



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



Ciências Biológicas

GABRIELE SANTANA DE FARIAS

**LEVEDURAS ANTÁRTICAS: AVALIAÇÃO DE
RESISTÊNCIA A CONDIÇÕES EXTREMAS**

Rio Claro

2018

A decorative graphic in the bottom right corner of the page, consisting of a light blue and white geometric pattern of overlapping triangles and lines, resembling a stylized globe or a network structure.

GABRIELE SANTANA DE FARIAS

LEVEDURAS ANTÁRTICAS
AVALIAÇÃO DE RESISTÊNCIA A CONDIÇÕES EXTREMAS

Orientador: Lara Durães Sette

Co-orientador: Juliana Aparecida dos Santos

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Câmpus de Rio Claro, para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Rio Claro

2018

F2241 Farias, Gabriele Santana de
Leveduras Antárticas : Avaliação de resistência a condições extremas / Gabriele Santana de Farias. -- Rio Claro, 2018
29 p. : il., tabs., fotos

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro
Orientadora: Lara Durães Sette
Coorientadora: Juliana Aparecida dos Santos

1. Antártica. 2. Extremófilos. 3. Leveduras. 4. Resistência. I.
Título.

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

Essa ficha não pode ser modificada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha mãe, Marilene, por ser uma mulher extraordinária e um exemplo que tento seguir todos os dias. Ao meu pai, Marcelino, pela confiança, paciência e patrocínio nesses longos anos de graduação.

Agradeço à minha orientadora, Prof^a Dr^a Lara Durães Sette pela oportunidade no LAMAI e os aprendizados que vieram junto. À minha co-orientadora, Juliana Santos, pelas ajudas de última hora e por me apresentar à astrobiologia. A todos os colegas de laboratório, pelas conversas, conselhos e risadas no meio do caminho.

Agradeço aos amigos que estiveram por perto e compartilharam desses anos árduos de faculdade: Tamiris, obrigada pelos conselhos e o estado de eterno sono compartilhado; Luana, obrigada pelas risadas e pelos gatinhos; Trentin, obrigada por ter continuado por perto e todos os memes apresentados; Álvaro, obrigada por compartilhar o desespero que a microbiologia causa; João, obrigada por todas as ajudas em provas do Bertini e por ter paciência eterna com a gente; Gabi, obrigada por estar sempre do meu lado, mesmo eu sendo bem difícil de lidar; Breno, obrigada pela companhia, pelas (muitas) horas de UV e todo o resto. E também aos amigos que mesmo longe, sempre ajudaram a recarregar as energias e enfrentar os imprevistos da melhor maneira possível: Sthefani, Maycon e Letícia, vocês são incríveis.

RESUMO

A Antártica é marcada pela predominância de características extremas tais como clima, habitats e biogeografia. A vida presente no continente é singular devido às condições a que estão expostas e sob as quais os organismos tiveram que se adaptar, desenvolvendo mecanismos que refletem todas as adversidades presentes no ambiente. Leveduras extremófilas, como as encontradas na região Antártica, possuem adaptações às baixas temperaturas, à radiação ultravioleta (que tem maior incidência nessa região comparado aos outros continentes) e à alta salinidade do mar (no caso das leveduras presentes no ambiente marinho). Algumas das leveduras estudadas já são conhecidas por sintetizarem enzimas de interesse industrial, o que faz o estudo mais aprofundado de seu comportamento em situações adversas imprescindível para averiguar novas adaptações de interesse biotecnológico. O presente trabalho é parte dos projetos FAPESP 2016/07957-7 e PROANTAR/CNPq MICROSFERA e tem como objetivo principal conhecer a resistência de leveduras isoladas a partir de amostras de solo e substrato marinho coletadas na Ilha Rei George, à radiação ultravioleta (UV-A, UV-B e UV-C), diferentes temperaturas, diferentes pH, estresse nutricional e diferentes salinidades. A condução do presente estudo revelou o potencial das leveduras da Antártica quanto à resistência a diferentes condições extremas, sendo a levedura *Naganishia* sp., proveniente de solo de Yellow Point, a que apresentou os melhores resultados no geral.

Palavras-chave: Antártica, extremófilos, leveduras, resistência.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Locais de coleta das amostras utilizadas no isolamento das leveduras estudadas (Baia do Almirantado): 1) sedimento marinho na frente da Estação Antártica Comandante Ferraz e, 2) solos do Yellow Point (Fonte: adaptado de Simões et al., 2004).	9
Figura 2 – <i>Naganishia</i> sp. no ensaio de exposição à radiação ultravioleta A. A: controle, sem exposição; B: 5 min de exposição; C: 15 min de exposição; D: 30 min de exposição; E: 60 min de exposição. Incubação à 15°C por 7 dias.	15
Figura 3 - Porcentagens de sobrevivência em cada um dos períodos testados: 15 min, 30 min, 60 min após 7 dias de incubação à 15°C.	15
Figura 4 – <i>Leucosporidium</i> sp. após exposição à radiação ultravioleta B. A: controle, sem exposição; B: 5 min de exposição; C: 15 min de exposição; D: 30 min de exposição; E: 60 min de exposição. Incubação à 15°C por 7 dias.	16
Figura 5 – <i>Cryptococcus gastricus</i> após exposição à radiação ultravioleta B. A: controle, sem exposição; B: 5 min de exposição; C: 15 min de exposição; D: 30 min de exposição; E: 60 min de exposição. Incubação à 15°C por 7 dias.	16
Figura 6 - Porcentagem de sobrevivência em relação ao tempo de exposição à radiação ultravioleta C após 7 dias de incubação à 15°C.	17
Figura 7 - Espécie <i>Holtermanniella wattica</i> exposta à radiação UV-C. A: controle, sem exposição; B: 5 min de exposição; C: 15 min de exposição; D: 30 min de exposição; E: 60 min de exposição. Incubação à 15°C por 7 dias.	17
Figura 8 - <i>Cryptococcus gastricus</i> após exposição à radiação ultravioleta C. A: controle, sem exposição; B: 5 min de exposição; C: 15 min de exposição; D: 30 min de exposição; E: 60 min de exposição. Incubação à 15°C por 7 dias.	17
Figura 9 - <i>Naganishia</i> sp. em meio de cultura com diferentes concentrações de NaCl. A: controle, sem adição de cloreto de sódio; B: 2% NaCl; C: 5% NaCl; D: 7% NaCl; E: 10% NaCl. Incubação à 15°C por 7 dias.	18
Figura 10 - <i>Naganishia</i> sp. em meio de cultura com diferentes concentrações de glicose. A: meio YMA de controle; B: Czapek's Dox 0% glicose; C: Czapek's Dox 0,5% glicose; D: Czapek's Dox 1,5% glicose; E: Czapek's Dox 2% glicose. Incubação à 15°C por 7 dias.....	18
Figura 11 - <i>Naganishia</i> sp. incubada em diferentes temperaturas. A: 5°C; B: 10°C; C: 15°C; D: 25°C; E: 35°C. Incubação à 15°C por 7 dias.	19
Figura 12 - Média da biomassa em gramas produzida em cada um dos valores de pH analisados após 7 dias de incubação a 15°C sob agitação de 120 rpm.	20
Figura 13 - Os pH de preferência das diversas leveduras estudadas após 7 dias de incubação a 15°C sob agitação de 120 rpm	20
Figura 14 - Diferença de quantidade de biomassa produzida por cada uma das leveduras em 7 dias de experimento em incubadora a 15°C sob agitação de 120 rpm. <i>Naganishia</i> sp., <i>Leucosporidium</i> sp., <i>Metschnikowia australis</i> e <i>Cryptococcus gastricus</i> incubadas em meio com pH 7 e <i>Goffeauzyma gilvescens</i> em meio de cultura com pH 9.	21

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Parâmetros físico-químicos dos solos onde as amostras foram coletadas (* em ppm) (valores em mg.L-1) (YPA: Yellow Point solo amarelado; YPM: Yellow Point solo marrom; CDB Al e Fe: quantidades de Al e Fe extraídas pelo método CDB; Ox. Al e Fe: : quantidades de Al e Fe extraídas pelo método do oxalato de amônia; Piro Al e Fe: quantidades de Al e Fe extraídas pelo método do pirofosfato; TC: teor de carbono total). (Fonte: adaptado de Inforsato (2017) e Wentzel (2017)) 12

Tabela 2 - Leveduras estudadas e seus respectivos locais de coleta. Solo de Yellow point, amarelado e marrom, e sedimento marinho do ponto próximo à Estação Antártica Comandante Ferraz (EACF), Botany Point (BP) e Punta Ullman (PU). (Fonte: adaptado de Inforsato (2017) e Wentzel (2017))..... 12

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	7
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	7
2.1 Antártica: características e diversidade	7
2.2 Ilha Rei George: Baía do Almirantado	8
2.3 Leveduras provenientes de sedimento marinho	10
2.4 Resistência de leveduras à radiação ultravioleta	10
3. OBJETIVOS	11
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	12
4.1 Leveduras antárticas	12
4.2 Padronização das leveduras.....	13
4.3 Ensaio de resistência à radiação UV-A, UV-B e UV-C	13
4.4 Ensaio de resistência à salinidade	13
4.5 Ensaio de resistência a pH	13
4.6 Estresse nutricional	14
4.7 Ensaio de resistência à temperatura.....	14
5. RESULTADOS	14
5.1 Ensaio radiação ultravioleta	14
5.1.1 Radiação ultravioleta A.....	14
5.2 Radiação ultravioleta B.....	15
5.2.1 Radiação ultravioleta C.....	16
5.3 Salinidade.....	17
5.4 Estresse nutricional	18
5.5 Temperatura	19
5.6 pH ideal	19
6. DISCUSSÃO	21
7. CONCLUSÕES	25
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25

1. Introdução

A Antártica possui condições ambientais extremas que condicionam os organismos a buscarem adaptações que os tornem capazes de ocupar o nicho vazio que o continente representa. Qualquer tipo de vida, desde as microscópicas até as formas mais complexas, precisa aprender a lidar com as adversidades que este continente apresenta, incluindo, entre outras, o extremo de temperaturas negativas, aridez, alto teor de radiação ultravioleta proveniente do sol, que é mais acentuada nessa parte do globo devido ao estreitamento da camada de ozônio.

Neste contexto, o grupo de pesquisa coordenado pela Profa. Dra. Lara D. Sette tem focado seus estudos no isolamento, preservação, seleção e identificação taxonômica de micro-organismos derivados de ambientes antárticos visando obtenção de enzimas com aplicação biotecnológica na área industrial e ambiental. Os resultados derivados dos projetos de pesquisa fomentados pela Fapesp (2010/17033-0, 2013/19486-0 e 2016/07957-7) vêm demonstrando o potencial biotecnológico de fungos recuperados a partir de amostras da Antártica e têm estimulado a continuidade e o desenvolvimento de novos estudos.

O presente trabalho tem como objetivo avaliar a resistência de leveduras antárticas à diversas condições de estresse, tais como: temperaturas mais altas do que as encontradas no hábitat natural, alta salinidade, exposição prolongada à radiação UV, crescimento em condições oligotróficas e a ciclos de congelamento e descongelamento. A busca por micro-organismos extremófilos da Antártica pode representar uma estratégia para encontrar novas rotas metabólicas em eucariotos, e conseqüentemente, novos compostos naturais de interesse biotecnológico.

2. Revisão bibliográfica

2.1 Antártica: características e diversidade

O continente Antártico encontra-se isolado dos demais continentes por correntes oceanográficas e pela distância, sendo caracterizado por extremos de clima, hábitats e biogeografia. Os ecossistemas antárticos apresentam algumas características determinantes como o ar seco, escassez de nutrientes, alta taxa de ventos, altos índices de radiação ultravioleta e baixas temperaturas (TURNER et al, 2009).

A Antártica é dividida em três regiões: a Antártica continental, a Antártica marítima e a zona subantártica. A Antártica continental é a que apresenta as maiores

altitudes e as menores temperaturas já registradas na Terra, com condições extremas para as formas de vida presentes nesse local. Devido à superfície branca coberta de gelo e a atmosfera sem nuvens, com pouco vapor d'água, grande parte da radiação solar é refletida de volta ao espaço, o que auxilia na manutenção das baixas temperaturas (TURNER et al, 2009). A região marítima, abrange a península Antártica e ilhas vizinhas, incluindo o arquipélago das ilhas Shetland do Sul, possui clima mais ameno do que o apresentando na região continental, com mais chuvas. A zona subantártica é representada pelas ilhas mais dispersas no oceano, onde o inverno é menos rígido (BÖLTER; BAYER; STONEHOUSE, 2002).

O solo da região Antártica possui uma relativa abundância de vida microbiana, apesar do extremo estresse ambiental, principalmente devido ao congelamento e à dessecação. Na Ilha Rei George, as comunidades microbianas mostram variabilidade nas propriedades fisiológicas e metabólicas, como adaptações às condições difíceis do solo e proteção contra a radiação UV (BÖLTER, 2011).

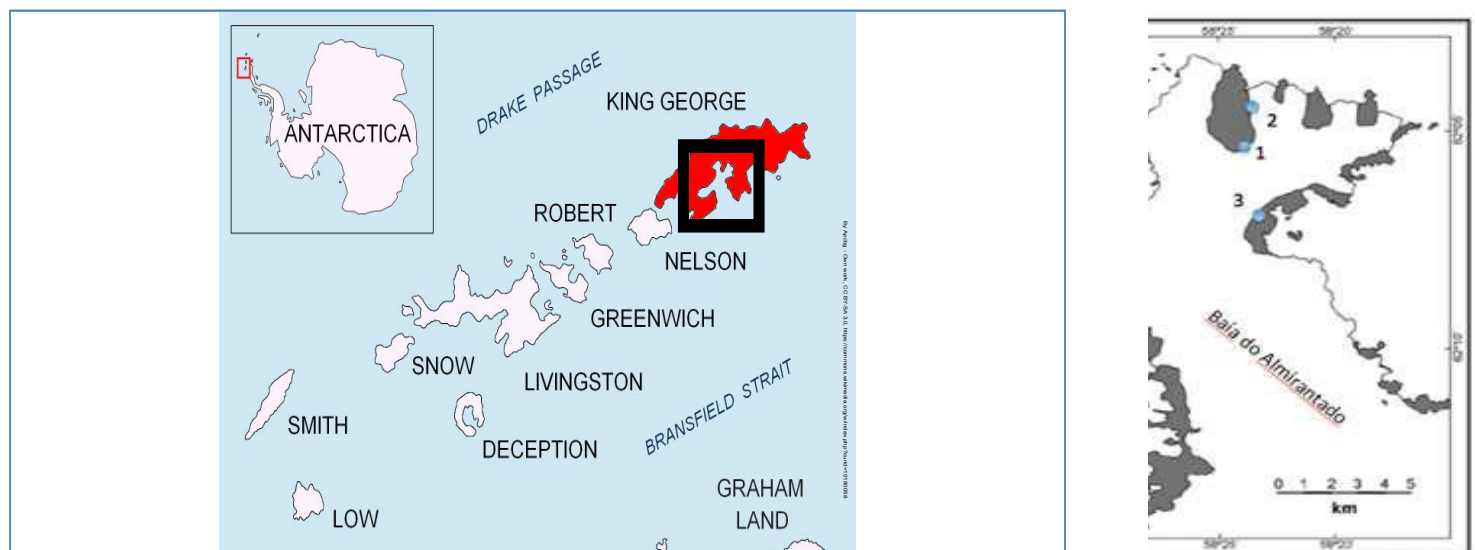
De acordo com Ruisi et al. (2007) os micro-organismos que habitam os ecossistemas da Antártica são classificados como psicrófilos, psicrotolerantes e mesofílicos-psicrotolerantes. Os psicrófilos são aqueles capazes de crescer a 0°C, possuem ótimo crescimento a $\leq 15^{\circ}\text{C}$ e temperatura máxima de crescimento $\leq 20^{\circ}\text{C}$. Os psicrotolerantes (ou psicrotróficos) são aqueles que podem crescer a 0°C e cuja máxima temperatura de crescimento pode estar acima de 20°C, sendo a temperatura ótima >15.0 e $\leq 25^{\circ}\text{C}$. Os micro-organismos mesofílicos-psicrotolerantes possuem habilidade de crescer a baixas temperaturas com ótima temperatura de crescimento >25.0 e $\leq 40^{\circ}\text{C}$. A maioria dos micro-organismos recuperados de amostras da região da península Antártica são psicrotolerantes (ONOFRI et al., 2007) e essa predominância pode ser explicada pelo fato de que em alguns períodos do ano a temperatura do solo pode chegar a 15°C (MÖLLER e DREYFUSS, 1996).

2.2 Ilha Rei George: Baía do Almirantado

A Ilha Rei George, a maior das ilhas Shetland do Sul, está 130 km a noroeste na Península Antártica e, na sua parte central, encontra-se a Baía do Almirantado onde está situada a estação Antártica Comandante Ferraz (EACF) e o Yellow Point (Figura 1), locais de coleta dos substratos de onde as das leveduras utilizadas no presente estudo foram isoladas. As temperaturas mais altas registradas no continente Antártico são encontradas na Península Antártica, provenientes dos ventos noroeste

que elevam a temperatura acima do ponto de congelamento, mantendo-as positivas por 2 a 4 meses do ano (TURNER et al., 2009). Devido à sua localização mais ao norte do arquipélago, a Ilha Rei George é dominada por ventos oeste e rápidas sucessões de sistemas de baixa pressão, os quais transportam ar quente e úmido para a costa, o que resulta em uma grande sensibilidade das camadas de gelo a mudanças bruscas de temperatura (KNAP; OERLEMANS; CADÉE, 1996).

Figura 1 - Locais de coleta das amostras utilizadas no isolamento das leveduras estudadas (Baia do Almirantado): 1) sedimento marinho na frente da Estação Antártica Comandante Ferraz e, 2) solos do Yellow Point (Fonte: adaptado de Simões et al., 2004).



Essas mudanças bruscas de temperatura podem resultar em efeito direto no ciclo de vida de micro-organismos que habitam o solo, como também em um efeito indireto, afetando a vegetação e a camada de gelo que protegem a microbiota do solo. Segundo Yergeau e Kowalchuk (2008), ciclos de congelamento e descongelamento levaram a mudanças na estrutura e no tamanho a nível molecular da comunidade de fungos de solo antártico, assim como na atividade enzimática, enquanto diferenças graduais de temperatura de incubação não apresentaram mudanças semelhantes. Para conseguirem sobreviver às condições extremas, esses micro-organismos precisam de mecanismos como proteínas anticongelamento, composição diferente da membrana plasmática, enzimas com atividades em temperaturas diversas e agentes crioprotetores (ROBINSON, 2001).

2.3 Leveduras provenientes de sedimento marinho

Além das já citadas adaptações às temperaturas extremas do continente antártico, leveduras que são isoladas em sedimento marinho nessa região precisam desenvolver mecanismos para lidar com o alto teor de sal desse hábitat, o que pode torná-las capazes de sintetizar biomoléculas com funções de interesse científico e tecnológico (CONNELL et al, 2008). A união de todos esses fatores resulta em microorganismos com características únicas, as quais os tornam capazes de sobreviver nesse ambiente extremo (VAZ et al., 2011).

Em estudos realizados por Inforsato (2017), 16 leveduras isoladas de sedimento marinho antártico apresentaram atividade a enzima lipase em meio de cultura líquido, sendo a espécie *Metschnikowia australis* a que obteve melhores resultados.

Além disso, as espécies *Rhodotorula muscorum* e *Mrakia frigida*, provenientes de sedimento marinho antártico, apresentaram atividade proteolítica (INFORSATO, 2017), algo de grande interesse industrial, pois as proteases correspondem a 60%-65% do comércio mundial de enzimas, podendo ser usadas nos ramos de limpeza, alimentício, tratamento de resíduos e farmacêutico (COTARLET et al., 2011; MURI, 2014; SANTOS et al., 2013).

2.4 Resistência de leveduras à radiação ultravioleta

A radiação ultravioleta chega à superfície terrestre com intensidades diferentes, dependendo de uma série de fatores, incluindo a densidade da camada de ozônio, períodos do dia e do ano. No caso do continente Antártico, a camada de ozônio é o agente principal a ser considerado. O ozônio da atmosfera absorve os comprimentos de luz correspondentes às radiações ultravioletas, no entanto, devido à dispersão de substâncias e químicos no ar, essa camada tornou-se mais fina ao longo dos anos (NARAYANAN; SALADI; FOX, 2010). Farman et al. (1985) foram os primeiros a publicarem observações referentes à perda de ozônio na atmosfera da Antártica. Desde então, o continente antártico apresenta um “furo” na camada: uma região onde os níveis de ozônio caem abaixo de 200 Dobson, unidade tradicional de medida de ozônio estratosférico (SIVASAKTHIVEL; REDDY, 2011). Como resultado, a taxa de radiação na Antártica é muito maior do que em qualquer outro continente do globo terrestre.

No estudo realizado por Pulschen et al. (2015), leveduras identificadas como *Exophiala* sp., *Cryptococcus friedmannii*, *Holtermanniella watticus* e *Rhodospodium toruloides* coletadas do deserto do Atacama (Chile) em locais onde as temperaturas encontravam-se abaixo do ponto de congelamento, mostraram uma alta resistência às radiações UV-B e UV-C. Essa resistência é atribuída a um conjunto de fatores, tais como: presença de pigmentos, moléculas fotoprotetoras e mecanismos de foto-reativação, que ajudam a reparar os danos no DNA causados pela radiação.

Do espectro de luz solar, o intervalo entre UV-B e UV-C é o mais relevante quando se trata de danos aos sistemas biológicos, podendo causar dano direto às células e alterações nas funções imunológicas, incluindo danos ao DNA, mutações gênicas, imunossupressão, estresse oxidativo e respostas inflamatórias (NARAYANAN; SALADI; FOX, 2010). As radiações ultravioletas B e C, mesmo aparecendo com uma frequência menor que a UV-A, são de extrema importância devido aos danos que podem causar ao material genético das células: induzem a síntese de dímeros de ciclobutano pirimidinas e pirimidina-pirimidinas, que levam a uma quebra do DNA devido a um sistema de reparo ineficiente. A radiação UV-C, além dos danos causados ao DNA, leva a formação de espécies reativas de oxigênio, provocando a morte celular por outros mecanismos, como má formação de lipídios e proteínas essenciais às atividades normais da célula (DOUKI; ZALIZNIAK; CADET, 1997; SANTOS et al, 2012).

Desta forma, destacamos a importância de estudos para uma melhor compreensão dos micro-organismos adaptados às condições extremas, podendo assim auxiliar no desenho de novas estratégias de isolamento de linhagens com propriedades únicas e no desenvolvimento de produtos que visem a proteção contra à radiação UV ou ainda encontrar aplicações em áreas como a medicina, incluindo estudos que visam o aperfeiçoamento de terapias oncológicas a partir dos processos de reparo celular frente aos altos índices de radiação UV.

3. Objetivos

O presente projeto teve como objetivo avaliar leveduras provenientes de solo e sedimento marinho da Antártica quanto à resistência aos seguintes fatores: temperatura, escassez de nutrientes, pH, salinidade e radiação UV-A, UV-B e UV-C.

4. Material e métodos

4.1 Leveduras antárticas

As leveduras estudadas no presente projeto são provenientes de amostras de solos e sedimento marinho da região da Baía do Almirantado (Ilha Rei George, Antártica). As amostras de dois tipos diferentes de solo (marrom e amarelo) da região de Yellow Point e também as amostras sedimento marinho (Tabela 1) foram coletadas em janeiro de 2015 pela Profa. Dra. Lara Sette durante a fase IV da OPERANTAR XXXIII. O presente estudo foi realizado com 5 táxons distintos de leveduras isoladas de solos e 3 de sedimento marinho da Antártica (Tabela 2). Para alguns dos táxons estudados foram utilizados mais de um representante, totalizando 14 leveduras. Os isolados foram cultivados em placas de Petri contendo meio de cultura *Yeast Media Agar* (YMA) por um período de 7 a 14 dias em uma incubadora *Biochemical Oxygen Demand* (BOD) à 15°C.

Tabela 1 - Parâmetros físico-químicos dos solos onde as amostras foram coletadas (* em ppm) (valores em mg.L-1) (YPA: Yellow Point solo amarelado; YPM: Yellow Point solo marrom; CDB Al e Fe: quantidades de Al e Fe extraídas pelo método CDB; Ox. Al e Fe: : quantidades de Al e Fe extraídas pelo método do oxalato de amônia; Piro Al e Fe: quantidades de Al e Fe extraídas pelo método do pirofosfato; TC: teor de carbono total). (Fonte: adaptado de Inforsato (2017) e Wentzel (2017))

Amostra	pH	CBD Al	Ox. Al	CBD Fe	Ox Fe	Piro Al	Piro Fe	TC (%)
YPA	4,48	320,29	244,22	175,51	141,97	4,21	2,54	0,06556
YPM	8,10	153,05	60,61	91,74	44,76	1,35	0,80	0,07421
EACF	7,62	96,67*	160,59*	55,92*	99,86*	3,26*	1,93*	0,62205

Tabela 2 - Leveduras estudadas e seus respectivos locais de coleta. Solo de Yellow point, amarelado e marrom, e sedimento marinho do ponto próximo à Estação Antártica Comandante Ferraz (EACF), Botany Point (BP) e Punta Ullman (PU). (Fonte: adaptado de Inforsato (2017) e Wentzel (2017))

Espécie	Local de coleta
<i>Naganishia</i> sp.	Solo amarelado - Yellow Point
<i>Leucosporidium</i> sp.	Solo marrom - Yellow Point
<i>Holtermanniella wattica</i>	Solo marrom - Yellow Point
<i>Goffeauzyma gilvescens</i>	Solo amarelado - Yellow Point
<i>Goffeauzyma gastrica</i>	Solo marrom - Yellow Point
<i>Cryptococcus gastricus</i>	Sedimento Marinho – PU
<i>Metschnikowia australis</i>	Sedimento Marinho – EACF
<i>Mrakia frigida</i>	Sedimento Marinho – EACF

As leveduras utilizadas no presente estudo encontram-se preservadas por ultracongelamento a -80°C (10% glicerol) na coleção de pesquisa do Laboratório de Micologia Ambiental e Industrial (LAMAI) a qual está associada à Central de Recursos Microbianos da UNESP (CRM-UNESP).

4.2 Padronização das leveduras

Os isolados foram cultivados em meio de cultura *Yeast Media Broth* (YMB) em incubadora com agitação (120 rpm) a 15°C por 7 dias e, posteriormente, foi realizada a padronização do inóculo por meio de contagem de células utilizando a câmara de Neubauer. A concentração final utilizada foi de 10^7 UFC.mL⁻¹ para todas as leveduras. Essa padronização foi utilizada nos ensaios a seguir.

4.3 Ensaios de resistência à radiação UV-A, UV-B e UV-C

A partir da padronização, foram retiradas alíquotas de 0,1 mL que foram inoculadas em placas de Petri contendo meio YMA e, em seguida, expostas à radiação UV por 5, 15, 30 e 60 min. Primeiramente foi feita exposição à radiação UV-B (320–280 nm) e, posteriormente, à radiação UV-A (400 – 320 nm) e UV-C (280 - 100 nm). Após o período de exposição, as placas foram incubadas em BOD à 15°C . Nos dias 7 e 14, foram tiradas fotos das placas para acompanhar o crescimento das leveduras.

4.4 Ensaios de resistência à salinidade

Foram preparados meios de cultura YMA modificados com adição de cloreto de sódio (NaCl) nas concentrações de 3%, 5%, 7% e 10%. A partir da padronização, foram retiradas alíquotas de 0,1 mL que foram inoculadas em placas de Petri com o meio YMA modificado com NaCl e incubadas em BOD à 15°C . Cada uma das concentrações foi feita em triplicata e avaliadas após 7 e 14 dias de incubação.

4.5 Ensaios de resistência a pH

Tubos tipo Falcon permaneceram em estufa à 100°C por 24 horas e, após isso, foram pesados, sendo suas massas anotadas para posterior utilização. A partir da padronização, foram retiradas alíquotas de 0,1 mL que foram inoculadas em Erlenmeyers contendo 50 mL de meio de cultura YMB com pH 3, 5, 7 e 9 e incubadas sob agitação de 120 rpm à 15°C por 7 dias. Após esse período, o meio de cultura líquido com os inóculos foi transferido para os tubos Falcon anteriormente pesados e

foram centrifugados à 10000 rpm por 15 min. O sobrenadante foi dispensado e os tubos Falcon junto com o pellet voltaram para a estufa a 100°C por mais 24h. Após isso, os Falcons foram novamente pesados e, para definir a massa seca das leveduras, foi feita a subtração do valor do Falcon vazio do do valor do Falcon junto com a biomassa.

4.6 Estresse nutricional

A partir da padronização por contagem de células em câmara de Neubauer, foram retiradas alíquotas de 0,1 mL que foram inoculadas em placas de Petri com meio de cultura ágar Czapek Dox modificado com concentrações de glicose de 2%, 1%, 0,5% e 0% e em meio de cultura YMA que serviu como controle. Cada concentração foi testada em triplicata. As placas foram incubadas em BOD à 15°C e avaliadas após 7 e 14 dias de incubação.

4.7 Ensaio de resistência à temperatura

A partir da padronização por contagem de células em câmara de Neubauer, alíquotas de 0,1 mL foram inoculadas em placas de Petri com meio de cultura YMA e, posteriormente, as placas foram incubadas em BOD com diferentes temperaturas: 25°C, 35°C e 45°C por 14 dias. A temperatura de controle foi de 15°C. Cada temperatura foi testada em triplicata para cada uma das leveduras. A análise foi realizada após 7 e 14 dias de incubação.

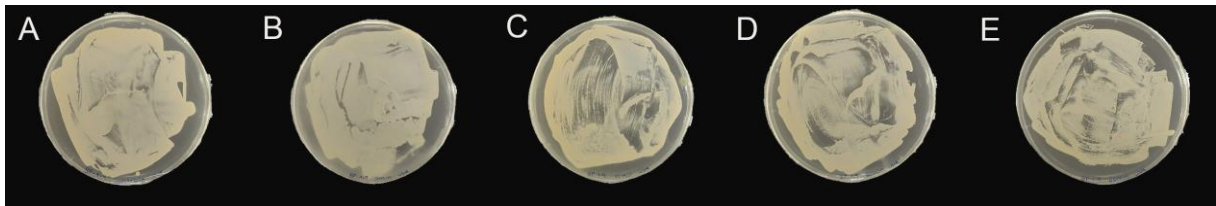
5. Resultados

5.1 Ensaio radiação ultravioleta

5.1.1 Radiação ultravioleta A

Todas as leveduras testadas apresentaram resistência à radiação ultravioleta A, sem diminuição na quantidade de colônias formadas comparando-se com a placa de controle, que não foi exposta a nenhum tipo de radiação, mesmo após o período máximo de exposição de 60 min (Figura 2).

Figura 2 – *Naganishia* sp. no ensaio de exposição à radiação ultravioleta A. A: controle, sem exposição; B: 5 min de exposição; C: 15 min de exposição; D: 30 min de exposição; E: 60 min de exposição. Incubação à 15°C por 7 dias.



Fonte: Autora.

5.2 Radiação ultravioleta B

Do total de 12 leveduras analisadas, 83% mostrou-se resistente a pelo menos 15 min de exposição à radiação UV-B. Entre elas, 41% continuou apresentando crescimento de colônias mesmo após o tempo máximo de 60 min (Figura 3). Entre os táxons testados, *Leucosporidium* sp. (isolada de amostra de solo de Yellow Point) foi a que apresentou os melhores resultados, sem diminuição no número de colônias formadas mesmo após exposição prolongada à radiação (Figura 4). Entretanto, o resultado padrão foi uma diminuição no número de colônias formadas, conforme o tempo de exposição aumentava, como no caso da levedura *Cryptococcus gastricus* (Figura 5). A espécie *Metschnikowia australis*, isolada de sedimento marinho da Antártica (na frente da Estação Antártica Comandante Ferraz – módulos emergenciais) não apresentou resistência em todos os períodos de tempo testados.

Figura 3 - Porcentagens de sobrevivência em cada um dos períodos testados: 15 min, 30 min, 60 min após 7 dias de incubação à 15°C.

Ensaio Radiação UV-B

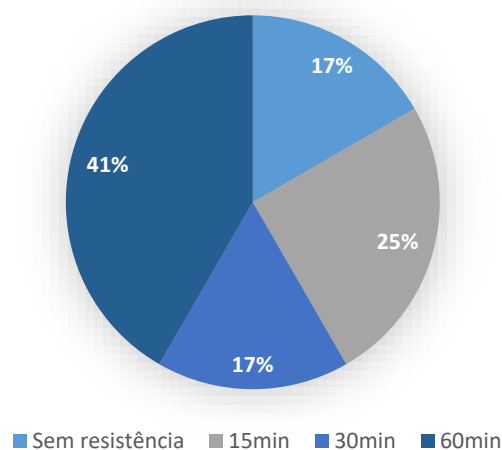
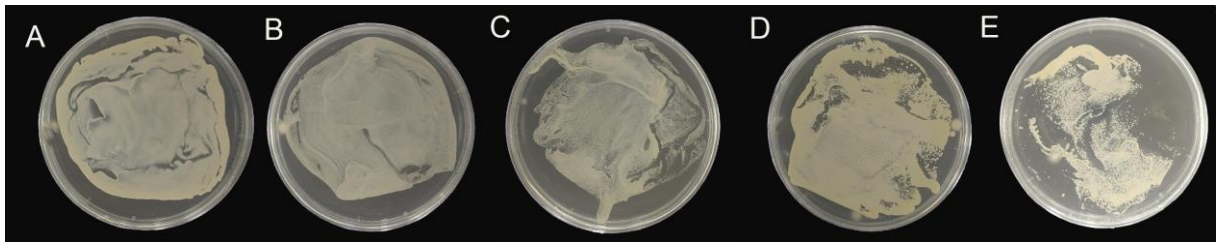
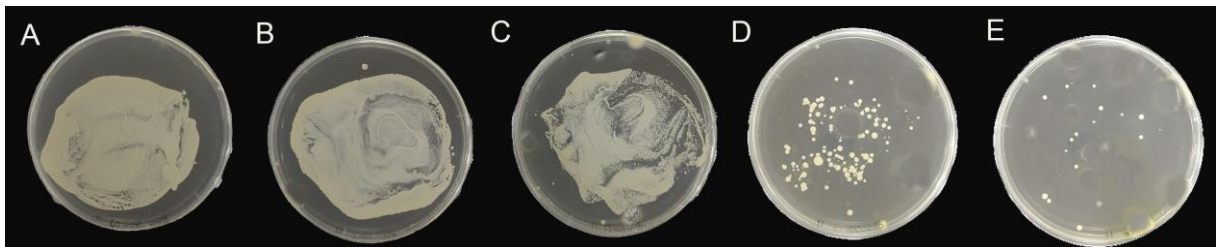


Figura 4 – *Leucosporidium* sp. após exposição à radiação ultravioleta B. A: controle, sem exposição; B: 5 min de exposição; C: 15 min de exposição; D: 30 min de exposição; E: 60 min de exposição. Incubação à 15°C por 7 dias.



Fonte: autora.

Figura 5 – *Cryptococcus gastricus* após exposição à radiação ultravioleta B. A: controle, sem exposição; B: 5 min de exposição; C: 15 min de exposição; D: 30 min de exposição; E: 60 min de exposição. Incubação à 15°C por 7 dias.



Fonte: autora.

5.2.1 Radiação ultravioleta C

Do total de 14 leveduras analisadas, 81% apresentou algum nível de resistência a radiação ultravioleta C e 19% não suportou exposição ao tempo mínimo de 5 min (Figura 6). Entretanto, em todos os casos de resistência, o número de colônias formadas diminuiu drasticamente quando comparadas com aquelas da placa de controle, que não foi exposta à radiação. As duas espécies com maior resistência a radiação ultravioleta C foram *Holtermanniella wattica* (Figura 7), isolada de solo marrom de Yellow Point, e *Cryptococcus gastricus* (Figura 8), isolada de sedimento marinho do ponto Punta Ullman, as quais resistiram à exposição de 60 min. As espécies *Mrakia frigida* e *Metschnikowia australis*, ambas provenientes de sedimento marinho, não apresentaram resistência nos período de exposição avaliados.

Figura 6 - Porcentagem de sobrevivência em relação ao tempo de exposição à radiação ultravioleta C após 7 dias de incubação à 15°C.

Ensaio radiação UV-C

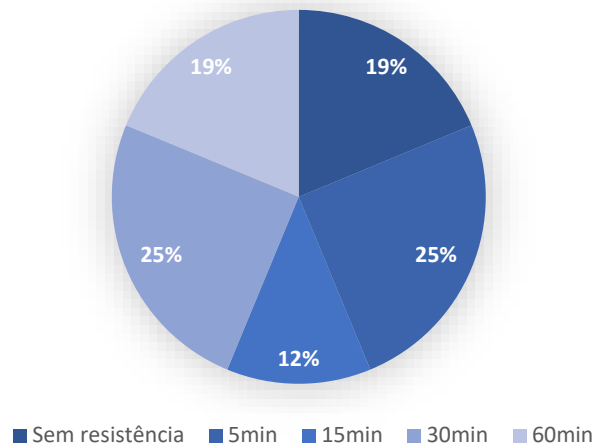
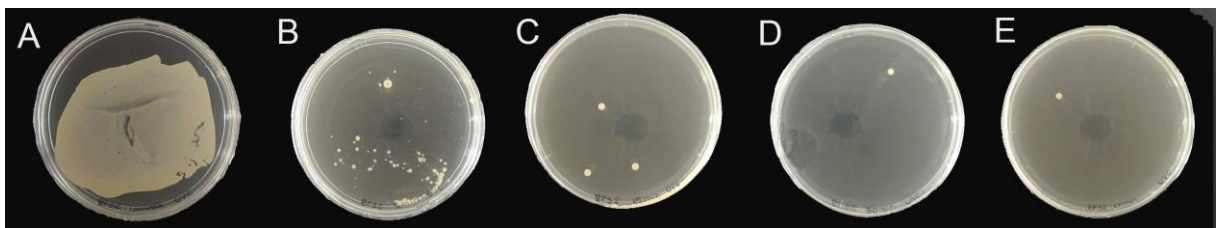
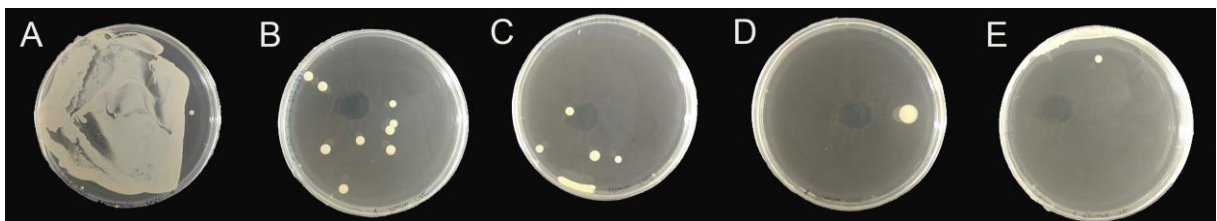


Figura 7 - Espécie *Holtermanniella wattica* exposta à radiação UV-C. A: controle, sem exposição; B: 5 min de exposição; C: 15 min de exposição; D: 30 min de exposição; E: 60 min de exposição. Incubação à 15°C por 7 dias.



Fonte: autora.

Figura 8 - *Cryptococcus gastricus* após exposição à radiação ultravioleta C. A: controle, sem exposição; B: 5 min de exposição; C: 15 min de exposição; D: 30 min de exposição; E: 60 min de exposição. Incubação à 15°C por 7 dias.



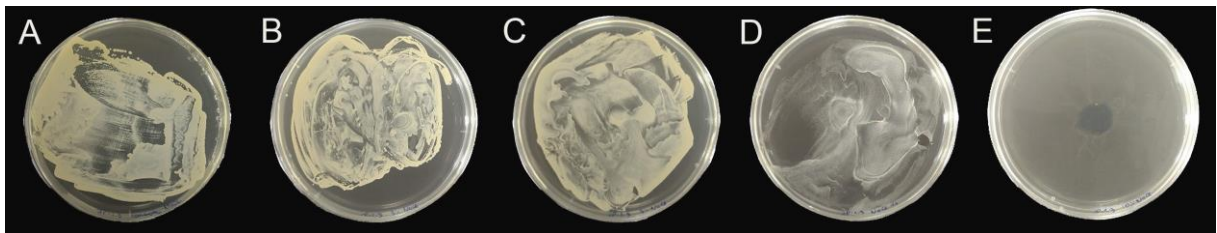
Fonte: autora.

5.3 Salinidade

Para os ensaios de salinidade três táxons, um deles com dois representantes, foram analisados (*Naganishia* sp., *Goffeauzyma gilvescens*, *Cryptococcus gastricus*).

Todas as leveduras analisadas apresentaram resistência a um máximo de 7% de cloreto de sódio acrescidos ao meio de cultura. Em todos os casos, a quantidade de colônias formadas foi inversamente proporcional à concentração salina do meio de cultura, como no caso da *Naganishia* sp., proveniente de amostra de solo de Yellow Point (Figura 9).

Figura 9 - *Naganishia* sp. em meio de cultura com diferentes concentrações de NaCl. A: controle, sem adição de cloreto de sódio; B: 2% NaCl; C: 5% NaCl; D: 7% NaCl; E: 10% NaCl. Incubação à 15°C por 7 dias.



Fonte: autora.

5.4 Estresse nutricional

Para os ensaios de estresse nutricional três táxons, um com dois representantes, foram analisados (*Naganishia* sp., *Goffeauzyma gilvescens*, *Cryptococcus gastricus*). Todas apresentaram uma alta resistência a pouca disponibilidade nutricional no meio de cultura. O crescimento nos meios Czapek Dox modificados foi menor do que na placa de controle, contendo meio YMA. Entretanto, houve crescimento de colônias em todas as concentrações de glicose, inclusive na placa em que não houve adição de fonte de carbono. O crescimento de colônias nas placas com as diferentes concentrações de glicose não diminuiu conforme a menor disponibilidade de nutriente (Figura 10).

Figura 10 - *Naganishia* sp. em meio de cultura com diferentes concentrações de glicose. A: meio YMA de controle; B: Czapek's Dox 0% glicose; C: Czapek's Dox 0,5% glicose; D: Czapek's Dox 1,5% glicose; E: Czapek's Dox 2% glicose. Incubação à 15°C por 7 dias.

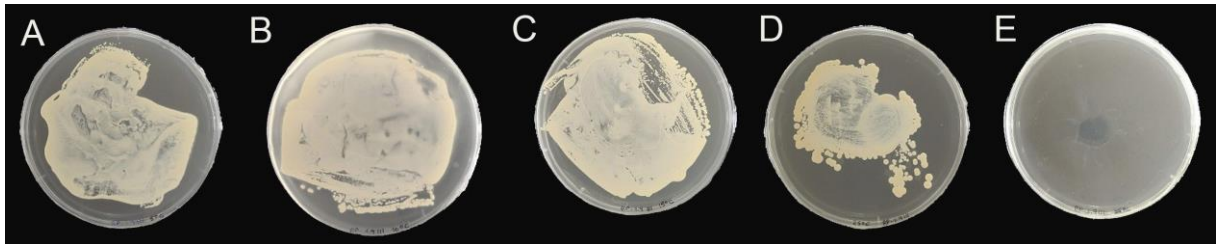


Fonte: autora.

5.5 Temperatura

Dentre os 3 táxons testados (*Naganishia* sp., *Goffeauzyma gilvescens*, *Cryptococcus gastricus*), a levedura *Naganishia* sp. cresceu em todas as temperaturas avaliadas abaixo de 35°C (Figura 11). As outras espécies avaliadas tiveram como temperatura máxima de crescimento 15°C.

Figura 11 - *Naganishia* sp. incubada em diferentes temperaturas. A: 5°C; B: 10°C; C: 15°C; D: 25°C; E: 35°C. Incubação à 15°C por 7 dias.



Fonte: autora.

5.6 pH ideal

Quanto aos testes de resistência a diferentes valores de pH, os mesmos foram realizados para dos 5 táxons de leveduras (*Naganishia* sp., *Leucosporidium* sp., *Goffeauzyma gilvescens*, *Metschnikowia australis*, *Cryptococcus gastricus*), 20% das leveduras testadas demonstraram preferência a meios estritamente básicos, apresentando produção de biomassa igual tanto em pH 7, quanto em pH 9. Entretanto, a grande maioria, 80%, cresceu igualmente em meio levemente ácido, com pH 5, e nos demais meios básicos testados (Figura 12).

Mesmo demonstrando uma clara preferência pelos meios básicos ou apenas levemente ácidos, as leveduras foram capazes de crescer também em pH 3, só que com uma produção de biomassa um pouco menor do que aquela apresentada nas outras condições. Apenas as leveduras *Naganishia* sp. e *Leucosporidium* sp. apresentaram crescimento muito inferior em meio com pH 3, sendo que a *Naganishia* sp. produziu apenas 2,4% do valor máximo de biomassa apresentado por essa espécie nos testes em diferentes pH (Figura 12).

Além do pH de preferência, foi possível avaliar a produção de biomassa pelas diferentes leveduras em um mesmo período de tempo. *Goffeauzyma gilvescens* e *Leucosporidium* sp. produziram apenas metade do que as outras testadas em um período de 7 dias (Figura 14).

Figura 12 - Média da biomassa em gramas produzida em cada um dos valores de pH analisados após 7 dias de incubação a 15°C sob agitação de 120 rpm.

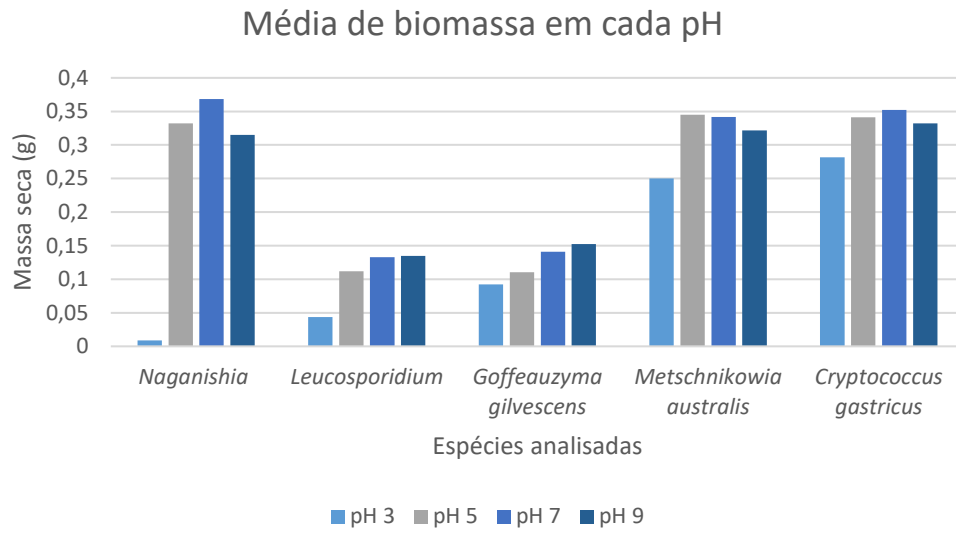


Figura 13 - Os pH de preferência das diversas leveduras estudadas após 7 dias de incubação a 15°C sob agitação de 120 rpm

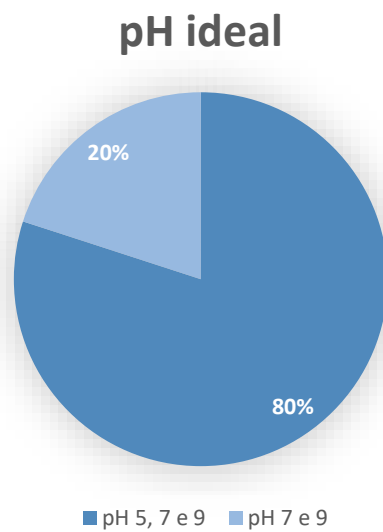
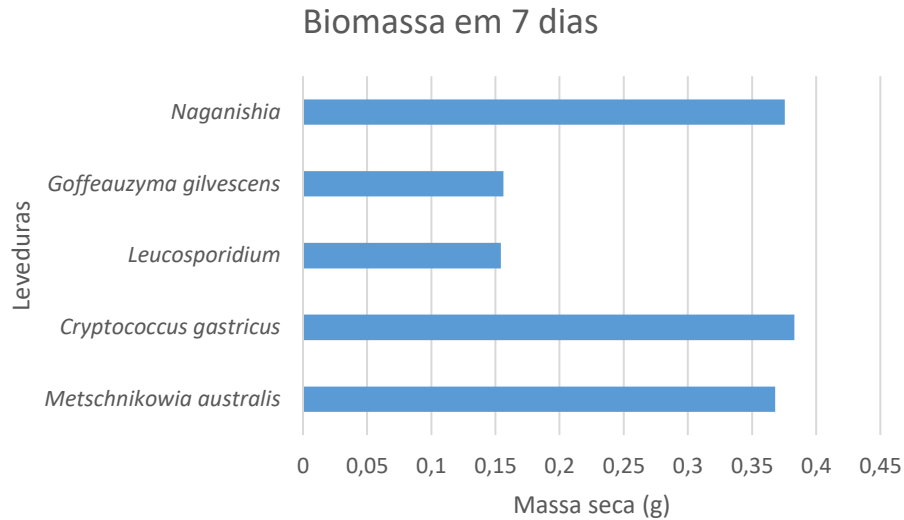


Figura 14 - Diferença de quantidade de biomassa produzida por cada uma das leveduras em 7 dias de experimento em incubadora a 15°C sob agitação de 120 rpm. *Naganishia* sp., *Leucosporidium* sp., *Metschnikowia australis* e *Cryptococcus gastricus* incubadas em meio com pH 7 e *Goffeauzyma gilvescens* em meio de cultura com pH 9.



6. Discussão

A radiação ultravioleta A é o subtipo que chega com maior abundância à superfície terrestre devido a sua capacidade de passar através dos gases que compõem a atmosfera da Terra sem sofrer grande absorção; sendo assim, a luz solar que chega até o solo é composta, em sua quase totalidade, de radiação UV-A. Quanto à radiação ultravioleta B, cerca de 90% que chega até atmosfera, é absorvido pela camada de ozônio, enquanto a UV-C é absorvida em sua totalidade pelo ozônio atmosférico. Sendo assim, o fato de todas as leveduras utilizadas nesse estudo não demonstrarem mudanças ou diminuição de crescimento mesmo após a longos períodos de exposição à radiação ultravioleta A é explicado pela grande abundância desse comprimento de onda na luz solar; leveduras que habitam o solo, como a *Holtermanniella wattica*, estão expostas diariamente a radiação UV-A, não seria viável serem sensíveis e ainda assim, serem encontradas em um local onde o índice de radiação é o maior em toda a superfície terrestre. Entretanto, mesmo após serem retiradas do seu hábitat natural e passando por um processo de criopreservação, todas as espécies analisadas não perderam sua capacidade de resistência.

Normalmente, a resistência aos tipos mais letais de radiação ultravioleta está ligada a presença de pigmentos, como a melanina e os carotenoides (Moline et al, 2009), mas, como no caso das leveduras utilizadas no presente estudo, que eram

todas hialinas e, ainda assim, demonstraram grande resistência às radiações UV-B e UV-C, corrobora as observações de Schiave et al (2009) e Sinha e Häder (2002) de que a pigmentação não seja o fator principal de proteção, não impedindo completamente os danos ao DNA.

Não havendo pigmentos fotoprotetores, há um indicativo de que haja outros mecanismos atuando na proteção à radiação nessas leveduras, podendo ser a presença de moléculas fotoprotetoras, como a micosporina (LIBKIND et al, 2009) ou a expressão de enzimas antioxidantes que protegem o DNA de degradação causada pelos subprodutos formados pela exposição à radiação ultravioleta (HOERTER et al, 2005). Além da presença dessas diferentes moléculas fotoprotetoras, o mecanismo de fotorreativação (ZENOFF, SIÑERIZ, FARÍAS, 2006), que conta com enzimas que reparam os produtos gerados pelas radiações UV-B e UV-C, também poderia estar atuando; entretanto, para as enzimas fotoliasas atuarem, é necessária a presença de luz azul e, como as leveduras foram incubadas em BOD sem luz solar, é provável que a atividade dessas enzimas estivesse baixa demais para ser relevante na proteção (MARIZCURRENA et al, 2017). Comparando-se com os dados obtidos por Chen et al (2011), as leveduras utilizadas no presente estudo possuem uma potencial resistência muito maior do que a encontrada em *Saccharomyces cerevisiae*, comumente usada em fermentações, que apresentou queda do número de colônias formadas em períodos de exposição inferiores a 35 min.

Os estudos com leveduras que demonstram potencial resistência à radiação ultravioleta são de grande relevância para a área da saúde. Através do estudo das possíveis rotas que possibilitam esses micro-organismos sobreviverem a uma exposição prolongada a radiação pode-se chegar a inovações na proteção solar com meios que impeçam danos ao DNA e, conseqüentemente, diminuindo a ocorrência de câncer de pele (FREEMAN; LEY; LEY, 1988). Além disso, os carotenoides encontrados em leveduras pigmentadas podem ser usados como suplemento alimentar, atuando como um tratamento sistemático contra os eritemas na pele causados pela exposição à luz solar (SIES; STAHL, 2004).

As duas espécies que não demonstraram nenhuma resistência à radiação UV-C, *Mrakia frigida* e *Metschnikowia australis*, são provenientes de sedimento marinho, havendo uma atenuação da quantidade de radiação ultravioleta que chega até o sedimento devido a absorção pela água. Entretanto, a espécie *Cryptococcus gastricus*, proveniente de sedimento marinho de Punta Ullman, foi uma das leveduras

testadas que demonstraram maior resistência a radiação ultravioleta C, a mais severa dos três tipos estudados. Essa resistência pode ser explicada pela transparência das águas que cobriam o sedimento de onde vieram as amostras e da transparência do sedimento em si, que permitiriam a passagem da radiação ultravioleta até os micro-organismos (GARCIA-PICHEL; BEBOUT, 1996).

Além dos possíveis benefícios para a saúde humana, as leveduras que demonstram resistência a longos períodos de exposição à radiação ultravioleta podem ser utilizadas como modelos de estudo para a astrobiologia. Em estudos de Onofri et al (2008), foi evidenciado que leveduras, principalmente as melânicas, possuem alto potencial para estudos astrobiológicos, visto que apresentam alta resistência a fatores como radiação, estresse osmótico e flutuação de temperatura.

No continente antártico, devido ao ambiente extremamente seco, os solos da região tendem a acumular uma alta concentração de sal. Nas áreas temperadas, a constante precipitação e processos de descongelamento levam um fluxo de sal até áreas mais profundas do solo (FISCHER, 2014). As leveduras analisadas no presente trabalho, como a *Naganishia* sp., são provenientes de amostras de solo da região de Yellow Point, logo, os resultados encontrados quanto a resistência a uma concentração salina alta no meio de cultura corroboram os dados anteriormente citados da literatura sobre a presença de sal nos solos da Antártica. A maior concentração que as leveduras desse estudo conseguiram resistir foi de 7%, concentração esta que já ultrapassa a média encontrada em oceanos, de 3,5% (MILLERO et al., 2008).

Os mecanismos pelos quais essas leveduras conseguem suportar o estresse osmótico proporcionado por uma concentração alta de sal no meio de cultura podem ser: acúmulo de compostos osmorreguladores de baixo peso molecular que não interferem na atividade de enzimas ou no próprio metabolismo do micro-organismo (RUISI et al, 2007); acúmulo de glicerol e arabitól (PASCUAL; MELGAREJO; MAGAN, 2002), que podem ser sintetizados após a ativação de genes específicos (HAN; PRADE, 2002).

Na Antártica, o solo pode ser levemente ácido, com pH 6, no interior das ilhas ou em altas altitudes, ou extremamente alcalino, com pH 9, na região costeira (AISLABIE; McLEOD; FRASER, 1998). Isso explica os resultados encontrados nesse estudo, em que todas as leveduras testadas, tanto as de sedimento marinho, como a *Metschnikowia australis*, e as de solo de Yellow Point, como a *Goffeauzyma*

gilvescens, terem uma maior produção de biomassa em meio levemente ácido até altamente básico (pH 9).

Em meio ácido, o crescimento de todas as espécies testadas foi menor do que o encontrado em meios básico. Segundo Restaino, Lenovich e Bills (1982), o meio de cultura, ao atingir um limiar de pH muito abaixo daquele necessário para o funcionamento fisiológico normal das leveduras, leva a uma extensão prolongada da fase lag, onde há preparação para o crescimento celular exponencial, e uma consequente inibição da proliferação de células.

Através dos testes de pH ideal, também foi possível ver a diferença de produção de biomassa por cada uma das leveduras em um mesmo período de tempo. Segundo Walker (1998), isso está relacionado com a capacidade de obtenção de nutrientes, que vai definir a taxa com que as células se multiplicam.

As espécies de leveduras analisadas nesse estudo podem ser classificadas como psicrotolerantes, como no caso da *Naganishia* sp., devido a seu crescimento em temperaturas baixas, mas ainda assim apresentando formação de colônias em temperaturas superiores a 20°C.

Em estudos feitos por Onofri et al (2008), leveduras psicrófilicas provenientes da Antártica resistiram a temperaturas de incubação de até 90°C, devido a sua capacidade de entrar em um estado criptobiótico de resistência. As leveduras analisadas não demonstraram capacidade semelhante, apresentando crescimento ótimo apenas em temperaturas baixas.

Para suportar temperaturas tão baixas como as encontradas na Antártica, as leveduras precisaram desenvolver mecanismos adaptativos, como: açúcares crioprotetores, que ajudam manter a membrana plasmática estável em casos de desidratação; glicerol e manitol mantêm a pressão de turgor das células; maior concentração de lipídios e ácidos graxos formando a membrana plasmática; proteínas anti-congelantes que impedem a formação de cristais no citosol; por fim, presença de enzimas capazes de atividade em temperaturas baixas (ROBINSON, 2001).

O solo da região onde as amostras utilizadas nesse estudo foram coletadas contém uma concentração muito baixa de carbono, com valor máximo de 14%, sendo então considerados solos pobres (WENTZEL, 2018). Tal fato corrobora os resultados encontrados nos testes de estresse nutricional, em que as leveduras estudadas apresentaram uma grande resistência a meios de cultura extremamente oligotróficos, inclusive com formação de colônias em meio sem adição de fonte de carbono.

Leveduras capazes de crescer em ambientes oligotróficos são de interesse para estudos astrobiológicos, já que a presença de nutrientes no solo de Marte é extremamente baixa (PULSCHEN et al, 2015). Jennings et al (1995) demonstrou que a fixação de CO₂ seria um mecanismo chave nos processos metabólicos de leveduras capazes de crescimento em meio oligotrófico.

7. Conclusões

A partir dos resultados obtidos no presente estudo, evidenciou-se que leveduras provenientes de solo e sedimento marinho da região Antártica possuem alta resistência a diversos fatores de estresse. Observou-se que as leveduras provenientes de solo coletado no Yellow Point apresentaram os maiores índices de resistência aos diferentes tipos de radiação ultravioleta, apresentando formação de colônias até no período máximo de exposição à UV-C. Todas as espécies analisadas resistiram a uma concentração alta de sal, maior do que a encontrada na água do mar, e apresentaram crescimento expressivo de colônias em meio altamente oligotrófico. Mesmo apresentando uma clara preferência por meios básicos, as espécies estudadas ainda produziram biomassa em meio ácido. Nenhuma das leveduras testada apresentou resistência a temperaturas mais altas do que 25°C. No geral, a levedura *Naganishia* sp. foi a que obteve os melhores resultados, sendo um possível organismo modelo para estudos astrobiológicos. Alguns dos testes foram realizados com um número inferior de táxons devido a uma exiguidade de tempo para realizá-los. Entretanto, os dados coletados com as leveduras utilizadas foram extremamente interessantes para ampliar os conhecimentos sobre micro-organismos extremófilos; tais dados estão sendo compilados para uma publicação científica.

8. Referências bibliográficas

AISLABIE, J.; McLEOD, M.; FRASER, R. Potential for biodegradation of hydrocarbons in soil from the Ross Dependency, Antarctica. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.49, n.2, p.210-214, 1998.

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

BÖLTER, M. Soil development and soil biology on King George Island, Maritime Antarctic. *Polish Polar Research*, v.32, n.2, p.105-116, 2011.

CARVALHO, P. O.; CAMPOS, P. R. B.; NOFFS, M. D.; OLIVEIRA, J. G.; SHIMIZU, M. T.; SILVA, D. M.. Application of Microbial Lipases to Concentrate Polyunsaturated Fatty Acids. *Quimica Nova*, v. 26, n. 1, p. 75–80, 2003.

CHEN, S.; LEE, R.; OH, H.; PRESTON, C. The impact of ultraviolet radiation on *Saccharomyces cerevisiae* survival. *Open Journal Systems*, v.1, 2011.

CONNELL, L.; REDMAN, R.; CRAIG, S.; SCORZETTI, G.; ISZARD, M.; RODRIGUEZ, R. Diversity of soil yeasts isolated from South Victoria Land, Antarctica. *Microbiol Ecol.*, v.56, p.448–459, 2008.

COTARLET, M.; NEGOITA, T. G.; BAHRIM, G.; STOUGAARD, P.. Partial characterization of cold active amylases and proteases of *Streptomyces* sp. From Antarctica. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 42, n. 3, p. 868–877, 2011.

DOUKI, T.; ZALIZNIAK, T.; CADET, J. Far-UV-induced dimeric photoproducts in short oligonucleotides: sequence effects. *Photochem. Photobiol.*,v.67, p.171-179, 1997.

FARMAN, J. C.; GARDINER, B. G., SHANKLIN, J. D. Large losses of total ozone in Antarctica reveal seasonal ClO_x/NO_x interaction. *Nature*, vol. 315, p. 207-210, 1985.

FERREIRA-DIAS, S.; SANDOVAL, G.; PLOU., F.; VALERO, F.. The potential use of lipases in the production of fatty acid derivatives for the food and nutraceutical industries. *Electronic Journal of Biotechnology*, v. 16, n. 3, 2013.

FISCHER, M. Spotlight back on Antarctica's peculiar soils as scientists study climate change effects. *Soil Horizons*, v.55, n.2, p.1-4, 2014.

FREEMAN, S.E.; LEY, R. D.; LEY, K. D. Sunscreen protection against UV-induced pyrimidine dimers in DNA of human skin in situ. *Photo-dermatology*, v.5, n.6, p.243-247, 1988.

GARCIA-PICHEL, F.; BEBOUT, B. M. Penetration of ultraviolet radiation into shallow water sediments: high exposure for photosynthetic communities. *Marine Ecology Progress Series*, v.131, p. 257-262, 1996.

HAN, K. H.; PRADE, R. A. Osmotic stress-coupled maintenance of polar growth in *Apergillus nidulans*. *Molecular Microbiology*, v.43, n.5, p.1065-1078, 2002.

HOERTER, J. D et al. Effects of sublethal UVA irradiation on activity levels of oxidative defense enzymes and protein oxidation in *Escherichia coli*. *J Photochem Photobiol B.*, n.81, v.3, p.171-180, 2005.

INFORSATO, F. J. Fungos de sedimentos marinhos da Antártica: diversidade e prospecção de enzimas. 2017. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada) – Instituto de Biociências, UNESP, Rio Claro.

JENNINGS, D. H. The physiology of fungal nutrition. New York: *Cambridge University Press*, 1995.

KNAP, W. H.; OERLEMANS, J.; CADÉE, M. Climate sensitivity of the ice cap of King George Island, South Shetland Island, Antarctica. *Annals of Glaciology*, v.23, p.154-159, 1996.

- LACHACZ, A.; KALISZ, B.; GIELWANOWSKA, I.; OLECH, M.; CHWEDORZEWSKA, K. J.; KELLMAN-SOPYLA, W. Nutrient abundance and variability from soils in the coast of King George Island. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, v.18, n.2, p.294-311, 2018.
- LIBKIND, D. et al. Yeasts from high-altitude lakes: influence of UV radiation. *FEMS Microbiol Ecol*, n.69, p.353-362, 2009.
- MARIZCURRENA, J. J.; MOREL, M. A.; BRAFIA, V.; MORALES, D.; MARTINEZ-LOPEZ, W.; CASTRO-SOWINSKI, S. Searching for novel photolyases in UVC-resistant Antarctic bacteria. *Extremophiles*, v.21, n.2, p.409-418, 2017.
- MILLERO, F. J.; FEISTEL, R.; WRIGHT, D. G.; McDOUGALL, T. J. The composition of Standard Seawater and the definition of the Reference-Composition Salinity Scale. *Deep-sea Research I*, v.55, p.50-72, 2008.
- MOLINE, M.; LIBKIND, D.; DIÉGUEZ, M. C.; BROOCK, M. Photoprotective role of carotenoids in yeasts: Response to UV-B of pigmented and naturally-occurring albino strains. *J Photochem Photobiol B.*, n.95, p.156-161, 2009.
- MÖLLER, C.; DREYFUSS, M. M. Microfungi from Antarctic lichens, mosses and vascular plants. *Mycologia*, v.88, p.922-933, 1996.
- MURI, E. M. F. Proteases virais: importantes alvos terapêuticos de compostos peptidomiméticos. *Química Nova*, v. 37, n. 2, 308-316, 2014.
- NARAYANAN, D. L.; SALADI, R. N.; FOX, J. L. Review: ultraviolet radiation and skin cancer. *International Journal of Dermatology*, v.49, n.9, p.978-986, 2010.
- ONOFRI, S.; SELBMANN, L.; HOOG, G. S.; GRUBE, M.; BARRECA, D.; RUISI, S.; ZUCCONI, L.; Evolution and adaptation of fungi at boundaries of life. *Advances in Space Research*, v.40, n.11, p.1657-1664, 2007.
- ONOFRI, S.; BARRECA, D.; SELBMANN, L.; ISOLA, D.; RABOW, E.; HOMECK, G.; VERA, J. P. P.; HATTON, J.; ZUCCONI, L. Resistance of Antarctic black fungi and cryptoendolithic communities to simulated space and Martian conditions. *Studies in Microbiology*, v.61, p. 99-109, 2008.
- PASCUAL, S.; MELGAREJO, P., MAGAN, N. Water availability affects the growth, accumulation of compatible solutes and the viability of the biocontrol agent *Epicoccum nigrum*. *Mycopathology*, v.156, p.93-100, 2002.
- PULSCHEN, A. A.; RODRIGUES, F.; DUARTE, R. T. D.; ARAUJO, G. G.; SANTIAGO, I. F.; PAULINO-LIMA, I. G.; ROSA, C. A.; KATO, M. J.; PELLIZARI, V. H.; GALANTE, D. UV-resistant yeasts isolated from a high-altitude volcanic area on the Atacama Desert as eukaryotic models for astrobiology. *MicrobiologyOpen*, v.4, n.4, p.574-588, 2015.
- RAJENDRAN, A.; PALANISAMY, A.; THANGAVELU, V. Lipase catalyzed ester synthesis for food processing industries. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 52, n. 1, p. 207-219, 2009.

- RESTAINO, L.; LENOVICH, L. M.; BILLS, S. Effect of acids and sorbate combinations on the growth of four osmophilic yeasts. *J. Food. Prot.*, v.45, p.1138-1142, 1982.
- ROBINSON, C. H. Cold adaptation in Arctic and Antarctic fungi. *New Phytologist*, v.151, p.341-353, 2001.
- RUISI, S.; BARRECA, D.; SELBMANN, L.; ZUCCONI, L.; ONOFRI, S. Fungi in Antarctica. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, v.6, p.27-141, 2007.
- SANTOS, A. F.; VALLE, R. S.; PACHECO, C. A.; ALVAREZ, V. M.; SELDIN, L. SANTOS, A. L. S.. Extracellular proteases of *Halobacillus blutaparonensis* strain M9, a new moderately halophilic bacterium. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 44, n. 4, p.1299–1304, 2013.
- SANTOS, A. L.; OLIVEIRA, V.; BAPTISTA, I.; HENRIQUES, I.; GOMES, N. C. M.; ALMEIDA, A. ; CORREIA, A.; CUNHA, A. Wavelength dependence of biological damage induced by UV radiation on bacteria. *Archives of Microbiology*, v.195, n.1, p.63-74, 2012.
- SCHIAVE, L. A.; PEDROSO, R. S.; CANDIDO, R. C.; ROBERTS, D. W.; BRAGA, G, U L. Variability in UVB tolerances of melanized and nonmelanized cells of *Cyptococcus neoformans* and *C. laurentii*. *Photochemistry and Photobiology*, n. 85, p.205-213, 2009.
- SIES, H.; STAHL, W. Carotenoids and UV protection. *Photochemical and Photobiological Sciences*, v.3, n.8, p.749-752 2004
- SIMÕES, J. C.; ARIGONY-NETO, J.; BREMER, U. F. O uso de mapas antárticos em publicações. *Pesquisa Antártica Brasileira*, Rio de Janeiro, v. 4, p. 191-197, 2004.
- SINHA, R. P.; HÄDER, D. P. UV-induced DNA damage and repair: a review. *Photochemistry and Photobiology Science*, v.1, n.4, p.225-236, 2002.
- SIVASAKTHIVEL, T; REDDY, K. K. S. K. Ozone layer depletion and its effects: a review, *International Journal of Environmental Science and Development*, v. 2, n.1, p. 30-37, 2011.
- TURNER, J.; BINDSCHADLER, R.; CONVEY, P.; PRISCO, G.; FAHRBACH, E.; GUTT, J.; HODGSON, D.; MAYEWSKI, P.; SUMMERHAYES, C. Antarctic climate change and the environment. *Scientific Committee on Antarctic Research*, v.1, p.1-26, 2009.
- VAZ, A. B. M., ROSA, L. H., VIEIRA, M. L. A., DE GARCIA, V., BRANDÃO, L. R., TEIXEIRA, L. C. R. S., ROSA, C. A. The diversity, extracellular enzymatic activities and photoprotective compounds of yeasts isolated in Antarctica. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 42, n. 3, p. 937–947, 2011.
- YERGEAU, E.; KOWALCHUK, G. A. Responses of Antarctic soil microbial communities and associated functions to temperature and freeze-thaw cycle frequency. *Environmental Microbiology*, v. 10, n.9, p.2223-2235, 2008.

WALKER, G. M. Yeast physiology and biotechnology. Chichester: J. Wiley & Sons, 1998.

WENTZEL, L. C. P. Diversidade de fungos de solos antárticos e prospecção de enzimas lignolíticas. 2017. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada) – Instituto de Biociências, UNESP, Rio Claro.

WENTZEL, L. C. P.; INFORSATO, F. J.; MONTOYA, Q. V.; ROSSIN, B. G.; NASCIMENTO, N. R.; RODRIGUES, A.; SETTE, L. D. Fungi from Admiralty Bay (King George, Antarctica) soils and marine sediment. *Fungal Microbiology*, 2018.

ZENOFF, V. F.; SIÑERIZ, F.; FARÍAS, M. E. Diverse responses to UV-B radiation and repair mechanisms of bacteria isolated from high-altitude aquatic environments. *Applied and Environmental Microbiology*, v.72, n. 12, p.7857-7863, 2006.

Gabriele Santana de Farias
(Discente)

Juliana Aparecida dos Santos
(Co-orientador)

Lara Durães Sette
(Orientador)