



## Degradação de hidrocarbonetos derivados do óleo diesel (DFA) por duas espécies autóctones da Antártica

Fabiana Reinis Franca Passamani<sup>1</sup>, Taís Teixeira das Neves<sup>1</sup>, Nathasha de Azevedo Lira<sup>2</sup>, Suzana Reis Evangelista<sup>2</sup>, Juliano de Carvalho Cury<sup>3</sup>, Luis Roberto Batista<sup>2</sup>, Cristina Ferreira Silva<sup>1</sup>

1. Laboratório de Biotecnologia Ambiental, Departamento de Biologia, Universidade Federal de Lavras.

2. Laboratório de Micologia e Micotoxinas, Departamento de Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Lavras.

3. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Alimento e Nutrição, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

### RESUMO

A presença de hidrocarbonetos derivados de petróleo no solo do entorno das estações de pesquisas é uma das principais causas de poluição resultante da presença humana na Antártica, o que causa preocupação pois são compostos recalcitrantes. A busca por alternativas para remediação dessa contaminação tem sido um desafio e os processos biológicos, através do uso de microrganismos autóctones são considerados a principal alternativa. Nesse sentido, o presente estudo teve como objetivo avaliar o potencial de degradação de alguns hidrocarbonetos presentes no óleo diesel, assim como o perfil protéico expresso por duas espécies de fungos autóctones da Antártica, *Pseudogymnoascus* sp. e *Cladosporium subuliforme*. Essas duas espécies foram cultivadas em meio líquido acrescido de hidrocarbonetos aromáticos (tolueno e xileno) e alcanos (heptano, hexadecano e dodecano), como única fonte de carbono. Os resultados obtidos mostraram que *Pseudogymnoascus* sp. obteve 100% de degradação para o heptano, 88% para o tolueno, 70% para o xileno, 65% para o hexadecano e apenas 38% para o dodecano. Já *C. subuliforme* obteve 100% de degradação do heptano, 73% do tolueno, 41% do xileno, 69% do hexadecano e 86% do dodecano. Os compostos voláteis obtidos após o cultivo das duas espécies de fungos, pertencem ao grupo dos aldeídos, alcanos, ésteres, álcoois, ácidos e aromáticos. As espécies testadas são promissoras para serem utilizadas em ensaios de biorremediação desses contaminantes orgânicos, em solo antártico.

**Palavras-chave:** Biodegradação, Poluentes Orgânicos, Remediação, Ascomycota.

### 1. INTRODUÇÃO

A península Antártica possui um dos climas mais amenos do continente Antártico e, por isso, nesse local e nas muitas ilhas próximas, se localizam o maior número de estações de pesquisa. Trinta países, todos signatários do Tratado Antártico, operam estações de pesquisa na Antártica,

algumas são operadas somente no verão e outras são mantidas ativas o ano inteiro. Toda a energia utilizada nessas estações é gerada a partir de derivados de petróleo, por meio da queima de combustível estocado em tanques (JESUS *et al.*, 2015). O combustível mais utilizado na região é o Diesel Fuel Artic (DFA), o qual é composto principalmente por hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos (ISMAIL *et al.*, 2012). Vazamentos desse óleo diesel, durante a estocagem ou transporte, tem sido uma das principais causas de poluição resultante da presença humana na Antártica (VAN HAMME, 2003), o que causa preocupação pois são compostos recalcitrantes. A busca por alternativas para remediação dessa contaminação no solo Antártico tem sido um desafio e os processos biológicos são considerados a principal opção, por menor custo quando comparado aos processos físico-químicos, além de serem considerados ambientalmente corretos e seguros (HARITASH e KAUSHIK, 2009; ZHANG *et al.*, 2010; ZAKARIA *et al.*, 2020; ABDULSASHEED *et al.*, 2020).

Sabe-se que bactérias e fungos apresentam a capacidade metabólica e fisiológica de degradar hidrocarbonetos derivados de petróleo, tanto os compostos alifáticos como os aromáticos policíclicos (KRAUSS *et al.*, 2011; CÉBRON *et al.*, 2015; LING *et al.*, 2015; MIURA e URABE, 2015; CURY *et al.*, 2015; ANDREOLLI *et al.*, 2015; ABDULRASHEED *et al.*, 2020). Na Antártica, a capacidade das bactérias como degradadores de hidrocarbonetos em solo contaminado e em ambiente marinho vem sendo avaliada. No entanto, estudos com fungos filamentosos isolados de ecossistemas antárticos são praticamente inexistentes. Isso demonstra a grande lacuna sobre estudos de fungos autóctones na degradação desses poluentes orgânicos, e também na possibilidade de avaliar o uso de consórcios mistos, de bactérias e fungos, nesse processo, degradando-os em dióxido de carbono e água ou transformando-os em outras substâncias não tóxicas ou de baixa toxicidade (PERELO *et al.*, 2010; ABO-STATE *et al.*, 2018)

Em estudos realizados em solo contaminado de regiões tropicais e temperadas, os fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Cladosporium*, *Neosartorya*, *Paecilomyces*, *Penicillium* e *Talaromyces* apresentaram a capacidade de transformar ou remover enzimaticamente esses hidrocarbonetos, tanto os de baixo como os de alto peso molecular (RIVILLA, ALEU e COLLADO, 2009; PASSARINI *et al.*, 2011; ARANI e GUNALE 2012; CHANDRA *et al.*, 2013; VARJANI, 2015; VARJANI e UPASANI, 2016; WU *et al.*, 2016; BOVIO *et al.*, 2017). Assim tem-se aumentando o interesse no estudo desses fungos em processos de biodegradação, não só nessas regiões, como também em regiões polares, como na Antártica. Vale ressaltar, que na Antártica os estudos de remediação *in situ* só podem ser realizados com espécies autóctones, pois é vedado o uso de organismos alóctones, segundo o Tratado Antártico.

Atualmente, uma das formas de determinar quantitativa e qualitativamente o hidrocarboneto e os compostos degradados é através do uso de técnicas cromatográficas (BOVIO *et al.*, 2017; MANDAL e DAS, 2018; ABO-STATE *et al.*, 2018). Nesse sentido, o presente estudo teve como objetivo avaliar o potencial de degradação de alguns hidrocarbonetos presentes no óleo diesel pelos fungos *Pseudogymnoascus* sp. e *Cladosporium subuliforme*, assim como o seu perfil protéico expresso.

## 2. DESENVOLVIMENTO

### 2.1 Material e Métodos

#### 2.1.1 Obtenção dos isolados fúngicos e preparo da suspensão de esporos

Os fungos utilizados neste estudo foram isolados de solo de rizosfera de *Deschampsia antarctica*, coletado no verão do ano de 2017, na localidade de Punta Hanequim, Baía do Almirantado, Antártica e se encontram depositados na Coleção de Cultura de Microrganismos do Departamento de Ciência dos Alimentos (CCDCA), pertencente à Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, Brasil. Foram selecionados os isolados *Pseudogymnoascus* sp. (CCDCA 11642) e *Cladosporium subuliforme* (CCDCA 11636), por apresentarem o maior crescimento em meio de cultura seletivo (Capítulo anterior desta tese), contendo o óleo diesel como única fonte de carbono. Para a reativação dos fungos, os mesmos foram transferidos para placas contendo 15 mL do meio de cultura (MEA), incubados a 10°C, por um período de 21 dias. Após esse período, e com certificação da pureza da cultura, foram preparadas as suspensões de esporos para avaliação da degradação dos hidrocarbonetos. A suspensão de esporos foi obtida adicionando-se 40 mL de água destilada estéril com 0,5% de Tween 80 e filtrada em gaze estéril. A determinação da concentração final de esporos da suspensão foi realizada com a contagem em câmara de Neubauer, sendo padronizada a 6 log esporos/mL para todos os tratamentos.

#### 2.1.2 Caracterização da composição química do óleo DFA

A caracterização da composição química do óleo diesel (DFA) foi realizada no Laboratório de Cromatografia, do Departamento de Química, da Universidade Federal de Lavras. Desta caracterização, foram selecionados os seguintes hidrocarbonetos para os ensaios *in vitro*: tolueno

( $C_6H_5CH_3$ ), xileno ( $C_6H_4(CH_3)_2$ ), heptano ( $CH_3(CH_2)_5CH_3$ ), hexadecano ( $CH_3(CH_2)_{14}CH_3$ ) e dodecano ( $CH_3(CH_2)_{10}CH_3$ ). Todos compostos químicos utilizados nos ensaios de degradação apresentam pureza > 99.0% (Sigma-Aldrich -USA).

### 2.1.3 Avaliação da degradação do tolueno, xileno, heptano, hexadecano e dodecano

A capacidade das cepas puras de *Pseudogymnoascus* sp. e *C. subuliforme* de degradarem tolueno, xileno, heptano, dodecano e hexadecano foram avaliadas em caldo BH (0.2 g/l de  $MgSO_4$ ; 0.02 g/l de  $CaCl_2$ ; 1 g/l de  $KH_2PO_4$ ; 1 g/l de  $K_2HPO_4$ ; 0,05 g/l de  $FeCl_2$ ; 1 g/l de  $NH_4NO_3$ ; 0,1% de Tween 80 (CURY *et al.*, 2015). Esse meio de cultura fornece as quantidades adequadas de microelementos para o crescimento microbiano, exceto uma fonte de carbono, sendo recomendado para ser utilizado em estudos de degradação de hidrocarbonetos por microrganismos. Para a avaliação da degradação dos hidrocarbonetos alcanos e aromáticos pelos fungos, o caldo BH foi então suplementado com 2% (v/v) de cada hidrocarboneto. Foram então preparados seis tubos com 10 mL de caldo BH e adicionado 2% (v/v) de tolueno, seis tubos com caldo BH e 2% (v/v) de xileno, seis tubos com caldo BH e 2% (v/v) de heptano, seis tubos com caldo BH e 2% (v/v) de dodecano e seis tubos com 2% (v/v) de hexadecano. Como controle positivo foram preparados seis tubos com caldo BH adicionado de uma solução de glicose a 10%. Dos seis tubos preparados para cada hidrocarboneto e controle positivo, 3 tubos foram inoculados com cultura pura pré-crescida de *Pseudogymnoascus* sp. e 3 tubos com *C. subuliforme*. Após a inoculação, os tubos foram incubados a 10°C por um período de 21 dias. Após esse período, realizou-se a filtração do micélio fúngico e o filtrado obtido encaminhado para análise cromatográfica dos compostos voláteis produzidos e a determinação do percentual de degradação de cada hidrocarboneto testado.

### 2.1.4 Análise dos compostos voláteis obtidos pela degradação dos hidrocarbonetos

Os compostos voláteis resultantes da degradação dos hidrocarbonetos testados foram avaliados por cromatografia gasosa seguida de espectrometria de massa. Para isso, 4 mL da amostra foram colocados em um vial de 15mL, com posterior aquecimento a 50°C/15 min, até atingir o ponto de equilíbrio. Após esse período, a fibra (divinilbenzeno, carboxeno e polidimetilsiloxano) foi inserida no headspace da amostra e mantida a 50°C/20 min. Após 20 min, a fibra foi recolhida e injetada no

GC/MS, com exposição por 5 min. A coluna utilizada foi a Rtx-5MS (30m x 25mm x 0.25  $\mu\text{m}$ ; Agilent), composta de 5% de difenil e 95% de dimetil polisiloxano, com fase estacionária apolar (GOICOECHEA e GUILLÉN, 2014). O programa para análise de hidrocarbonetos iniciou-se a 50°C/ 5 min, aquecida a 4°C  $\text{min}^{-1}$  e a 280°C (por 2 min). As temperaturas da fonte de íons e do analisador de massa quadrupolo foram mantidas a 230°C e 150°C, respectivamente. O gás hélio foi utilizado a uma pressão de 16,5 psi; as temperaturas do injetor e detector de temperatura foram mantidas a 220 e 280°C, respectivamente. O modo splitless foi usado para injeção. Os espectros de massa foram registrados na energia de ionização de 70eV (GOICOECHEA e GUILLÉN, 2014). Para a análise semi-quantitativa da concentração dos compostos obtidos, dois microlitros de padrão interno de 4 nonanol (12.500mg/g) foram injetados com as amostras.

Os dados cromatográficos e espectrais de massa foram analisados com o software de solução GC-MS da Shimadzu. Os compostos foram identificados por comparação de seus espectros de massa com a biblioteca espectral de massa NIST e índice de retenção linear, em relação a uma série de n-alcenos.

#### 2.1.5 Determinação do percentual de degradação dos hidrocarbonetos

Para a determinação do percentual de degradação foi realizada a análise semi-quantitativa da concentração do hidrocarboneto testado, através da concentração conhecida do padrão interno, no meio de cultura com e sem a inoculação do fungo. (HUNG e THIEMANN, 2002).

#### 2.1.6 Análise do perfil proteico por MALDI-TOF

Após o cultivo dos fungos *Pseudogymnoascus* sp. e *C. subuliforme* em meio líquido contendo os hidrocarbonetos tolueno, xileno, heptano, hexadecano e dodecano, como única fonte de carbono, o micélio fúngico foi filtrado e uma pequena alíquota (1  $\mu\text{l}$ ) do micélio foi utilizada para determinar o perfil de proteínas expressa pelo fungo, nas condições de cultivo testadas. Esta alíquota foi então aplicada diretamente na placa de aço inoxidável MALDI-TOF MS (aço polido alvo MSP 96; Bruker Daltonics) e com a amostra quase seca na placa, 1  $\mu\text{l}$  da solução de matriz ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico (Fluka) saturado em uma solução orgânica foi adicionada e misturada suavemente. A placa foi deixada exposta ao ambiente para a completa evaporação da amostra. Posteriormente, as amostras secas ao ar foram analisadas por um ultrafleXtreme MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha) equipado com um laser de granada de ítrio alumínio dopado com neodímio de

1000 Hz.MALDI-TOF MS. No geral, cada amostra de MALDI-TOF MS foi localizada em triplicata para testar a reprodutibilidade. Antes das análises, a calibração foi realizada com um padrão de teste bacteriano (Bruker Daltonics) contendo um extrato de *Escherichia coli* DH5 alfa previamente preparado (CARVALHO *et al.*, 2016). O valor m/z de cada pico foi identificado. Os espectros de massa foram processados com o pacote de software MALDI Biotyper 3.0 (Bruker Daltonics) para agrupamento estatístico e análise do perfil proteico. A fonte de íons 1 era de 19,38 kV, a fonte de íons 2 era de 18,18 kV e a detecção foi definida de 1000 a 15.500 Da. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas biológicas independentes para cada agente e tempo de tratamento. O sistema ClinProt Peak Statistic foi utilizado para a aquisição de padrões de perfis proteômicos complexos e sua análise comparativa entre os tratamentos e o controle.

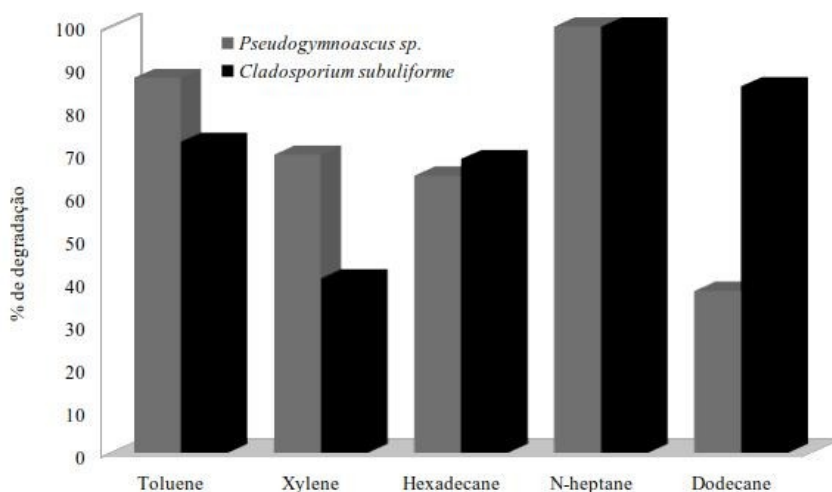
## 2.2 Resultados

### 2.2.1 Degradação de hidrocarbonetos alcanos e aromáticos por culturas puras de fungos filamentosos

De acordo com os resultados do capítulo anterior, 14 isolados de fungos filamentosos foram capazes de crescer em meio de cultura seletivo, com 2% (v/v) do óleo diesel, como única fonte de carbono. Dos 14 isolados obtidos, 2 espécies de fungos, *Cladosporium subuliforme* e *Pseudogymnoascus* sp., foram selecionados para serem testados quanto a capacidade de degradarem hidrocarbonetos aromáticos e alcanos, constituintes do óleo diesel-DFA, utilizado como fonte de energia na Estação de Pesquisa Brasileira na Antártica.

Os resultados obtidos mostram que as duas espécies de fungos apresentam mecanismos metabólicos capazes de degradar todos os hidrocarbonetos testados, mas os percentuais de degradação foram diferentes entre as duas espécies e também entre os hidrocarbonetos, exceto para o alcano heptano, onde foi observado 100% de degradação pelas duas espécies avaliadas (FIGURA 1). O fungo *Pseudogymnoascus* sp. apresentou a capacidade de degradar 88% do tolueno, 70% do xileno, 65% do hexadecano e 38% do dodecano. Já *C. subuliforme* degradou 73% do tolueno, 41% do xileno, 69% do hexadecano e 86% do dodecano, após 21 dias de cultivo. Isso demonstra que o fungo *Pseudogymnoascus* sp. apresenta maior habilidade em utilizar o xileno como fonte de carbono e energia para o seu desenvolvimento, quando comparado ao *Cladosporium subuliforme*. Por outro lado, o *C. subuliforme* mostrou maior capacidade em degradar o alcano dodecano quando comparado com o fungo *Pseudogymnoascus* sp. nas condições de cultivo utilizadas.

Figura 1 – Percentual de degradação dos hidrocarbonetos que compõem o óleo DFA: tolueno e xileno (aromáticos) e, hexadecano, n-heptano e dodecano (alcanos), obtidos pelos fungos *Pseudogymnoascus* sp. e *Cladosporium subuliforme*, após 21 dias de cultivo em meio líquido.

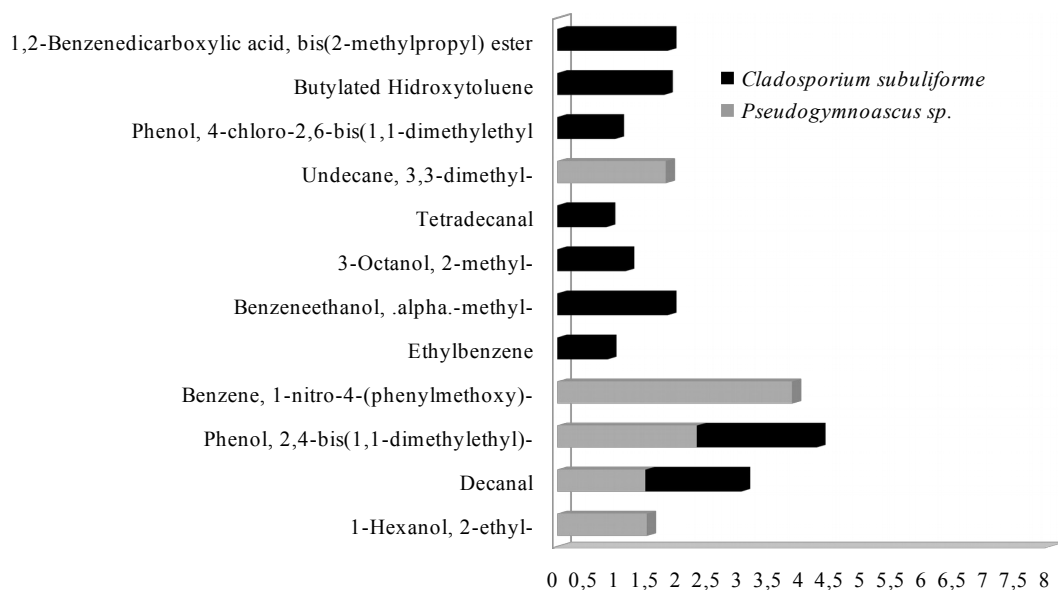


## 2.2.2 Compostos voláteis obtidos da degradação dos hidrocarbonetos

### 2.2.2.1 Aromáticos

Os compostos voláteis obtidos a partir do cultivo dos fungos na presença dos aromáticos (tolueno e xileno), diferiram entre as duas espécies testadas. Na figura 2 pode-se observar que na presença do tolueno, foram obtidos um total de 5 compostos voláteis no cultivo com *Pseudogymnoascus* sp., enquanto com *C. subuliforme* foram obtidos um total de 9 compostos voláteis. Do total de 12 compostos obtidos no cultivo com as duas espécies, 7 foram exclusivos de *C. subuliforme* e 3 compostos de *Pseudogymnoascus* sp.. O composto obtido em maior concentração, na presença do *Pseudogymnoascus* sp. foi o Benzene 1-nitro 4 phenylmethoxy (3,82 log mg/g) e do *C. subuliforme* foi o phenol, 2,4-bis (1,1-dimethylethyl (1,95 log mg/g).

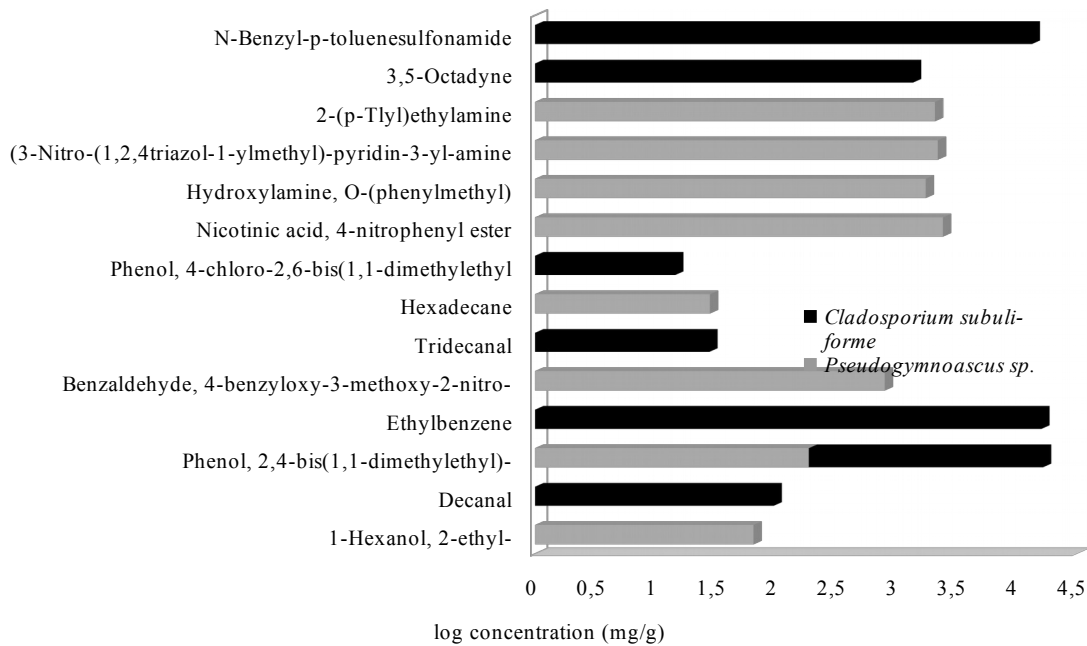
Figura 2 - Concentração (log mg/g) dos compostos voláteis produzidos após o cultivo dos fungos *Pseudogymnoascus* sp. (cor cinza) e *Cladosporium subuliforme* (cor preta) em caldo líquido contendo 2% (v/v) de Tolueno como única fonte de carbono.



No tratamento com o xileno (FIGURA 3), 8 compostos voláteis foram obtidos do cultivo com o fungo *Pseudogymnoascus* sp. e o composto obtido em maior quantidade foi o Nicotinic acid 4-nitrophenyl ester (3,39 log mg/g) e em menor quantidade foram o alcano hexadecano (1,45 log mg/g) e o álcool 1-hexano-2-ethyl (1,82 log mg/g). Já no cultivo com o *Cladosporium subuliforme* foram obtidos 7 compostos voláteis, sendo o N-Benzyl-p-toluenesulfonamide e o ethylbenzene, com 4,13 log mg/g e 4,21 log mg/g, respectivamente, os que apresentaram maior concentração. Já o Phenol, 4-chloro-2,6-bis(1,1-dimethylethyl), com 1,16 log mg/g foi o composto obtido em menor concentração. Analisando ainda os resultados da figura 3 pode-se observar que alguns compostos voláteis só foram detectados no cultivo com uma determinada espécie fúngica, como o Nicotinic acid 4-nitrophenyl ester e o hexadecane pelo fungo *Pseudogymnoascus* sp. e os compostos N-benzyl-p-toluenesulfonamide e o tridecanal por *C. subuliforme*.



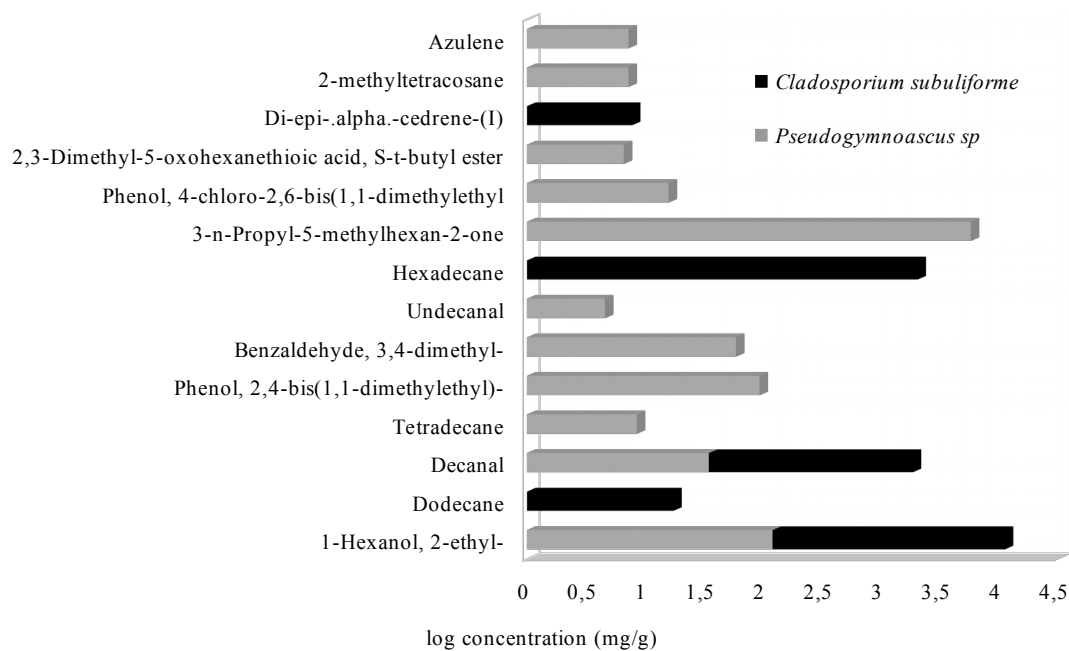
Figura 3 - Concentração (log mg/g) dos compostos voláteis produzidos após o cultivo dos fungos *Pseudogymnoascus* sp. (cor cinza) e *Cladosporium subuliforme* (cor preta) em caldo líquido contendo 2% (v/v) de Xileno como única fonte de carbono.



### 2.2.2.2 Alcanos

As duas espécies de fungos também foram testadas quanto a capacidade de usar hidrocarbonetos alcanos como fonte de carbono e energia para o seu crescimento. Na presença do n-heptano, com o *Pseudogymnoascus* sp., foram obtidos 11 compostos voláteis, enquanto que com o *Cladosporium subuliforme* foram obtidos 5 compostos (FIGURA 4). O composto com maior concentração obtido na cultura de *Pseudogymnoascus* sp foi o 3n propil 5 metilhexanona (3,76 log mg/g) e da cultura de *C. subuliforme* foi o alcano hexadecano (3,31 log mg/g). O 3n propil 5 metilhexanona é estruturalmente um alceno com 6 átomos de carbono (hexano) e com um grupo metil ligado ao seu segundo átomo de carbono.

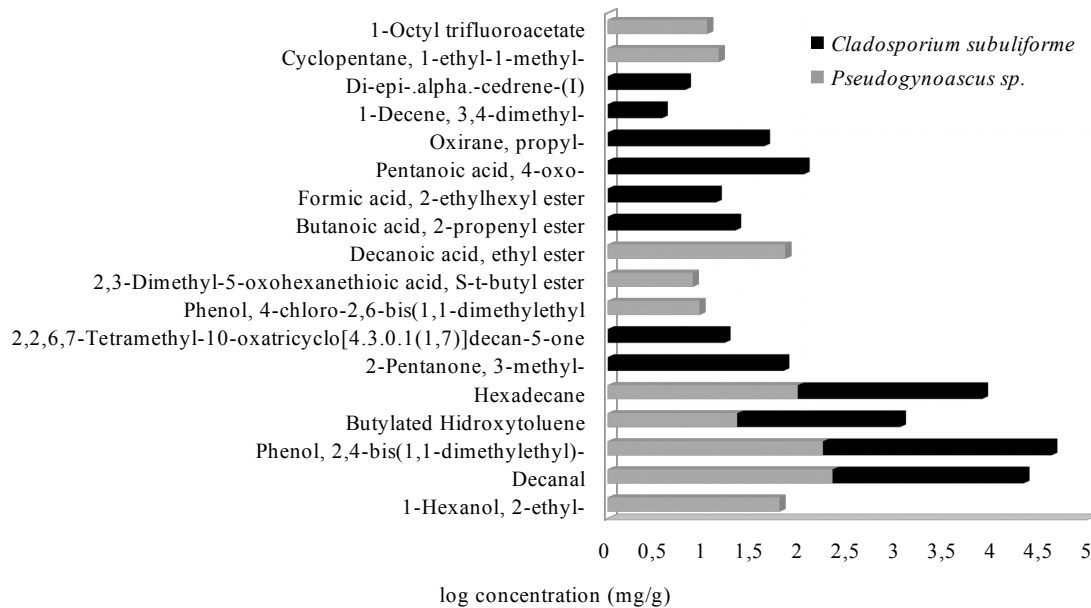
Figura 4 - Concentração (log mg/g) dos compostos voláteis produzidos após o cultivo dos fungos *Pseudogymnoascus* sp. (cor cinza) e *Cladosporium subuliforme* (cor preta) em caldo líquido contendo 2% (v/v) de n-heptano como única fonte de carbono.



No tratamento com o hexadecano foram obtidos 10 compostos voláteis quando o cultivo foi realizado com o *Pseudogymnoascus* sp (FIGURA 5). Os compostos que tiveram maiores concentrações foram o aldeído decanal (2,33 log mg/g), o Phenol,2,4-bis(1,1-dimethylethyl) (2,23 log mg/g) e o Decanoil acid ethyl ester (1,84 log mg/g). Este último composto é classificado como um éster do ácido decanóico ou cáprico que é um ácido graxo de cadeia saturada com 10 átomos de carbono.

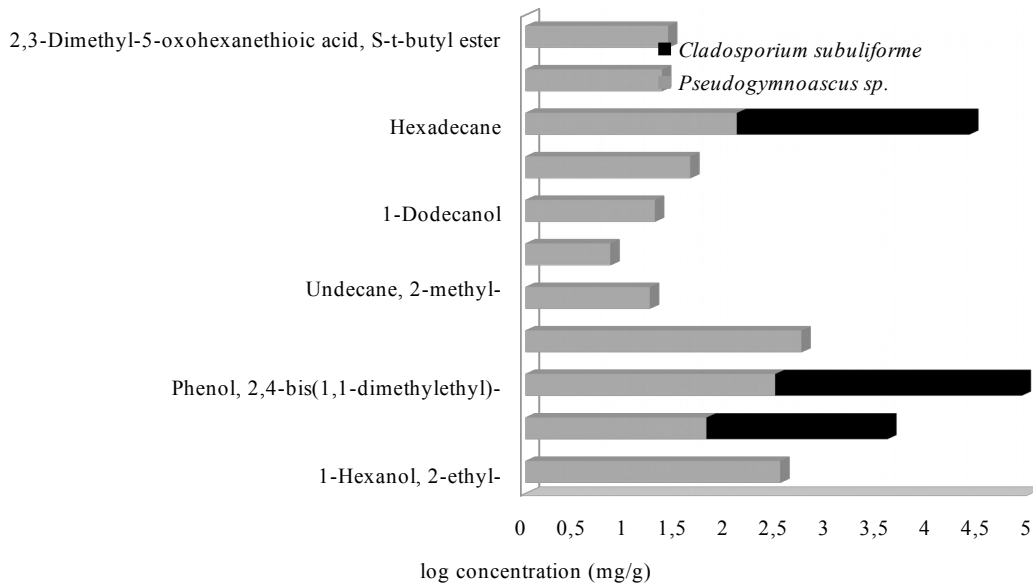
Em relação ao cultivo com o fungo *Cladosporium subuliforme* foram obtidos 12 compostos voláteis, e o de maior concentração também foi Phenol,2,4-bis(1,1-dimethylethyl) (2,37 log mg/g).

Figura 5 - Concentração (log mg/g) dos compostos voláteis produzidos após o cultivo dos fungos *Pseudogymnoascus* sp. (cor cinza) e *Cladosporium subuliforme* (cor preta) em caldo líquido contendo 2% (v/v) de Hexadecano como única fonte de carbono.



A figura 6 mostra os resultados da concentração (log mg/g) de todos os compostos voláteis obtidos pelas duas espécies de fungos avaliadas. Foram obtidos um total de 11 compostos voláteis, sendo 11 no cultivo com o *Pseudogymnoascus* sp. e 3 com o *C. subuliforme*. Os compostos de maiores concentrações obtidos no cultivo com *Pseudogymnoascus* sp. foram hexadecane (2,09 log mg/g), silanediol dimethyl (2,73 log mg/g), 1-hexanol 2 ethyl (2,52 log mg/g) e phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl) (2,47 log mg/g). Este último também foi o composto produzido em maior concentração (2,44 log mg/g) no cultivo do *C. subuliforme*.

Figura 6 - Concentração (log mg/g) dos compostos voláteis produzidos após o cultivo dos fungos *Pseudogymnoascus* sp. (cor cinza) e *Cladosporium subuliforme* (cor preta) em caldo líquido contendo 2% (v/v) de dodecano como única fonte de carbono.



De uma maneira geral, independente da fração de óleo analisada, os compostos voláteis pertencem a classe dos álcoois, aldeídos, alcanos, cetonas, ésteres, fenóis, ácidos e aminas. Esses resultados evidenciam uma produção metabólica diversa pelas espécies de fungo testada, sendo resultado da interação do fungo com o ambiente ao qual está contido. Dessa forma as condições ambientais podem modificar a produção de compostos pelos fungos.

### 2.2.3 Perfil proteico

A análise do perfil de proteínas expressas por *C. subuliforme* nos tratamentos avaliados gerou uma lista de 98 picos com diferentes proporções de massa/carga ( $m/z$ ) na presença do tolueno, 124 picos na presença do xileno, 96 picos com o heptano, 83 picos com o hexadecano e 121 picos com o dodecano. Cada pico gerado corresponde a razão de massa para carga ( $m/z$ ) e o número total de picos a proteína identificada nos diferentes tratamentos (TABELA 1). Para o *Pseudogymnoascus* sp. foram gerados uma lista de 113 picos na presença do tolueno e do xileno, 128 picos com o heptano, 94 picos com o hexadecano e 133 picos na presença do dodecano.

TABELA 1 - Razões de massa para carga mínima e máxima (m / z), e o número total de picos de proteínas identificados nos diferentes tratamentos.

Tratamento	Lowest m/z		Highest m/z		Nº de picos proteínas	
	P*	C*	P*	C*	P*	C*
Tolueno	2004,93	2605,49	15241,7	15242,76	113	98
Xileno	2005,34	2005,71	15260,3	15260,92	113	96
Heptano	2004,77	2005,02	15274,2	15277,86	128	96
Hexadecano	2005,08	2005,28	15261,6	15264,53	94	83
Dodecano	2004,77	2188,28	15274,2	15273,98	133	121

\* P- *Pseudogymnoascus* sp. C- *Cladosporium subuliforme*.

Após análise estatística de todos os picos de proteínas gerados entre os tratamentos com os hidrocarbonetos avaliados (condição não ótima) e o controle, com a glicose (condição ótima) pelo fungo *Pseudogymnoascus* sp., pôde-se observar que houve diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) entre algumas proteínas (TABELA 2). Somente no cultivo com o tolueno, como fonte de carbono, não foram observadas diferenças estatísticas significativas na expressão das proteínas, quando comparado com o tratamento controle. Isso significa que o *Pseudogymnoascus* sp. quando cultivado na presença do xileno, heptano, hexadecano e dodecano expressa proteínas diferentes daquelas expressas quando cultivado na presença da glicose.

TABELA 2 – Massa das proteínas expressas pelo fungo *Pseudogymnoascus* sp., quando cultivado na presença dos hidrocarbonetos tolueno, xileno, heptano, hexadecano e dodecano (condição não ótima) e que foram estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ) de quando o fungo foi cultivado na presença da glicose (condição ótima).

Hidrocarboneto	Massa	p<0,05
Tolueno		
Xileno	6215,14	0,0152
	2852,83	0,0211
	6054,85	0,0211
	3777,2	0,0211
	6112,48	0,0257
	6124,3	0,0351
	6015,48	0,0352
	6142,95	0,0352
	5225,92	0,0352
	13892,04	0,0352
	4214,57	0,0352
	3909,77	0,0472
	3001,31	0,0472
Heptano	5226,01	0,00621

	12222,12	0,00621
	14030,36	0,00816
	3777,43	0,00894
	6216,05	0,00894
	2852,88	0,01
	13892,36	0,0138
	6127,18	0,015
	13926,23	0,015
	13744,78	0,0235
	13997,75	0,0236
	10448,88	0,0236
	11366,21	0,0307
	3909,55	0,0373
	6112,62	0,0373
	7017,07	0,0415
Hexadecano	7004,91	0,00029
	14002,35	0,0267
	5226,12	0,0267
	6114,66	0,0267
	6449,76	0,0344
	6810,08	0,0344
	3777,87	0,0344
	10966,94	0,0435
	4214,8	0,0435
Dodecano	5226,01	0,00621
	12222,12	0,00621
	14030,36	0,00816
	3777,43	0,00894
	6216,05	0,00894
	2852,88	0,01
	13892,36	0,0138
	6127,18	0,015
	13926,23	0,015
	13744,78	0,0235
	13997,75	0,0236
	10448,88	0,0236
	11366,21	0,0307
	3909,55	0,0373
	6112,62	0,0373
	7017,07	0,0415

Para o fungo *C. subuliforme* os resultados encontrados foram bem diferentes dos obtidos para *Pseudogymnoascus* sp.. A análise dos resultados dos picos de proteínas mostrou que no cultivo com o xileno (condição não ótima) quando comparado com o controle, com a glicose (condição ótima), somente a proteína de massa 13.992,93 foi diferente estatisticamente entre as duas condições de cultivo ( $p < 0,025$ ). Nos outros tratamentos com o tolueno, heptano, hexadecano e dodecano não foram observadas diferenças estatísticas significativas na expressão das proteínas quando comparados os tratamentos como os hidrocarbonetos (condição não ótima) com o controle (condição ótima). Isso mostra que o *Cladosporium subuliforme* apresenta o mesmo perfil proteico quando utiliza os hidrocarbonetos testados e a glicose como fonte de carbono e energia para o seu desenvolvimento, diferente do observado para o fungo *Pseudogymnoascus* sp..

### 2.3 Discussão

A degradação microbiológica é uma das ferramentas utilizadas para remediar a poluição causada por hidrocarbonetos derivados de petróleo em diferentes ambientes (ELYAMINE *et al.*, 2021; PREMNATH *et al.*, 2021), podendo ser utilizada em ambientes extremos, como o encontrado no solo Antártico. No solo, os fungos são considerados um dos microrganismos mais importantes, não só pela sua abundância e função, mas também porque degradam poluentes orgânicos, sendo reconhecidos por sua habilidade em utilizar diversos compostos orgânicos tóxicos como fonte de carbono e energia para o seu desenvolvimento. Isso é possível devido à produção de enzimas intra e extracelulares, capazes de degradarem diferentes fontes de carbono, inclusive polímeros complexos (RAMDASS e RAMPERSAD, 2021) e, por isso, os fungos vêm sendo considerados organismos promissores para os processos de biorremediação de ambientes contaminados com poluentes orgânicos (HARMS *et al.*, 2011).

Os resultados obtidos neste estudo, mostraram que os fungos *Pseudogymnoascus* sp. e *C. subuliforme* são capazes de degradar todos os hidrocarbonetos alcanos e aromáticos analisados. Na presença de alguns destes compostos a degradação foi total (100%), como o alcano heptano, que é linear, de cadeia curta e constituído por 7 átomos de carbono, o que pode facilitar a sua degradação completa. Realmente, de acordo com VARJANI *et al.* (2017), a eficiência na biodegradação do heptano está relacionada ao número de carbonos, tipo de cadeia e presença de anéis aromáticos, sendo que os alcanos lineares são mais facilmente biodegradados que os ramificados, e estes que os aromáticos. A degradação dos compostos aromáticos por microrganismos é considerada mais difícil porque requer mais enzimas e etapas extras. Assim, a maioria dos microrganismos prefere usar alcanos como fonte de carbono, principalmente devido ao menor tempo de adaptação e síntese de enzimas envolvidas na decomposição (VARJANI, 2017; WANG *et al.*, 2012). Os resultados obtidos com o fungo *Cladosporium subuliforme* confirmam esta tendência relatada por Varjani *et al.* (2017), pois os maiores percentuais de degradação foram na presença do alcano linear dodecano e os menores na presença dos compostos aromáticos. Entretanto, ao contrário do esperado e do obtido por *C. subuliforme*, o fungo *Pseudogymnoascus* sp. apresentou maior capacidade em degradar os compostos aromáticos (tolueno e xileno) quando comparado aos alcanos de cadeias lineares maiores, tais como os hexadecano com 16 átomos de carbono e o dodecano com 12 átomos de carbono. Apesar da presença do anel aromático, o tolueno é considerado o composto mais facilmente degradado dentre os aromáticos, e isto pode ser explicado pela presença do grupo substituinte no anel, que oferece uma rota alternativa de degradação pelos microrganismos (EL-

NASS *et al.*, 2010). Essas diferenças nos percentuais de degradação pelos dois fungos testados pode estar relacionado a capacidade de síntese das enzimas envolvidas no processo em cada espécie.

Os estudos mais recentes sobre percentuais de degradação de hidrocarbonetos com fungos filamentosos têm sido realizados com a utilização de isolados obtidos de solos contaminados com óleo em regiões de clima tropical e temperado e a eficiência de degradação difere entre as espécies testadas e entre os hidrocarbonetos utilizados. A eficiência de remoção do alcano octadecano ( $C_{18}H_{38}$ ) por *Fusarium* sp., por exemplo, foi de 89% (HIDAYAT e TACHIBANA, 2013), já o percentual de eficiência de degradação por algumas espécies de *Penicillium* sp. para o decano ( $C_{10}H_{22}$ ) foi de 49% (GOVARTHABNAN *et al.*, 2017), enquanto que para n-alcanos foi de 95% (BARNES *et al.*, 2018). O hexadecano também foi utilizado como fonte de carbono para o *Aspergillus* sp., e mostrou uma eficiência de remoção de 86% (AL-HAWASH *et al.*, 2018). Li *et al.* (2021), testaram três espécies de fungos filamentosos, *Aspergillus terreus*, *Penicillium neolegrinum* e *Trichoderma longibrachiatum* quanto a eficiência de remoção de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos, e obtiveram valores de remoção de 80, 82 e 90%, respectivamente. Apesar das diferenças obtidas, essas espécies de fungos Ascomycota apresentam a maquinaria enzimática necessária para a degradação desses compostos, podendo assim utilizá-los como fonte de carbono e energia para o seu desenvolvimento, assim como o *Pseudogymnoascus* sp. e *Cladosporium subuliforme* mostraram neste estudo.

O problema de contaminação do solo com poluentes orgânicos derivados de petróleo não é exclusivo de regiões de clima tropical e temperado, e já há contaminação desses poluentes no continente Antártico, principalmente no solo do entorno das estações de pesquisa próximos aos tanques de armazenamento do óleo diesel utilizado como fonte de energia (AISLABIE *et al.* 1999; CURTOSI *et al.* 2007; BÍCEGO *et al.* 2009; JESUS *et al.* 2015; CABRERIZO *et al.* 2016). Essa contaminação também foi observada no solo próximo à estação brasileira na Antártica em vários estudos (OLIVEIRA *et al.*, 2007; BÍCEGO *et al.*, 2009 e CURY *et al.*, 2015) que mostraram a persistência desses poluentes por pelo menos 12 anos no solo. Este tempo longo de persistência pode estar associado às baixas temperaturas da região, que reduzem a velocidade de degradação biológica destes hidrocarbonetos no ambiente natural, associado também à baixa quantidade de nutrientes do solo (VAN HAMME, 2007). Aliado a isso, os fungos aqui testados apresentaram crescimento lento, em condições *in vitro* e em baixas temperaturas, levando até 21 dias para crescerem. Isso corresponde a um tempo de 4 vezes mais lento quando comparado com fungos filamentosos em regiões tropicais (cerca de 5 dias) (KLICH, 2001), confirmando que as baixas



temperaturas interferem no crescimento e conseqüentemente no processo de degradação desses hidrocarbonetos derivados de petróleo.

A via de degradação de hidrocarbonetos alifáticos por fungos filamentosos requer a oxidação do substrato pela ação da enzima citocromo p450 monoxigenase (CHEN *et al.*, 2014; TRIPPE *et al.*, 2014). Após a oxidação de alcano a um álcool primário, outras oxidações produzem aldeídos e, finalmente, ácidos graxos. Já a via de degradação dos compostos aromáticos por fungos, principalmente dos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, vem sendo bastante investigada nos últimos anos (HARMS *et al.*, 2011; GHOSAL *et al.*, 2016; KADRI *et al.*, 2017) e três diferentes mecanismos enzimáticos para a degradação desses recalcitrantes vem sendo propostos: 1. oxidação do anel aromático pela ação da enzima citocromo p-450 monoxigenase; 2. ação oxidativa não específica de aromáticos por peroxidases extracelulares e, 3. ação oxidativa envolvendo lacases extracelulares (PRENAFETA-BOLDÚ, 2012).

Considerando a alta persistência desses poluentes em solo Antártico, faz-se necessário implementar estratégias para a sua degradação, e os processos de biorremediação usando espécies autóctones são os únicos possíveis de serem realizados naquele continente, haja vista a proibição de introdução deliberada de espécies alóctones (Tratado da Antártica, 1975). A seleção de espécies potencialmente degradadoras de hidrocarbonetos e ensaios de biorremediação são realizados majoritariamente com bactérias (LI *et al.*, 2020; ABDULRASHEED *et al.*, 2020), mas é importante ressaltar que fungos filamentosos podem apresentar algumas vantagens, quando comparados com bactérias, na biorremediação de hidrocarbonetos presentes no solo (PENG *et al.*, 2008; HARMS *et al.*, 2011 e LI *et al.*, 2020) e essas vantagens estão relacionadas às suas características fisiológicas, morfológicas e genéticas, tais como i) possuir enzimas extracelulares, além das intracelulares, ii) habilidade de penetrar no solo através das hifas, promovendo a homogeneização e aumentando a biodisponibilidade dos contaminantes e translocando os mesmos entre as diferentes partes do micélio (WICK *et al.*, 2010; FURUNO *et al.*, 2012; WORRICH *et al.*, 2016).

Mesmo que não seja considerado um estudo proteômico, os resultados obtidos de perfil protéico expresso dos fungos *Pseudogymnoascus* sp. e *C. subuliforme* quando cultivados na presença dos hidrocarbonetos (condição de estresse) e na presença da glicose (condição ótima) mostraram que algumas proteínas só foram expressas quando o fungo foi cultivado na condição de estresse. Isso pode indicar que o fungo precisa sintetizar algumas enzimas necessárias para utilizar o carbono e a energia do hidrocarboneto presente no meio de cultura e necessário para o seu crescimento. No entanto, para entender profundamente o papel das enzimas na degradação desses compostos

poluentes seria necessário a realização de estudos ômicos, que permitiriam identificar as principais enzimas responsáveis nesse processo de degradação desses hidrocarbonetos derivados de petróleo.

Apesar das dúvidas quanto às rotas metabólicas dos fungos filamentosos no processo de biodegradação desses hidrocarbonetos derivados de petróleo, as duas espécies de fungos testadas aqui se mostraram bastantes promissoras para serem utilizadas em ensaios de biorremediação *in situ* para descontaminação do solo nas proximidades da estação brasileira de pesquisa na Antártica.

### 3. CONCLUSÃO

Os fungos do Filo Ascomyta são considerados um dos mais diversos em solo antártico e os gêneros *Pseudogymnoascus*, *Cladosporium*, *Penicillium* e *Aspergillus* foram os mais abundantes em solo de rizosfera de *Deschampsia antarctica* encontrados neste estudo. A riqueza total foi de 23 espécies e houve diferenças na distribuição e população das espécies isoladas entre as amostras avaliadas.

Duas das espécies de fungos selecionadas (*Pseudogymnoascus* sp. e *Cladosporium subuliforme*) apresentaram potencial de degradação dos hidrocarbonetos tolueno, xileno, hexadecano, n-heptano e dodecano, sendo promissoras para serem utilizadas em ensaios de remediação desses contaminantes orgânicos, em solo antártico. Além disso, são espécies autóctones e totalmente adaptadas as condições extremas da Antártica.

*Cladosporium subuliforme* apresentou perfil proteico diferente no tratamento com o tolueno quando comparado com o controle. Isso indica que algumas proteínas só foram expressas quando o fungo foi submetido a uma condição de estresse. Já o fungo *Pseudogymnoascus* sp. foi diferente na maioria dos tratamentos, exceto na presença do tolueno. Isso indica que quando esse fungo é cultivado na presença do xileno, heptano, hexadecano e dodecano, as proteínas expressas são diferentes daquelas quando cultivado na presença da glicose.

## REFERÊNCIAS

- Abdulrasheed, M., Zakaria, N., Ahmad Roslee, A., Shukor, M., Zulkharnain, A., Napis, S., Ahmad, S. (2020). Biodegradation of diesel oil by cold-adapted bacterial strains of *Arthrobacter* spp. from Antarctica. *Antarctic Science*, 32(5), 341-353. doi:10.1017/S0954102020000206
- Abo-State, M. A. M.; Riad, B. Y.; Bakr, A. A.; Abdel Aziz, M. F. Biodegradation of naphthalene by *Bordetella avium* isolated from petroleum refinery wastewater in Egypt and its pathway. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 11(1). 1-9.
- Aislabie, J.; Balks, M.; Astori, N.; Stevenson, G.; Symons, R. 1999. Polycyclic aromatic hydrocarbons in fuel-oil contaminated soils, Antarctica. *Chemosphere*, 33(13). 2201-2207.
- Al-Hawash AB, Zhang J, Li S, Liu J, Ghalib HB, Zhang X, Ma F. 2018. Biodegradation of n-hexadecane by *Aspergillus* sp. RFC-1 and its mechanism. *Ecotoxicol Environ Saf* 164:398–408. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.08.049>
- Andreolli, M.; Lampis, S.; Brignoli, P.; Vallini, G. 2015. Bioaugmentation and biostimulation as strategies for the bioremediation of a burned woodland soil contaminated by toxic hydrocarbons: a comparative study. *Journal Environmental management*, 153: 121-131
- Aranda, E. 2016. Promising approaches towards biotransformation of polycyclic aromatic hydrocarbons with *Ascomycota* fungi. *Current Opinion in Biotechnology*, 38. 1-8.
- Arani L. G., Gunale V. 2010. Soil petroleum hydrocarbon bioremediation by a fungi consortium. *Environ Sci* 7(3):23–36
- Barnes, N. M.; Khodse, V. B.; Lotlikar, N. P.; Meena, R. M.; Damare, S. R. 2018. Bioremediation potential of hydrocarbon utilizing fungi from select marines niches of India. *Biotechnology*, 8:20-31. Barnes et al., 2017
- Bícego, M. C.; Zanardi-Lamardo, E.; Taniguchi, S.; Martins, C.; Silva, D. A. M.; Sasaki, S. T.; Albergaria-Barbosa, A. C. R.; Paolo, F. S.; Weber, R. R.; Montone, R. C. 2009. Results from a 15-year study on hydrocarbon concentrations in water and sediment from Admiralty Bay, King George Island, Antarctica. *Antarctic Science*, 21 (3). 209–220. doi:10.1017/S0954102009001734
- Bovio, E.; Gnani, G.; Prigione, V.; Spina, F.; Denaro, R.; Yakimov, M.; Calogero, R.; Crisafi, F.; Varese, G. C. The culturable mycobiota of a Mediterranean marine site after an oil spill: isolation, identification and potential application in bioremediation. *Science of the Total Environment*, 576 (15). 310-318.

Cabrerizo, A.; Tejedo, P.; Dachs, J.; Benayas, J. 2016. Anthropogenic and biogenic hydrocarbons in soils and vegetation from the South Shetland Islands (Antarctica). *Science of the Total Environment*, 569-570 (1). 1500-1509.

Carvalho, B. F.; Ávila, C. L. S.; Bernardes, T. F.; Pereira, M. N.; Santos, C.; Schwan, R. F. 2017. Fermentation profile and identification of lactic acid bacteria and yeasts of rehydrated corn kernell silage. *Journal of Applied Microbiology*, 122 (3), 589-600. <https://doi.org/10.1111/jam.13371>.

Cébron, A.; Beguiristain, T.; Bongoua-Devisme, J.; Denonfoux, J.; Faure, P.; Lorgeoux, C.; Ouvrard, S.; Parisot, N.; Peyret P.; Leyval, C. 2015. Impacto f clay mineral, wood sawdust or root organic matter on the bacterial and fungal community structures in two aged PAH-contaminated soils. *Environmental Science Pollutant Research*, 22, 13724-13738.

Chandra, R.; Bhargava, R. N. 2013. Bacterial degradation of synthetic and kraft lignin by axenic and mixed culture and their metabolic products. *Journal of Environmental Biology*, 34. 991-999.

Chen, W.; Lee, M. K.; Jefcoate, C.; Kim, S. C.; Chen, F.; Yu, J. H. (2014) Fungal cytochrome P450 monooxygenase: their distribution, structure, functions, family expansion, and evolutionary origin. *Genome Biology Evol* 6(7):1620-1634. *Genome Biology and Evolution*, Volume 6, Issue 7, July 2014, Pages 1620–1634, <https://doi.org/10.1093/gbe/evu132>

Curtosi, A.; Pelletier, E.; Vodopivec, C. L.; Cornack, W. P. M. 2007. Polycyclic aromatic hydrocarbons in soil and surface marine sediment near Jubany Station (Antarctica). Role of permafrost as a low-permeability barrier. *Science of the Total Environment*, 38(1-3). 193-204.

Cury, J. C.; Jurelevicius, D. A.; Vilela, H. D. M.; Jesus, H. E.; Peixoto, R. S.; Schaefer, C. E. G. R.; Bicego, M. C.; Seldin, L., Rosado, A. S. 2015. Microbial diversity and hydrocarbon depletion in low and high diesel-polluted soil samples from Keller península, South Shetland Islands. *Antarctica Science*, 27:263-273.

Elyamine, A. M.; Kan, J.; Meng, S.; Tao, P.; Wang, H.; Hu, Z. 2021. Aerobic and Anaerobic Bacterial and Fungal Degradation of Pyrene: Mechanism Pathway Including Biochemical Reaction and Catabolic Genes. *Int. Journal of Molecular Science*, 22, 8202. <https://doi.org/10.3390/ijms22158202>.

*FEMS Microbiology Ecology*, Volume 80, Issue 3, June 2012, Pages 722–734, <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2012.01344.x>

Festa, S.; Coppotelli, B. M.; Morelli, I. S. Bacterial diversity and functional interactions between bacterial strains from a phenanthrene-degrading consortium obtained from a chronically contaminated-soil. 2013. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 84. 42-51.

Furuno, S.; Foss, S.; Wild, Ed; Jones, K. C.; Semple, K. T.; Harms, H.; Wick, L. Y. 2012. Mycelia Promote Active Transport and Spatial Dispersion of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Environmental Science and Technology*, 46(10). 5463-5470. <https://doi.org/10.1021/es300810b>

Furuno, S.; Pazolt, K.; Rabe, C.; Neu, T. R.; Harms, H.; Wick, L. Y. 2010. Fungal mycelia allow chemotactic dispersal of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria in water-unsaturated systems. *Environmental Microbiology*, 12(6). 1391-1398.

Ghosal, D.; Ghosh, S.; Dutta, T. K.; Ahn, Y. (2016) Current state of knowledge in microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. *Frontiers in Microbiology* 7:1369. *Front. Microbiol.*, 31 August 2016 | <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01369>

Goicoechea, E.; Guillén, M. D. 2014. Volatile compounds generated in corn oil stored at room temperature. Presence of toxic compounds. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 116(4). 395-406. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201300244>

Govarthanan M, Fuzisawa S, Hosogai T, Chang Y-C. 2017. Biodegradation of aliphatic and aromatic hydrocarbons using the filamentous fungus *Penicillium* sp. CHY-2 and characterization of its manganese peroxidase activity. *RSC Adv* 7(34):20716–20723. <https://doi.org/10.1039/C6RA28687A>.

Haritash, A. K.; Kaushiki, C. P. 2009. Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbon: a review. *Journal of Hazardous Materials*, 169: 1-15.

Harms, H.; Schlosser, D.; Wick, L. Y. (2011) Untapped potential: exploiting fungi in biorremediation of hazardous chemicals. *Nat Rev Microbiol* 9(3):177-192.

Hidayat A, Tachibana S. 2013. Crude oil and n-octadecane degradation under saline conditions by *Fusarium* sp., F092. *J Environ Sci Technol* 6(1). 29–40.

Kadri, T.; Rouissi, T.; Kaur Brar, S.; Cledon, M.; Sarma, S.; Verma, M. (2017) Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by fungal enzymes: a review. *Journal Environmental Science* 51:52-74.

- Krauss, G. J.; Solé, M.; Krauss, G.; Schlosser, D.; Wesenberg, D. Barlocher, F. 2011. Fungi in freshwaters: ecology, physiology and biochemical potential. *FEMS Microbiology Review*. 35: 620-651.
- Li, H.; Li, Y.; Bao, M.; Li, Shudong. 2021. Solid inoculants as a practice for bioaugmentation to enhance bioremediation of hydrocarbon contaminated áreas. *Chemosphere*, 263. 128-175. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128175>
- Li, O.; Liu, J.; Gadd, G. M. 2020. Fungal bioremediation of soil co-contaminated with petroleum hydrocarbons and toxic metals. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104. 8999–9008.
- Ling, J.; Zhang, Y.; Wu, M.; Wang, Y.; Dong, J.; Jiang, Y.; Yang, Q.; Zeng, S. 2015. Fungal community successions in rhizosphere sediment of seagrasses *Enhalus acoroides* under PAHs stress. *International Journal of Molecular Science*. 2015, 16: 14039.
- Mandal, S. K.; Das, N. 2018. Biodegradation of perylene and benzo [ghi] perylene (5-6 rings) using yeast consortium : Kinetic study, enzyme analysis and degradation pathway. *Journal of Environmental Biology*, 39(1). 5-15. DOI:10.22438/jeb/39/1/MRN-540
- Miura, A.; Urabe, J. 2015. Spatial and seasonal changes in species diversity of epilithic fungi along environmental gradients of a river. *Freshwater Biology*, 60: 673-685.
- Passarini, M. R. Z.; Rodrigues, M. V. N.; Silva, M.; Sette, L. D. 2011. Marine-derived filamentous fungi and their potential application for polycyclic aromatic hydrocarbon bioremediation. *Marine Pollution Bulletin*, 62(2). 364-370.
- Perelo, L. W. 2010. Review: In situ and bioremediation of organic pollutants in aquatic sediments. *Journal of Hazardous Materials*, 177(1-3). 81-89. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.12.090>
- Premnath, N.; Mohanrasu, K.; Guru R. R.; Dinesh, G. H.; Prakash, G. S.; Ananthi. K. P.; Muthusamy, G.; Arun, A. 2021. A crucial review on polycyclic aromatic Hydrocarbons – Environmental occurrence and strategies for microbial degradation. *Chemosphere* , 280. 130608. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.130608>.
- Prenafeta-Boldú, F. X.; Guivernau, M.; Gallastegui, G.; Viñas, M.; de Hoog, G. S.; Elías, A. (2012). Fungal / bacterial interactions during the biodegradation of TEX hydrocarbons (toluene, ethylbenzene and p-xylene) in gas biofilters operated under xerophilic conditions. *FEMS Microbiol Ecol* 80 (3): 722-734.

Ramdass, A. C.; Rampersad, S. N. 2021. Diversity and Oil Degradation Potential of Culturable Microbes Isolated from Chronically Contaminated Soils in Trinidad. *Microorganisms*, 9, 1167. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9061167>.

Ri-He Peng, Ai-Sheng Xiong, Yong Xue, Xiao-Yan Fu, Feng Gao, Wei Zhao, Yong-Sheng Tian, Quan-Hong Yao, Microbial biodegradation of polyaromatic hydrocarbons, *FEMS Microbiology Reviews*, Volume 32, Issue 6, November 2008, Pages 927–955, <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00127.x>

Rivilla, P. C.; Aleu, J.; Collado, I. G. 2009. Pollutants Biodegradation by Fungi. *Current Organic Chemistry*, 13 (12). 1194-1214.

Trippe, K. M.; Wolpert, T. J.; Hyman, M. R.; Ciuffetti, L. M. (2014) RNAi silencing of a cytochrome P450 monooxygenase disrupts the ability of a filamentous fungi, *Graphium* sp., to grow on short-chain gaseous alkanes and ethers. *Biodegradation* 25(1): 137-151.

Van Hamme, J.; Singh, A.; Ward, O. P. 2003. Recent Advances in Petroleum Microbiology. *Microbiology Molecular Biological Review*. 67(4): 503–549. doi: [10.1128/MMBR.67.4.503-549.2003](https://doi.org/10.1128/MMBR.67.4.503-549.2003)

Varjani, S. J.; Rana, D. P.; Jain, A. K.; Bateja, S.; Upasani, V. N. 2015. Synergistic ex-situ biodegradation of crude oil by halotolerant bacterial consortium of indigenous strains isolated from on shore sites of Gujarat, India. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 103, 116 -124.

Varjani, S. J.; Upasani, V. N. 2016. Biodegradation of petroleum hydrocarbons by oleophilic strain of *Pseudomonas aeruginosa* NCIM 5514. *Bioresource Technology*, 222 : 195–201

Vila, J.; Tauler, M.; Grifoll, M. 2015. Bacterial PAHx degradation in marine and terrestrial habitats. *Current Opinion Biotechnology*, 33, 95-102.

Worrich A, Wick LY, Banitz T (2018) Ecology of contaminant biotransformation in the mycosphere: role of transport processes. *Adv Appl Microbiol* 104:93–133

Wu, M.; Dick, W. A.; Li, W.; Wang, X.; Yang, Q.; Wang, T.; Xu, L.; Zhang, M.; Chen, L. 2016. Bioaugmentation and biostimulation of hydrocarbon degradation and the microbial community in a petroleum-contaminated soil. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 107: 158-164.

Zakaria, N. N.; Roslee, A. F. A.; Gomez-Fuentes, C.; Zulkharnain, A.; Abdulrasheed, M.; Sabri, S.; Ramírez-Moreno, N.; Calisto-Ulloa, N.; Ahmad, S. A. Kinetic studies of marine psychrotolerant

microorganisms capable of degrading diesel in the presence of heavy metals. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 19(3). 1375-1388. <https://doi.org/10.24275/rmiq/Bio1072>.

Zhang, T.; Gannon, S. M.; Nevin, K. P.; Franks, A. E.; Lovley, D. R. 2010. Stimulating the anaerobic degradation of aromatic hydrocarbons in contaminated sediments by providing an electrode as the electron acceptor. *Environmental Microbiology*, 12(4). 1011-1020. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.02145.x>

### **Agradecimentos**

Os autores gostariam de agradecer ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia Antártico de Pesquisas Ambientais (INCT-APA), Programa Antártico Brasileiro (PROANTAR) e as agências brasileiras de fomento: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Brasil (CNPQ), Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro para a realização dessa pesquisa.