



**INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE
CIÊNCIAS DA VIDA E NATUREZA (ILACVN)**

BIOTECNOLOGIA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE BIOPRECIPITAÇÃO DE CARBONATO DE
CÁLCIO POR BACTÉRIAS ENDOLÍTICAS DA ANTÁRTICA PARA APLICAÇÃO
NA ÁREA DE COSMÉTICA**

SUSANA PATRICIA LOTERO ARCILA

Foz do Iguaçu
2024

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE BIOPRECIPITAÇÃO DE CARBONATO DE CÁLCIO
POR BACTÉRIAS ENDOLÍTICAS DA ANTÁRTICA PARA APLICAÇÃO NA ÁREA DE
COSMÉTICA**

SUSANA PATRICIA LOTERO ARCILA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e Natureza da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Michel Rodrigo Zambrano Passarini

Foz do Iguaçu
2024

SUSANA PATRICIA LOTERO ARCILA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE BIOPRECIPITAÇÃO DE CARBONATO DE CÁLCIO
POR BACTÉRIAS ENDOLÍTICAS DA ANTÁRTICA PARA APLICAÇÃO NA ÁREA DE
COSMÉTICA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e Natureza da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Michel Rodrigo Zambrano Passarini
UNILA

Prof. Dra. Nathalia Correa Chagas
UNILA

M.e Diego Alberto Tavares
Itaipu Parquetec

Foz do Iguaçu, _____ de _____ de _____.

TERMO DE SUBMISSÃO DE TRABALHOS ACADÊMICOS

Nome completo do autor(a): Susana Patricia Lotero Arcila

Curso: Biotecnologia

Tipo de Documento	
<input checked="" type="checkbox"/> (.X.) graduação	<input type="checkbox"/> (.....) artigo
<input type="checkbox"/> (.....) especialização	<input checked="" type="checkbox"/> (.X.) trabalho de conclusão de curso
<input type="checkbox"/> (.....) mestrado	<input type="checkbox"/> (.....) monografia
<input type="checkbox"/> (.....) doutorado	<input type="checkbox"/> (.....) dissertação
	<input type="checkbox"/> (.....) tese
	<input type="checkbox"/> (.....) CD/DVD – obras audiovisuais
	<input type="checkbox"/> (.....) _____

Título do trabalho acadêmico: Avaliação do potencial de bioprecipitação de carbonato de cálcio por bactérias endolíticas da antártica para aplicação na área de cosmética Michel Rodrigo Zambrano Passarini

Nome do orientador(a): Prof. Dr. Michel Rodrigo Zambrano Passarino

Data da Defesa: 14/10/2024

Licença não-exclusiva de Distribuição

O referido autor(a):

a) Declara que o documento entregue é seu trabalho original, e que o detém o direito de conceder os direitos contidos nesta licença. Declara também que a entrega do documento não infringe, tanto quanto lhe é possível saber, os direitos de qualquer outra pessoa ou entidade.

b) Se o documento entregue contém material do qual não detém os direitos de autor, declara que obteve autorização do detentor dos direitos de autor para conceder à UNILA – Universidade Federal da Integração Latino-Americana os direitos requeridos por esta licença, e que esse material cujos direitos são de terceiros está claramente identificado e reconhecido no texto ou conteúdo do documento entregue.

Se o documento entregue é baseado em trabalho financiado ou apoiado por outra instituição que não a Universidade Federal da Integração Latino-Americana, declara que cumpriu quaisquer obrigações exigidas pelo respectivo contrato ou acordo.

Na qualidade de titular dos direitos do conteúdo supracitado, o autor autoriza a Biblioteca Latino-Americana – BIUNILA a disponibilizar a obra, gratuitamente e de acordo com a licença pública *Creative Commons Licença 3.0 Unported*.

Foz do Iguaçu, 14 de outubro de 2024.

Assinatura do Responsável

RESUMO

O carbonato de cálcio é um composto químico de fórmula CaCO_3 , amplamente utilizado em diversas indústrias devido às suas propriedades e versatilidade. O carbonato de cálcio pode ser obtido por extração de depósitos naturais ou também por processos de carbonatação. Outra forma interessante de obter carbonato de cálcio é através da bioprecipitação. Diferentes formas de vida conseguem induzir a formação de minerais, secretando substâncias que atuam como catalisadores ou nucleadores para sua formação. As bactérias endolíticas são microrganismos que possuem a capacidade de viver e proliferar no interior de rochas e minerais, onde podem decompor e extrair nutrientes da matriz mineral. Essas características lhes conferem um grande potencial para precipitar diversos minerais, como o carbonato de cálcio. O uso de amostras e bactérias da Antártica é especialmente importante devido às condições extremas do ambiente, que podem revelar organismos únicos com capacidades biotecnológicas excepcionais. Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade das bactérias isoladas de três diferentes amostras de rocha, coletadas em diferentes locais na Antártica: 1) Pedras coletadas em Fumarole Bay (FB), Ilha Deception; 2) Pedras coletadas em Ulmann Point (UP); 3) Pedras coletadas no Refúgio, ambas na Ilha Rei George; para precipitar carbonato de cálcio, bem como avaliar os cristais produzidos, visando sua aplicação na área de cosméticos. Para isso, foram realizados ensaios de triagem qualitativa para selecionar potenciais bactérias indutoras da precipitação de carbonato de cálcio, utilizando meios de cultivo contendo indicadores de pH: 1) Meio padrão B4; 2) Meio ácido B4 tamponado a pH 7; 3) Meio alcalino B4 tamponado a pH 8,2. No total, foram isoladas 48 bactérias, das quais 45 apresentaram formação de cristais. Para determinar a capacidade de bioprecipitação do carbonato de cálcio, foi visualizada a formação de cristais na superfície das colônias com a ajuda do estereomicroscópio. Além disso, para confirmar a presença de carbonato nos cristais formados pelas 45 bactérias, foi realizado um teste com ácido clorídrico (HCl). Este teste consistiu em adicionar algumas gotas de HCl sobre os cristais, o que resultou em efervescência ou borbulhamento devido à liberação de CO_2 , confirmando assim a presença de carbonato. As 45 amostras testadas apresentaram efervescência nos locais onde estavam localizados os cristais. Adicionalmente, foi realizado um teste para confirmar a presença de cálcio nos cristais formados. Para isso, foi utilizado o microscópio eletrônico de varredura (MEV), acoplado a um detector de espectroscopia de dispersão de energia (EDS). Este teste foi conduzido em 13 das amostras de cristais precipitadas por diferentes bactérias, confirmando a presença de cálcio nas regiões onde os cristais se formaram. Quanto à identificação das bactérias, o sistema MALDI Biotyper Sirius One e o Sistema VITEK® 2 COMPACT foram utilizados para identificar um total de 17 bactérias, confirmando que várias das 45 bactérias isoladas correspondiam à mesma espécie. Esse conjunto de análises e identificação permitiu caracterizar de maneira confiável a capacidade dessas bactérias de bioprecipitar carbonato de cálcio, com resultados promissores para sua possível aplicação na indústria cosmética.

Palavras-chave: Bioprospecção; bioprecipitação; carbonato de cálcio; bactérias endolíticas; cosmética.

RESUMEN

El carbonato de calcio es un compuesto químico con la fórmula CaCO_3 , ampliamente utilizado en diversas industrias debido a sus propiedades y versatilidad. El carbonato de calcio puede obtenerse mediante la extracción de depósitos naturales o también por procesos de carbonatación. Otra forma interesante de obtener carbonato de calcio es a través de la bioprecipitación. Diferentes formas de vida pueden inducir la formación de minerales al secretar sustancias que actúan como catalizadores o nucleadores para su formación. Las bacterias endolíticas son microorganismos que tienen la capacidad de vivir y proliferar en el interior de rocas y minerales, donde pueden descomponer y extraer nutrientes de la matriz mineral. Estas características les confieren un gran potencial para precipitar diversos minerales, como el carbonato de calcio. El uso de muestras y bacterias de la Antártida es especialmente importante debido a las condiciones extremas del ambiente, que pueden revelar organismos únicos con capacidades biotecnológicas excepcionales. En este sentido, el objetivo de este trabajo fue evaluar la capacidad de las bacterias aisladas de tres diferentes muestras de roca, recolectadas en distintos lugares de la Antártida: 1) Piedras recolectadas en Fumarole Bay (FB), Isla Deception; 2) Piedras recolectadas en Ulmann Point (UP); 3) Piedras recolectadas en el Refugio, ambas en la Isla Rey George; para precipitar carbonato de calcio, así como evaluar los cristales producidos, con miras a su aplicación en el área de cosméticos. Para ello, se realizaron ensayos de cribado cualitativo para seleccionar bacterias potenciales que inducen la precipitación de carbonato de calcio, utilizando medios de cultivo con indicadores de pH: 1) Medio estándar B4; 2) Medio ácido B4 tamponado a pH 7; 3) Medio alcalino B4 tamponado a pH 8,2. En total, se aislaron 48 bacterias, de las cuales 45 presentaron formación de cristales. Para determinar la capacidad de bioprecipitación del carbonato de calcio, se visualizó la formación de cristales en la superficie de las colonias con la ayuda del estereomicroscopio. Además, para confirmar la presencia de carbonato en los cristales formados por las 45 bacterias, se realizó una prueba con ácido clorhídrico (HCl). Esta prueba consistió en añadir unas gotas de HCl sobre los cristales, lo que resultó en efervescencia o burbujeo debido a la liberación de CO_2 , confirmando así la presencia de carbonato. Las 45 muestras probadas presentaron efervescencia en los lugares donde estaban ubicados los cristales. Adicionalmente, se realizó una prueba para confirmar la presencia de calcio en los cristales formados. Para ello, se utilizó un microscopio electrónico de barrido (MEV), acoplado a un detector de espectroscopía de dispersión de energía (EDS). Esta prueba se realizó en 13 de las muestras de cristales precipitadas por diferentes bacterias, confirmando la presencia de calcio en las regiones donde se formaron los cristales. En cuanto a la identificación de las bacterias, se utilizaron los sistemas MALDI Biotyper Sirius One y el Sistema VITEK® 2 COMPACT para identificar un total de 17 bacterias, confirmando que varias de las 45 bacterias aisladas correspondían a la misma especie. Este conjunto de análisis e identificación permitió caracterizar de manera confiable la capacidad de estas bacterias para bioprecipitar carbonato de calcio, con resultados prometedores para su posible aplicación en la industria cosmética.

Palabras clave: Bioprospección; bioprecipitación; carbonato de calcio; bacterias endolíticas; productos cosméticos.

ABSTRACT

Calcium carbonate is a chemical compound with the formula CaCO_3 , widely used in various industries due to its properties and versatility. Calcium carbonate can be obtained by extracting natural deposits or through carbonation processes. Another interesting way to obtain calcium carbonate is through bioprecipitation. Different life forms can induce the formation of minerals by secreting substances that act as catalysts or nucleators for their formation. Endolithic bacteria are microorganisms that have the ability to live and proliferate inside rocks and minerals, where they can decompose and extract nutrients from the mineral matrix. These characteristics give them great potential to precipitate various minerals, such as calcium carbonate. The use of Antarctic samples and bacteria is especially important due to the extreme environmental conditions, which can reveal unique organisms with exceptional biotechnological capacities. In this context, the objective of this work was to evaluate the ability of bacteria isolated from three different rock samples, collected from various locations in Antarctica: 1) Rocks collected from Fumarole Bay (FB), Deception Island; 2) Rocks collected from Ulmann Point (UP); 3) Rocks collected from the Refuge, both on King George Island, to precipitate calcium carbonate, as well as to evaluate the crystals produced, with a view to their application in the cosmetics industry. For this, qualitative screening assays were performed to select potential bacteria capable of inducing calcium carbonate precipitation, using culture media containing pH indicators: 1) Standard B4 medium; 2) Acidic B4 medium buffered to pH 7; 3) Alkaline B4 medium buffered to pH 8.2. In total, 48 bacteria were isolated, of which 45 presented crystal formation. To determine the calcium carbonate bioprecipitation capacity, crystal formation on the surface of the colonies was visualized with the help of a stereomicroscope. Additionally, to confirm the presence of carbonate in the crystals formed by the 45 bacteria, a test with hydrochloric acid (HCl) was performed. This test consisted of adding a few drops of HCl onto the crystals, which resulted in effervescence or bubbling due to the release of CO_2 , thus confirming the presence of carbonate. The 45 tested samples showed effervescence in the areas where the crystals were located. Furthermore, a test was carried out to confirm the presence of calcium in the formed crystals. For this, a scanning electron microscope (SEM), coupled with an energy dispersive spectroscopy (EDS) detector, was used. This test was conducted on 13 of the crystal samples precipitated by different bacteria, confirming the presence of calcium in the regions where the crystals had formed. Regarding the identification of the bacteria, the MALDI Biotyper Sirius One system and the VITEK® 2 COMPACT system were used to identify a total of 17 bacteria, confirming that several of the 45 isolated bacteria corresponded to the same species. This set of analyses and identifications allowed for a reliable characterization of the ability of these bacteria to bioprecipitate calcium carbonate, with promising results for its potential application in the cosmetics industry.

Key words: Bioprospecting; bioprecipitation; calcium carbonate; endolithic bacteria; cosmetics.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Baía do Almirantado (Ilha Rei George, Península Antártica). Os pontos representam as seguintes áreas: REF2 Refúgio, Estação FS Ferraz, UP Ullmann Point e BP Botany Point.....	10
Figura 2 – Localização da Península Antártica (a) e da Ilha Decepção, com os locais geotérmicos de Fumarole Bay e Whalers Bay destacados (b).....	11
Figura 3 – Ilha Decepation	23
Figura 4 – Ilha Rei George	23
Figura 5 – Preparação das Amostras: a) Processo de limpeza da superfície das amostras de pedra; b) Processo de fragmentação das amostras de pedra.....	24
Figura 6 – Processo de inoculação das amostras de pedra no meio sólido (NA com adição de nistatina)	25
Figura 7 – Processo de inoculação das amostras de pedra no meio líquido (Caldo Nutritivo).....	26
Figura 8 – Processo de Isolamento das Bactérias que cresceram ao redor dos fragmentos das amostras de pedra	27
Figura 9 – Meios de cultura teste: B4 (padrão); B4 ácido; B4 alcalino.....	29
Figura 10 – Processo de inoculação das bactérias isoladas nos meios de cultura teste (B4, B4 ácido e B4 alcalino).....	30
Figura 11 – Processo de recuperação dos cristais formados no biofilme bacteriano: a) Processo cuidadoso de extração do biofilme bacteriano junto com os cristais formados; b) Processo de aquecimento da amostra do biofilme com os cristais em água destilada; c) Cristais retidos no papel filtro, observados no estereoscópio	32
Figura 12 – a) Processo de coleta e traslado dos cristais para os suportes; b) Cristais colados nos suportes, prontos para a análise no MEV	33
Figura 13 – Amostras prontas para serem centrifugadas.....	35
Figura 14 – Processo de secagem das amostras na Placa de MALDI	36
Figura 15 – Equipamento MALDI Biotyper Sirius One (Bruker)	36
Figura 16 – Equipamento VITEK® 2 COMPACT	37
Figura 17 – Processo de transferencia dos 3,0 mL da solução salina estéril (NaCl) para os tubos de ensaio.....	38

Figura 18 – Processo de coleta da amostra da bactéria.....	38
Figura 19 – Processo de ajuste da densidade com ajuda do VITEK® 2 DensiCHEK™ Plus calibrado.....	39
Figura 20 – Cartas GN sendo colocadas no Cassete VITEK® 2 COMPACT.....	39
Figura 21 – Tabela especificando a densidade do inóculo de acordo com o padrão McFarland, dependendo da carta e do microrganismo a serem identificados.....	40
Figura 22 – Placas Petri com as 48 bactérias isoladas das diferentes amostras de pedra.....	41
Figura 23 – Bactérias crescidas ao redor dos fragmentos de pedra correspondentes às amostras de UP. É possível observar diferenças morfológicas como variações de cor e forma	42
Figura 24 – Bactérias crescidas ao redor dos fragmentos de pedra correspondentes às amostras do Refúgio. É notável a diferença de diversidade de crescimento entre as placas, tendo em conta que contém fragmentos da mesma amostra de pedra: a) Nessa placa é possível observar o crescimento de poucas colônias mais com as mesmas características morfológicas; b) Por outro lado nessa placa tem um crescimento bacteriano considerável, é possível observar colônias com diferenças morfológicas evidentes como cor e forma.....	43
Figura 25 – Colônias de bactérias crescidas na placa correspondente à diluição de 10^{-2} . Pelas características morfológicas observadas, parece que apenas um tipo de bactéria cresceu nesta placa	43
Figura 26 – Crescimento de bactérias ao redor dos fragmentos de pedra correspondentes à amostra de FB.....	44
Figura 27 – Bactérias isoladas.....	45
Figura 28 – Sistema de pontuação, onde: - Um score superior a 2.0 sugere uma identificação precisa a nível de espécie; - Entre 1.7 e 2.0 sugere uma identificação confiável a nível de gênero; - Inferior a 1.7 indica que a identificação é duvidosa ou falha	48
Figura 29 – Mudanças de cor nos meios testes (B4, B4 Ácido, B4 Alcalino): a) Meios teste recém inoculados pelas bactérias; b) Meios após aproximadamente 10 dias de incubação	55
Figura 30 – Acidificação do meio	56

Figura 31 – Cristais precipitados pela bactéria FB1: a) Cristais formados em meio B4; b) Cristais formados em meio B4 ácido; c) Cristais formados em meio B4 alcalino.....	58
Figura 32 – Teste Presença de Carbonato, com adição de HCL 0.1N, nas placas correspondentes à bactéria FB1. As imagens mostram o antes e o depois da adição do HCL 0.1N, evidenciando-se a liberação de CO ₂ nos locais exatos onde tem cristais formados: a) Teste em cristais formados em meio B4; b) Teste em cristais formados em meio B4 ácido; c) Teste em cristais formados em meio B4 alcalino...	62
Figura 33 – Microscópio eletrônico de varredura (MEV) Zeiss EVO-MA10, acoplado ao detector de espectroscopia de dispersão de energia (EDS) INCA x-act da Oxford Instrument (modelo 51-ADD0048)	64
Figura 34 – Gráfico dos espectros de uma das amostras de cristais gerado pelo microscópio eletrônico de varredura (MEV) Zeiss EVO-MA10, acoplado ao detector de espectroscopia de dispersão de energia (EDS) INCA x-act da Oxford Instrument (modelo 51-ADD0048).....	66
Figura 35 – Cristal de Carbonato de Cálcio, precipitado pela bactéria FB1, observado com microscópio eletrônico de varredura (MEV) Zeiss EVO-MA10. Para a obter essa imagen foi feito o processo deposição de ouro-paládio	67
Figura 36 – Cristais de Carbonato de Cálcio, precipitados pela bactéria UP6, observados e medidos implementando o microscópio eletrônico de varredura (MEV) Zeiss EVO-MA10	67
Figura 37 – Relatório gerado da bactéria UP11	88
Figura 38 – Relatório gerado da bactéria UP12.....	88
Figura 39 – Relatório gerado da bactéria UP13.....	89
Figura 40 – Relatório gerado da bactéria UP20.....	89
Figura 41 – Relatório gerado da bactéria UP26.....	89
Figura 42 – Relatório gerado da bactéria R2	90
Figura 43 – Relatório gerado da bactéria R3	90
Figura 44 – Gráfico do espectro de massa, correspondente à bactéria UP4.....	91
Figura 45 – Gráfico do espectro de massa, correspondente à bactéria UP19.....	91
Figura 46 – Gráfico do espectro de massa, correspondente à bactéria R9	92
Figura 47 – Gráfico do espectro de massa, correspondente à bactéria R11	92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Bactérias de Ulmann Point identificadas com o sistema MALDI Biotyper® sirius one.....	49
Tabela 2 – Bactérias do Refúgio identificadas com o sistema MALDI Biotyper® sirius one	50
Tabela 3 – Bactérias de Fumarole Bay identificadas com o sistema MALDI Biotyper® sirius one.....	50
Tabela 4 – Classificação das bactérias a serem analisadas pelo sistema VITEK® 2 COMPACT, pelo método de coloração de Gram.....	51
Tabela 5 – Bactérias identificadas com o sistema VITEK® 2 COMPACT	52
Tabela 6 – Evidências de climas onde podem ser encontradas as diferentes bactérias identificadas	54
Tabela 7 – Resultados dos testes de formação de cristais e mudanças de cor no meio de cultivo em cada uma das bactérias isoladas	59
Tabela 8 – Imagens e mapeamentos dos cristais implementando o microscópio eletrônico de varredura (MEV) Zeiss EVO-MA10, acoplado a um detector de espectroscopia de dispersão de energia (EDS) INCA x-act da Oxford Instrument (modelo 51-ADD0048).....	65

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	7
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	9
2.1 ANTÁRTICA: UM CONTINENTE DE CONTRASTES GEOGRÁFICOS E CLIMÁTICOS.....	9
2.2 BIOPROSPECÇÃO NA ANTÁRTICA.....	12
2.3 BIOPROSPECÇÃO COM BACTÉRIAS ENDOLÍTICAS	13
2.4 BIOPRECIPITAÇÃO DE CARBONATO DE CÁLCIO	15
2.5 CARBONATO DE CÁLCIO NA INDÚSTRIA	18
2.5.1 Carbonato de Cálcio em Cosméticos.....	19
3 JUSTIFICATIVA	21
4 OBJETIVOS	22
5 MATERIAIS E MÉTODOS	23
5.1 ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS ENDOLÍTICAS ASSOCIADAS A AMOSTRAS DE PEDRAS DA ANTÁRTICA	23
5.1.1 Preparação das Amostras.....	24
5.1.2 Inoculação em Meios de Cultura	25
5.1.3 Processo de Isolamento das Bactérias Endolíticas	26
5.1.3.1 Isolamento de Bactérias em Meio Sólido.....	27
5.1.3.2 Isolamento de Bactérias em Meio Líquido	27
5.2 TESTE DE BIOPRECIPITAÇÃO DE CARBONATO DE CÁLCIO	28
5.3 CONFIRMAÇÃO DA PRESENÇA DE CARBONATO DE CÁLCIO	30
5.3.1 Teste de Presença de Carbonato.....	31
5.3.2 Teste de Presença de Cálcio (MEV)	31
5.4 IDENTIFICAÇÃO DAS BACTÉRIAS ISOLADAS.....	34
5.4.1 Identificação pela técnica de espectrometria de massas por ionização e dessorção a laser assistida por matriz (MALDI-TOF MS).....	34
5.4.1.1 Preparação das Amostras Bacterianas.....	34
5.4.1.2 Extração de Proteínas	34
5.4.1.3 Aplicação na Placa de MALDI e Secagem.....	35

5.4.1.4 Identificação pelo MALDI-TOF MS	36
5.4.2 Identificação pelo Sistema VITEK® 2 COMPACT.....	37
6 RESULTADOS E DISCUSSÕES	41
6.1 ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS ENDOLÍTICAS	41
6.1.1 Bactérias isoladas da Amostras de pedra de Ulmann Point (UP)	41
6.1.2 Bactérias isoladas da Amostras de pedra do Refúgio.....	42
6.1.3 Bactérias isoladas da Amostras de pedra de Fumarole Bay (FB).....	44
6.1.4 Bactérias Previamente Isoladas nas Mesmas Regiões das Amostras de Pedra	45
6.1.4.1 Bactérias aisladas da Ilha Deception	45
6.1.4.2 Bactérias aisladas da Ilha Rei George	46
6.2 IDENTIFICAÇÃO DAS BACTÉRIAS ISOLADAS.....	47
6.2.1 Identificação pelo sistema MALDI Biotyper® Sirius One	47
6.2.1.1 Bactérias identificadas das amostras de pedra de Ulmann Point (UP).....	49
6.2.1.2 Bactérias identificadas das amostras de pedra do Refúgio	49
6.2.1.3 Bactérias identificadas das amostras de pedra de Fumarole Bay (FB)	50
6.2.2 Identificação pelo Sistema VITEK® 2 COMPACT.....	51
6.3 CARACTERÍSTICAS E CONSIDERAÇÕES DAS BACTÉRIAS IDENTIFICADAS	53
6.4 CAPACIDADE DE BIOPRECIPITAÇÃO DE CARBONATO DE CÁLCIO PELAS BACTÉRIAS ISOLADAS	55
6.4.1 Formação de Cristais e Mudanças de Cor no Meio de Cultura	55
6.4.2 Confirmação Presença de Carbonato.....	60
6.4.3 Confirmação Presença de Cálcio	63
6.4.4 Considerações sobre a Bioprecipitação de Carbonato de Cálcio por parte de Bactérias adaptadas a ambientes frios	68
7 CONCLUSÃO	70
REFERÊNCIAS	71
ANEXOS	87
ANEXO A – RELATÓRIOS GERADOS PELOS SISTEMA VITEK® 2 COMPACT	88

ANEXO B – ESPECTROS DE MASSAS GERADOS PELO MALDI-TOF MS..... 91

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, a bioprospecção tem demonstrado grande potencial, permitindo a descoberta e exploração de compostos para o desenvolvimento de diversos produtos relacionados às indústrias de cosméticos, biotecnologia agrícola, agroinsumos, botânica, medicina farmacêutica, entre outras (Artuso, 2002; Córdova-Albores *et al.*, 2021; Torres; Velho, 2009). A exploração de diferentes biomas e suas biodiversidades promove e incentiva a identificação de organismos, biomoléculas ou genes que sejam úteis para a indústria e, assim, possam gerar produtos com valor econômico atual ou potencial (Balick; Elisabetsky; Laird, 1996; Kozeretska *et al.*, 2021; Mosier; Murray; Fritsen, 2007; Shah *et al.*, 2020).

A Antártica, apesar de ter condições atmosféricas extremas, abriga uma surpreendente diversidade de vida, o que a tornou foco de interesse de pesquisadores que não estão apenas interessados em estudar as adaptações dos microrganismos às condições extremas da Antártica, mas também em avaliar possíveis usos dos metabólitos produzidos por eles, para aplicação na indústria (Oliart-ros *et al.*, 2016; Yarzabal, 2016). Um dos grupos de microrganismos que tem gerado grande interesse são as bactérias, pois tem sido evidenciado como elas conseguem viver em locais com condições climáticas extremas e, até, como são capazes de adquirir os recursos necessários para crescer no interior de rochas e minerais. Bactérias com essa capacidade de viver dentro de rochas são chamadas de bactérias endolíticas (Weber; Büdel, 2011; Stjepko Golubic, Imre Friedmann, Ju, 1981).

Essas bactérias têm desenvolvido adaptações para sobreviver em condições extremamente adversas em rochas e minerais. Uma das mais notáveis são as adaptações metabólicas que desenvolveram para obter nutrientes dos minerais circundantes (Williams *et al.*, 2024). Estas adaptações permitiram-lhes utilizar compostos inorgânicos como fonte de energia e carbono e algumas espécies desenvolveram a capacidade de oxidar minerais para obter energia (Andreas, 2018). Outra capacidade que essas bactérias podem ter como resultado de sua atividade metabólica é a de formar minerais extracelularmente, processo conhecido como bioprecipitação (Kumari *et al.*, 2016; Omoregie *et al.*, 2022; Reis *et al.*, 2017). Um dos minerais conhecidos que certas bactérias conseguem precipitar é o carbonato de cálcio (CaCO_3). Esta precipitação e que leva à produção de cristais de carbonato de cálcio, é gerados a partir de íons de cálcio e bicarbonato presentes no meio ambiente (Páramo Aguilera; Narváez Zapata; Ortega

Morales, 2015).

O carbonato de cálcio (CaCO_3) é um composto químico essencial em diversas indústrias devido à sua alta pureza, brancura, baixa abrasividade e insolubilidade em água. Além disso, o tamanho e a forma das partículas do CaCO_3 são características que o tornam atraente para a indústria. Atualmente, esse mineral possui uma ampla gama de aplicações, incluindo nas indústrias de plástico, vidro, concreto, alimentícia e, até mesmo, na indústria farmacêutica e na cosmetologia. Sua versatilidade e propriedades únicas, como a capacidade de melhorar as propriedades mecânicas e ópticas dos produtos, o tornam indispensável para melhorar a qualidade e eficiência na fabricação de uma ampla gama de produtos industriais (Betancourt *et al.*, 2007; Herrera Álvarez *et al.*, 2020; Niu *et al.*, 2022).

Ainda, as propriedades abrasivas, opacificantes e reguladoras de pH do CaCO_3 o tornam um componente essencial na indústria cosmética. Desta forma, é utilizado em uma variedade de produtos como pasta de dente, pós faciais, sombras de olhos e cremes, onde melhora a limpeza, proporciona um acabamento opaco e adiciona textura e consistência a esses produtos (Carretero; Pozo, 2010). Graças à sua capacidade de absorver o excesso de óleo e manter o pH equilibrado, este produto é perfeito para peles oleosas e sensíveis, melhorando a eficácia e qualidade dos cosméticos. Um bom exemplo, são os esfoliantes que implementam o carbonato de cálcio, por ter uma textura fina e suave que pode atuar como agente esfoliante mecânico, além de melhorar sua textura e consistência, tornando o produto mais fácil de aplicar e distribuir na pele (Marto *et al.*, 2020).

Diante de tudo o que foi mencionado, este trabalho buscou avaliar o potencial de bioprecipitação de carbonato de cálcio, por parte de bactérias isoladas de pedras coletadas no continente antártico, e propor seu possível uso na indústria cosmética. Apesar de existirem numerosos estudos sobre a capacidade das bactérias de precipitar carbonato de cálcio (Kumari *et al.*, 2016; Li; Silva; Passarini; Santos, 2017) e sua aplicação na recuperação de estruturas (Ortega-Villamagua *et al.*, 2022) e na produção de bioconcreto (Song *et al.*, 2022; Tyagi *et al.*, 2023), não há pesquisas que abordem o uso deste carbonato de cálcio bioprecipitado por bactérias na indústria cosmética. Este trabalho busca abrir novos horizontes e propor uma alternativa inovadora para a obtenção de carbonato de cálcio, explorando sua aplicação direta em produtos cosméticos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ANTÁRTICA: UM CONTINENTE DE CONTRASTES GEOGRÁFICOS E CLIMÁTICOS

A Antártica, considerada um dos continentes mais inóspitos e extremos do planeta, está localizada no hemisfério sul, além do Círculo Polar Antártico (66°S), na região conhecida como Polo Sul. Este vasto continente, com uma extensão próxima a 14 milhões de quilômetros quadrados, é o quinto maior do mundo, superado apenas pela Ásia, África, América do Norte e América do Sul (Boger, 2011; Hopkins *et al.*, 2006). Aproximadamente 98% do seu território está coberto por uma espessa camada de gelo que contém cerca de 70% da água doce do mundo, embora 0,35% da superfície, em áreas como os Vales Secos no leste das Montanhas Transantárticas, as zonas vulcânicas e os picos de montanhas, que chegam a 4.000 metros de altura, permaneçam livres de gelo durante parte ou todo o ano (Hopkins *et al.*, 2006).

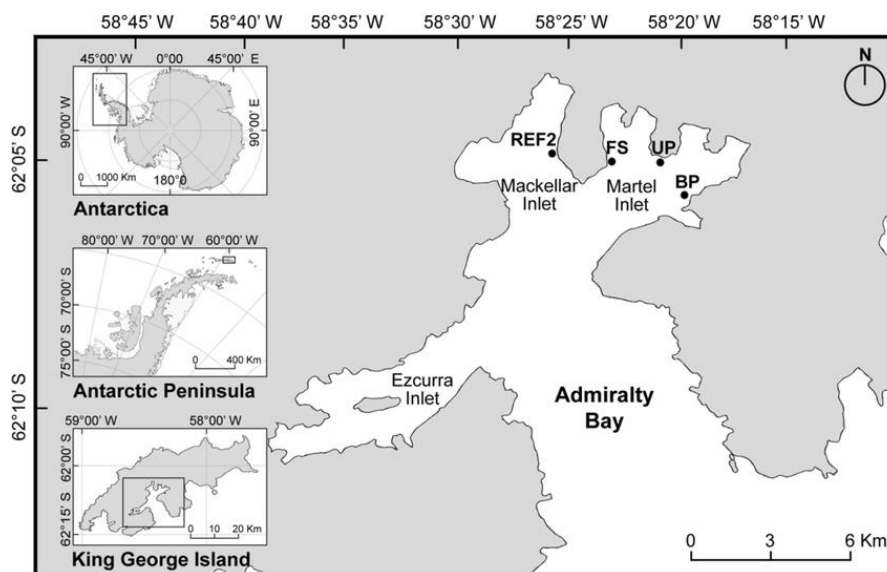
O clima da Antártica é extremamente severo, com temperaturas médias no verão que chegam a -30 °C e no inverno podem cair para -60 °C. Além disso, é uma das regiões mais áridas do mundo, com uma precipitação anual que varia entre 150 e 200 mm (Cannone *et al.*, 2022; Hopkins *et al.*, 2006). Também é o continente mais ventoso, com rajadas de vento que podem alcançar 327 km/h. A Antártica apresenta outras condições extremas, como alta exposição à radiação ultravioleta, ciclos intensos de congelamento e descongelamento, níveis elevados de salinidade, flutuações de pH e baixa disponibilidade de nutrientes, o que torna a vida nesta região extremamente desafiadora (Arenz & Blanchette, 2011; Bottos *et al.*, 2014; Gonçalves *et al.*, 2012).

Sem dúvida a Antártica é um continente de contrastes geográficos e climáticos, com vastas camadas de gelo, montanhas, vales secos e áreas costeiras. Apresenta uma gama de microclimas devido à sua topografia e localização: as áreas costeiras, como a Península Antártica, têm um clima mais temperado e úmido, enquanto o interior é extremamente frio e seco, com temperaturas que podem cair abaixo de -80°C (Alcântara; Dalto; Lavrado, 2024; Turner; Marshall, 2009). Os ventos catabáticos também criam microclimas ao afetar a temperatura e a umidade, enquanto áreas protegidas por montanhas experimentam condições mais quentes. A diversidade dos solos antárticos varia consideravelmente; nas áreas costeiras e nas ilhas, os solos são mais ricos em matéria orgânica, enquanto no interior são pobres em nutrientes e podem estar saturados de sais tóxicos (Alcântara; Dalto; Lavrado, 2024; Bascur *et al.*, 2021; Hopkins *et al.*, 2006; Mosier;

Murray; Fritsen, 2007).

Na zona do arquipélago das Shetland do Sul, na ponta norte da Península Antártica, encontra-se a Ilha Rei George, onde estão localizadas diversas estações de pesquisa, incluindo a Estação Antártica Comandante Ferraz do Brasil (Alcântara; Dalto; Lavrado, 2024; Rückamp *et al.*, 2011; Setzer, Alberto W.; Harter, 2004). Ullmann Point (UP) e Refúgio são áreas de estudo-chave na Baía Almirantado (Figura 1), Ilha Rei George. UP, um cabo próximo à Estação Antártica Comandante Ferraz, caracteriza-se por solos arenosos e gravosos com baixa capacidade de retenção de água e nutrientes, enquanto o Refúgio, localizado no Inlet Mackellar, possui solos mais finos e com maior proporção de lodo (mais de 59%), o que favorece uma maior retenção de água e nutrientes. Ambas as regiões experimentam um clima antártico severo, com baixas temperaturas, ventos fortes e nevascas frequentes (Alcântara; Dalto; Lavrado, 2024; Bascur *et al.*, 2021;).

Figura 1 - Baía do Almirantado (Ilha Rei George, Península Antártica). Os pontos representam as seguintes áreas: REF2 Refúgio, Estação FS Ferraz, UP Ullmann Point e BP Botany Point

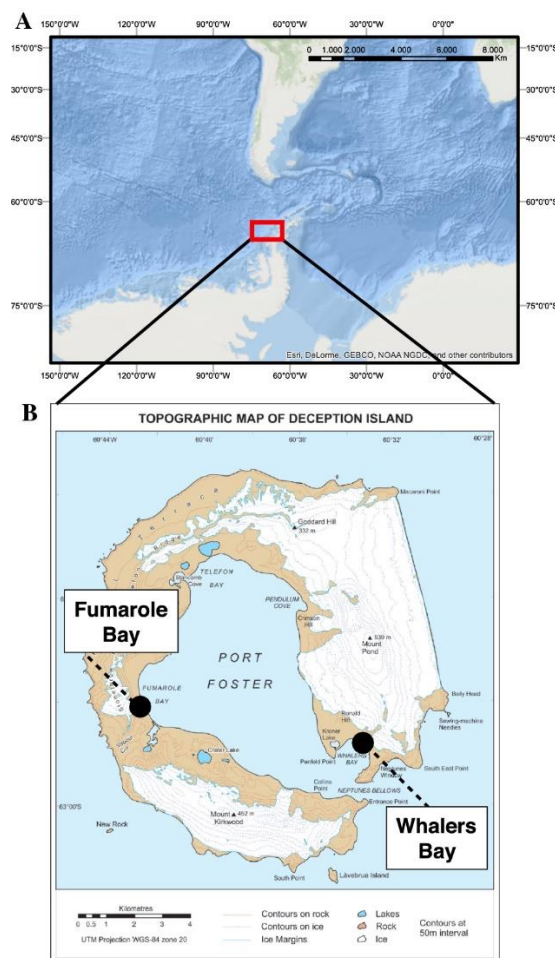


Fonte: (Alcântara; Dalto; Lavrado, 2024).

Em contraste, temos uma área conhecida como Fumarole Bay (FB), localizada na Ilha Deception (Figura 2), um estratovulcão marinho na Antártica, é uma região geograficamente notável por sua atividade geotérmica, onde fumarolas emitem vapor e gases a temperaturas que atingem até 98 °C, criando um contraste extremo com as áreas cobertas de gelo próximas. O clima nesta zona é característico da região antártica,

com variações drásticas de temperatura, permitindo a coexistência de organismos adaptados a diferentes faixas térmicas, desde termófilos, em calor intenso, até psicrófilos, em condições frias (Bottos *et al.*, 2014; Robert *et al.*, 2020; Ruisi *et al.*, 2007; Vaz *et al.*, 2011; Yergeau; Kowalchuk, 2008; Zgonik *et al.*, 2021). O solo da FB, influenciado pela atividade geotérmica e pela presença de sedimentos marinhos, é rico em minerais e nutrientes, o que favorece a colonização de microrganismos extremófilos. Esta combinação de altas temperaturas e composição mineral cria um ambiente propício para a vida microbiana, ressaltando a capacidade desses organismos para sobreviver em solos com condições extremas de desidratação e exposição à radiação ultravioleta (UV) (Bendia *et al.*, 2018; Hidalgo-Arias *et al.*, 2023).

Figura 2 – Localização da Península Antártica (a) e da Ilha Decepção, com os locais geotérmicos de Fumarole Bay e Whalers Bay destacados (b)



Fonte: (Bendia *et al.*, 2018).

Assim, enquanto UP e o Refúgio exemplificam a vida em ambientes áridos

e frios com solos limitados em nutrientes (Alcântara; Dalto; Lavrado, 2024), FB representa um ecossistema onde a atividade geotérmica proporciona um ambiente rico e diversificado, permitindo a coexistência de organismos que prosperam em extremos opostos de temperatura e composição do solo (Bendia *et al.*, 2018; Franco *et al.*, 2017; Musilova *et al.*, 2015).

2.2 BIOPROSPECÇÃO NA ANTÁRTICA

A Antártica, com seu clima extremo e geografia variada, é um lugar de grande interesse para a bioprospecção. Este continente apresenta habitats livres de gelo que vão desde áreas costeiras com solos ricos em nutrientes até desertos continentais e regiões de alta elevação com solos oligotróficos (Hopkins *et al.*, 2006). Embora a maioria dos ambientes terrestres na Antártica apresentem condições adversas, muitos solos abrigam comunidades de microrganismos extremófilos (Bottos *et al.*, 2014). Esses organismos desenvolveram adaptações singulares, como proteínas anticongelantes, enzimas eficientes a baixas temperaturas e a produção de químicos únicos, o que lhes permite sobreviver nesses ambientes desafiadores (Artuso, 2002; Bottos *et al.*, 2014; Robert *et al.*, 2020; Ruisi *et al.*, 2007; Vaz *et al.*, 2011; Yergeau; Kowalchuk, 2008).

Essas adaptações têm um grande potencial para aplicações na indústria da biotecnologia, como a produção de enzimas industriais, agentes de limpeza e outras substâncias com propriedades especiais (Artuso, 2002; Mosier; Murray; Fritsen, 2007). Estudos tem demonstrado a presença de uma variedade de organismos na Antártica, com características e capacidades de alto interesse biotecnológico (Chown *et al.*, 2015; Kozeretska *et al.*, 2021; Shah *et al.*, 2020; Silva *et al.*, 2021; Singh; Banik, 2013). Um dos que mais se destacam são as bactérias, possuindo adaptações extraordinárias às condições extremas deste continente. Esses microrganismos não apenas sobrevivem, mas prosperam em temperaturas extremamente baixas, alta salinidade e níveis elevados de radiação ultravioleta (Silva *et al.*, 2021; Smirnova *et al.*, 2020; Rocío *et al.*, 2021). Estudar essas bactérias pode revelar novos mecanismos de resistência e adaptação que podem ser aplicados em diversas áreas da biotecnologia (Artuso, 2002; Balick; Elisabetsky; Laird, 1996; Yarzabal, 2016).

Um exemplo é o fato de que essas bactérias produzem enzimas que são ativas em temperaturas baixas, as quais podem ser aplicadas na indústria alimentícia e em

processos industriais nos quais se requerem condições frias (Chandra *et al.*, 2020). Ademais, as bactérias da Antártica têm a capacidade de criar antibióticos e outros compostos bioativos que poderiam ser empregados no campo médico para enfrentar infecções que não respondem aos tratamentos atuais (Leiva *et al.*, 2015; Rocío *et al.*, 2021). A busca por bactérias na Antártica não apenas resulta na descoberta de novos compostos úteis, como também nos permite aprender mais sobre a vida em condições extremas e pode estimular o desenvolvimento de tecnologias e soluções biotecnológicas inovadoras (Artuso, 2002; Balick; Elisabetsky; Laird, 1996; Ramos *et al.*, 2019; Yarzabal, 2016).

Devido à importância dos microrganismos antárticos na produção de enzimas, antibióticos, solventes e probióticos, bem como sua influência no crescimento vegetal e controle biológico, o ecossistema antártico é frequentemente utilizado para isolar essas espécies (Leiva *et al.*, 2015; Ramos *et al.*, 2019; Rocío *et al.*, 2021; Smirnova *et al.*, 2020; Znój *et al.*, 2021). A biodiversidade antártica é vasta e há muitos aspectos ainda a serem explorados, o que poderia resultar na descoberta de compostos bioativos inéditos. A bioprospecção na Antártica já está sendo aproveitada tanto pela ciência quanto pela indústria, com diversos produtos encontrados sendo utilizados em setores como a farmacêutica e a cosmética (Leiva *et al.*, 2015; Rocío *et al.*, 2021; Silva *et al.*, 2021). Isso ressalta o imenso valor que este continente possui para ambos os setores.

2.3 BIOPROSPECÇÃO COM BACTÉRIAS ENDOLÍTICAS

A diversidade metabólica das bactérias torna a bioprospecção com elas fundamental, uma vez que isso possibilita a produção de diversos compostos bioativos com aplicações médicas importantes, como antibióticos e anticancerígenos (Badgeley *et al.*, 2021; Leiva *et al.*, 2015; Rocío *et al.*, 2021). As bactérias desempenham um papel essencial na biotecnologia moderna, sendo empregadas para a produção de biocombustíveis, remediação ambiental e síntese de produtos químicos valiosos (Brigham, 2019; Rajni Hatti-Kaul; Mattiasson, 2016). A busca por bactérias com potencial biológico tem resultado na identificação de medicamentos e tratamentos inovadores, o que impulsiona a sustentabilidade ao substituir produtos químicos sintéticos por alternativas naturais e diminuindo assim o impacto ambiental (Córdova-Albores *et al.*, 2021; Torres; Velho, 2009).

Microrganismos especializados como as bactérias endolíticas têm a habilidade única de habitar no interior de rochas e minerais. O termo “endolítico” provém do

grego, cujo significado é “dentro da pedra”, já que é formado pelas palavras “endo”, que significa dentro, e “lithos”, que se traduz como pedra (Weber; Büdel, 2011). Isso se refere ao seu habitat que está dentro das estruturas rochosas. As bactérias endolíticas, ao colonizar microfissuras e poros nas rochas, podem utilizar os minerais e a umidade presentes nesses ambientes (Omelon, 2016; Pérez; García, 2020; Wegner *et al.*, 2023). Essas bactérias desenvolveram características específicas para poder sobreviver e se reproduzir em condições ambientais desafiadoras, tais como a falta de nutrientes, intensa radiação e temperaturas extremamente altas (Córdova-Albores *et al.*, 2021; De Los Rã-Os *et al.*, 2007; Dupraz *et al.*, 2009; Omelon, 2016; Ortega-Villamagua *et al.*, 2022; Wegner *et al.*, 2023).

As adaptações que desenvolveram as bactérias endolíticas incluem a capacidade de metabolizar compostos inorgânicos, como sulfeto de hidrogênio (H_2S), ferro (Fe^{2+}) e amônia (NH_3), através da litotrofia, obtendo energia ao oxidar esses compostos, e a autotrofia, que lhes permite fixar dióxido de carbono (CO_2) para a biossíntese de compostos orgânicos (Andreas, 2018; Gadd, 2009; Kaplan *et al.*, 2022; Lai; Cooper, 2021; Wani *et al.*, 2022). Além disso, produzem substâncias protetoras como pigmentos fotoprotetores (carotenoides e melaninas) que as protegem contra a radiação ultravioleta (UV), e solutos crioprotetores (como trealose e glicerol) que evitam a formação de cristais de gelo em suas células, mantendo a integridade celular durante as flutuações extremas de temperatura (Lai; Cooper, 2021; Wynn-Williams; Edwards; Farran Garcia-Pichel, 1999; Silva *et al.*, 2021). Essas adaptações também incluem ajustes na composição da membrana, aumentando os ácidos graxos insaturados para assegurar a fluidez da membrana em ambientes frios (Coleine *et al.*, 2021; Hidalgo-Arias *et al.*, 2023; Russell, 1997; Williams *et al.*, 2024).

Outra das capacidades e adaptações mais destacadas das bactérias endolíticas é sua habilidade para precipitar minerais, particularmente carbonato de cálcio ($CaCO_3$), através de um processo conhecido como bioprecipitação (Kumari *et al.*, 2016; Omoregie *et al.*, 2022). Este ocorre quando as bactérias alteram as condições químicas do seu entorno, facilitando a formação de minerais a partir de íons presentes no ambiente. Um exemplo disso é a produção de urease por certas bactérias endolíticas, que hidrolisa a ureia em amônia e dióxido de carbono, aumentando o pH e favorecendo a precipitação de $CaCO_3$ (Gadd, 2009; Li; Cheng; Guo, 2013; Omoregie *et al.*, 2022; Reis *et al.*, 2017; Silva; Passarini; Santos, 2017).

Essa habilidade de precipitar minerais torna as bactérias endolíticas

particularmente interessantes para a bioprospecção, especialmente em regiões como a Antártica, onde as espécies adaptadas a climas extremos possuem capacidades biotecnológicas únicas com aplicações industriais valiosas (Bottos *et al.*, 2014; Córdova-Albores *et al.*, 2021; Hidalgo-Arias *et al.*, 2023; Robert *et al.*, 2020). Estas bactérias se destacam na biotecnologia não apenas pela produção de compostos bioativos e enzimas eficientes a baixas temperaturas, mas também pelo seu papel na precipitação mineral, que tem aplicações significativas na construção civil, na indústria cosmética e na remediação ambiental, onde são usadas para reparar fissuras em estruturas, compor produtos cosméticos e precipitar metais pesados em locais contaminados, respectivamente (Andreas, 2018; ; Silva *et al.*, 2021; Stjepko Golubic, Imre Friedmann, Ju, 1981; Ortiz-Galeana *et al.*, 2018; Pérez; García, 2020; Tyagi *et al.*, 2023; Zoppas; Bernardes; Meneguzzi, 2016).

2.4 BIOPRECIPITAÇÃO DE CARBONATO DE CÁLCIO

A bioprecipitação de carbonato de cálcio (CaCO_3) é de grande importância em diversas indústrias. Pela sua capacidade, por exemplo, de restaurar estruturas por meio do bioconcreto, selando automaticamente fissuras e melhorando a durabilidade das construções (Ortega-Villamagua *et al.*, 2022; Pérez; García, 2020; Seifan; Samani; Berenjian, 2016; Tyagi *et al.*, 2023). Também é utilizada no tratamento de águas, removendo metais pesados e contaminantes, e na estabilização de solos, aumentando sua resistência e prevenindo a erosão (Song *et al.*, 2022; Zoppas; Bernardes; Meneguzzi, 2016). Além disso, é fundamental na biorremediação, neutralizando solos contaminados, e na produção de materiais avançados com aplicações na medicina e eletrônica. Ademais, pode contribuir para a captura e armazenamento de carbono, ajudando a mitigar as mudanças climáticas ao fixar CO_2 na forma de carbonato de cálcio, tornando esse processo uma ferramenta ecológica e eficiente para melhorar a sustentabilidade industrial (Herrera Álvarez *et al.*, 2020; Niu *et al.*, 2022; Páramo Aguilera; Narváez Zapata; Ortega Morales, 2015; Reis *et al.*, 2017; Song *et al.*, 2022).

O processo de bioprecipitação, especificamente pela precipitação de carbonato de cálcio mediada por bactérias, envolve uma variedade de microrganismos, diferentes rotas metabólicas e ambientes variados. De forma geral, existem três mecanismos principais para a formação de carbonato de cálcio. O primeiro é a redução

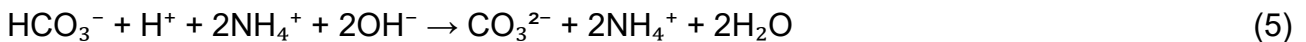
dissimilatória de sulfato, realizada por bactérias redutoras de sulfato em ambientes anóxicos, ou seja, na ausência de oxigênio e com presença de sulfato (Widdel, 1988). O segundo mecanismo é a conversão metabólica de sais de cálcio em condições aeróbias. O terceiro envolve a hidrólise da ureia, catalisada por enzimas presentes em bactérias ureolíticas (Dupraz *et al.*, 2009; Páramo Aguilera; Narváez Zapata; Ortega Morales, 2015; Pérez; García, 2020; Reis *et al.*, 2017).

O processo metabólico da redução dissimilatória de sulfato é realizado por bactérias redutoras de sulfato em condições anaeróbicas, onde o sulfato (SO_4^{2-}) atua como aceptor final de elétrons. Essas bactérias, utilizam compostos orgânicos como lactato ou acetato como doadores de elétrons para reduzir o sulfato a sulfeto de hidrogênio (H_2S) e produzir bicarbonato (HCO_3^-) como subproduto. O bicarbonato reage com o cálcio (Ca^{2+}) presente no ambiente, precipitando carbonato de cálcio (CaCO_3) (DUPRAZ *et al.*, 2009; Páramo Aguilera; Narváez Zapata; Ortega Morales, 2015; Widdel, 1988; Shriver; Peter William Atkins; Langford, 2007).

Por outra parte no processo de conversão metabólica aeróbica de sais de cálcio, certas bactérias induzem a oxidação de um sal de cálcio orgânico, como o acetato de cálcio ($\text{Ca}(\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_4)$) ou o lactato de cálcio ($\text{Ca}(\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_6)$), para gerar carbonato de cálcio (CaCO_3), dióxido de carbono (CO_2) e água (H_2O). Esse processo ocorre sob condições ambientais favoráveis, como temperatura e pH adequados, além da presença de água, oxigênio e nutrientes, que são essenciais para o crescimento e desenvolvimento das bactérias (Dupraz *et al.*, 2009; Páramo Aguilera; Narváez Zapata; Ortega Morales, 2015; Zoppas; Bernardes; Meneguzzi, 2016).

O processo de hidrólise enzimática da ureia é catalisado pela enzima urease, produzida por bactérias ureolíticas, que converte a ureia ($\text{CO}(\text{NH}_2)_2$) em amônia (NH_4^+) e carbonato (CO_3^{2-}) através de várias reações químicas. Inicialmente, a ureia é hidrolisada intracelularmente em carbamato (NH_2COOH) e amônia (NH_3) (Eq. 1). Em seguida, o carbamato se hidrolisa espontaneamente para formar mais amônia e ácido carbônico (H_2CO_3) (Eq. 2). O ácido carbônico se dissocia em bicarbonato (HCO_3^-) e íon hidrogênio (Eq. 3), enquanto as moléculas de amônia se convertem em íons amônio (NH_4^+) e íons hidróxido (OH^-), aumentando o pH do meio (Eq. 4). Posteriormente, as moléculas produzidas nas equações 3 e 4 reagem e produzem uma molécula de carbonato (CO_3^{2-}) e duas moléculas de amônio (2NH_4^+) (Eq. 5) (Dupraz *et al.*, 2009; Gadd, 2009; Li; Cheng; Guo, 2013; Longo; Melo, 2005; Páramo Aguilera; Narváez Zapata; Ortega Morales, 2015;

Reis *et al.*, 2017; Shriver; Peter William Atkins; Langford, 2007; Rodrigues *et al.*, 2023; Silva; Passarini; Santos, 2017).



Esse aumento de pH gera um ambiente favorável para a precipitação de carbonato de cálcio (CaCO_3), já que os íons bicarbonato reagem com os íons de cálcio (Ca^{2+}) presentes no ambiente. As bactérias, carregadas negativamente pela presença do íon CO_3^{2-} em sua parede celular, atraem íons de cálcio, que se depositam e reagem com o carbonato, resultando na precipitação de CaCO_3 (Eq. 6 e 7) (Dupraz *et al.*, 2009; Longo; Melo, 2005; Páramo Aguilera; Narváez Zapata; Ortega Morales, 2015; Reis *et al.*, 2017; Shriver; Peter William Atkins; Langford, 2007; Silva; Passarini; Santos, 2017).



Dentre os três mecanismos para precipitar o carbonato de cálcio, a decomposição da ureia pelas bactérias ureolíticas é o mais utilizado entre as pesquisas já desenvolvidas, devido à sua simplicidade de controle e eficiência operacional. Esse processo permite um controle direto do pH local através da produção de amônia, o que favorece a precipitação rápida e eficiente de CaCO_3 em condições alcalinas. Ao contrário dos outros métodos, que requerem condições mais específicas e difíceis de manter, como a presença de oxigênio ou ambientes anaeróbicos, a hidrólise da ureia é mais flexível e facilmente ajustável ao modificar a concentração de ureia ou a quantidade de bactérias (Dupraz *et al.*, 2009; Gadd, 2009; Longo; Melo, 2005; Li; Cheng; Guo, 2013; Páramo Aguilera; Narváez Zapata; Ortega Morales, 2015; Pérez; García, 2020; Reis *et al.*, 2017; Rodrigues *et al.*, 2023; Shriver; Peter William Atkins; Langford, 2007; Silva; Passarini; Santos, 2017).

2.5 CARBONATO DE CÁLCIO NA INDÚSTRIA

O carbonato de cálcio (CaCO_3) é um composto inorgânico de grande relevância na natureza e em diversas indústrias, conhecido por suas propriedades físico-químicas como a alta brancura, baixa abrasividade, pH neutro e insolubilidade em água, embora reaja com ácidos liberando dióxido de carbono (Al Omari *et al.*, 2016; Shriver; Peter William Atkins; Langford, 2007). Encontra-se em rochas sedimentares como calcário, mármore e calcita, e é utilizado em múltiplas aplicações industriais. Na construção, é empregado na fabricação de cimento e como enchimento em concreto; na indústria alimentícia, atua como suplemento de cálcio e antiaglomerante; na fabricação de papel e plásticos, melhora a opacidade e a resistência mecânica; em tintas, oferece maior cobertura e durabilidade; e na agricultura, é utilizado como corretivo de solos ácidos. Além disso, é fundamental no tratamento de águas como neutralizador de acidez (Betancourt *et al.*, 2007; Herrera Álvarez *et al.*, 2020; Niu *et al.*, 2022; Páramo Aguilera; Narváez Zapata; Ortega Morales, 2015; Reis *et al.*, 2017; Song *et al.*, 2022).

O CaCO_3 usado na indústria pode ser obtido de duas formas principais: calcita natural e carbonato de cálcio precipitado (PCC). O carbonato de cálcio natural é obtido a partir de fontes minerais como calcário e mármore (Reeder, 1983). Ele passa por um processo de trituração e purificação, que oferece benefícios como baixo custo e abundância. No entanto, existem desvantagens consideráveis associadas a ele, tais como a variação na sua pureza. Adicionalmente, a extração de CaCO_3 natural resulta em danos ambientais significativos, pois implica na exploração e no comprometimento dos ecossistemas presentes nas áreas de mineração, o que contribui para o desmatamento e a perda dos habitats naturais. Além disso, o PCC pode ser sintetizado através da reação controlada entre CO_2 e hidróxido de cálcio, resultando em um produto altamente puro com tamanho das partículas meticulosamente controlado. Essas características fazem dele a escolha ideal para indústrias como cosméticos, farmacêutica e plásticos. No entanto, o PCC tem um custo de produção mais elevado e, além de depender de insumos químicos, o processo pode gerar resíduos indesejáveis, como subprodutos líquidos e sólidos que precisam ser adequadamente tratados para evitar impactos ambientais (Andreassen, 2005; Carretero; Pozo, 2010; Herrera Álvarez *et al.*, 2020; Rodriguez-Blanco; Shaw; Benning, 2011; Takabait *et al.*, 2016; Trushina *et al.*, 2014).

2.5.1 Carbonato de Cálcio em Cosméticos

O carbonato de cálcio (CaCO_3) é um ingrediente comum e versátil na indústria cosmética devido às suas propriedades físico-químicas, mencionadas anteriormente, que oferecem múltiplos benefícios às formulações de produtos de cuidado pessoal e beleza. Entre essas propriedades destacam-se sua baixa abrasividade, pH neutro, alta branquidão, e sua capacidade de atuar como agente espessante, opacificante, preenchedor e abrasivo suave (Herrera Álvarez *et al.*, 2020; Niu *et al.*, 2022; Páramo Aguilera; Narváez Zapata; Ortega Morales, 2015; Reis *et al.*, 2017; Song *et al.*, 2022; Shriver; Peter William Atkins; Langford, 2007).

Um dos usos mais comuns do CaCO_3 é em cremes dentais, onde é empregado como agente abrasivo suave. Sua principal função é ajudar a eliminar a placa e as manchas superficiais dos dentes sem danificar o esmalte, o que o torna um ingrediente ideal para produtos de cuidados dentários. Além disso, sua capacidade de neutralizar ácidos na boca contribui para prevenir a erosão dentária, ao mesmo tempo que ajuda a manter um equilíbrio adequado do pH oral, melhorando a saúde bucal dos usuários. O uso do CaCO_3 no cuidado bucal é conhecido há muitos anos e também possui certo poder antimicrobiano, o que adiciona uma razão extra para incluí-lo em preparações dentais (Carella *et al.*, 2021; Carretero; Pozo, 2010; Hamideh Sadat Mohammadipour *et al.*, 2024; Lynch; Ten Cate, 2005; Mattar *et al.*, 2019).

Em produtos como pós faciais e maquiagens, o CaCO_3 é utilizado como opacificante e preenchedor, melhorando a textura e proporcionando um acabamento mais profissional ao produto. Sua cor branco calcário, ajuda a uniformizar a cor e a textura do produto, além de funcionar como um potenciador estético que melhora o aspecto geral da fórmula. Além disso, oferece um efeito mate ao absorver o excesso de oleosidade e sebo da pele, o que reduz o brilho indesejado e proporciona um acabamento uniforme e suave. Devido ao seu pH neutro, é adequado até mesmo para produtos destinados a peles sensíveis, pois não irrita a pele. Além disso, funciona como aglutinante, melhorando a capacidade de espalhamento dos pós prensados (Al Omari *et al.*, 2016; Carretero; Pozo, 2010; Marto *et al.*, 2020).

O uso do CaCO_3 em esfoliantes é particularmente importante devido à sua baixa abrasividade, o que permite eliminar as células mortas da pele de maneira eficaz, mas suave, sem causar irritação. Sua ação esfoliante é suficientemente suave para não danificar a pele, mas eficaz para melhorar a textura e o brilho, tornando-o um ingrediente-

chave em esfoliantes tanto faciais quanto corporais. Além de sua função abrasiva, o carbonato de cálcio também atua como absorvente, ajudando a eliminar o excesso de oleosidade e deixando a pele mais limpa e fresca (Al Omari *et al.*, 2016; Carella *et al.*, 2021; Carretero; Pozo, 2010; Kuhlmann, 2001; Marto *et al.*, 2020; Shriver; Peter William Atkins; Langford, 2007);

No caso de cremes e loções, o CaCO_3 funciona como espessante e agente amortecedor, melhorando a consistência do produto e estabilizando a fórmula, evitando a separação dos ingredientes ativos. Além disso, proporciona uma sensação suave e agradável ao toque, tornando a aplicação do produto mais confortável. Nos desodorantes, o carbonato de cálcio atua como um agente absorvente que neutraliza odores e absorve a umidade, oferecendo uma opção suave e não irritante em comparação com outros compostos mais agressivos. Sua capacidade de manter o pH equilibrado também o torna ideal para produtos destinados a peles sensíveis, evitando irritações e garantindo um uso mais confortável. Todas essas propriedades mencionadas fazem do CaCO_3 um ingrediente essencial em diversas formulações cosméticas, melhorando a funcionalidade, a estética e a experiência geral do usuário, ao mesmo tempo que estabiliza e otimiza a performance dos produtos (Carretero; Pozo, 2010; Di Maiuta; Schwarzentruher, 2011; Kuhlmann, 2001; Marto *et al.*, 2020).

3 JUSTIFICATIVA

O carbonato de cálcio é amplamente utilizado em diversas indústrias devido às suas propriedades versáteis, como opacidade e absorção de umidade, especialmente na indústria cosmética. No entanto, sua extração a partir de depósitos naturais, como calcário, apresenta desvantagens significativas, incluindo a destruição de habitats, a perda da biodiversidade local e a contribuição para o aumento das emissões de gases de efeito estufa, devido ao processo intensivo de mineração e produção. Além disso, esses métodos tradicionais exigem grande consumo de energia e geram impactos ambientais irreversíveis.

Embora existam alternativas como o PCC (carbonato de cálcio precipitado), que pode ser considerada uma abordagem mais sustentável, este processo também apresenta desafios. A produção de subprodutos e resíduos exige um gerenciamento cuidadoso para evitar danos ao meio ambiente. Nesse contexto, o desenvolvimento de novas técnicas biotecnológicas que reduzam esses impactos é crucial.

A bioprospecção e a biotecnologia têm como objetivo principal a busca por soluções mais sustentáveis e inovadoras. Este trabalho propõe a utilização de bactérias endolíticas na produção de carbonato de cálcio, uma abordagem que busca minimizar os impactos ambientais e atender à demanda da indústria cosmética por ingredientes mais sustentáveis. A aplicação de microrganismos para a bioprecipitação de carbonato de cálcio não apenas oferece uma alternativa ecológica, mas também pode resultar em processos de produção mais eficientes e com menor geração de resíduos, contribuindo para a economia circular e a preservação do meio ambiente.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial de bioprecipitação de carbonato de cálcio por bactérias endolíticas isoladas de amostras de pedras da Antártica para sua aplicação na indústria cosmética.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar e identificar bactérias endolíticas presentes em três diferentes amostras de pedras coletadas na Antártica: Fumarole Bay, Ullmann Point e Refúgio.
- Realizar a bioprospecção de bactérias endolíticas em amostras de pedras da Antártica, identificando e selecionando cepas com potencial biotecnológico para a bioprecipitação de carbonato de cálcio.
- Avaliar a capacidade dessas bactérias de bioprecipitar carbonato de cálcio em diferentes condições de pH, utilizando meios de cultura específicos.
- Analisar a morfologia e o tamanho dos cristais de carbonato de cálcio formados pelas bactérias, utilizando estereomicroscopia e técnicas de caracterização mineral.
- Confirmar a presença de carbonato de cálcio nos cristais formados, através de testes químicos e microscopia eletrônica de varredura.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS ENDOLÍTICAS ASSOCIADAS A AMOSTRAS DE PEDRAS DA ANTÁRTICA

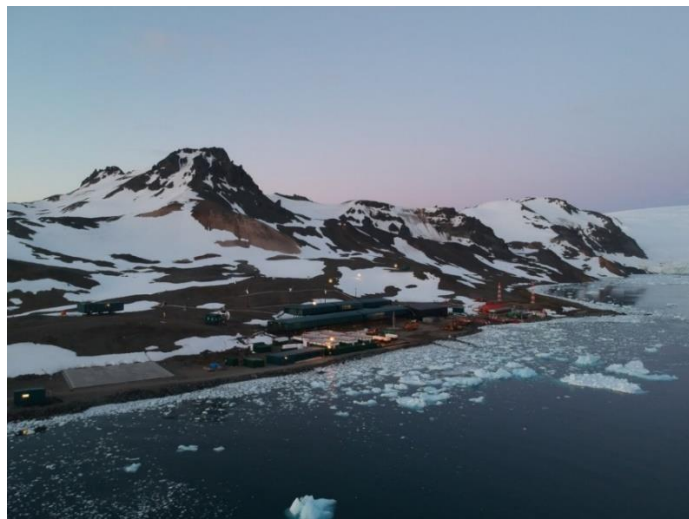
Para o isolamento de bactérias endolíticas, foram utilizadas três amostras de pedras coletadas durante a Expedição Antártica (OPERANTAR 41), em diferentes localidades da Antártica: Fumarole Bay (FB), Ilha Deception (Figuras 2 e 3); Ulmann Point (UP), Ilha Rei George e Refúgio, Ilha Rei George (Figuras 1 e 4). Essas amostras foram transportadas e armazenadas sob congelamento para preservar sua integridade e minimizar a contaminação.

Figura 3 - Ilha Deception



Fonte: ("Deception Island | | Alluring World", 2018).

Figura 4 - Ilha Rei George



Fonte: (National Geographic, 2020).

5.1.1 Preparação das Amostras

Inicialmente, as amostras de pedras foram retiradas do congelador onde haviam sido preservadas. As amostras estavam cuidadosamente embaladas para evitar qualquer tipo de contaminação durante a manipulação. Uma vez fora do congelador, as pedras foram transferidas para uma cabine de fluxo laminar previamente desinfetada. A cabine foi limpa com álcool a 70% e esterilizada por meio da aplicação de luz ultravioleta (UV) durante um período adequado para garantir um ambiente livre de contaminantes.

Dentro da cabine de fluxo laminar, procedeu-se ao desempacotamento de cada amostra de pedra com cuidado, colocando-a em um recipiente desinfetado. Para eliminar qualquer possível contaminação superficial, as amostras foram cuidadosamente limpas com toques suaves na superfície, utilizando um pedaço de papel umedecido em álcool a 70%, garantindo que as bactérias isoladas proviessem do interior das pedras e não da superfície externa (Figura 5).

Em seguida, procedeu-se à fragmentação das amostras de pedra. Utilizando um martelo e uma chave de fenda de ponta plana desinfetados, as pedras foram quebradas em pequenos fragmentos (Figura 5). Esta etapa foi essencial para acessar as bactérias endolíticas localizadas no interior das amostras, permitindo que estivessem mais expostas e em contato direto com os meios de cultura utilizados para seu crescimento.

Figura 5 - Preparação das Amostras: a) Processo de limpeza da superfície das amostras de pedra; b) Processo de fragmentação das amostras de pedra



a)

b)

Fonte: Autora, 2023.

5.1.2 Inoculação em Meios de Cultura

Os fragmentos obtidos foram inoculados em meios de cultura tanto líquidos quanto sólidos para favorecer o crescimento bacteriano. Para a inoculação em meio sólido, foram utilizadas placas de Petri contendo Ágar Nutritivo (NA) (extrato de carne 3 g L⁻¹; peptona 5 g L⁻¹; ágar 15 g L⁻¹) com adição de 10.000 U L⁻¹ de nistatina para evitar o crescimento de fungos. Em cada placa de Petri, foram colocados três pequenos fragmentos de pedra, posicionados o mais afastados possível entre si (Figura 6). Ao colocar os fragmentos no meio de cultura, pressionou-se levemente cada pedra contra o meio NA, garantindo uma boa fixação e um contato eficiente dos fragmentos com os nutrientes do meio. Este procedimento foi repetido em triplicata para cada amostra de pedra.

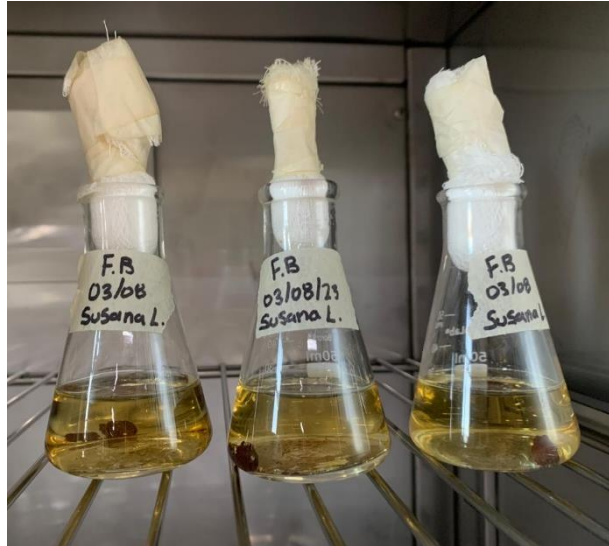
Figura 6 – Processo de inoculação das amostras de pedra no meio sólido (NA com adição de nistatina)



Fonte: Autora, 2023.

Para a inoculação em meio líquido, foram utilizados frascos Erlenmeyer de 50 mL contendo 30 mL de Caldo Nutritivo (Extrato de Carne 1,0 g L⁻¹; Extrato de Levedura 2,0 g L⁻¹; Peptona 5,0 g L⁻¹; Cloreto de Sódio 5,0 g L⁻¹). Dentro de cada Erlenmeyer foi depositado um fragmento de pedra (Figura 7). Este processo também foi repetido em triplicata para as três diferentes amostras de pedra.

Figura 7 – Processo de inoculação das amostras de pedra no meio líquido (Caldo Nutritivo)



Fonte: Autora, 2023.

Após a inoculação, tanto as placas de Petri quanto os frascos Erlenmeyer foram incubados em condições adequadas para cada tipo de amostra, sem agitação para os Erlenmeyer contendo meio líquido e fragmentos de pedra (Figura 7). As amostras foram mantidas nas temperaturas adequadas de acordo com suas origens. As amostras correspondentes às pedras de Ulmann Point (UP) e do Refúgio foram colocadas para crescer em refrigerador a aproximadamente 12 °C, com um tempo de incubação de 72 horas, considerando que essas amostras provêm de um clima frio. Por outro lado, as amostras de pedra extraídas de Fumarole Bay (FB) foram incubadas em estufa a uma temperatura mais elevada (24 °C), com um tempo de incubação de 48 horas, levando em conta que esta amostra provém de um solo vulcânico, cuja temperatura é ligeiramente superior em comparação com os solos de UP e Refúgio.

5.1.3 Processo de Isolamento das Bactérias Endolíticas

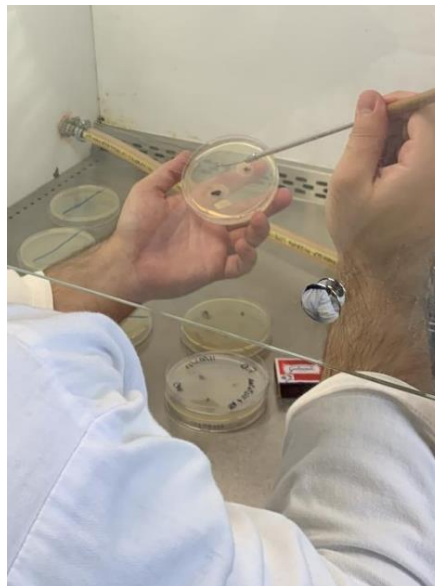
Após um período de incubação de 48 horas, as amostras correspondentes a Fumarole Bay (FB) foram retiradas da estufa para analisar o crescimento bacteriano e proceder com o isolamento. A seguir, são detalhados os procedimentos realizados tanto para as bactérias que cresceram em meio sólido quanto para aquelas que se

desenvolveram em meio líquido:

5.1.3.1 Isolamento de Bactérias em Meio Sólido

Para o isolamento em meio sólido, foram selecionadas pequenas porções de cada colônia diferenciada que cresceram ao redor dos fragmentos de pedra nas placas de Petri com Ágar Nutritivo (NA) e nistatina (Figura 8). Essas colônias se caracterizavam por apresentar diferenças morfológicas em termos de tamanho, cor, forma e borda. Utilizando uma alça bacteriológica estéril, foi retirada uma pequena porção de cada colônia e inoculada em uma nova placa de Petri com meio NA e nistatina, empregando o método de estria por esgotamento. Procurando, assim, obter cultivos puros de cada tipo de bactéria, garantindo o crescimento de um único tipo de microrganismo nas novas placas. Este processo foi repetido para cada placa com fragmentos de pedra, assegurando o isolamento de todas as morfologias bacterianas observadas ao redor dos fragmentos.

Figura 8 – Processo de Isolamento das Bactérias que cresceram ao redor dos fragmentos das amostras de pedra



Fonte: Autora, 2023.

5.1.3.2 Isolamento de Bactérias em Meio Líquido

Para as bactérias que cresceram em meio líquido, foi realizada uma série

de diluições antes de transferi-las para meios sólidos. Foram preparados quatro tubos do tipo Falcon estéreis, cada um contendo 9 mL de diluente estéril (0,1% de peptona). Os tubos foram rotulados com as respectivas diluições (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4}). A partir de cada Erlenmeyer com o caldo nutritivo e as bactérias, foi retirado 1 mL e transferido para o primeiro tubo, correspondente à diluição 10^{-1} , e foi homogeneizado cuidadosamente. Dessa primeira diluição, foi retirado 1 mL e transferido para o segundo tubo (10^{-2}), repetindo este procedimento até alcançar a diluição 10^{-4} .

Em seguida, foi retirado 1 mL de cada uma das diluições (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}) e transferido para placas de Petri estéreis com meio NA e nistatina. Utilizando uma alça de Drigalski, a amostra foi espalhada por toda a superfície do meio, assegurando uma distribuição uniforme das bactérias. Posteriormente, todas as placas foram incubadas novamente na estufa na mesma temperatura utilizada previamente.

O mesmo procedimento descrito anteriormente foi realizado com as amostras de Ulmann Point (UP) e Refúgio, com a diferença de que estas foram deixadas incubando por mais um dia no refrigerador a aproximadamente 12 °C. Isso se deve ao fato de que essas amostras, ao crescerem em uma temperatura mais baixa, requerem um tempo de incubação mais prolongado para que se observe um crescimento bacteriano ideal.

5.2 TESTE DE BIOPRECIPITAÇÃO DE CARBONATO DE CÁLCIO

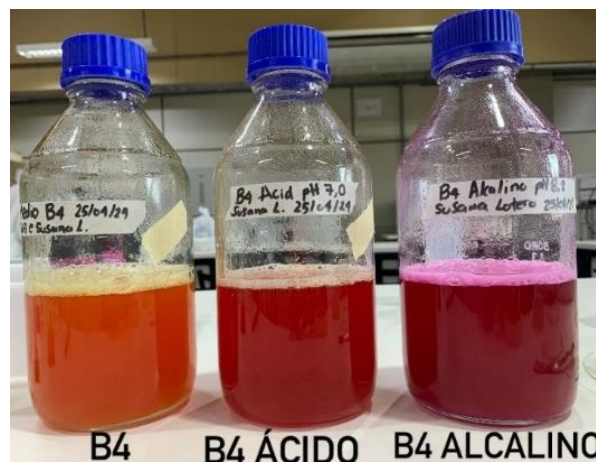
Após o isolamento das diferentes bactérias, procedeu-se à realização de testes para verificar a capacidade dessas bactérias de bioprecipitar carbonato de cálcio. Para isso, cada bactéria isolada foi cultivada em três diferentes meios de cultura (Figura 9), conforme procedimentos descritos por Marvasi; Davila-Vazquez; Martinez (2013) e Marvasi et al. (2010).

- 1) Meio padrão B4: Contendo 4 g L⁻¹ de extrato de levedura, 14 g L⁻¹ de ágar bacteriológico, 2,5 mL L⁻¹ de solução de vermelho de fenol, 12,5 mL L⁻¹ de glicose a 40% e 25 mL L⁻¹ de acetato de cálcio a 10% (Figura 9).
- 2) Meio ácido B4 tamponado a pH 7: Composto por 4 g L⁻¹ de extrato de levedura, 12 g L⁻¹ de TRIS, 14 g L⁻¹ de ágar bacteriológico, 2,5 mL L⁻¹ de solução de vermelho

de fenol, 12,5 mL L⁻¹ de glicose a 40%, 25 mL L⁻¹ de acetato de cálcio a 10%, pH ajustado para 7 com HCl 1N (Figura 9).

- 3) Meio básico B4 tamponado a pH 8,2: Contendo 4 g L⁻¹ de extrato de levedura, 12 g L⁻¹ de TRIS, 14 g L⁻¹ de ágar bacteriológico, 2,5 mL L⁻¹ de solução de vermelho de fenol, 12,5 mL L⁻¹ de glicose a 40%, 25 mL L⁻¹ de acetato de cálcio a 10%, pH ajustado para 8,2 com HCl 1N (Figura 9).

Figura 9 – Meios de cultura teste: B4 (padrão); B4 ácido; B4 alcalino



a)

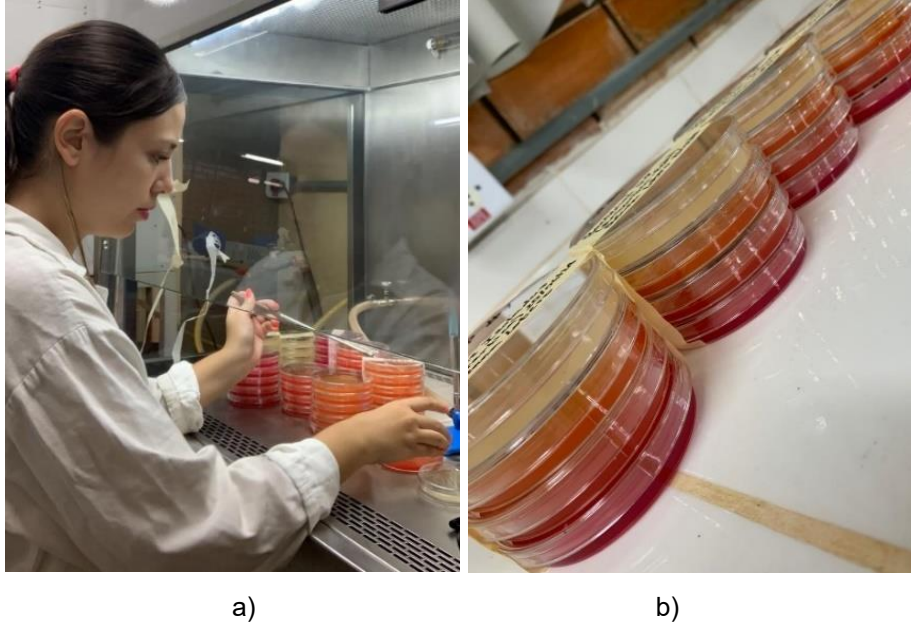


b)

Fonte: Autora, 2024.

Cada bactéria isolada foi inoculada nos três meios de cultura mencionados (Figura 10). As placas de Petri foram incubadas em condições de temperatura específicas, conforme o local de origem da amostra de pedra de onde a bactéria foi isolada, mantendo-se as temperaturas de incubação utilizadas no processo inicial de isolamento: 12°C para as amostras de Ulmann Point (UP) e Refúgio, e 24°C para as amostras de Fumarole Bay (FB).

Figura 10 – Processo de inoculação das bactérias isoladas nos meios de cultura teste (B4, B4 ácido e B4 alcalino)



Fonte: Autora, 2024.

Durante o período de incubação, foi realizado um monitoramento periódico das placas para observar o desenvolvimento e as alterações nos meios de cultura. As observações foram realizadas nos seguintes intervalos: 3 dias após a inoculação, 7 dias após a inoculação e, por fim, 10 dias após a inoculação. Durante estas avaliações, foram analisadas possíveis mudanças no meio de cultura, como variação de cor, e o aparecimento de cristais na superfície das colônias bacterianas.

Para a análise das placas, foi utilizado um estereoscópio (Carl Zeiss Stemi 305) o que permitiu a observação detalhada da formação de cristais na superfície das colônias bacterianas. Além disso, foi possível correlacionar a formação dos cristais com alterações de cor nos diferentes meios de cultura, indicando a capacidade das bactérias de induzir a precipitação de carbonato de cálcio em diferentes condições de pH.

5.3 CONFIRMAÇÃO DA PRESENÇA DE CARBONATO DE CÁLCIO

Após o período de incubação de 10 dias, durante o qual já era possível visualizar a formação de cristais na superfície do biofilme bacteriano, foram realizados dois

testes para confirmar a presença de carbonato de cálcio: um para identificar a presença do íon carbonato e outro para detectar o cálcio.

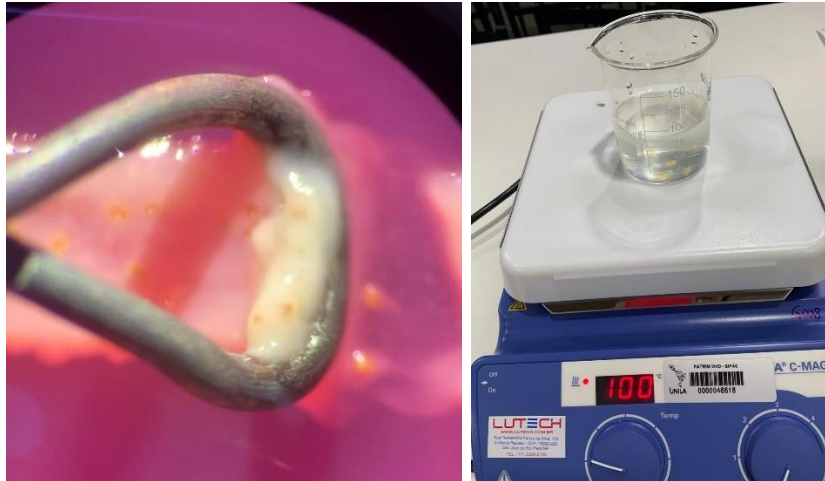
5.3.1 Teste de Presença de Carbonato

O primeiro teste consistiu na adição de ácido clorídrico (HCl) diretamente nas placas onde se evidenciava a maior formação de cristais. Utilizando uma pipeta Pasteur, aplicou-se uma pequena quantidade de HCl 0.1N na área da placa com maior concentração de cristais visíveis. A formação imediata de bolhas (efervescência) na região em contato com o ácido indicou a presença de carbonato de cálcio, como é descrito por Marvasi; Davila-Vazquez; Martinez (2013) e Marvasi et al. (2010).

5.3.2 Teste de Presença de Cálcio (MEV)

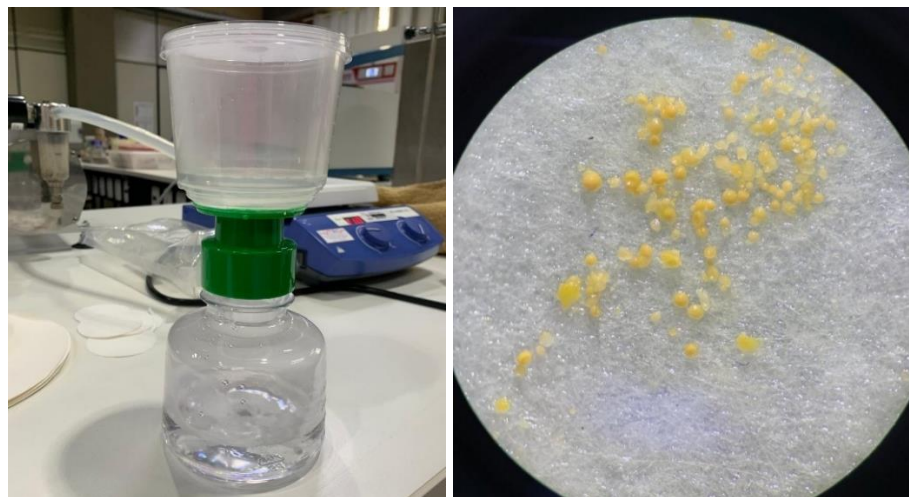
Para confirmar a presença de cálcio, os cristais formados pelas bactérias foram analisados com um microscópio eletrônico de varredura (MEV) (Zeiss EVO-MA10) acoplado a um detector de espectroscopia de dispersão de energia (EDS) (INCA x-act da Oxford Instrument modelo 51-ADD0048). Inicialmente, foi necessário recuperar os cristais formados no biofilme bacteriano, conforme procedimentos descritos por Marvasi; Davila-Vazquez; Martinez (2013). Para isso, o biofilme contendo os cristais foi cuidadosamente coletado utilizando uma alça bacteriológica de ponta redonda (Figura 9 (a)). A amostra de bactérias e cristais foi depositada em um béquer de 150 mL contendo 80 mL de água destilada. Esta solução foi então aquecida por 20 minutos a uma temperatura de 100°C (Figura 11 (b)). Após o aquecimento, a solução foi filtrada fazendo uso de um sistema de filtração a vácuo com discos de papel filtro, no qual os cristais ficaram retidos (Figura 11 (c) e (d)). Essa etapa de recuperação dos cristais, foi realizada no Laboratório de Pesquisa G011, Jardim Universitário, Unila.

Figura 11 – Processo de recuperação dos cristais formados no biofilme bacteriano: a) Processo cuidadoso de extração do biofilme bacteriano junto com os cristais formados; b) Processo de aquecimento da amostra do biofilme com os cristais em água destilada; c) Cristais retidos no papel filtro, observados no estereoscópio



a)

b)



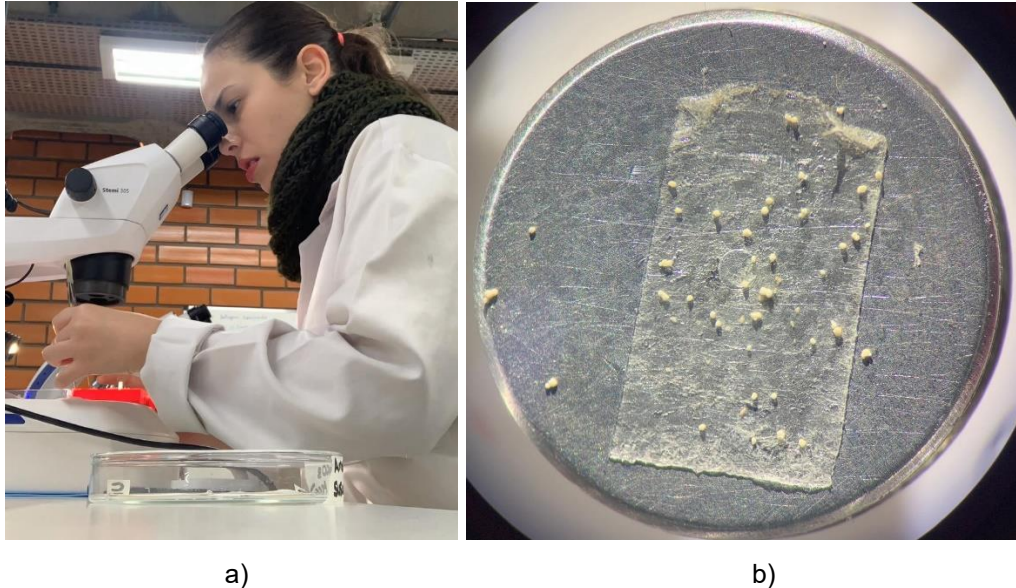
c)

d)

Fonte: Autora, 2024.

Os discos de papel filtro contendo apenas os cristais foram secos em estufa a 40 °C para garantir que a amostra estivesse completamente seca antes de serem montados nos suportes específicos para análise no MEV. Cuidadosamente, os cristais secos foram colocados nos suportes (Figura 12) e levados para o MEV acoplado ao detector de Espectroscopia por energia dispersiva (EDS). Com o uso do microscópio de varredura, foi possível obter imagens detalhadas dos cristais formados, permitindo inclusive a medição do tamanho de alguns deles. Através do detector EDS, analisou-se a emissão de raios-X por dispersão de energias na amostra de cristais, permitindo a identificação elementar das áreas selecionadas e confirmando, assim, a presença de cálcio. Essa etapa de análises no MEV acoplado ao detector EDS, foi realizada no laboratório de Microscopia Eletrônica, Itaiputec, Unila.

Figura 12 – Processo de recuperação dos cristais formados: a) Processo de coleta e traslado dos cristais para os suportes; b) Cristais colados nos suportes, prontos para a análise no MEV



Fonte: Autora, 2024.

Após a realização da análise com o microscópio eletrônico de varredura (MEV) acoplado ao espectrômetro de dispersão de energia (EDS) para confirmar a presença de cálcio nas amostras de cristais, algumas amostras foram submetidas a um processo adicional de metalização. Este processo consistiu na deposição de uma camada de ouro-paládio com uma espessura de 6 a 9 nm, utilizando o equipamento SC7620 Quorum Mini Sputter Coater/Glow Discharge System. A metalização foi realizada para melhorar a condução elétrica das amostras, o que é essencial para evitar o acúmulo de carga e, conseqüentemente, permitir a formação de imagens de alta qualidade durante a análise no MEV.

5.4 IDENTIFICAÇÃO DAS BACTÉRIAS ISOLADAS

5.4.1 Identificação pela técnica de espectrometria de massas por ionização e dessorção a laser assistida por matriz (MALDI-TOF MS)

As bactérias isoladas das diferentes amostras de pedras foram identificadas utilizando o sistema MALDI Biotyper Sirius One (Bruker). O processo de

identificação envolveu a preparação das amostras bacterianas e a extração de proteínas para análise. Essa etapa foi realizada no Laboratório Ambiental, Itaipu. A seguir, detalham-se os procedimentos realizados, conforme indica o Guia Rápido: Fluxo de Trabalho e Procedimentos Operacionais. Bruker Daltonik GmbH, proporcionada pelo próprio MALDI Biotyper (MALDI Biotyper, 2024):

5.4.1.1 Preparação das Amostras Bacterianas

Uma pequena porção de cada cultura bacteriana isolada foi retirada com uma alça de inoculação estéril e transferida para um tubo do tipo Eppendorf contendo 300 μ L de água grau HPLC. As amostras foram então homogeneizadas utilizando um agitador tipo vórtex por, pelo menos, um minuto, garantindo uma suspensão uniforme das células bacterianas (MALDI Biotyper, 2024).

5.4.1.2 Extração de Proteínas

Após a homogeneização, foram adicionados 900 μ L de etanol puro à suspensão bacteriana, e a mistura foi agitada novamente no vórtex por mais um minuto. A seguir, os tubos do tipo Eppendorf contendo as amostras foram centrifugados a 13.000 rpm por 2 minutos (Figura 13), sendo o sobrenadante cuidadosamente removido com uma micropipeta. Este passo foi repetido uma vez mais para garantir a remoção completa da solução etanólica (MALDI Biotyper, 2024).

Figura 13 – Amostras prontas para serem centrifugadas



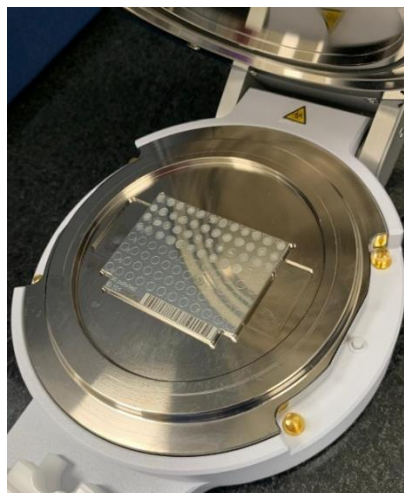
Fonte: Autora, 2024.

Com o pellet bacteriano resultante, foi realizada a extração de proteínas adicionando 50 μL de ácido fórmico a 70% ao tubo Eppendorf, seguido de agitação no vórtex até completa homogeneização. Em seguida, foram adicionados 50 μL de acetonitrila, e a mistura foi novamente agitada no vórtex. Para garantir a separação adequada das proteínas, as amostras foram centrifugadas por 2 minutos a 13.000 rpm, obtendo-se assim o extrato proteico de cada bactéria (MALDI Biotyper, 2024).

5.4.1.3 Aplicação na Placa de MALDI e Secagem

Após a extração, foi transferido 1 μL de cada extrato proteico para uma placa de MALDI limpa, depositando a amostra no local específico correspondente na placa. As amostras foram deixadas secar em temperatura ambiente controlada até que todo o solvente evaporasse completamente. Quando as amostras estavam secas, foi adicionado 1 μL de solução matriz IVD HCCA (α -ciano-4-hidroxicinâmico) sobre cada amostra, cobrindo-as cuidadosamente. A placa foi novamente deixada secar em temperatura ambiente controlada até que a matriz cristalizasse sobre as amostras (Figura 14) (MALDI Biotyper, 2024).

Figura 14 – Processo de secagem das amostras na Placa de MALDI



Fonte: Autora, 2024.

5.4.1.4 Identificação pelo MALDI-TOF MS

Após a secagem completa das amostras com a matriz, a placa foi inserida no equipamento MALDI Biotyper Sirius One (Figura 15) para a classificação e identificação das bactérias. Através da técnica de espectrometria de massas por ionização e dessorção a laser assistida por matriz (MALDI-TOF MS), os espectros de massa gerados foram comparados com uma biblioteca de referência, permitindo a identificação precisa das espécies bacterianas com base no perfil proteico de cada isolado (MALDI Biotyper, 2024).

Figura 15 – Equipamento MALDI Biotyper Sirius One (Bruker)



Fonte: Autora, 2024.

5.4.2 Identificação pelo Sistema VITEK® 2 COMPACT

As bactérias que não puderam ser diretamente identificadas na biblioteca de referência do sistema MALDI Biotyper® sirius one ou que apresentaram um baixo escore de identificação foram submetidas a análises adicionais. Os dados gerados pelo MALDI-TOF MS foram transferidos para serem analisados em diferentes bancos de dados alternativos, a fim de tentar obter uma identificação mais precisa. No entanto, para as poucas bactérias que não foram encontradas nos bancos de dados consultados, foi realizado um novo tipo de análise utilizando o sistema VITEK® 2 COMPACT (Figura 16).

Figura 16 – Equipamento VITEK® 2 COMPACT



Fonte: Autora, 2024.

Para o uso do sistema VITEK® 2 COMPACT, foi necessário inicialmente realizar a coloração de Gram nas amostras, a fim de determinar se as bactérias eram Gram-positivas ou Gram-negativas e, assim, seguir o protocolo apropriado para cada caso. As bactérias identificadas como Gram-negativas (GN) foram preparadas conforme o procedimento indicado no manual com as informações dos produtos VITEK® 2 Systems (bioMérieux, 2013):

- Foram transferidos assepticamente 3,0 mL de solução salina estéril (NaCl aquoso a 0,45% a 0,50%, pH 4,5 a 7,0) para um tubo de ensaio de plástico transparente (poliestireno) de 12 mm x 75 mm (Figura 17) (bioMérieux, 2013).

Figura 17 – Processo de transferencia dos 3,0 mL da solução salina estéril (NaCl) para os tubos de ensaio



Fonte: Autora, 2024.

- Com uma zaragatoa estéril, foi transferido um número suficiente de colônias bacterianas para o tubo contendo a solução salina preparada, formando uma suspensão homogênea de microrganismos (Figura 18) (bioMérieux, 2013).

Figura 18 – Processo de coleta da amostra da bactéria



Fonte: Autora, 2024.

- A densidade da suspensão foi ajustada para corresponder ao padrão McFarland N.º 0,50 a 0,63, utilizando o dispositivo VITEK® 2 DensiCHEK™ Plus calibrado (bioMérieux, 2013) (Figura 19).

Figura 19 – Processo de ajuste da densidade com ajuda do VITEK® 2 DensiCHEK™ Plus calibrado



Fonte: Autora, 2024.

Após a preparação, os tubos com as suspensões bacterianas e as cartas GN foram colocados no Cassete VITEK® 2 COMPACT (Figura 20). O Cassete foi então inserido no sistema VITEK® 2 COMPACT (Figura 14) para iniciar o processo automatizado de classificação e identificação das bactérias, proporcionando uma identificação mais precisa das amostras que não puderam ser classificadas pelo método MALDI-TOF MS (bioMérieux, 2013).

Figura 20 – Cartas GN sendo colocadas no Cassete VITEK® 2 COMPACT



Fonte: Autora, 2024.

Para as bactérias identificadas como Gram-positivas (GP) após a coloração de Gram, foi seguido um protocolo distinto de preparação e identificação utilizando o sistema VITEK® 2 COMPACT, comparado ao das bactérias Gram-negativas (GN). A principal diferença está na densidade bacteriana, que deve ser ajustada ao padrão McFarland N.º 2,70 a 3,30, em vez do padrão 0,50 a 0,63 utilizado para GN (Figura 21), devido à maior espessura da parede celular das Gram-positivas. Além disso, foi utilizada a Carta BCL (Bacillus, Corynebacterium, Lactobacillus), projetada especificamente para grupos de Gram-positivas, contendo substratos e testes bioquímicos otimizados para suas características metabólicas. Após ajustar a densidade, as suspensões bacterianas em solução salina estéril (NaCl 0,45%-0,50%, pH 4,5-7,0) foram inseridas, juntamente com as cartas BCL, no Cassete VITEK® 2 COMPACT, permitindo a leitura automatizada das reações bioquímicas e a identificação precisa dessas bactérias, adaptando-se às suas particularidades em relação às Gram-negativas (bioMérieux, 2013).

Figura 21 – Tabela especificando a densidade do inóculo de acordo com o padrão McFarland, dependendo da carta e do microrganismo a serem identificados

VITEK		
CARTA	DENSIDADE DO INÓCULO (McFarland)	DILUIÇÃO PARA AST (em 3,0 mL de salina)
GN	0,5 - 0,63	145 uL
GP	0,5 - 0,63	280 uL
BCL	1,80 - 2,20	-
ANC	2,70 - 3,30	-
YST	1,80 - 2,20	280 uL

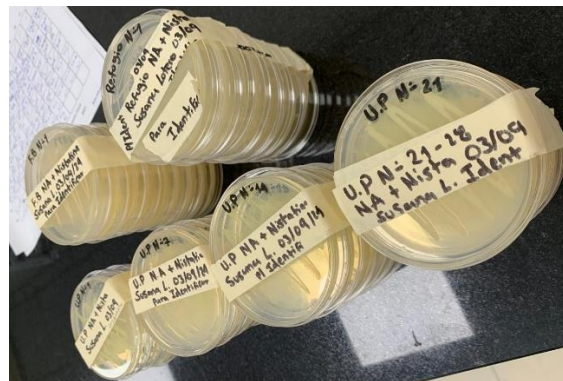
Fonte: Autora, 2024.

6 RESULTADOS E DISCUSSÕES

6.1 ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS ENDOLÍTICAS

O processo de isolamento de bactérias endolíticas resultou na obtenção de um total de 48 isolados bacterianos das diferentes amostras de pedras coletadas na Antártica (Figura 22). De modo geral, observou-se um crescimento bacteriano limitado nas placas de Petri, indicando que o número de microrganismos endolíticos presentes nas amostras pode ser relativamente baixo, ou que as condições de cultivo não foram ideais para a proliferação de um maior número de espécies.

Figura 22 – Placas Petri com as 48 bactérias isoladas das diferentes amostras de pedra



Fonte: Autora, 2023.

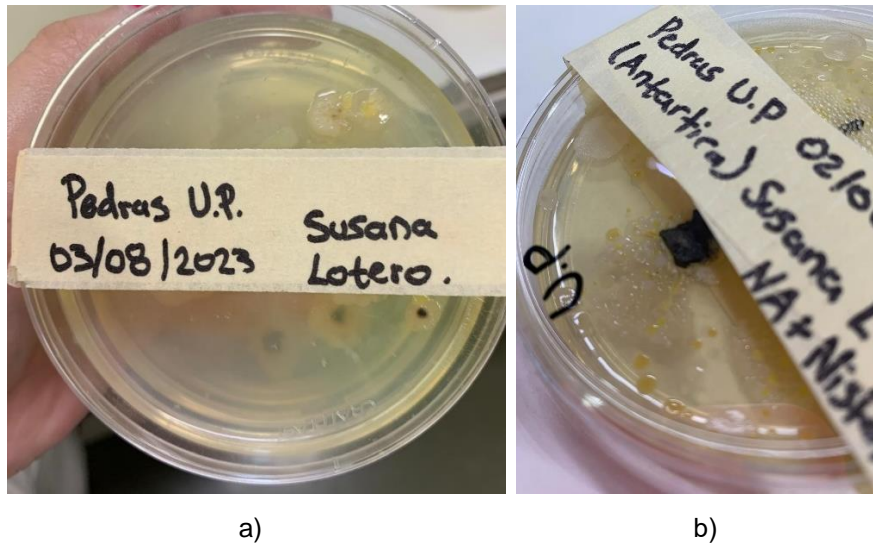
A seguir, detalha-se mais a respeito do isolamento das bactérias em cada amostra de pedra:

6.1.1 Bactérias isoladas da Amostras de pedra de Ulmann Point (UP)

A maioria dos isolados (28) foi obtida das amostras de pedras provenientes de Ulmann Point. O crescimento bacteriano mais expressivo nestas amostras foi observado nas placas onde os fragmentos de pedra foram diretamente colocados em meio sólido (NA com nistatina). Por outro lado, as placas inoculadas com as diluições seriadas dos meios líquidos apresentaram um crescimento bacteriano insignificante. Em muitas destas placas, não houve o desenvolvimento de colônias, e nas poucas que apresentaram crescimento, as colônias exibiram características morfológicas muito semelhantes às das colônias isoladas diretamente dos fragmentos de pedra. Entretanto, foi nas amostras de UP que se

observou uma maior diversidade morfológica entre as colônias isoladas, com variações evidentes de cor e forma, incluindo colônias de cores diferentes, como amarelo, laranja e branco (Figura 23).

Figura 23 – Bactérias crescidas ao redor dos fragmentos de pedra correspondentes às amostras de UP. É possível observar diferenças morfológicas como variações de cor e forma



a)

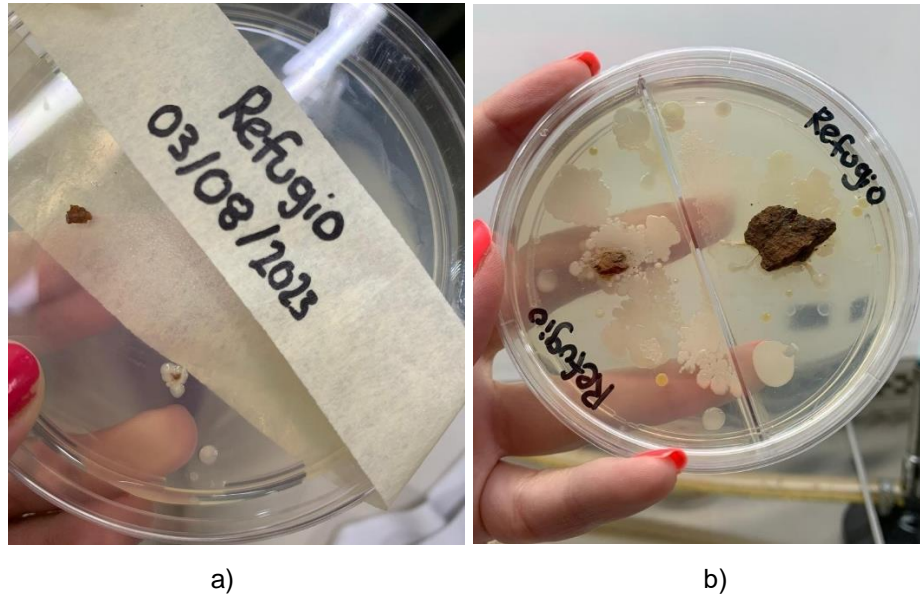
b)

Fonte: Autora, 2023.

6.1.2 Bactérias isoladas da Amostras de pedra do Refúgio

Das amostras de pedra coletadas no Refúgio, foram isoladas 11 bactérias. Assim como em UP, o crescimento bacteriano foi mais notável nas placas onde os fragmentos de pedra foram diretamente inoculados no meio sólido. As placas com diluições seriadas não apresentaram variedade de crescimento significativo (Figura 25) e, em algumas, não houve desenvolvimento de colônias. Nas poucas placas que exibiram crescimento, as colônias eram morfológicamente similares às observadas nas placas de fragmentos. No entanto, também nas amostras do Refúgio, foi possível isolar bactérias com características morfológicas claramente distintas, como diferenças de cor e textura, indicando uma relativa diversidade microbiana. Assim como em UP, observou-se uma variação de cores entre as colônias, incluindo tons amarelados e esbranquiçados (Figura 24).

Figura 24 – Bactérias crescidas ao redor dos fragmentos de pedra correspondentes às amostras do Refúgio. É notável a diferença de diversidade de crescimento entre as placas, tendo em conta que contém fragmentos da mesma amostra de pedra: a) Nessa placa é possível observar o crescimento de poucas colônias mais com as mesmas características morfológicas; b) Por outro lado nessa placa tem um crescimento bacteriano considerável, é possível observar colônias com diferenças morfológicas evidentes como cor e forma



Fonte: Autora, 2023.

Figura 25 – Colônias de bactérias crescidas na placa correspondente à diluição de 10^{-2} . Pelas características morfológicas observadas, parece que apenas um tipo de bactéria cresceu nesta placa

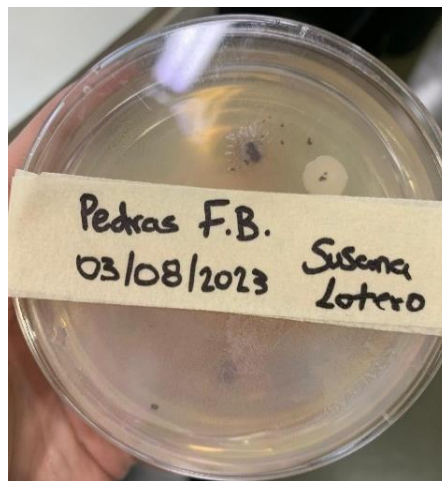


Fonte: Autora, 2023.

6.1.3 Bactérias isoladas das Amostras de pedra de Fumarole Bay (FB)

Apenas 9 isolados foram obtidos das amostras de pedra de Fumarole Bay. Diferente das amostras de UP e Refúgio, nas amostras de FB, todas as colônias isoladas apresentaram características morfológicas muito semelhantes, com colônias de aparência uniforme, geralmente de cor esbranquiçada e com bordas lisas. Não foram observadas variações significativas de cor ou morfologia nas colônias provenientes das diluições seriadas em comparação com aquelas isoladas diretamente dos fragmentos de pedra (Figura 26). Este resultado sugere uma menor diversidade bacteriana nas amostras de FB ou uma predominância de uma única espécie adaptada às condições extremas deste ambiente.

Figura 26 – Crescimento de bactérias ao redor dos fragmentos de pedra correspondentes à amostra de FB

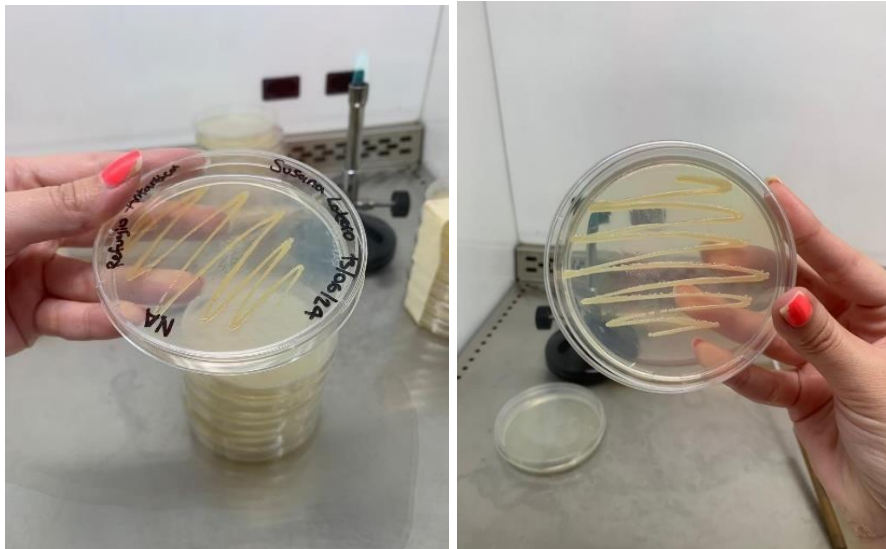


Fonte: Autora, 2023.

Embora o número total de isolados tenha sido relativamente baixo, as amostras de UP e Refúgio apresentaram maior diversidade morfológica entre as colônias bacterianas isoladas (Figura 23, 24 e 27). Em contraste, nas amostras de FB, as colônias isoladas eram morfológicamente muito semelhantes, sugerindo a presença de uma comunidade bacteriana mais homogênea ou menos diversificada. As placas inoculadas com diluições seriadas dos meios líquidos, por sua vez, não se mostraram eficazes para o isolamento de novas morfologias, já que as colônias crescidas eram morfológicamente semelhantes às dos fragmentos de pedra, sem apresentar características diferenciadas. Em alguns casos, as placas de diluições sequer apresentaram crescimento, reforçando a

hipótese de que a concentração de microrganismos liberados nos meios líquidos era insuficiente para gerar uma diversidade significativa. Esses resultados destacam a importância de otimizar as condições de cultivo e isolamento para maximizar a recuperação de uma maior diversidade de microrganismos desses ambientes extremos.

Figura 27 – Bactérias isoladas



Fonte: Autora, 2023.

6.1.4 Bactérias Previamente Isoladas nas Mesmas Regiões das Amostras de Pedra

6.1.4.1 Bactérias aisladas da Ilha Deception

A Ilha Deception, localizada na Antártica, é mundialmente conhecida por suas condições extremas, representando um dos ambientes mais desafiadores do planeta. No entanto, mesmo em meio a esse cenário inóspito, foram identificadas diversas bactérias altamente adaptadas, capazes de prosperar em condições severas (Márquez; Blamey, 2019). Entre essas bactérias destacam-se espécies do gênero *Geobacillus*, famosas por sua habilidade de degradar hidrocarbonetos e produzir biossurfactantes (Schultz *et al.*, 2022; Silva *et al.*, 2022), e *Bacillus*, que apresentam adaptações tanto a temperaturas frias quanto a condições de calor intenso (Llarch *et al.*, 1997).

Além disso, foram isoladas *Pseudomonas*, microrganismos notáveis pela sua versatilidade na degradação de compostos orgânicos, e arqueias, que habitam regiões com gradientes extremos de temperatura e salinidade (Carrasco *et al.*, 2023). Em Fumarole

Bay, uma área específica da Ilha Deception, a cepa termofílica *Geobacillus* LEMMJ02 foi isolada (Schultz *et al.*, 2019), demonstrando uma capacidade excepcional de fixação de carbono e resistência a condições extremas. Juntamente com ela, várias cepas de *Bacillus* também foram encontradas, revelando seu potencial biotecnológico significativo, com aplicações em biorremediação, produção de enzimas e estudos evolutivos (Schultz *et al.*, 2019; Schultz *et al.*, 2022).

Inclusive, foram encontradas bactérias especificamente nas rochas vulcânicas dessa zona. Além das *Cyanobacteria*, que são os organismos endolíticos mais amplamente distribuídos, foram identificadas *Proteobacteria* e *Actinobacteria*, ambas desempenhando papéis cruciais na adaptação aos ambientes hostis da Ilha Deception. As *Proteobacteria* são conhecidas por sua versatilidade metabólica e capacidade de degradar uma ampla gama de compostos orgânicos, o que as torna importantes para processos de biorremediação. As *Actinobacteria*, por outro lado, são reconhecidas por sua habilidade de produzir compostos bioativos, incluindo antibióticos e enzimas industriais, demonstrando seu enorme potencial biotecnológico (Hidalgo-Arias *et al.*, 2023).

6.1.4.2 Bactérias aisladas da Ilha Rei George

A Ilha King George, situada na região marítima da Antártica, é reconhecida por abrigar uma impressionante diversidade microbiana, adaptada às rigorosas condições extremas de seu ambiente. Estudos realizados na ilha revelaram uma variedade notável de bactérias, demonstrando como esses microrganismos se ajustam para sobreviver em climas severos.

Nos sedimentos costeiros da Maxwell Bay, por exemplo, foram identificadas bactérias produtoras de proteases, pertencentes aos filos *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes* e *Proteobacteria*, com destaque para gêneros como *Bacillus*, *Flavobacterium* e *Lacinutrix*. Essas bactérias desempenham um papel fundamental na decomposição do nitrogênio orgânico presente nos sedimentos, reforçando sua importância no ciclo de nutrientes desses ecossistemas únicos (Zhou *et al.*, 2013).

Além disso, um estudo conduzido na Península Fildes identificou 26 filótipos de bactérias cultiváveis, distribuídos em três clados principais, sugerindo que a história de colonização da Antártica e a classificação das espécies influenciam diretamente a diversidade microbiana. Já em um lago periódico da Ilha King George, as *Actinobacteria*

foram as mais abundantes, representando 45% dos isolados, apesar de constituírem apenas 4% da comunidade total. Esse cenário se alterou significativamente com a adição de escoamento, resultando no aumento das *Firmicutes* e na diminuição das *Cyanobacteria*, demonstrando o impacto de fatores ambientais na dinâmica bacteriana (Tomasz Krucoń; Dziejwit; Drewniak, 2021).

A diversidade bacteriana na ilha também inclui microrganismos adaptados a condições extremas, como os encontrados no estudo de Lopes et al. (2024). Nele, 215 microrganismos foram isolados de amostras de solo, musgo, permafrost e sedimentos marinhos, com 118 identificados molecularmente. Desses, 24 cepas mostraram resistência à congelação, incluindo espécies de *Arthrobacter sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Cryobacterium sp.* e *Acinetobacter sp.* Essas bactérias produzem proteínas anticongelantes (AFP), que alteram a estrutura do gelo, reduzindo seu ponto de congelamento e inibindo a recristalização, o que reforça sua incrível adaptabilidade e valor biotecnológico (Lopes et al., 2024).

Outro estudo notável, realizado por González-Rocha et al. (2017), destacou a riqueza de *Actinobacteria* nos sedimentos marinhos da ilha. Foram isoladas 45 cepas, principalmente dos gêneros *Streptomyces*, *Nocardiosis* e *Micromonospora*, que demonstraram significativa atividade antimicrobiana contra patógenos como *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, sublinhando seu potencial para o desenvolvimento de novos antibióticos (González-Rocha et al., 2017).

A riqueza microbiana da Ilha King George, composta por bactérias altamente adaptadas e com ampla gama de capacidades biotecnológicas, continua a surpreender os pesquisadores. A exploração contínua dessas espécies oferece oportunidades valiosas para aplicações em biotecnologia e novos insights sobre a sobrevivência em condições extremas.

6.2 IDENTIFICAÇÃO DAS BACTÉRIAS ISOLADAS

6.2.1 Identificação pelo sistema MALDI Biotyper® Sirius One

O sistema MALDI Biotyper® sirius one é uma ferramenta avançada para a identificação de microrganismos baseada em espectrometria de massas MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight). Ele funciona analisando o perfil

proteico de cada bactéria e comparando-o com um banco de dados de referência, permitindo identificar com precisão a espécie bacteriana em minutos. O sistema utiliza tecnologia de laser smartbeam™ para ionizar as proteínas bacterianas, gerando um espectro de massas único que é comparado com uma biblioteca para obter o resultado (“MALDI Biotyper® sirius one System”, 2024; Mellmann *et al.*, 2009; Wan *et al.*, 2023).

A importância do seu uso na identificação bacteriana reside na capacidade de fornecer resultados rápidos e confiáveis, mesmo com amostras complexas, facilitando a tomada de decisões em investigações microbiológicas. Neste estudo, graças ao MALDI Biotyper® sirius one, foram identificadas 33 cepas bacterianas das amostras isoladas, das quais 22 obtiveram uma pontuação superior a 2. Este score indica uma identificação confiável a nível de espécie (Figura 28).

Figura 28 – Sistema de pontuação, onde: - Um score superior a 2.0 sugere uma identificação precisa a nível de espécie; - Entre 1.7 e 2.0 sugere uma identificação confiável a nível de gênero; - Inferior a 1.7 indica que a identificação é duvidosa ou falha

Meaning of log(score) Values

for Sample Type **Sample**

Range	Interpretation	Symbols	Color
2.00 - 3.00	High Confidence Identification	(+++)	green
1.70 - 1.99	Low Confidence Identification	(+)	yellow
0.00 - 1.69	No organism identification possible	(-)	red

Fonte: (Bruker MALDI Biotyper Identification Results, 2024)

Para as bactérias que não puderam ser identificadas diretamente na biblioteca de referência do sistema MALDI Biotyper® sirius one (marcadas em vermelho) e aquelas com um score mais baixo (amarelo), foram realizadas análises adicionais. Os espectros de massas gerados pelo MALDI-TOF MS foram analisados na base de dados MicrobeNet. Como resultado, das 15 bactérias que inicialmente não foram identificadas na biblioteca de referência (score vermelho), 8 foram identificadas com sucesso na base de dados MicrobeNet. Além disso, para as bactérias com score intermediário (amarelo), a identificação foi confirmada pela mesma base de dados (MicrobeNet), muitas vezes com um score superior, validando assim os resultados obtidos inicialmente.

A seguir, são apresentados os resultados do processo de identificação das bactérias isoladas de cada amostra de pedra: UP, FB e Refúgio. Incluindo tanto as identificações realizadas pela biblioteca de referência do sistema MALDI Biotyper® sirius one quanto aquelas obtidas a partir da base de dados MicrobeNet, utilizando os espectros de massas gerados pelo MALDI-TOF MS. Vale destacar que todas as bactérias foram nomeadas e numeradas conforme a amostra de origem antes da identificação. Por exemplo, os isolados de Ulmann Point (UP) foram designados como UP1, UP2, UP3, e assim sucessivamente, até UP28. O mesmo sistema foi aplicado às amostras de Fumarole Bay (FB) e Refúgio, nomeando as bactérias como FB1, FB2, etc., e R1, R2, etc., de acordo com o total isolado de cada local.

6.2.1.1 Bactérias identificadas das amostras de pedra de Ulmann Point (UP)

Durante o processo de isolamento das bactérias das amostras de pedra de Ulmann Point (UP), muitas apresentavam características morfológicas semelhantes. A tabela a seguir (Tabela 1) apresenta os resultados da identificação das bactérias isoladas das amostras de pedras de Ulmann Point (UP) utilizando o sistema MALDI Biotyper® sirius one.

Tabela 1 – Bactérias de Ulmann Point identificadas com o sistema MALDI Biotyper® sirius one

Código Inicial	Bactéria Identificada
UP1 e UP6	<i>Arthrobacter psychrolactophilus</i>
UP2	<i>Arthrobacter stackebrandtii</i>
UP3, UP4, UP5, UP7, UP9, UP10, UP14, UP15, UP16, UP18, UP19, UP21, UP22, UP23, UP25, UP27 e UP28	<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i>
UP8	<i>Pseudarthrobacter chlorophenolicus</i>
UP17	<i>Pseudomonas libanensis</i>
UP24	<i>Pseudomonas fluorescens</i>

Fonte: Autora, 2024.

6.2.1.2 Bactérias identificadas das amostras de pedra do Refúgio

Assim como nas amostras de Ulmann Point (UP), várias das bactérias isoladas das pedras do Refúgio apresentavam morfologias muito semelhantes. Após a identificação, verificou-se que algumas dessas bactérias pertenciam à mesma espécie (Tabela 2).

Tabela 2 – Bactérias do Refúgio identificadas com o sistema MALDI Biotyper® sirius one

Código Inicial	Bactéria Identificada
R1	<i>Brevundimonas intermedia</i>
R4	<i>Cytobacillus horneckiae</i>
R5 e R8	<i>Bacillus thuringiensis</i>
R6	<i>Paenibacillus tylopili</i>
R7	<i>Bacillus cereus</i>
R9 e R10	<i>Bacillus wiedmannii</i>
R11	<i>Niallia circulans</i>

Fonte: Autora, 2024.

6.2.1.3 Bactérias identificadas das amostras de pedra de Fumarole Bay (FB)

Nas amostras de Fumarole Bay (FB), conforme já discutido no processo de isolamento, não foram observadas muitas diferenças morfológicas entre as bactérias. As colônias apresentavam cor e forma muito semelhantes. Após a identificação, foi confirmado que todas as 9 bactérias isoladas pertenciam à mesma espécie, *Stenotrophomonas rhizophila* (Tabela 3). Essa identificação foi realizada através dos espectros de massas gerados pelo MALDI-TOF MS e analisados na base de dados MicrobeNet. O uso dessa ferramenta foi essencial, já que na biblioteca referencial do MALDI Biotyper® sirius one as bactérias obtiveram um score baixo (vermelho), possivelmente porque essa espécie não estava incluída na biblioteca.

Tabela 3 – Bactérias de Fumarole Bay identificadas com o sistema MALDI Biotyper® sirius one

Código Inicial	Bactéria Identificada
FB1, FB2, FB3, FB4, FB5, FB6, FB7, FB8 e FB9	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>

Fonte: Autora, 2024.

6.2.2 Identificação pelo Sistema VITEK® 2 COMPACT

As sete bactérias que não puderam ser identificadas pelo sistema MALDI Biotyper® Sirius One, nem encontradas na base de dados MicrobeNet: UP11, UP12, UP13, UP20, UP26, R2 e R3; foram submetidas a uma análise adicional utilizando o sistema VITEK® 2 COMPACT. Esse sistema automatizado é amplamente utilizado em microbiologia clínica para identificar com precisão bactérias e fungos, baseado em perfis bioquímicos. Ele avalia a reação dos microrganismos em 64 ensaios bioquímicos, comparando os perfis gerados com uma extensa base de dados, oferecendo resultados rápidos e precisos, mesmo para organismos não identificados por outros métodos (Ochiuzzi *et al.*, 2014; Torrecillas *et al.*, 2020; “VITEK® 2 Compact”, [s.d.]

Para iniciar o processo de identificação das bactérias no sistema VITEK® 2 COMPACT, a coloração de Gram foi um passo essencial. Esse procedimento é importante porque define a metodologia subsequente, uma vez que as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas possuem diferentes características bioquímicas. Após a coloração, 4 das 7 bactérias foram classificadas como Gram-negativas, e 3 como Gram-positivas (Tabela 4).

Tabela 4 – Classificação das bactérias a serem analisadas pelo sistema VITEK® 2 COMPACT, pelo método de coloração de Gram

Código Inicial	Classificação
UP11	Gram-positivas
UP12	Gram-positivas
UP13	Gram-positivas
UP20	Gram-negativas
UP26	Gram-negativas
R2	Gram-negativas

R3

Gram-negativas

Fonte: Autora, 2024.

Para as Gram-negativas, foi utilizada a carta GN, e a densidade da suspensão foi ajustada ao padrão McFarland N.º 0,50 a 0,63, essencial para garantir uma quantidade uniforme de células bacterianas, facilitando a correta leitura bioquímica. A densidade padronizada assegura que a quantidade de células em cada teste seja suficiente para gerar reações confiáveis nas diferentes cartas bioquímicas utilizadas pelo sistema. No caso das bactérias Gram-positivas, foi seguida a metodologia apropriada, usando a carta BCL e ajustando a densidade ao padrão McFarland N.º 2,70 a 3,30, garantindo precisão na identificação.

Após a análise das bactérias pelo sistema VITEK® 2 COMPACT, os resultados indicaram que UP11, UP12 e UP13 correspondiam à espécie *Alicyclobacillus acidoterrestris/acidocaldarius*, com excelente nível de confiança. No entanto, essa identificação foi considerada uma classificação taxonômica pseudo-multiopcional, sugerindo a necessidade de testes adicionais, como o teste de crescimento a 60-63°C, para diferenciar as duas espécies.

As cepas identificadas como UP20 e UP26 apresentaram resultados muito semelhantes, com baixa discriminação, sugerindo que poderiam pertencer a dois ou três grupos taxonômicos, especificamente *Aeromonas salmonicida* ou *Oligella ureolytica*. O sistema VITEK® 2 COMPACT recomendou a realização de testes adicionais, como os de urease e DNase, para confirmar a identificação. Se a bactéria for *Aeromonas salmonicida*, não mostrará atividade ureolítica, mas apresentará resultados positivos no teste de DNase. Por outro lado, se for *Oligella ureolytica*, será positiva para o teste de urease e negativa para o teste de DNase.

Por fim, as cepas R2 e R3 apresentaram resultados com excelente grau de confiança, identificadas como *Sphingomonas paucimobilis*.

Tabela 5 – Bactérias identificadas com o sistema VITEK® 2 COMPACT

Código Inicial	Bactéria Identificada
UP11, UP12 e UP13	<i>Alicyclobacillus acidoterrestris/acidocaldarius</i>
UP20 e UP26	<i>Aeromonas salmonicida</i> ou <i>Oligella ureolytica</i>
R2 e R3	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>

Fonte: Autora, 2024.

Mesmo com os bons resultados de identificação proporcionados pelos sistemas MALDI Biotyper® Sirius One e VITEK® 2 COMPACT, ambos apresentando scores e níveis de confiança satisfatórios, é necessário complementar essas identificações com outras análises, especialmente ao identificar bactérias a nível de espécie. A sequenciação genética é fundamental, pois permite confirmar a identificação ao nível molecular, garantindo precisão ao analisar o DNA bacteriano. Além disso, seria interessante criar e avaliar dendrogramas, que auxiliariam na visualização das relações filogenéticas entre as bactérias isoladas, proporcionando uma análise evolutiva mais detalhada.

6.3 CARACTERÍSTICAS E CONSIDERAÇÕES DAS BACTÉRIAS IDENTIFICADAS

As bactérias identificadas apresentam uma diversidade de espécies, muitas das quais são adaptadas a climas frios. Espécies como *Arthrobacter psychrolactophilus*, *Pseudomonas frederiksbergensis* e *Pseudarthrobacter chlorophenolicus* são conhecidas por habitar ambientes polares, mostrando uma notável capacidade de adaptação a condições extremas de temperatura (Binish Mechirackal Balan *et al.*, 2018; Kallayane Naloka *et al.*, 2024; Wang *et al.*, 2009). A maioria dessas bactérias é psicrófila ou psicrotrófica, ou seja, cresce bem em temperaturas baixas. Além disso, algumas dessas espécies, como *Bacillus cereus*, é reconhecida por sua atividade ureolítica, e capacidade de bioprecipitar de carbonato de cálcio, características ideais para seu uso em diferentes indústrias, inclusive na indústria cosmética (Xu *et al.*, 2023; Yang *et al.*, 2022). No entanto, é importante levar em consideração que *Bacillus cereus* é conhecido por causar intoxicações alimentares e infecções oportunistas (Lentz *et al.*, 2018).

Portanto, além do potencial biotecnológico, é importante considerar o risco patogênico de algumas dessas espécies ao utilizá-las em aplicações industriais. Por exemplo, *Aeromonas salmonicida* é um patógeno de peixes que também pode afetar humanos imunocomprometidos (Almeida *et al.*, 2023). O gênero *Pseudomonas*, inclui várias espécies patogênicas. *Pseudomonas aeruginosa*, uma das mais conhecidas, é um patógeno oportunista que causa infecções graves, especialmente em pessoas com sistema imunológico debilitado (Bush; Vazquez-Pertejo, 2022). Embora *Pseudomonas fluorescens* seja principalmente ambiental, existem casos raros em que foi associada a infecções

humanas, tornando o gênero digno de atenção em termos de biossegurança (Scales *et al.*, 2014). Por outro lado, o gênero *Arthrobacter* é geralmente considerado não patogênico, sendo predominantemente ambiental, com pouca ou nenhuma associação a doenças humanas (Li *et al.*, 2021). Sua principal relevância está no uso biotecnológico, dada a sua versatilidade metabólica e capacidade de sobrevivência em ambientes extremos (Ganzert *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2009). No gênero *Stenotrophomonas*, embora também seja conhecido por possuir espécies principalmente ambientais, observa-se a espécie *Stenotrophomonas maltophilia*, um patógeno oportunista em ambientes hospitalares (Rodrigues; Gioia; Rossi, 2011).

A tabela a seguir apresenta uma pesquisa detalhada na qual foram buscados artigos que evidenciam a presença de cada uma das bactérias identificadas em climas frios. Destaca-se que, durante a pesquisa, foram encontrados artigos que confirmam a ocorrência de várias dessas bactérias na Antártica, local de onde foram extraídas as amostras das quais as bactérias foram isoladas. Além disso, também foram encontrados estudos interessantes que relatam a presença de algumas dessas espécies em ambientes com temperaturas extremamente baixas, semelhantes às condições encontradas na Antártica, reforçando a adaptação dessas bactérias a climas polares e extremos.

Tabela 6 – Evidências de climas onde podem ser encontradas as diferentes bactérias identificadas

Bactéria	Evidência de crescimento em ambientes frios	Referências
<i>Arthrobacter psychrolactophilus</i>	SIM**	(Wang <i>et al.</i> , 2009), (Shen <i>et al.</i> , 2021)
<i>Arthrobacter stackebrandtii</i>	SIM	(Ganzert <i>et al.</i> , 2010)
<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i>	SIM*	(Binish Mechirackal Balan <i>et al.</i> , 2018)
<i>Pseudarthrobacter chlorophenolicus</i>	SIM	(Kallayane Naloka <i>et al.</i> , 2024)
<i>Pseudomonas libanensis</i>	SIM	(Souza-Alonso <i>et al.</i> , 2021), (Mai-Prochnow <i>et al.</i> , 2016)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	SIM**	(Reddy, 2004)
<i>Brevundimonas intermedia</i>	NÃO	(Huang <i>et al.</i> , 2022)
<i>Cytobacillus horneckiae</i>	NÃO	(Zammuto <i>et al.</i> , 2021)
<i>Bacillus thuringiensis</i>	SIM**	(Forsyth; Logan, 2000), (Prabhakar; Bishop, 2011)

<i>Paenibacillus tylopili</i>	SIM*	(Yadav et al., 2015)
<i>Bacillus cereus</i>	SIM**	(Timmerly; Hu; Mahillon, 2011)
<i>Bacillus wiedmannii</i>	SIM*	(Wu et al., 2019)
<i>Niallia circulans</i>	NÃO	(Srivastava; Dafale, 2023)
<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	SIM*	(Chen, 2014)
<i>Alicyclobacillus acidoterrestris/acidocaldarius</i>	NÃO	(Groenewald; Gouws; Witthuhn, 2009)
<i>Aeromonas salmonicida</i>	SIM	(Long et al., 2023)
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	SIM	(Rob Van Houdt et al., 2008)

(**) – Bactérias encontradas na Antártica

(*) – Bactérias encontradas em climas parecidos com a Antártica

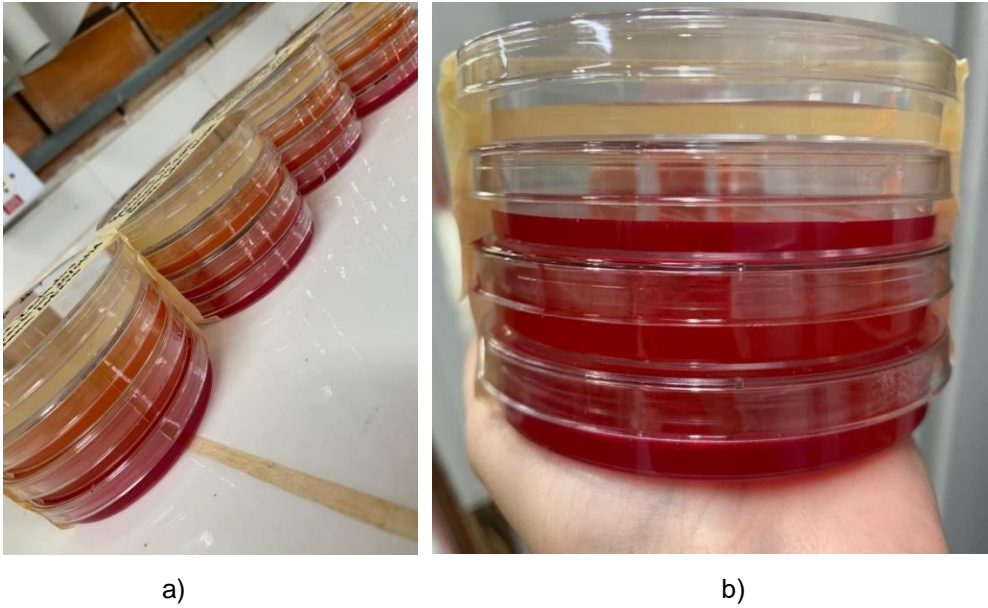
Fonte: Autora, 2024.

6.4 CAPACIDADE DE BIOPRECIPITAÇÃO DE CARBONATO DE CÁLCIO PELAS BACTÉRIAS ISOLADAS

6.4.1 Formação de Cristais e Mudanças de Cor no Meio de Cultura

Os resultados dos testes para avaliar a capacidade de bioprecipitação de carbonato de cálcio pelas bactérias endolíticas isoladas foram bastante variados e satisfatórios. Em 45 das 48 bactérias testadas, observou-se a formação de cristais e uma mudança de cor no meio de cultura, indicando atividade ureolítica. O vermelho de fenol, presente nos meios, é um indicador de pH que muda de cor conforme o ambiente se alcaliniza ou acidifica, sendo utilizado justamente para confirmar a atividade ureolítica. O aumento do pH foi observado nas bactérias que precipitaram carbonato de cálcio, mostrando que a alcalinização, causada pela produção de amônio e carbonato através da urease, foi o mecanismo que permitiu a formação dos cristais (Figura 29) (Marvasi et al., 2010; (Marvasi; Martinez; Davila-Vazquez, 2013).

Figura 29 – Mudanças de cor nos meios testes (B4, B4 Ácido, B4 Alcalino): a) Meios teste recém inoculados pelas bactérias; b) Meios após aproximadamente 10 dias de incubação



a)

b)

Fonte: Autora, 2024.

Apesar de a maioria das bactérias apresentar precipitação de carbonato de cálcio, os resultados variaram entre elas. Nem todas as bactérias formaram cristais da mesma forma, com diferenças de tamanho, forma, quantidade e até no meio em que cresceram. Mesmo dentro do mesmo teste, algumas bactérias não formaram cristais em todos os meios (B4, B4 ácido e B4 alcalino). Em certos casos, observou-se acidificação do meio (Figura 30), o que pode ser causado pela fermentação de açúcares presentes no meio, levando à produção de ácidos orgânicos que baixam o pH, impedindo a precipitação de carbonato (Caycedo Lozano; Corrales Ramírez; Trujillo Suárez, 2021). Esses resultados indicam que o processo de bioprecipitação pode ser influenciado por múltiplos fatores, como a composição do meio e o metabolismo específico de cada bactéria.

Figura 30 – Acidificação do meio



Fonte: Autora, 2024.

Nos meios B4 e B4 alcalino, em geral, observou-se uma alcalinização completa e formação considerável de cristais. A principal diferença entre a formação de cristais nesses dois meios residia no fato de que, no meio B4, a maioria das placas apresentava cristais predominantemente superficiais, formando-se principalmente na superfície do biofilme (Figura 31 (a)). Em contraste, nas placas do meio B4 alcalino, a maioria dos cristais formava-se mais no interior do biofilme (Figura 31 (c)). Além disso, os cristais observados no meio B4 eram visivelmente maiores do que os cristais formados no meio B4 alcalino. No entanto, apesar de os cristais no meio B4 alcalino serem menores, observou-se uma quantidade significativamente maior de cristais formados nesse meio.

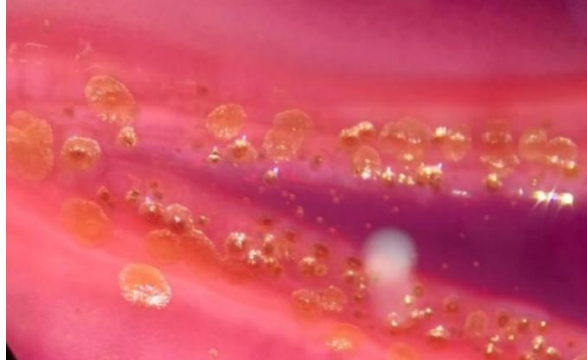
Outra diferença notável foi a textura dos cristais. No meio B4, os cristais se apresentavam mais rugosos, com texturas menos uniformes (Figura 31 (a)). Em contraste, no meio B4 alcalino, foram observados tanto cristais com superfícies rugosas e menos uniformes quanto cristais mais arredondados, com superfícies mais lisas e uniformes. Essas variações na textura e na localização dos cristais sugerem que as condições do meio influenciam significativamente a morfologia e a precipitação dos cristais de carbonato de cálcio, afetando tanto o tamanho quanto a qualidade superficial dos mesmos (Liu *et al.*, 2023; Sandra Patricia Chaparro-Acuña *et al.*, 2018).

Além disso, uma característica em que os meios diferiram foi o crescimento bacteriano. No meio B4, as bactérias cresceram vigorosamente em quase todas as placas, enquanto, em muitas das placas do meio B4 alcalino, evidenciou-se um crescimento bacteriano menos vigoroso. Isso pode ser atribuído justamente ao ambiente alcalino, que exige mais energia para o metabolismo bacteriano, dificultando o crescimento ideal (Jiménez-Delgadillo *et al.*, 2018).

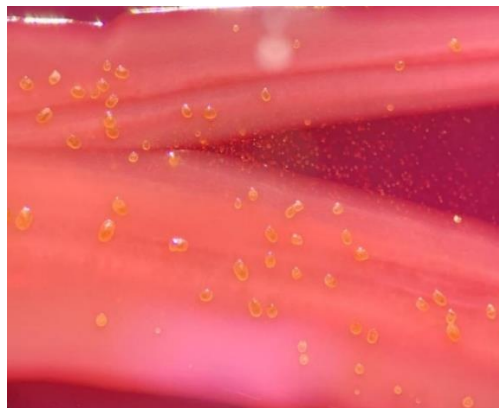
Por outro lado, no meio B4 ácido, os resultados foram variados. Na maioria das placas, observou-se uma alcalinização completa, com o meio adquirindo um tom vermelho intenso (Figura 29 (b)). No entanto, algumas placas mostraram pouco crescimento bacteriano e uma acidificação mais acentuada, onde o meio ficou completamente amarelo (Figura 30). Essa variação pode estar relacionada às diferentes respostas das bactérias às condições ácidas do meio. A formação de cristais nos meios B4 ácidos não foi tão evidente como no meio B4 padrão. As bactérias nos meios B4 ácidos produziram significativamente menos cristais em comparação com os outros meios (B4 e B4 alcalino). Os cristais formados nos meios ácidos caracterizavam-se por serem menores, com uma textura e forma mais uniforme (Figura 31 (b)). Em contraste, os cristais formados nos outros meios apresentavam maior variação em tamanho e textura, destacando-se

cristais com uma aparência mais rugosa, menos uniforme e menos arredondada.

Figura 31 – Cristais precipitados pela bactéria FB1: a) Cristais formados em meio B4; b) Cristais formados em meio B4 ácido; c) Cristais formados em meio B4 alcalino



a)



b)



c)

Fonte: Autora, 2024.

A seguir, é apresentada uma tabela onde foram registrados os resultados

do teste de bioprecipitação de carbonato de cálcio com cada uma das bactérias isoladas (Tabela 7). Nesta tabela, foram anotadas as observações sobre as mudanças de cor no meio de cultivo, assim como os níveis de formação de cristais observados em cada caso. As variações de cor refletem a alteração no pH do meio causada pela atividade metabólica das bactérias, enquanto os níveis de cristalização indicam o grau de bioprecipitação de carbonato de cálcio obtido para cada bactéria testada. Esses dados são fundamentais para entender como cada isolado bacteriano contribui para o processo de formação de cristais e a alteração nas condições do meio.

Tabela 7 – Resultados dos testes de formação de cristais e mudanças de cor no meio de cultivo em cada uma das bactérias isoladas

Código Inicial	Bactéria Identificada	Meios B4		
		Padrão	Ácido	Alcalino
UP1 e UP6	<i>Arthrobacter psychrolactophilus</i>	CB***, FC***, A***	CB***, FC*, A***	CB***, FC*, A***
UP2	<i>Arthrobacter stackebrandtii</i>	CB**, NFC; AC***	CB***, FC*, A***	CB***, FC*, A***
UP3, UP4, UP5, UP7, UP9, UP10, UP14, UP15, UP16, UP18, UP19, UP21, UP22, UP23, UP25, UP27 e UP28	<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i>	CB**, FC**, A***	CB***, FC*, A***	CB**, FC**, A***
UP8	<i>Pseudarthrobacter chlorophenolicus</i>	CB***, FC**, A**	CB**, NFC; AC***	CB**, FC**, A***
UP11, UP12 e UP13	<i>Alicyclobacillus acidoterrestris/ acidocaldarius</i>	CB***, FC***, A***	CB***, NFC; A***	CB**, FC*, A***
UP17	<i>Pseudomonas libanensis</i>	CB*, NFC; AC***	CB*, NFC; AC***	CB**, FC*, A***
UP24	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	CB*, NFC; AC***	CB*, NFC; AC***	CB**, FC**, A***
UP20 e UP26	<i>Aeromonas salmonicida</i> ou <i>Oligella ureolytica</i>	CB**, NFC; AC***	CB**, NFC; AC*	CB**, FC*, A**
R1	<i>Brevundimonas intermedia</i>	CB**, NFC; A*	CB**, NFC; A*	CB*, NFC; A**
R2 e R3	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	CB*, NFC; A*	CB**, NFC; AC**	CB*, FC*, A**
R4	<i>Cytobacillus horneckiae</i>	CB**, NFC; A*	CB**, NFC; A**	CB*, FC*, A**
R5 e R8	<i>Bacillus thuringiensis</i>	CB***, FC***,	CB*, NFC;	CB*, FC*;

		A***	AC***	A***
R6	<i>Paenibacillus tylopili</i>	CB*; NFC; AC***	CB*; NFC; AC***	CB*; NFC; A**
R7	<i>Bacillus cereus</i>	CB***; FC***; A***	CB**; NFC; A*	CB***; FC*; A**
R9 e R10	<i>Bacillus wiedmannii</i>	CB***; FC***; A***	CB**; NFC; A**	CB***; FC*; A***
R11	<i>Niallia circulans</i>	CB*; NFC; AC***	CB*; NFC; AC***	CB*; NFC; AC***
FB1, FB2, FB3, FB4, FB5, FB6, FB7, FB8 e FB9	<i>Stenotrophomonas rhizophila.</i>	CB***; FC***; A***	CB**; FC**; A***	CB***; FC***; A***

(*) – Intensidade da característica: (*) - Baixa, (**) - Média, (***) - Alta; Crescimento Bacteriano: CB – Cresceu a bactéria, NCB – Não cresceu a bactéria; Formação de Cristais: FC – Formou Cristais, NFC – Não Formou Cristais; Mudança de pH: A – Alcalinização do meio, AC – Acidificação do meio
Fonte: Autora, 2024.

Das 48 bactérias isoladas no total, 45 apresentaram formação de cristais. No entanto, três das bactérias testadas, identificadas como R1, R6 e R11, não mostraram precipitação de cristais em nenhum dos meios testados (B4, B4 ácido e B4 alcalino). Isso sugere que essas cepas, ao contrário das demais, podem não ter a capacidade de bioprecipitar carbonato de cálcio sob as condições experimentais estabelecidas. Este fato ressalta a variabilidade metabólica entre os isolados bacterianos e a importância de explorar diferentes fatores ambientais e condições de cultivo para maximizar o potencial de bioprecipitação (Sandra Patricia Chaparro-Acuña *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2022).

6.4.2 Confirmação da Presença de Carbonato

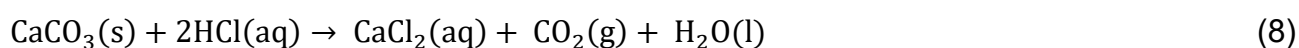
Para confirmar que os cristais formados correspondiam de fato a carbonato de cálcio, foram realizados dois testes: um para verificar a presença de carbonato e outro para confirmar a presença de cálcio. No entanto, além desses testes, existem análises mais detalhadas que poderiam confirmar com maior precisão a composição dos cristais, como a Análise Termogravimétrica (TGA).

A TGA é uma técnica importante para a caracterização de materiais, que mede a variação de massa de uma amostra à medida que ela é aquecida, permitindo identificar perdas de massa relacionadas à decomposição térmica, volatilização ou outras mudanças físicas e químicas. No caso da confirmação de carbonato de cálcio, a TGA pode

detectar a perda de massa devido à decomposição do carbonato de cálcio em óxido de cálcio e dióxido de carbono em temperaturas específicas (cerca de 800-900°C) (Yao *et al.*, 2022). Essa análise é fundamental para garantir que os cristais formados pelas bactérias são de fato compostos por carbonato de cálcio e não por outros minerais com propriedades semelhantes.

Como neste estudo não foi possível realizar especificamente a análise termogravimétrica (TGA), foram implementadas outras técnicas para confirmar a presença de carbonato nos cristais formados. Para isso, utilizou-se um método simples e rápido, amplamente empregado em estudos de bioprecipitação de carbonato de cálcio. Embora essa técnica pareça básica, ela é eficaz e frequentemente utilizada para confirmar a presença de carbonato de cálcio em amostras (Marvasi *et al.*, 2010; Marvasi; Martinez; Davila-Vazquez, 2013).

Nos estudos sobre bioprecipitação de carbonato de cálcio por bactérias, é comum adicionar ácido clorídrico (HCl) aos cristais formados para verificar a presença de carbonato. A reação entre o carbonato de cálcio (CaCO₃) e o ácido clorídrico gera dióxido de carbono (CO₂), o que resulta em um burbujeio visível. Esse burbujeio é um indicativo claro da decomposição do carbonato de cálcio pela liberação de CO₂ (Eq 8).



Nesta reação (Eq. 8), o ácido clorídrico reage com o carbonato de cálcio, resultando em cloreto de cálcio (CaCl₂), água (H₂O) e dióxido de carbono (CO₂). A liberação de CO₂ em forma de gás é o que causa o burbujeio visível, confirmando a presença de carbonato na amostra.

Após a adição de HCl 0.1N na superfície dos cristais, foi extremamente evidente a formação de bolhas em todas as 45 bactérias que apresentaram formação de cristais. Em todas as placas onde se observou a formação de cristais, aplicou-se este método para confirmar a presença de carbonato, e os resultados foram positivos em todos os casos (Figura 32). A quantidade de bolhas formadas estava diretamente relacionada à quantidade de cristais presentes na amostra, ao tamanho dos cristais e, principalmente, ao contato direto entre o cristal e o HCl. Nas placas com meio B4 alcalino, onde os cristais estavam mais cobertos pelo biofilme e não tão superficiais, a reação de formação de bolhas não foi tão evidente (Figura 32 (c)). Neste caso, foi necessário, com a ajuda de uma alça, espalhar parte do biofilme para expor melhor os cristais e permitir o contato direto com o

HCl.

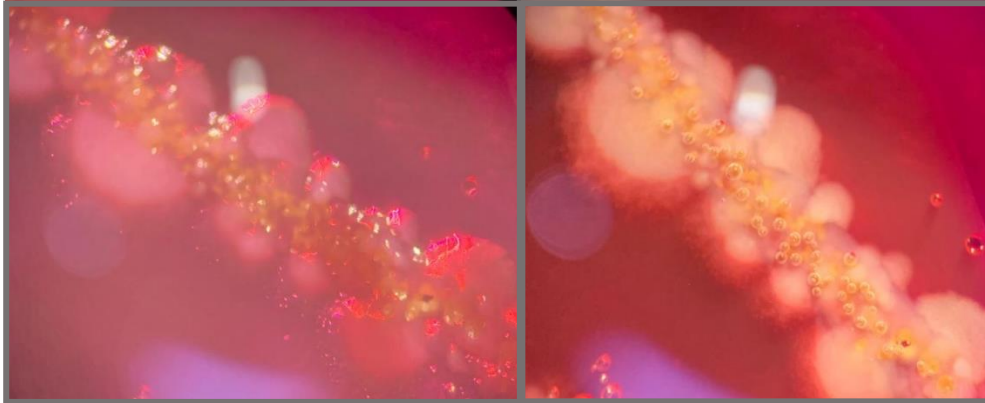
Figura 32 – Teste Presença de Carbonato, com adição de HCL 0.1N, nas placas correspondentes à bactéria FB1. As imagens mostram o antes e o depois da adição do HCL 0.1N, evidenciando-se a liberação de CO₂ nos locais exatos onde tem cristais formados: a) Teste em cristais formados em meio B4; b) Teste em cristais formados em meio B4 ácido; c) Teste em cristais formados em meio B4 alcalino



a)



b)



c)

Fonte: Autora, 2024.

Embora os resultados tenham sido bastante satisfatórios, confirmando a presença de carbonato, é importante destacar que este método, utilizado em diversos estudos de referência, confirma apenas a presença de carbonato de forma geral. Quimicamente, a reação com HCl poderia ocorrer com qualquer tipo de carbonato, não apenas com o carbonato de cálcio (Kokot ZJ, 2024). Assim, a formação de bolhas não é suficiente para afirmar que o composto seja exclusivamente carbonato de cálcio. Por essa razão, foi decidido realizar um teste adicional para confirmar a presença de cálcio nos cristais formados, garantindo maior precisão nos resultados.

6.4.3 Confirmação da Presença de Cálcio

Para confirmar a presença de cálcio nas amostras dos cristais formados e, assim, garantir de maneira mais confiável que os cristais correspondem ao carbonato de cálcio, as amostras foram analisadas pelo EDS, acoplado ao MEV, é uma técnica poderosa que permite a detecção de elementos químicos em uma amostra, identificando a composição elementar com grande precisão (Figura 33). Isso ocorre porque o feixe de elétrons do MEV, ao interagir com a amostra, excita os átomos presentes, gerando raios-X característicos de cada elemento. A partir desses raios-X, o EDS consegue identificar os elementos e sua distribuição na amostra (Mendonça *et al.*, 2022).

Esta análise com o MEV acoplado ao EDS foi realizada em 13 amostras, correspondentes aos cristais formados pelas seguintes bactérias: UP2, UP5, UP6, UP8, UP9, UP11, UP24, UP26, R4, R7, R8, R9 e FB1.

Figura 33 – Microscópio eletrônico de varredura (MEV) Zeiss EVO-MA10, acoplado ao detector de espectroscopia de dispersão de energia (EDS) INCA x-act da Oxford Instrument (modelo 51-ADD0048)

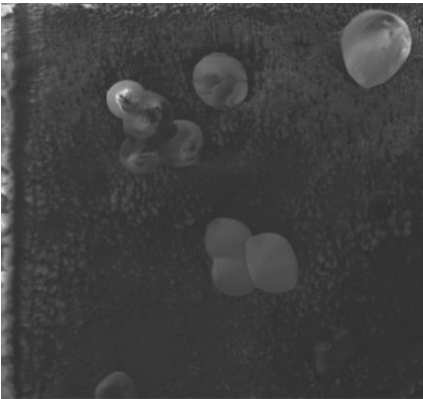
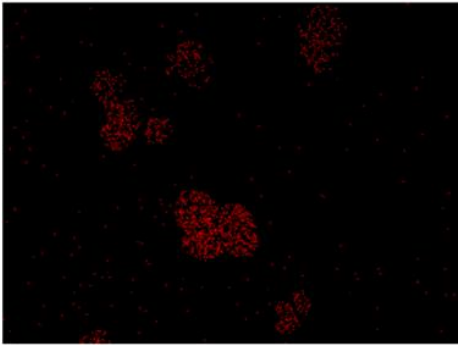

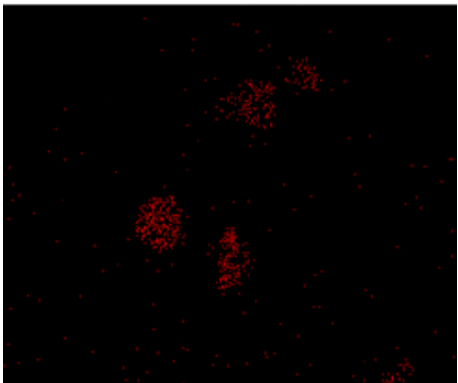

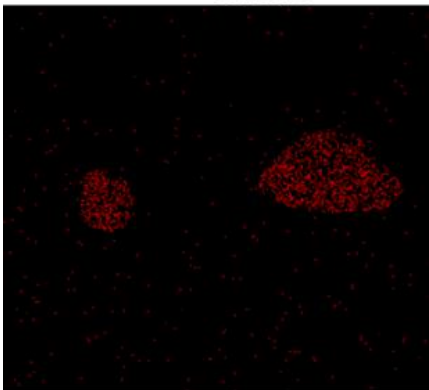


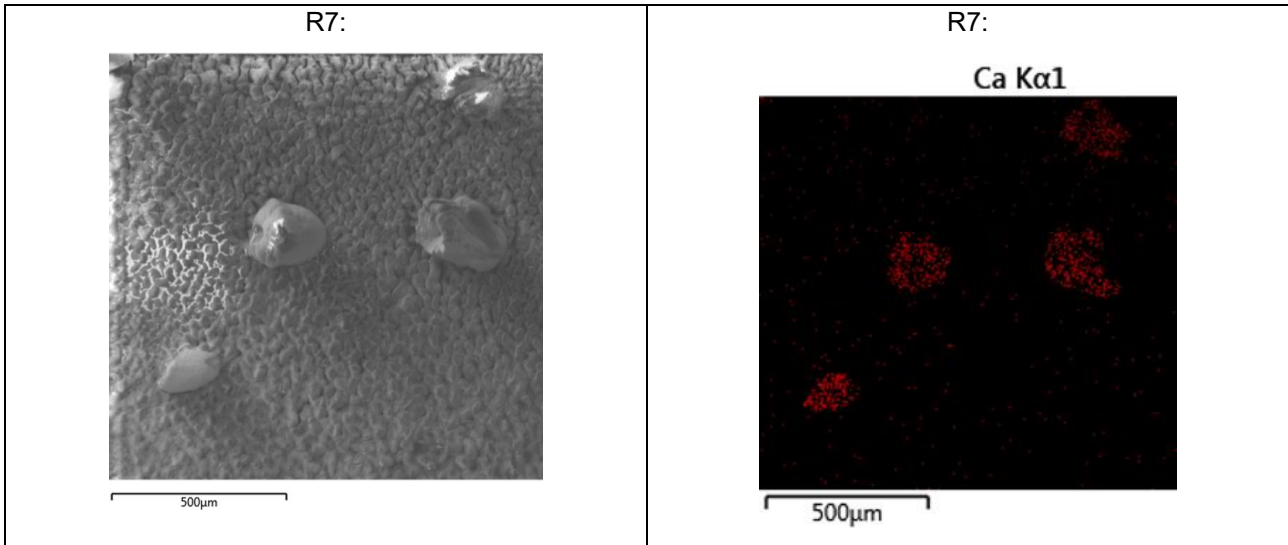
Fonte: Autora, 2024.

A importância dessa técnica reside em sua capacidade de fornecer uma análise elementar detalhada, permitindo a confirmação exata da presença de cálcio nas áreas onde os cristais se formaram. Para todas as amostras de cristais precipitados por cada uma das bactérias testadas, foi confirmada a presença de cálcio nas áreas correspondentes à formação dos cristais.

Na tabela a seguir (Tabela 8), é possível observar e comparar algumas das imagens obtidas com o MEV acoplado ao EDS, além de mostrar o mapeamento das regiões com presença de cálcio. Destaca-se que, para esta análise, as amostras não foram metalizadas, ou seja, não houve deposição de ouro-paládio, o que demonstra que a condutividade natural das amostras foi suficiente para a obtenção de imagens claras e um mapeamento preciso dos elementos. Foi evidente a concentração de cálcio nas regiões correspondentes aos cristais, reforçando a eficácia da técnica e confirmando a formação de carbonato de cálcio pelas bactérias testadas (Tabela 8).

Tabela 8 – Imagens e mapeamentos dos cristais implementando o microscópio eletrônico de varredura (MEV) Zeiss EVO-MA10, acoplado a um detector de espectroscopia de dispersão de energia (EDS) INCA x-act da Oxford Instrument (modelo 51-ADD0048)

Fotos de amostras de cristais obtidas com o MEV acoplado ao EDS.	Mapeamento de concentração de Cálcio nas amostras
<p style="text-align: center;">UP2:</p>  <p style="text-align: center;">500µm</p>	<p style="text-align: center;">UP2: Ca Kα1</p>  <p style="text-align: center;">500µm</p>
<p style="text-align: center;">UP6:</p>  <p style="text-align: center;">500µm</p>	<p style="text-align: center;">UP6: Ca Kα1</p>  <p style="text-align: center;">500µm</p>
<p style="text-align: center;">R4:</p>  <p style="text-align: center;">500µm</p>	<p style="text-align: center;">R4: Ca Kα1</p>  <p style="text-align: center;">500µm</p>



Fonte: Autora, 2024.

Além das imagens detalhadas geradas pelo MEV, a análise EDS não apenas mapeou as regiões de concentração de cálcio, mas também gerou gráficos que mostravam os diferentes elementos presentes na área selecionada para análise, indicando o percentual de cada um (Figura 34). Essa análise detalhada mostrou, de forma clara, a predominância de cálcio nos cristais formados.

Figura 34 – Gráfico dos espectros de uma das amostras de cristais gerado pelo microscópio eletrônico de varredura (MEV) Zeiss EVO-MA10, acoplado ao detector de espectroscopia de dispersão de energia (EDS) INCA x-act da Oxford Instrument (modelo 51-ADD0048)

Espectro de Soma de Mapas		
	Wt%	σ
C	83.4	0.2
O	14.5	0.2
Ca	2.0	0.1

a)

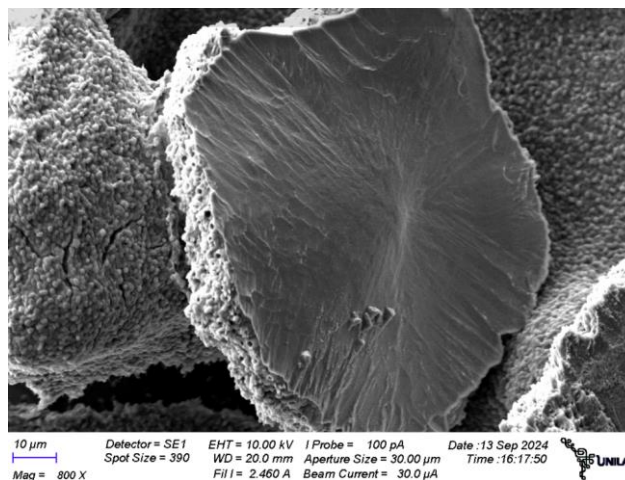


b)

Fonte: Imagens extraídas do relatório gerado após a análise pelo microscópio eletrônico de varredura (MEV) Zeiss EVO-MA10, acoplado ao detector de espectroscopia de dispersão de energia (EDS) INCA x-act da Oxford Instrument (modelo 51-ADD0048), 2024.

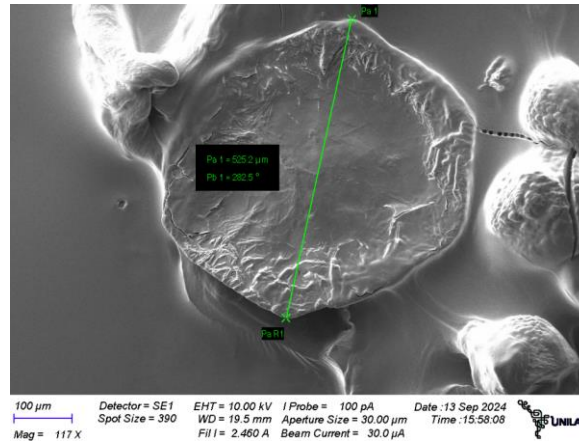
O MEV também possibilitou observar os cristais em detalhes, revelando sua morfologia, estrutura superficial e até mesmo permitindo a medição de alguns deles (Figura 36). É importante destacar que depois de ter feito a análise de presença de cálcio com o EDS, algumas das amostras foram metalizadas, fazendo um processo de deposição de ouro-paládio com uma espessura de 6-9nm, utilizando-se o equipamento SC7620 Quorum Mini Sputter Coater/Glow Discharge System, para melhorar a condução elétrica e, assim, permitir a formação de imagens de alta qualidade (Figura 35). Isso ocorre porque o MEV usa um feixe de elétrons para escanear a superfície da amostra e, para que os elétrons interajam corretamente com a amostra e produzam uma imagem clara, a superfície precisa ser condutora de eletricidade (Lewczuk; Szyryńska, 2021).

Figura 35 – Cristal de Carbonato de Cálcio, precipitado pela bactéria UP2, observado com microscópio eletrônico de varredura (MEV) Zeiss EVO-MA10. Para a obter essa imagen foi feito o processo deposição de ouro-paládio

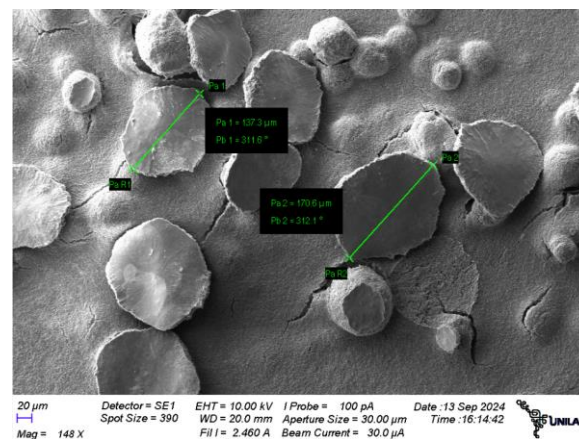


Fonte: Imagens geradas implementando o microscópio eletrônico de varredura Zeiss EVO-MA10, 2024.

Figura 36 – Cristais de Carbonato de Cálcio, precipitados pela bactéria UP6, observados e medidos implementando o microscópio eletrônico de varredura (MEV) Zeiss EVO-MA10



a)



b)

Fonte: Imagens geradas implementando o microscópio eletrônico de varredura Zeiss EVO-MA10, 2024.

Tanto o teste com HCl, que confirmou a presença de carbonato, quanto a análise MEV-EDS, que comprovou a presença de cálcio, contribuíram significativamente para uma confirmação completa de que os cristais formados pelas bactérias testadas correspondem ao carbonato de cálcio, reforçando os resultados obtidos e a relevância do estudo.

6.4.4 Considerações sobre a Bioprecipitação de Carbonato de Cálcio por parte de Bactérias adaptadas a ambientes frios

Ao longo da realização deste trabalho, não foram encontrados estudos que avaliassem especificamente a capacidade de bioprecipitação de carbonato de cálcio por parte de bactérias isoladas da Antártica. No entanto, existem diversos estudos que investigam essa capacidade em bactérias que demonstraram evidências de estarem

presentes na Antártica ou em outros ambientes frios. Um exemplo claro é o gênero *Bacillus*, que tem sido foco de vários estudos sobre bioprecipitação de carbonato de cálcio. Esse gênero demonstrou uma notável capacidade para precipitar esse mineral em diferentes condições, e há também evidências sólidas de sua presença na Antártica, tornando-se um foco importante de pesquisa no contexto de climas frios (Forsyth; Logan, 2000; Jung *et al.*, 2020; Prabhakar; Bishop, 2011; Sandra Patricia Chaparro-Acuña *et al.*, 2018; Timmerly; Hu; Mahillon, 2011; Wu *et al.*, 2019; Yadav *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2022).

Além de *Bacillus*, outros gêneros bacterianos que demonstraram capacidade de precipitar carbonato de cálcio e que apresentam adaptações ao frio incluem *Pseudomonas* e *Arthrobacter*. Essas bactérias são conhecidas não apenas por sua capacidade de precipitar minerais, mas também pela sua habilidade de crescer em condições ambientais adversas, como as baixas temperaturas características das regiões polares (Binish Mechirackal Balan *et al.*, 2018; Cohen-Cyberknoh *et al.*, 2022; Daskalakis *et al.*, 2013; Parthasarathy Baskaran Sujiritha *et al.*, 2024; Shen *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2009, Zhang *et al.*, 2020).

Diversos estudos destacam que as condições do meio desempenham um papel fundamental no processo de bioprecipitação de carbonato de cálcio induzido por bactérias. Um fator chave que influencia esse processo é a temperatura, já que ela afeta diretamente a atividade ureolítica das bactérias. De fato, pesquisas avaliaram o efeito da temperatura na bioprecipitação, indicando que temperaturas extremamente baixas podem afetar negativamente o processo. Segundo esses estudos, o processo é favorecido em uma faixa de temperatura entre 20 e 37°C, pois é nesse intervalo que se observa uma hidrólise enzimática ótima da ureia, condição essencial para a bioprecipitação de carbonato de cálcio (Liu *et al.*, 2023; Mitchell; Ferris, 2005; Sandra Patricia Chaparro-Acuña *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2022).

Esse referencial teórico permite discutir os resultados obtidos neste estudo para as diferentes bactérias isoladas das amostras de rocha da Antártica. As bactérias isoladas e testadas a partir das amostras de rocha de Fumarole Bay (FB) mostraram uma excelente atividade ureolítica e uma notável capacidade de precipitar carbonato de cálcio. Considerando os estudos anteriores, pode-se sugerir que essas bactérias foram favorecidas pelo fato de terem crescido a uma temperatura mais elevada (24°C), o que se encontra dentro da faixa ótima para a atividade ureolítica (Sandra Patricia Chaparro-Acuña *et al.*, 2018).

Por outro lado, as bactérias isoladas de Ulmann Point (UP) e do Refúgio

também mostraram resultados satisfatórios na precipitação de carbonato de cálcio, embora se tenha observado que o crescimento bacteriano e a formação de cristais foram mais lentos em comparação com as bactérias de FB. Isso pode ser devido ao fato de que essas bactérias foram incubadas a uma temperatura mais baixa (12°C), o que, de acordo com a literatura, poderia ter retardado o processo de bioprecipitação. Portanto, sugere-se realizar estudos futuros para testar a capacidade de bioprecipitação dessas bactérias a diferentes temperaturas, a fim de determinar se um aumento na temperatura poderia melhorar sua eficiência na precipitação de carbonato de cálcio.

7 CONCLUSÃO

O presente estudo obteve resultados bastante interessantes, satisfatórios e promissores, abrindo um grande panorama para futuras pesquisas. Embora existam inúmeros estudos sobre a capacidade de bactérias em bioprecipitar carbonato de cálcio, sua aplicação tem sido amplamente explorada na área de bioconcreto. Durante a investigação, não foram encontrados estudos que tratassem da aplicação desse carbonato de cálcio bioprecipitado por bactérias especificamente na indústria cosmética.

Embora este trabalho tenha mostrado que as bactérias endolíticas isoladas conseguem precipitar carbonato de cálcio, mais análises são necessárias para confirmar a adequação desse carbonato para uso em cosméticos. Alguns testes importantes que poderiam ser realizados incluem análises de pureza, granulometria e segurança para uso tópico, além de testes que garantam a estabilidade e compatibilidade do carbonato de cálcio bioprecipitado com outros ingredientes cosméticos. Além disso, seria interessante realizar uma comparação detalhada entre o carbonato de cálcio bioprecipitado pelas bactérias e o carbonato de cálcio convencionalmente usado na indústria, avaliando suas propriedades físico-químicas e eficácia em diferentes formulações cosméticas.

Portanto, este estudo não só abre novos horizontes na pesquisa de bioprospecção, como também propõe uma alternativa inovadora e sustentável para a obtenção de carbonato de cálcio, sugerindo seu uso potencial na indústria cosmética.

REFERÊNCIAS

- Al Omari, M. M. H. *et al.* Calcium Carbonate. Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology, v. 41, p. 31–132, 3 fev. 2016.
- Alcântara, I. B.; Dalto, A. G.; Lavrado, H. P. Population structure of the bivalve *Aequiyoldia eightsii* (Jay, 1839) in the shallow water zone of Admiralty Bay (King George Island, Antarctic Peninsula). *Polar Biology*, 27 jun. 2024.
- Almeida, A. *et al.* Aeromonassp. in freshwater fish and antimicrobial resistance: emerging pathogen. *Ciencia Rural*, v. 53, n. 7, 1 jan. 2023.
- Andreas, J. Bacterias endolíticas cultivables en minerales (Cuarzo, Feldespato y Calcita) provenientes de muestreos geológicos en áreas de Villa de Leyva, Boyacá y Pescadero, Santander (Colombia). *Unal.edu.co*, 2018.
- Andreassen, J. Formation mechanism and morphology in precipitation of vaterite—nano-aggregation or crystal growth? *Journal of Crystal Growth*, v. 274, n. 1-2, p. 256–264, 1 jan. 2005.
- Arenz, B. E.; Blanchette, R. A. Distribuição e abundância de fungos do solo na Antártica em locais da Península, Região do Mar de Ross e Vales Secos de McMurdo. *Biologia e Bioquímica do Solo*, v. 43, n. 2, p. 308-315, 2011.
- Artuso, A. Bioprospecting, Benefit Sharing, and Biotechnological Capacity Building. *World Development*, v. 30, n. 8, p. 1355–1368, ago. 2002.
- Bacdiv. *Arthrobacter stackebrandtii* AC 836. Disponível em: <<https://bacdiv.dsmz.de/strain/7612>>. Acesso em: 2 out. 2024.
- Badgeley, A. *et al.* Effect of probiotics and gut microbiota on anti-cancer drugs: Mechanistic perspectives. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, v. 1875, n. 1, p. 188494, jan. 2021.
- Balick, M. J.; Elisabetsky, E.; Laird, S. A. Medicinal resources of the tropical forest : biodiversity and its importance to human health. New York: Columbia University Press, 1996.
- Bascur, M. *et al.* Interpopulational differences in the nutritional condition of *Aequiyoldia eightsii* (Protobranchia: Nuculanidae) from the Western Antarctic Peninsula during austral summer. *PeerJ*, v. 9, p. e12679–e12679, 21 dez. 2021.

Bendia, A. G. *et al.* Surviving in hot and cold: psychrophiles and thermophiles from Deception Island volcano, Antarctica. *Extremophiles*, v. 22, n. 6, p. 917–929, 14 ago. 2018.

Betancourt, D. *et al.* Influencia de la adición de carbonato de calcio en la eficiencia energética de la producción de ladrillos de cerámica roja. *Revista ingeniería de construcción*, v. 22, n. 3, dez. 2007.

Binish Mechirackal Balan *et al.* Mercury tolerance and biosorption in bacteria isolated from Ny-Ålesund, Svalbard, Arctic. *Journal of basic microbiology*, v. 58, n. 4, p. 286–295, 31 jan. 2018.

Bio Mérieux. Relatório do Laboratório: Alicyclobacillus acidoterrestris/acidocaldarius. 2024. 2 p.

Boger, S. D. Antarctica — Before and after Gondwana. *Gondwana Research*, v. 19, n. 2, p. 335–371, mar. 2011.

Boger, Steven D. Antarctica—before and after Gondwana. *Gondwana Research*, vol. 19, no 2, p. 335-371, 2011.

Bottos, Eric M., *et al.* Bacterial community structures of Antarctic soils. *Antarctic terrestrial microbiology: Physical and biological properties of Antarctic soils*, p. 9-33, 2014.

Brigham, C. Perspectives for the biotechnological production of biofuels from CO₂ and H₂ using *Ralstonia eutropha* and other “Knallgas” bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 103, n. 5, p. 2113–2120, 21 jan. 2019.

Bush, L. M.; Vazquez-Pertejo, M. T. Infecções por *Pseudomonas* e infecções relacionadas. Disponível em:
<<https://www.msmanuals.com/pt/profissional/doen%C3%A7as-infecciosas/bacilos-gram-negativos/infec%C3%A7%C3%B5es-por-pseudomonas-e-infec%C3%A7%C3%B5es-relacionadas>>.

Cannone, N. *et al.* Acceleration of climate warming and plant dynamics in Antarctica. *Current Biology*, fev. 2022.

Carrasco, V. *et al.* *Pseudomonas violeae* sp. nov. and *Pseudomonas emilianonis* sp. nov., two new species with the ability to degrade TNT isolated from soil samples at Deception Island, maritime Antarctica. *Archives of Microbiology*, v. 206, n. 1, 24 dez. 2023.

Carretero, M. I.; Pozo, M. Clay and non-clay minerals in the pharmaceutical and cosmetic industries Part II. Active ingredients. *Applied Clay Science*, v. 47, n. 3-4, p. 171–181, fev. 2010.

Caycedo Lozano, L.; Corrales Ramírez, L. C.; Trujillo Suárez, D. M. Las bacterias, su nutrición y crecimiento: una mirada desde la química. *Nova*, v. 19, n. 36, p. 49–94, 20 set. 2021.

Chandra, P. *et al.* Microbial Lipases and Their Industrial applications: a Comprehensive Review. *Microbial Cell Factories*, v. 19, n. 1, 26 ago. 2020.

Chen. [Isolation, identification and characterization of 68 protease-producing bacterial strains from the Arctic]. *Wei sheng wu xue bao = Acta microbiologica Sinica*, v. 53, n. 7, 2014.

Chown, S. L. *et al.* The changing form of Antarctic biodiversity. *Nature*, v. 522, n. 7557, p. 431-438, 2015. DOI: 10.1038/nature14505.

Cohen-Cymerknoh, M. *et al.* Calcium carbonate mineralization is essential for biofilm formation and lung colonization. *iScience*, v. 25, n. 5, p. 104234, maio 2022.

Coleine, C. *et al.* Endolithic microbial composition in Helliwell Hills, a newly investigated Mars-like area in Antarctica. *Environmental Microbiology*, v. 23, n. 7, p. 4002–4016, 14 fev. 2021.

Córdova-Albores, L. C. *et al.* Omics sciences potential on bioprospecting of biological control microbial agents: the case of the Mexican agro-biotechnology. *Revista mexicana de fitopatología*, v. 39, n. 1, p. 147–184, 2021.

Córdova-Albores, L. C. *et al.* Omics sciences potential on bioprospecting of biological control microbial agents: the case of the Mexican agro-biotechnology. *Revista mexicana de fitopatología*, v. 39, n. 1, p. 147–184, 2021.

Daskalakis, M. *et al.* *Pseudomonas*, *Pantoea* and *Cupriavidus* isolates induce calcium carbonate precipitation for bioremediation of ornamental stone. v. 115, n. 2, p. 409–423, 16 maio 2013.

De Los Rãos, A. *et al.* Ultrastructural and genetic characteristics of endolithic cyanobacterial biofilms colonizing Antarctic granite rocks. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 59, n. 2, p. 386–395, fev. 2007.

Deception Island | | Alluring World. Disponível em:
<<https://www.alluringworld.com/deception-island/>>.

Di Maiuta, N.; Schwarzentruher, P. Molecular detection of bacteria in calcium carbonate powder used in cosmetic formulations. *International Journal of Cosmetic Science*, v. 33, n. 5, p. 426–431, 8 mar. 2011.

Donati, E. R.; Castro, C.; Urbieto, M. S. Thermophilic microorganisms in biomining. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 32, n. 11, 15 set. 2016.

Dupraz, C. *et al.* Processes of carbonate precipitation in modern microbial mats. *Earth-Science Reviews*, v. 96, n. 3, p. 141–162, 1 out. 2009.

Forsyth, G.; Logan, N. A. Isolation of *Bacillus thuringiensis* from Northern Victoria Land, Antarctica. *Letters in Applied Microbiology*, v. 30, n. 3, p. 263–266, mar. 2000.

Franco, D. C. *et al.* High Prevalence of Gammaproteobacteria in the Sediments of Admiralty Bay and North Bransfield Basin, Northwestern Antarctic Peninsula. *Frontiers in Microbiology*, v. 08, 2 fev. 2017.

Gadd, G. M. Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation. *Microbiology*, v. 156, n. 3, p. 609–643, 17 dez. 2009.

Ganzert, L. *et al.* *Arthrobacter livingstonensis* sp. nov. and *Arthrobacter cryotolerans* sp. nov., salt-tolerant and psychrotolerant species from Antarctic soil. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, v. 61, n. 4, p. 979–984, 28 maio 2010.

Gonçalves, Vívian N., *et al.* Diversity and distribution of fungal communities in lakes of Antarctica. *FEMS microbiology ecology*, vol. 82, no 2, p. 459-471, 2012.

González-Rocha, G. *et al.* Diversity structure of culturable bacteria isolated from the Fildes Peninsula (King George Island, Antarctica): A phylogenetic analysis perspective. *PLOS ONE*, v. 12, n. 6, p. e0179390, 20 jun. 2017.

Groenewald, W. H.; Gouws, P. A.; Witthuhn, R. C. Isolation, identification and typification of *Alicyclobacillus acidoterrestris* and *Alicyclobacillus acidocaldarius* strains from orchard soil and the fruit processing environment in South Africa. *Food Microbiology*, v. 26, n. 1, p. 71–76, 1 fev. 2009.

Hamideh Sadat Mohammadipour *et al.* Evaluation and comparison of the effects of a new paste containing 8% L-Arginine and CaCO₃ plus KNO₃ on dentinal tubules occlusion and dental sensitivity: a randomized, triple blinded clinical trial study. *BMC oral health*, v. 24, n. 1, 29 abr. 2024.

Hernández Ávila, J. Carbonato de calcio en México, características geológicas, mineralógicas y aplicaciones. www.uaeh.edu.mx, 1 jan. 2015.

Herrera Álvarez, S. *et al.* Influencia del uso del carbonato de calcio (CaCO₃) en la alcalinización y sedimentación del jugo de caña. *Centro Azúcar*, v. 47, n. 3, p. 70–82, 1 set. 2020.

Hidalgo-Arias, A. *et al.* Adaptation of the Endolithic Biome in Antarctic Volcanic Rocks. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 24, n. 18, p. 13824–13824, 7 set. 2023.

Hidalgo-Arias, A. *et al.* Adaptation of the Endolithic Biome in Antarctic Volcanic Rocks. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 24, n. 18, p. 13824–13824, 7 set. 2023.

Hopkins, D. W., *et al.* Controls on the distribution of productivity and organic resources in Antarctic Dry Valley soils. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, vol. 273, no 1602, p. 2687-2695, 2006.

- Hu, Y.-Q. *et al.* Comparative genomic analysis of two Arctic *Pseudomonas* strains reveals insights into the aerobic denitrification in cold environments. *BMC Genomics*, v. 24, n. 1, 11 set. 2023.
- Huang, Z. *et al.* Comparative Genomic Analysis Reveals Potential Pathogenicity and Slow-Growth Characteristics of Genus *Brevundimonas* and Description of *Brevundimonas pishanensis* sp. nov.. *Microbiology Spectrum*, v. 10, n. 2, 27 abr. 2022.
- Inoue, A. *et al.* Identification and characterization of cellouronate (β -1,4-linked polyglucuronic acid) lyase from the scallop *Mizuhopecten yessoensis*. *Carbohydrate Polymers*, v. 254, p. 117306–117306, 1 fev. 2021.
- Issifu, M. *et al.* Potential of *Pseudarthrobacter chlorophenicus* BF2P4-5 as a Biofertilizer for the Growth Promotion of Tomato Plants. *Bacteria*, v. 1, n. 4, p. 191–206, 1 dez. 2022.
- Jiménez-Delgadillo, R. *et al.* Efecto del pH y temperatura sobre el crecimiento y actividad antagónica de *Bacillus subtilis* sobre *Rhizoctonia solani*. *Revista mexicana de fitopatología*, v. 36, n. 2, p. 256–275, 1 ago. 2018.
- Jin, S.; Wang, Y.; Zhao, X. Cold-adaptive mechanism of psychrophilic bacteria in food and its application. *Microbial Pathogenesis*, v. 169, p. 105652, ago. 2022.
- Jung, Y. *et al.* Complete Genome and Calcium Carbonate Precipitation of Alkaliphilic *Bacillus* sp. AK13 for Self-Healing Concrete. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 30, n. 3, p. 404–416, 28 mar. 2020.
- Kallayanee Naloka *et al.* *Pseudomonas* and *Pseudarthrobacter* are the key players in synergistic phenanthrene biodegradation at low temperatures. *Scientific reports*, v. 14, n. 1, 25 maio 2024.
- Kaplan, M. *et al.* Dynamic structural adaptations enable the endobiotic predation of *bdellovibrio bacteriovorus*. *bioRxiv* (Cold Spring Harbor Laboratory), 13 jun. 2022.
- Kokot ZJ. Effect of pepsin on the kinetics of HCl neutralization by dihydroxyaluminum sodium carbonate, hydrotalcite and dihydroxyaluminum aminoacetate. *Acta poloniae pharmaceutica*, v. 48, n. 3-4, 2024.
- Kozeretska, I. A. *et al.* *Belgica antarctica* (Diptera: Chironomidae): A natural model organism for extreme environments. *Insect Science*, v. 29, n. 1, p. 2–20, 28 abr. 2021.
- Kuhlmann, R. Calcium Carbonate - A Versatile Mineral. *Birkhäuser Basel eBooks*, p. 275–311, 1 jan. 2001.
- Kumari, D. *et al.* Microbially-induced Carbonate Precipitation for Immobilization of Toxic Metals. *Advances in Applied Microbiology*, p. 79–108, 2016.
- Lai, H.-Y.; Cooper, T. F. Dynamics of bacterial adaptation. *Biochemical Society Transactions*, v. 49, n. 2, p. 945–951, 12 abr. 2021.

- Leiva, Sergio *et al.* Diversity of pigmented Gram-positive bacteria associated with marine macroalgae from Antarctica. *FEMS microbiology letters*, v. 362, n. 24, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/femsle/fnv206>.
- Lentz, S. A. M. *et al.* *Bacillus cereus* as the main casual agent of foodborne outbreaks in Southern Brazil: data from 11 years. *Cadernos de Saúde Pública*, v. 34, n. 4, 29 mar. 2018.
- Lewczuk, B.; Szyryńska, N. Field-Emission Scanning Electron Microscope as a Tool for Large-Area and Large-Volume Ultrastructural Studies. *Animals*, v. 11, n. 12, p. 3390, 1 dez. 2021.
- Li, M.; Cheng, X.; Guo, H. Heavy metal removal by biomineralization of urease producing bacteria isolated from soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 76, p. 81–85, jan. 2013.
- Li, S.-Y. *et al.* *Arthrobacter woluwensis* Bacteremia: A Clinical and Genomic Report. *Pathogens*, v. 10, n. 4, p. 443, 8 abr. 2021.
- Liu, Y. *et al.* Microbial-induced calcium carbonate precipitation: Influencing factors, nucleation pathways, and application in waste water remediation. *Science of The Total Environment*, v. 860, p. 160439, fev. 2023.
- Liu, Y. *et al.* Microbial-induced calcium carbonate precipitation: Influencing factors, nucleation pathways, and application in waste water remediation. *Science of The Total Environment*, v. 860, p. 160439, fev. 2023.
- Llarch, À. *et al.* Isolation and Characterization of Thermophilic *Bacillus* spp. from Geothermal Environments on Deception Island, South Shetland Archipelago. *Microbial Ecology*, v. 34, n. 1, p. 58–65, jul. 1997.
- Long, M. *et al.* Comparative genomic analysis provides insights into taxonomy and temperature adaption of *Aeromonas salmonicida*. *Journal of Fish Diseases*, v. 46, n. 5, p. 545–561, 2 mar. 2023.
- Longo, R. M.; Melo, W. J. DE. Hidrólise da uréia em latossolos: efeito da concentração de uréia, temperatura, pH, armazenamento e tempo de incubação. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v. 29, p. 651–657, 1 jul. 2005.
- Lopes, J. C. *et al.* Freezing and thawing in Antarctica: characterization of antifreeze protein (AFP) producing microorganisms isolated from King George Island, Antarctica. *Brazilian journal of microbiology*, 24 abr. 2024.
- Lynch, R. J. M.; Ten Cate, J. M. The anti-caries efficacy of calcium carbonate-based fluoride toothpastes. *International Dental Journal*, v. 55, p. 175–178, jun. 2005.
- Mai-Prochnow, A. *et al.* Gram positive and Gram negative bacteria differ in their sensitivity to cold plasma. *Scientific Reports*, v. 6, n. 1, dez. 2016.

MALDI Biotyper. Guia Rápido: Fluxo de Trabalho e Procedimentos Operacionais. Bruker Daltonik GmbH, 2024

MALDI Biotyper® sirius one System. Disponível em: <<https://www.bruker.com/en/products-and-solutions/microbiology-and-diagnostics/microbial-identification/maldi-biotyper-sirius-one-system.html>>. Acesso em: 28 set. 2024.

Márquez, S. L.; Blamey, J. M. Isolation and partial characterization of a new moderate thermophilic *Albidovulum* sp. SLM16 with transaminase activity from Deception Island, Antarctica. *Biological Research*, v. 52, n. 1, 4 fev. 2019.

Marto, J. *et al.* Pickering Emulsions Stabilized by Calcium Carbonate Particles: A New Topical Formulation. *Cosmetics*, v. 7, n. 3, p. 62, 31 jul. 2020.

Marvasi, M. *et al.* Physiological requirements for carbonate precipitation during biofilm development of *Bacillus subtilis* *etf* mutant. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 71, n. 3, p. 341–350, mar. 2010.

Marvasi, M.; Martinez, L. C.; Davila-Vazquez, Y. C. Laboratory Activity to Effectively Teach Introductory Geomicrobiology Concepts to Non-Geology Majors †. *Journal of Microbiology & Biology Education*, v. 14, n. 2, p. 206–212, 2 dez. 2013.

Mattar, M. *et al.* Root caries lesions inhibition and repair using commercial high-fluoride toothpastes with or without tri-calcium phosphate and conventional toothpastes containing or not 1.5% arginine CaCO₃: an in situ investigation. *Clinical Oral Investigations*, v. 24, n. 7, p. 2295–2304, 11 nov. 2019.

Mellmann, A. *et al.* High Interlaboratory Reproducibility of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry-Based Species Identification of Nonfermenting Bacteria. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 47, n. 11, p. 3732–3734, 1 nov. 2009.

Mendonça, L. *et al.* Use of Computerized Microtomography, Energy Dispersive Spectroscopy, Scanning Electron Microscopy, and Atomic Force Microscopy to Monitor Effects of Adding Calcium to Bleaching Gels. *Operative Dentistry*, v. 47, n. 3, p. E162–E173, 1 maio 2022.

Mitchell, A. C.; Ferris, F. G. The coprecipitation of Sr into calcite precipitates induced by bacterial ureolysis in artificial groundwater: Temperature and kinetic dependence. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, v. 69, n. 17, p. 4199–4210, set. 2005.

Mokashe, N.; Chaudhari, B.; Patil, U. Operative utility of salt-stable proteases of halophilic and halotolerant bacteria in the biotechnology sector. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 117, p. 493–522, out. 2018.

Morozkina EV; Slutskaja ES; Fedorova TV; Tugař TI; Golubeva LI; Koroleva OV. [Extremophilic microorganisms: biochemical adaptation and biotechnological application (review)]. *Prikladnaia biokhimiia i mikrobiologija*, v. 46, n. 1, 2024.

Mosier, A. C.; Murray, A. E.; Fritsen, C. H. Microbiota within the perennial ice cover of Lake Vida, Antarctica. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 59, n. 2, p. 274–288, fev. 2007.

Musilova, M. *et al.* Isolation of Radiation-Resistant Bacteria from Mars Analog Antarctic Dry Valleys by Preselection, and the Correlation between Radiation and Desiccation Resistance. *Astrobiology*, v. 15, n. 12, p. 1076–1090, dez. 2015.

National Geographic. Brasil inaugura nova base de pesquisas na Antártida. Disponível em: <<https://www.nationalgeographicbrasil.com/ciencia/2020/01/base-cientifica-inaugura-nova-era-de-pesquisas-brasileiras-na-antartida?image=estacao-2020-geral&gallery=41854>>. Acesso em: 6 out. 2024.

Nguyen, P.-T. *et al.* Halophilic lactic acid bacteria — Play a vital role in the fermented food industry. *Folia Microbiologica*, v. 69, n. 2, p. 305–321, 19 fev. 2024.

Niu, Y.-Q. *et al.* Calcium carbonate: controlled synthesis, surface functionalization, and nanostructured materials. *Chemical Society Reviews*, v. 51, n. 18, p. 7883–7943, 20 set. 2022.

Ochiuzzi, M. E. *et al.* Evaluación del sistema Vitek 2 para la identificación de las principales especies de levaduras del género *Candida*. *Revista Argentina de Microbiología*, v. 46, n. 2, p. 107–110, abr. 2014.

Oliart-Ros, R. M. *et al.* Utilización de microorganismos de ambientes extremos y sus productos en el desarrollo biotecnológico. *CienciaUAT*, v. 11, n. 1, p. 79–90, 1 dez. 2016.

Omelson, C. R. Endolithic Microorganisms and Their Habitats. *Their World: A Diversity of Microbial Environments*, p. 171–201, 2016.

Omoregie, A. I. *et al.* Calcium carbonate bioprecipitation mediated by ureolytic bacteria grown in pelletized organic manure medium. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 1 set. 2022.

Ortega-Villamagua, E. *et al.* Precipitación de carbonatos inducida microbiológicamente como potencial estrategia en la restauración de estructuras patrimoniales. *Geconservacion*, v. 21, n. 1, p. 224–234, 16 jun. 2022.

Ortiz-Galeana, M. A. *et al.* Diversidad de bacterias endófitas cultivables asociadas a plantas de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) cv. biloxi con actividades promotoras del crecimiento vegetal. *Chilean journal of agricultural & animal sciences*, n. ahead, 2018.

Páramo Aguilera, L. A.; Narváez Zapata, J. A.; Ortega Morales, B. O. La bioprecipitación de carbonato de calcio por la biota nativa como un método de restauración. *Nexo Revista Científica*, v. 28, n. 01, p. 25–40, 2 dez. 2015.

Parthasarathy Baskaran Sujiritha *et al.* Microbially induced carbonate precipitation with *Arthrobacter creatinolyticus*: An eco-friendly strategy for mitigation of chromium contamination. *Journal of Environmental Management*, v. 365, p. 121300–121300, 2 jul. 2024.

- Passante, E. K. *et al.* Halophilic bacteria in a Lake Michigan drainage basin as potential biological indicators of chloride-impacted freshwaters. *The Science of The Total Environment*, v. 846, p. 157458–157458, 1 nov. 2022.
- Pérez, H. F.; García, M. G. Bioprecipitation of calcium carbonate by *Bacillus subtilis* and its potential to self-healing in cement-based materials. *Journal of Applied Research and Technology*, v. 18, n. 5, 30 out. 2020.
- Prabhakar, A.; Bishop, A. H. Invertebrate pathogenicity and toxin-producing potential of strains of *Bacillus thuringiensis* endemic to Antarctica. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 107, n. 2, p. 132–138, jun. 2011.
- Rabert, C., Larama, G., Fuentes, A., Gutiérrez-Moraga, A., & Tapia-Valdebenito, D. In Situ Rhizosphere Microbiome in Antarctic Vascular Plants, Modulated by Soil Condition. *Microbiology resource announcements*, v. 9, n. 50, p. e01125-20, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/MRA.01125-20>.
- Rajni Hatti-Kaul; Mattiasson, B. Anaerobes in Industrial- and Environmental Biotechnology. *Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology*, p. 1–33, 1 jan. 2016.
- Ramos Cabrera, E. V. *et al.* Evaluación de bacterias endofíticas solubilizadores de fósforo en café, una alternativa sostenible. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, v. 19, n. 2, p. 94–107, 23 jan. 2021.
- Ramos, Larissa R., *et al.* Firmicutes in different soils of Admiralty Bay, King George Island, Antarctica. *Polar Biology*, vol. 42, p. 2219-2226, 2019.
- Reddy, G. S. N. Psychrophilic pseudomonads from Antarctica: *Pseudomonas antarctica* sp. nov., *Pseudomonas meridiana* sp. nov. and *Pseudomonas proteolytica* sp. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, v. 54, n. 3, p. 713–719, 1 maio 2004.
- Reeder, R. J. (Ed.). *Carbonates: Mineralogy and Chemistry*. *Reviews in Mineralogy*, v. 11. Washington D. C.: Mineralogy Society of America, 1983.
- Reis, L. *et al.* Bioprecipitação de carbonato de cálcio por bactérias ureolíticas e suas aplicações. *Enciclopédia Biosfera*, v. 14, n. 26, p. 860–881, 5 dez. 2017.
- Rob Van Houdt *et al.* Evaluation of the Airborne Bacterial Population in the Periodically Confined Antarctic Base Concordia. v. 57, n. 4, p. 640–648, 30 out. 2008.
- Rocío, G. *et al.* Antimicrobial activity against *Microcystis aeruginosa* and degradation of microcystin-LR by bacteria isolated from Antarctica. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 28, n. 37, p. 52381–52391, 19 maio 2021.
- Rodrigues, J. *et al.* Biomineralization of calcium carbonate in concrete by the action of *Bacillus pumilus*. *Engenharia Sanitaria e Ambiental*, v. 28, 1 jan. 2023.

Rodrigues, L. S.; Gioia, T. S. R. D.; Rossi, F. *Stenotrophomonas maltophilia*: resistência emergente ao SMX-TMP em isolados brasileiros. uma realidade? *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v. 47, n. 5, p. 511–517, out. 2011.

Rodriguez-Blanco, J. D.; Shaw, S.; Benning, L. G. The kinetics and mechanisms of amorphous calcium carbonate (ACC) crystallization to calcite, viavaterite. *Nanoscale*, v. 3, n. 1, p. 265–271, 2011.

Rückamp, M. *et al.* Observed glacial changes on the King George Island ice cap, Antarctica, in the last decade. *Global and Planetary Change*, v. 79, n. 1-2, p. 99-109, 2011.

Ruisi, S. *et al.* Fungos na Antártica. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, vol. 6, pág. 127-141, 2007.

Russell, N. J. Molecular adaptations in psychrophilic bacteria: Potential for biotechnological applications. *Biotechnology of Extremophiles*, p. 1–21, 1998.

Russell, N. J. Psychrophilic bacteria—Molecular adaptations of membrane lipids. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, v. 118, n. 3, p. 489–493, nov. 1997.

Sandra Patricia Chaparro-Acuña *et al.* Soil bacteria that precipitate calcium carbonate: mechanism and applications of the process. *Acta Agronómica*, v. 67, n. 2, p. 277–288, 2018.

Scales, B. S. *et al.* Microbiology, Genomics, and Clinical Significance of the *Pseudomonas fluorescens* Species Complex, an Unappreciated Colonizer of Humans. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 27, n. 4, p. 927–948, out. 2014.

Schultz, J. *et al.* Draft Genome Sequence of *Geobacillus* sp. Strain LEMMJ02, a Thermophile Isolated from Deception Island, an Active Volcano in Antarctica. *Microbiology Resource Announcements*, v. 8, n. 42, 17 out. 2019.

Schultz, J. *et al.* Polyphasic Analysis Reveals Potential Petroleum Hydrocarbon Degradation and Biosurfactant Production by Rare Biosphere Thermophilic Bacteria From Deception Island, an Active Antarctic Volcano. *Frontiers in Microbiology*, v. 13, 4 maio 2022.

Seifan, M.; Samani, A. K.; Berenjian, A. Bioconcrete: next generation of self-healing concrete. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 100, n. 6, p. 2591–2602, 29 jan. 2016.

Setzer, Alberto W.; Harter, F. Estudo das temperaturas mínimas de julho 1995 na Estação Antártica Comandante Ferraz, ilha Rei George. *Pesquisa Antártica Brasileira*, v. 4, p. 171-181, 2004.

Shah, M. *et al.* Antibacterial Polyketides from Antarctica Sponge-Derived Fungus *Penicillium* sp. HDN151272. *Marine Drugs*, v. 18, n. 2, p. 71, 23 jan. 2020.

- Shen, L. *et al.* Linking genomic and physiological characteristics of psychrophilic *Arthrobacter* to metagenomic data to explain global environmental distribution. *Microbiome*, v. 9, n. 1, 12 jun. 2021.
- Shriver, D. F.; Peter William Atkins; Langford, C. H. *Química inorgánica*. Barcelona Etc.: Reverté, 2007.
- Silva, F. P. C.; Passarini, V. DE C.; Santos, F. C. S. Bioconcreto: a tecnologia para construção sustentável. *INOVAE - Journal of Engineering, Architecture and Technology Innovation (ISSN 2357-7797)*, v. 5, n. 2, p. 41–58, 29 dez. 2017.
- Silva, J. B. *et al.* Unravelling the genetic potential for hydrocarbon degradation in the sediment microbiome of Antarctic islands. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 99, n. 1, 25 nov. 2022.
- Silva, T. R. E *et al.* Pigments from Antarctic bacteria and their biotechnological applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, p. 1–28, 23 fev. 2021.
- Singh, P.; Banik, R. M. Biochemical Characterization and Antitumor Study of L-Glutaminase from *Bacillus cereus* MTCC 1305. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 171, n. 2, p. 522–531, 20 jul. 2013.
- Smirnova, M. *et al.* Isolation and characterization of fast-growing green snow bacteria from coastal East Antarctica. *MicrobiologyOpen*, v. 10, n. 1, 29 dez. 2020.
- Smith, M. R.; Zahnley, J. C. Production of amylase by *Arthrobacter psychrolactophilus*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, v. 32, n. 7, p. 277–283, 2 jun. 2005.
- Song, M. *et al.* A review on the applications of microbially induced calcium carbonate precipitation in solid waste treatment and soil remediation. *Chemosphere*, v. 290, p. 133229, 1 mar. 2022.
- Souza-Alonso, P. *et al.* Encapsulation of *Pseudomonas libanensis* in alginate beads to sustain bacterial viability and inoculation of *Vigna unguiculata* under drought stress. *3 Biotech*, v. 11, n. 6, 24 maio 2021.
- Srivastava, S.; Dafale, N. A. Genomic dissection of *Niallia* sp. for potential application in lignocellulose hydrolysis and bioremediation. *Archives of microbiology*, v. 206, n. 1, 21 nov. 2023.
- Stjepko Golubic, Imre Friedmann, JU. The Lithobiotic Ecological Niche, with Special Reference to Microorganisms. *SEPM Journal of Sedimentary Research*, v. Vol. 51, 1981.
- Takabait, F. *et al.* Obtención de nanopartículas de carbonato de calcio a partir de precursores inorgánicos y sacarosa como aditivo con potencial utilización como biomaterial. *Boletín de la Sociedad Española de Cerámica y Vidrio*, v. 55, n. 5, p. 179–184, set. 2016.

Taxonomy. Taxonomy browser (*Arthrobacter stackebrandtii*). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=272161>>. Acesso em: 2 out. 2024.

Taxonomy. Taxonomy browser (*Pseudarthrobacter chlorophenolicus*). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=85085>>. Acesso em: 2 out. 2024.

Timmery, S.; Hu, X.; Mahillon, J. Characterization of Bacilli Isolated from the Confined Environments of the Antarctic Concordia Station and the International Space Station. *Astrobiology*, v. 11, n. 4, p. 323–334, maio 2011.

Tino Bashizi *et al.* Whole-Genome Sequence of *Pseudomonas frederiksbergensis* Strain A6, Isolated from the Rhizosphere of Pepper (*Capsicum annuum* L.). *Microbiology resource announcements*, v. 12, n. 7, 18 jul. 2023.

Tomasz Krucoń; Dziejwit, Ł.; Drewniak, Ł. Insight Into Ecology, Metabolic Potential, and the Taxonomic Composition of Bacterial Communities in the Periodic Water Pond on King George Island (Antarctica). *Frontiers in Microbiology*, v. 12, 8 out. 2021.

Torrecillas, M. *et al.* Evaluation of a mass spectrometry and Vitek 2 combined protocol for rapid identification and susceptibility testing of Enterobacterales directly from positive blood cultures. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, v. 38, n. 8, p. 375–378, 1 out. 2020.

Torres, O. D.; Velho, L. La bioprospección como un mecanismo de cooperación internacional para fortalecimiento de capacidades en ciencia y tecnología en Colombia. *Ciência da Informação*, v. 38, n. 3, p. 96–110, dez. 2009.

Trushina, D. B. *et al.* CaCO₃ vaterite microparticles for biomedical and personal care applications. *Materials Science and Engineering: C*, v. 45, p. 644–658, dez. 2014.

Turner, J.; Marshall, G. J. *Climate Change in the Polar Regions*. 2009.

Tyagi, G. *et al.* Bioconcrete-Enabled Resilient Construction: a Review. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 28 mar. 2023.

Vaz, Aline BM, *et al.* The diversity, extracellular enzymatic activities and photoprotective compounds of yeasts isolated in Antarctica. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2011, vol. 42, p. 937-947.

VITEK® 2 Compact. Disponível em: <<https://www.biomerieux.com.br/produto/vitek-2-compact>>.

Wan, T.-W. *et al.* Performance assessment of the Bruker Biotyper MALDI-TOF MS for the identification of difficult-to-identify viridans group streptococci. *Journal of clinical microbiology*, v. 61, n. 12, 19 dez. 2023.

- Wang, F. *et al.* *Arthrobacter psychrochitiniphilus* sp. nov., a psychrotrophic bacterium isolated from Antarctica. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 59, n. Pt 11, p. 2759–2762, 1 nov. 2009.
- Wang, Y. *et al.* Microscale investigations of temperature-dependent microbially induced carbonate precipitation (MICP) in the temperature range 4–50 °C. *Acta Geotechnica*, v. 18, n. 4, p. 2239–2261, 31 out. 2022.
- Wani, A. K. *et al.* Microbial adaptation to different environmental conditions: molecular perspective of evolved genetic and cellular systems. *Archives of Microbiology*, v. 204, n. 2, 19 jan. 2022.
- Weber, B.; Büdel, B. Endoliths. *Encyclopedia of Geobiology*, p. 348–355, 2011.
- Wegner, C.-E. *et al.* A glimpse of the paleome in endolithic microbial communities. *Microbiome*, v. 11, n. 1, 25 set. 2023.
- Widdel, F. Microbiology and ecology of sulfate and sulfur reducing bacteria. In: ZEHNDER, A.J.B. (ed.). *Biology of Anaerobic Microorganisms*. New York: John Wiley & Sons, 1988. p. 469-586.
- Williams, T. J. *et al.* Novel endolithic bacteria of phylum *Chloroflexota* reveal a myriad of potential survival strategies in the Antarctic desert. *Applied and Environmental Microbiology*, 19 fev. 2024.
- Wu, H. *et al.* Cold-adapted *Bacilli* isolated from the Qinghai–Tibetan Plateau are able to promote plant growth in extreme environments. *Environmental Microbiology*, v. 21, n. 9, p. 3505–3526, 5 ago. 2019.
- Wynn-Williams, D. D.; Edwards, H. G. M.; Farran Garcia-Pichel. Functional biomolecules of Antarctic stromatolitic and endolithic cyanobacterial communities. v. 34, n. 4, p. 381–391, 1 out. 1999.
- Xu, J.-M. *et al.* Exploring a high-urease activity *Bacillus cereus* for self-healing concrete via induced CaCO₃ precipitation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 107, n. 20, p. 6351–6362, 22 ago. 2023.
- Yadav, A. N. *et al.* Prospecting cold deserts of north western Himalayas for microbial diversity and plant growth promoting attributes. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 119, n. 6, p. 683–693, jun. 2015.
- Yang, G. *et al.* The effect of *Bacillus cereus* LV-1 on the crystallization and polymorphs of calcium carbonate. *RSC Advances*, v. 12, n. 41, p. 26908–26921, 1 jan. 2022.
- Yang, G. *et al.* The effect of *Bacillus cereus* LV-1 on the crystallization and polymorphs of calcium carbonate. *RSC Advances*, v. 12, n. 41, p. 26908–26921, 1 jan. 2022.
- Yao, F. *et al.* Thermogravimetric Analysis on a Resonant Microcantilever. *Analytical Chemistry*, v. 94, n. 26, p. 9380–9388, 22 jun. 2022.

- Yarzabal, Luis Andrés. Antarctic psychrophilic microorganisms and biotechnology: history, current trends, applications, and challenges. *Microbial models: From environmental to industrial sustainability*, p. 83-118, 2016.
- Yergeau, Etienne; KOWALCHUK, George A. Responses of Antarctic soil microbial communities and associated functions to temperature and freeze–thaw cycle frequency. *Environmental microbiology*, vol. 10, no 9, p. 2223-2235, 2008.
- Zammuto, V. *et al.* Hot Resistance of Spores from the Thermophilic *Bacillus horneckiae* SBP3 of Shallow Hydrothermal Vent Origin Elucidated by Spectroscopic Analyses. *Applied Sciences*, v. 11, n. 9, p. 4256, 8 maio 2021.
- Zgonik, V. *et al.* Extremophilic Microorganisms in Central Europe. *Microorganisms*, v. 9, n. 11, p. 2326, 10 nov. 2021.
- Zhang, C. *et al.* Comparison of carbonate precipitation induced by *Curvibacter* sp. HJ-1 and *Arthrobacter* sp. MF-2: Further insight into the biomineralization process. *Journal of Structural Biology*, v. 212, n. 2, p. 107609, nov. 2020.
- Zhou, M.-Y. *et al.* Diversity of Both the Cultivable Protease-Producing Bacteria and Bacterial Extracellular Proteases in the Coastal Sediments of King George Island, Antarctica. *PLoS ONE*, v. 8, n. 11, p. e79668, 4 nov. 2013.
- Znój, A. *et al.* Root-Associated Bacteria Community Characteristics of Antarctic Plants: *Deschampsia antarctica* and *Colobanthus quitensis*—a Comparison. *Microbial Ecology*, v. 84, n. 3, p. 808–820, 18 out. 2021.
- Zoppas, F. M.; Bernardes, A. M.; MENEGUZZI, Á. Parâmetros operacionais na remoção biológica de nitrogênio de águas por nitrificação e desnitrificação simultânea. *Engenharia Sanitaria e Ambiental*, v. 21, n. 1, p. 29–42, mar. 2016.

ANEXOS

ANEXO A – RELATÓRIOS GERADOS PELOS SISTEMA VITEK® 2 COMPACT

A seguir, serão anexadas as imagens dos relatórios gerados pelo sistema VITEK® 2 COMPACT, os quais correspondem aos testes bioquímicos realizados para identificar as 7 bactérias que não puderam ser identificadas pelo sistema MALDI Biotyper® Sirius One.

Figura 37 – Relatório gerado da bactéria UP11.

Informações da Identificação	Carta: BCL	N° de Lote: 2392436203	Data de Validade: 28/Jul/2024 11:00 BRT														
	Estado: Final	Hora da Análise: 13,90 Horas	Concluído: 17/Set/2023 23:56 BRT														
Origem do microrganismo	VITEK 2																
Microrganismo Selecionado	98% Probabilidade Alicyclobacillus acidoterrestris/acidocaldarius Bionúmero: 0703100000000000 Confiança: Excelente identificação																
Microrganismos de Análise e Testes a Separar: Alicyclobacillus acidoterrestris/ acidocaldarius Alicyclobacillus acidocaldarius 60-63C(100), Alicyclobacillus acidoterrestris 60-63C(0),																	
Mensagens da Análise:																	
Contradizem o(s) Perfí(l)s Biológico(s) Típico(s) Alicyclobacillus acidoterrestris/ PyrA(70),ELLM(80), acidocaldarius																	
Detalhes Bioquímicos																	
1	BXYL	-	3	LysA	-	4	AspA	-	5	LeuA	+	7	PheA	+	8	ProA	+
9	BGAL	-	10	PyrA	-	11	AGAL	-	12	AlaA	+	13	TyrA	+	14	BNAG	-
15	APPA	+	18	CDEX	-	19	dGAL	-	21	GLYG	-	22	INO	-	24	MdG	-
25	ELLM	-	26	MdX	-	27	AMAN	-	29	MTE	-	30	GlyA	-	31	dMAN	-
32	dMNE	-	34	dMLZ	-	36	NAG	-	37	PLE	-	39	IRHA	-	41	BGLU	-
43	BMAN	-	44	PHC	-	45	PVATE	-	46	AGLU	-	47	dTAG	-	48	dTRE	-
50	INU	-	53	dGLU	-	54	dRIB	-	56	PSCNa	-	58	NaCl 6.5%	-	59	KAN	-
60	OLD	-	61	ESC	-	62	TTZ	-	63	POLYB I	-						

Fonte: (BIO MÉRIEUX, 2024).

Figura 38 – Relatório gerado da bactéria UP12.

Informações da Identificação	Carta: BCL	N° de Lote: 2392436203	Data de Validade: 28/Jul/2024 11:00 BRT														
	Estado: Final	Hora da Análise: 13,88 Horas	Concluído: 17/Set/2023 23:55 BRT														
Origem do microrganismo	VITEK 2																
Microrganismo Selecionado	98% Probabilidade Alicyclobacillus acidoterrestris/acidocaldarius Bionúmero: 0703100000000000 Confiança: Excelente identificação																
Microrganismos de Análise e Testes a Separar: Alicyclobacillus acidoterrestris/ acidocaldarius Alicyclobacillus acidocaldarius 60-63C(100), Alicyclobacillus acidoterrestris 60-63C(0),																	
Mensagens da Análise:																	
Contradizem o(s) Perfí(l)s Biológico(s) Típico(s) Alicyclobacillus acidoterrestris/ PyrA(70),ELLM(80), acidocaldarius																	
Detalhes Bioquímicos																	
1	BXYL	-	3	LysA	-	4	AspA	-	5	LeuA	+	7	PheA	+	8	ProA	+
9	BGAL	-	10	PyrA	-	11	AGAL	-	12	AlaA	+	13	TyrA	+	14	BNAG	-
15	APPA	+	18	CDEX	-	19	dGAL	-	21	GLYG	-	22	INO	-	24	MdG	-
25	ELLM	-	26	MdX	-	27	AMAN	-	29	MTE	-	30	GlyA	-	31	dMAN	-
32	dMNE	-	34	dMLZ	-	36	NAG	-	37	PLE	-	39	IRHA	-	41	BGLU	-
43	BMAN	-	44	PHC	-	45	PVATE	(-)	46	AGLU	-	47	dTAG	-	48	dTRE	-
50	INU	-	53	dGLU	-	54	dRIB	-	56	PSCNa	-	58	NaCl 6.5%	-	59	KAN	-
60	OLD	-	61	ESC	-	62	TTZ	-	63	POLYB I	-						

Fonte: (BIO MÉRIEUX, 2024).

Figura 39 – Relatório gerado da bactéria UP13.

Informações da Identificação	Carta:	BCL	Nº de Lote:	2392436203	Data de Validade:	28/Jul/2024 11:00 BRT											
	Estado:	Final	Hora da Análise:	13,88 Horas	Concluído:	17/Set/2023 23:55 BRT											
Origem do microrganismo	VITEK 2																
Microrganismo Seleccionado	98% Probabilidade Alicyclobacillus acidoterrestris/acidocaldarius Bionúmero: 0703100000000000 Confiança: Excelente identificação																
Microrganismos de Análise e Testes a Separar: Alicyclobacillus acidoterrestris/ acidocaldarius Alicyclobacillus acidocaldarius 60-63C(100), Alicyclobacillus acidoterrestris 60-63C(0),																	
Mensagens da Análise:																	
Contradizem o(s) Perfí(l)s Biológico(s) Típico(s) Alicyclobacillus acidoterrestris/ PyrA(70),ELLM(80), acidocaldarius																	
Detalhes Bioquímicos																	
1	BXYL	-	3	LysA	-	4	AspA	-	5	LeuA	+	7	PheA	+	8	ProA	+
9	BGAL	-	10	PyrA	-	11	AGAL	-	12	AlaA	+	13	TyrA	+	14	BNAG	-
15	APPA	+	18	CDEX	-	19	dGAL	-	21	GLYG	-	22	INO	-	24	MdG	-
25	ELLM	-	26	MdX	-	27	AMAN	-	29	MTE	-	30	GlyA	-	31	dMAN	-
32	dMNE	-	34	dMLZ	-	36	NAG	-	37	PLE	-	39	IRHA	-	41	BGLU	-
43	BMAN	-	44	PHC	-	45	PVATE	-	46	AGLU	-	47	dTAG	-	48	dTRE	-
50	INU	-	53	dGLU	-	54	dRIB	-	56	PSCNa	-	58	NaCl	-	59	KAN	-
60	OLD	-	61	ESC	-	62	TTZ	-	63	POLYB	1-						

Fonte: (BIO MÉRIEUX, 2024).

Figura 40 – Relatório gerado da bactéria UP20.

Informações da Identificação	Carta:	GN	Nº de Lote:	2412507503	Data de Validade:	7/Out/2024 11:00 BRT											
	Estado:	Final	Hora da Análise:	9,97 Horas	Concluído:	17/Set/2023 20:00 BRT											
Origem do microrganismo	VITEK 2																
Microrganismo Seleccionado	Low Discrimination Bionúmero: 0000001000000000 Confiança: Baixa Discriminação																
Microrganismos de Análise e Testes a Separar: Low Discrimination Organism Aeromonas salmonicida UREASE(1),DNase(99), Oligella ureolytica UREASE(99),DNase(1),																	
Mensagens da Análise:																	
Contradizem o(s) Perfí(l)s Biológico(s) Típico(s) Oligella ureolytica GGT(93),URE(85),																	
Detalhes Bioquímicos																	
2	APPA	-	3	ADO	-	4	PyrA	-	5	IARL	-	7	dCEL	-	9	BGAL	-
10	H2S	-	11	BNAG	-	12	AGLTp	-	13	dGLU	-	14	GGT	-	15	OFF	-
17	BGLU	-	18	dMAL	-	19	dMAN	-	20	dMNE	-	21	BXYL	-	22	BAlap	-
23	ProA	+	26	LIP	-	27	PLE	-	29	TyrA	-	31	URE	-	32	dSOR	-
33	SAC	-	34	dTAG	-	35	dTRE	-	36	CIT	-	37	MNT	-	39	5KG	-
40	ILATk	-	41	AGLU	-	42	SUCT	-	43	NAGA	-	44	AGAL	-	45	PHOS	-
46	GlyA	-	47	ODC	-	48	LDC	-	53	IHISa	-	56	CMT	-	57	BGUR	-
58	O129R	-	59	GGAA	-	61	IMLTa	-	62	ELLM	-	64	ILATa	-			

Fonte: (BIO MÉRIEUX, 2024).

Figura 41 – Relatório gerado da bactéria UP26.

Informações da Identificação	Carta:	GN	Nº de Lote:	2412507503	Data de Validade:	7/Out/2024 11:00 BRT											
	Estado:	Final	Hora da Análise:	9,95 Horas	Concluído:	17/Set/2023 19:59 BRT											
Origem do microrganismo	VITEK 2																
Microrganismo Seleccionado	Low Discrimination Bionúmero: 0000001000000000 Confiança: Baixa Discriminação																
Microrganismos de Análise e Testes a Separar: Low Discrimination Organism Aeromonas salmonicida UREASE(1),DNase(99), Oligella ureolytica UREASE(99),DNase(1),																	
Mensagens da Análise:																	
Contradizem o(s) Perfí(l)s Biológico(s) Típico(s) Oligella ureolytica GGT(93),URE(85),																	
Detalhes Bioquímicos																	
2	APPA	-	3	ADO	-	4	PyrA	-	5	IARL	-	7	dCEL	-	9	BGAL	(-)
10	H2S	-	11	BNAG	-	12	AGLTp	-	13	dGLU	-	14	GGT	-	15	OFF	-
17	BGLU	-	18	dMAL	-	19	dMAN	-	20	dMNE	-	21	BXYL	-	22	BAlap	-
23	ProA	+	26	LIP	-	27	PLE	-	29	TyrA	-	31	URE	-	32	dSOR	-
33	SAC	-	34	dTAG	-	35	dTRE	-	36	CIT	-	37	MNT	-	39	5KG	-
40	ILATk	-	41	AGLU	-	42	SUCT	-	43	NAGA	-	44	AGAL	-	45	PHOS	-
46	GlyA	-	47	ODC	-	48	LDC	-	53	IHISa	-	56	CMT	-	57	BGUR	-
58	O129R	-	59	GGAA	-	61	IMLTa	-	62	ELLM	-	64	ILATa	-			

Fonte: (BIO MÉRIEUX, 2024).

Figura 42 – Relatório gerado da bactéria R2.

Informações da Identificação	Carta:	GN	Nº de Lote:	2412507503	Data de Validade:	7/Out/2024 11:00 BRT											
	Estado:	Final	Hora da Análise:	5,85 Horas	Concluído:	17/Set/2023 15:54 BRT											
Origem do microrganismo	VITEK 2																
Microrganismo Selecionado	98% Probabilidade Sphingomonas paucimobilis Bionúmero: 0000120100000000 Confiança: Excelente identificação																
Microrganismos de Análise e Testes a Separar:																	
Mensagens da Análise:																	
Contradizem o(s) Perfíl(s) Biológico(s) Típico(s)																	
Detalhes Bioquímicos																	
2	APPA	-	3	ADO	-	4	PyrA	-	5	IARL	-	7	dCEL	-	9	BGAL	-
10	H2S	-	11	BNAG	-	12	AGLTp	-	13	dGLU	-	14	GGT	-	15	OFF	-
17	BGLU	+	18	dMAL	-	19	dMAN	-	20	dMNE	-	21	BXYL	+	22	BAlap	-
23	ProA	-	26	LIP	-	27	PLE	-	29	TyrA	+	31	URE	-	32	dSOR	-
33	SAC	-	34	dTAG	-	35	dTRE	-	36	CIT	-	37	MNT	-	39	SKG	-
40	ILATk	-	41	AGLU	(-)	42	SUCT	-	43	NAGA	-	44	AGAL	-	45	PHOS	-
46	GlyA	-	47	ODC	-	48	LDC	-	53	IHISa	-	56	CMT	-	57	BGUR	-
58	O129R	-	59	GGAA	-	61	IMLTa	-	62	ELLM	-	64	ILATa	-			

Fonte: (BIO MÉRIEUX, 2024).

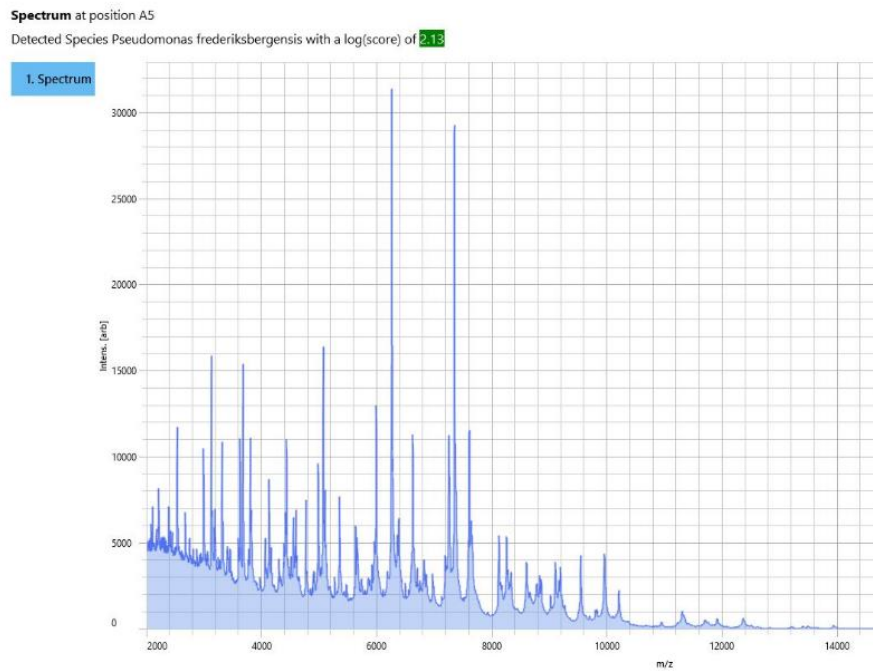
Figura 43 – Relatório gerado da bactéria R3.

Informações da Identificação	Carta:	GN	Nº de Lote:	2412507503	Data de Validade:	7/Out/2024 11:00 BRT											
	Estado:	Final	Hora da Análise:	4,87 Horas	Concluído:	17/Set/2023 14:55 BRT											
Origem do microrganismo	VITEK 2																
Microrganismo Selecionado	98% Probabilidade Sphingomonas paucimobilis Bionúmero: 0000120100200000 Confiança: Excelente identificação																
Microrganismos de Análise e Testes a Separar:																	
Mensagens da Análise:																	
Contradizem o(s) Perfíl(s) Biológico(s) Típico(s)																	
Detalhes Bioquímicos																	
2	APPA	-	3	ADO	-	4	PyrA	-	5	IARL	-	7	dCEL	-	9	BGAL	-
10	H2S	-	11	BNAG	-	12	AGLTp	-	13	dGLU	-	14	GGT	-	15	OFF	-
17	BGLU	+	18	dMAL	-	19	dMAN	-	20	dMNE	-	21	BXYL	+	22	BAlap	-
23	ProA	-	26	LIP	-	27	PLE	-	29	TyrA	+	31	URE	-	32	dSOR	-
33	SAC	-	34	dTAG	-	35	dTRE	-	36	CIT	-	37	MNT	-	39	SKG	-
40	ILATk	-	41	AGLU	+	42	SUCT	-	43	NAGA	-	44	AGAL	-	45	PHOS	-
46	GlyA	-	47	ODC	-	48	LDC	-	53	IHISa	-	56	CMT	-	57	BGUR	-
58	O129R	-	59	GGAA	-	61	IMLTa	-	62	ELLM	-	64	ILATa	-			

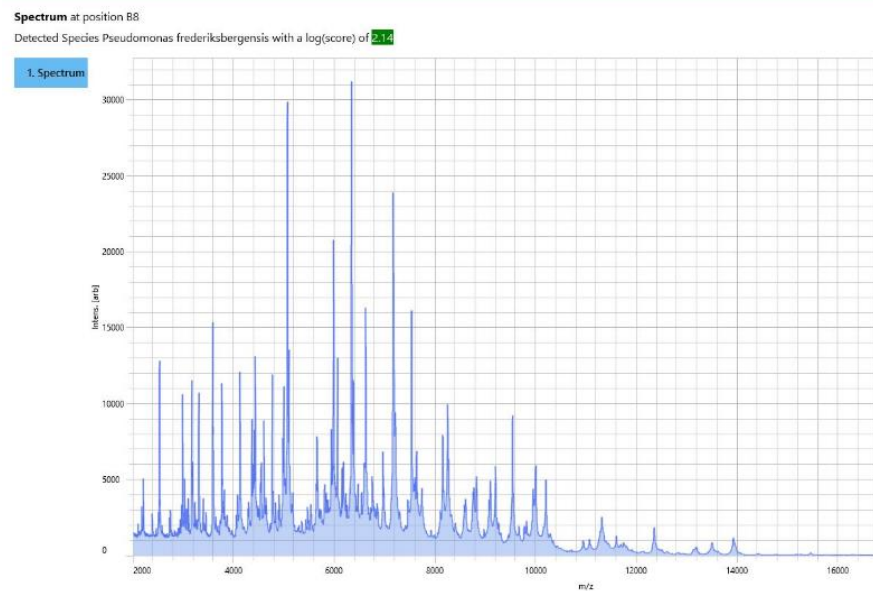
Fonte: (BIO MÉRIEUX, 2024).

ANEXO B – ESPECTROS DE MASSAS GERADOS PELO MALDI-TOF MS

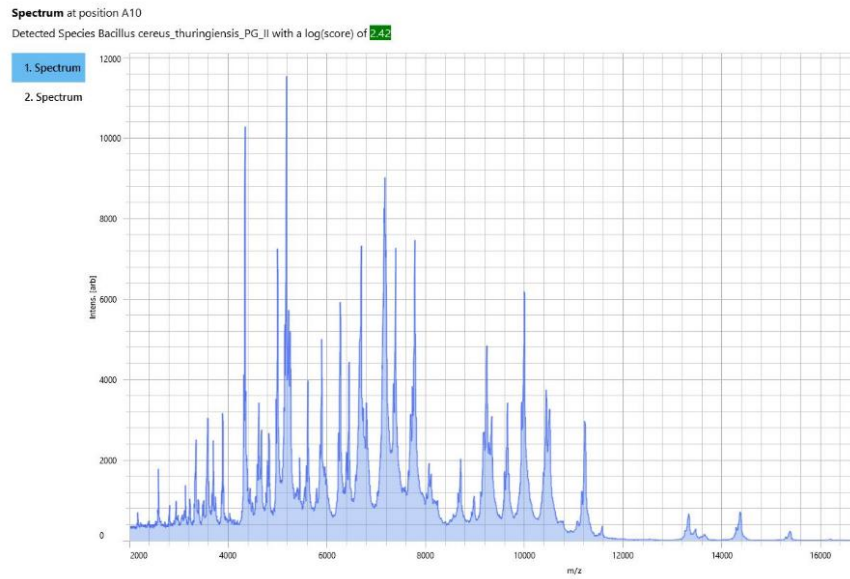
A seguir, são anexadas as imagens de alguns gráficos dos espectros de massas gerados pelo sistema. Esses gráficos correspondem às leituras que obtiveram os melhores scores, identificados como scores verdes, indicando uma identificação confiável das bactérias analisadas.

Figura 44 – Gráfico do espectro de massa, correspondente à bactéria UP4.

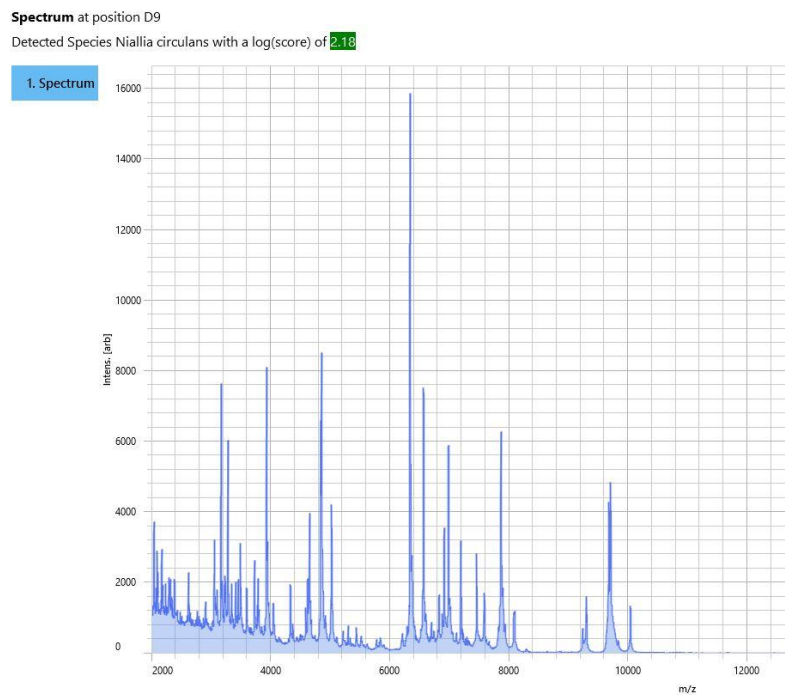
Fonte: (Bruker MALDI Biotyper Identification Results, 2024)

Figura 45 – Gráfico do espectro de massa, correspondente à bactéria UP19.

Fonte: (Bruker MALDI Biotyper Identification Results, 2024)

Figura 46 – Gráfico do espectro de massa, correspondente à bactéria R9.

Fonte: (Bruker MALDI Biotyper Identification Results, 2024)

Figura 47 – Gráfico do espectro de massa, correspondente à bactéria R11

Fonte: (Bruker MALDI Biotyper Identification Results, 2024)