



**INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE  
CIÊNCIAS DA VIDA E DA NATUREZA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM BIOCÊNCIAS**

**PROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS DA ANTÁRTICA TOLERANTES À BAIXAS  
TEMPERATURAS, CARACTERIZAÇÃO DA VIRULÊNCIA E RESISTÊNCIA A  
ANTIBIÓTICOS**

**ELIZANDRA RIBEIRO BUENO MOREIRA**

Foz do Iguaçu  
2021



**INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE CIÊNCIAS  
DA VIDA E DA NATUREZA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM BIOCÊNCIAS**

**PROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS DA ANTÁRTICA TOLERANTES À BAIXAS  
TEMPERATURAS, CARACTERIZAÇÃO DA VIRULÊNCIA E RESISTÊNCIA A  
ANTIBIÓTICOS**

**ELIZANDRA RIBEIRO BUENO MOREIRA**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, do Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza, da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Michel Rodrigo Zambrano Passarini


Foz do Iguaçu  
2021

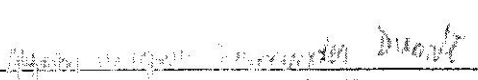
ELIZANDRA RIBEIRO BUENO MOREIRA

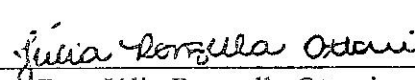
**PROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS DA ANTÁRTICA TOLERANTES À BAIXAS TEMPERATURAS, CARACTERIZAÇÃO DA VIRULÊNCIA E RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, do Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza, da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências.

**BANCA EXAMINADORA**

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Michel Rodrigo Zambrano Passarini  
Orientador  
UNILA

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Alysson Fernandes Duarte  
Examinador  
UFAL

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Júlia Ronzella Ottoni  
Examinadora  
UNILA

Catálogo elaborado pelo Setor de Tratamento da Informação  
Catálogo de Publicação na Fonte. UNILA - BIBLIOTECA LATINO-AMERICANA - PTI

M838p

Moreira, Elizandra Ribeiro Bueno.

Prospecção de bactérias da Antártica tolerantes a baixas temperaturas, caracterização da virulência e resistência a antibióticos / Elizandra Ribeiro Bueno Moreira. - Foz do Iguaçu, 2021.

93 fls.: il.

Universidade Federal da Integração Latino-Americana, CICV (Centro Interdisciplinar de Ciências da Vida), Programa de Pós-graduação em Biociências-PPGBC.

Orientador: Dr. Michel Rodrigo Zambrano Passarini.

1. Bactérias - Antártida. 2. Proteínas. 3. Drogas - Resistência em micro-organismos. I. Passarini, Dr. Michel Rodrigo Zambrano. II. Título.

CDU 579

## **AGRADECIMENTO (S)**

Em primeiro lugar agradeço ao meu professor orientador Dr. Michel Rodrigo Zambrano Passarini, não só pela constante orientação e paciência, mas, sobretudo por ter confiado a mim essa pesquisa, agradeço ao Programa de Pós-graduação em Biociências (PPGBC) e ao secretário do PPGBC, Erwin Becker Marques, que sempre foram solícitos em defender meus interesses de aluna e prestar informações pertinentes ao programa. A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- Brasil (CAPES), que permitiu minha dedicação exclusiva a essa pesquisa. Aos professores que contribuíram para que esse trabalho fosse realizado, em especial a Dra. Valéria Maia de Oliveira, por ter cedido o material de estudo e estar presente na banca de qualificação. A Dra. Maria Leandra Terencio, Dr. Carlos Henrique Schneider e a colega Geovana Marques Moreira Bertin, pelo auxílio nos testes moleculares. Agradeço também a minha família, por todo incentivo que recebi em especial aos meus pais e esposo que foram meu alicerce durante esse período. Por fim, agradeço a banca examinadora, Dra Júlia Ronzella Ottoni e Dr. Alysson Wagner Fernandes Duarte pelo tempo cedido e pelas sugestões que agregaram mais valor a esse trabalho.

*Não há problema que não possa ser solucionado pela paciência.*  
*Chico Xavier*

*Não importa o quão de vagar você anda desde que não pare.*  
*Confúcio.*

MOREIRA, Elizandra Ribeiro Bueno. **Prospecção de bactérias da Antártica tolerantes à baixas temperaturas, caracterização da virulência e resistência a antibióticos.** 93 p. Dissertação de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Biociências – Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Foz do Iguaçu, 2021.

## RESUMO

O continente Antártico abriga uma vasta diversidade de microrganismos psicrófilos. Devido às adaptações adquiridas por esses organismos às baixas temperaturas, os mesmos podem produzir compostos de interesse biotecnológico como os anticongelantes. A bioprospecção é uma estratégia promissora para o setor industrial, entretanto, a utilização de microrganismos potencialmente patogênicos pode inviabilizar sua utilização em larga escala. Assim a caracterização das atividades bioquímicas bacterianas incluindo fatores de virulência, bem como a avaliação da resistência a fármacos antimicrobianos pode ser uma abordagem utilizada na verificação do potencial patogênico de determinados microrganismos em uma eventual contaminação biológica. Desta forma, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o potencial biotecnológico de bactérias isoladas de amostras do continente Antártico em tolera baixas temperaturas (-80°C), bem como avaliar o potencial patogênico por meio de ensaios de virulência. Cem bactérias previamente preservadas à -80 °C em glicerol 20% foram reativadas em meio de cultivo R2B a 15 °C, por 15 dias. Sessenta e cinco isolados reativados foram submetidos a ensaios de produção de compostos anticongelantes em meio R2B à -80 °C, por 15 dias, sem a presença do agente crioprotetor (glicerol 20%), o indicativo de produção de anticongelantes foi a partir do crescimento sem crioprotetor nessas condições. A produção das enzimas hidrolíticas fosfolipase, proteinase e atividade hemolítica foram avaliadas em meio de cultura com indicador e a formação de halos ao redor dos isolados foi considerada ensaios positivos. Para a enzima catalase, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi adicionado às células microbiana sendo, a formação de bolhas, considerada ensaio positivo. O crescimento em pHs fisiológicos foram realizados com pH ajustado para 4,0, 7,0 e 8,0. Os ensaios de crescimento em temperatura corporal foram realizados em meio R2A, incubados a 15 °C, como controle a 15 °C e a 36 °C, 38 °C e 40 °C durante 15 dias. No total, 41 isolados foram considerados positivos para produção de compostos anticongelantes. Cinco linhagens foram positivas para atividade hemolítica, *Arthrobacter* sp. (356 e 443), *Psychromonas arctica* (ESH238) e as linhagens não identificadas (NI) 359 e 363, com índice de virulência variando de 1,2 a 1,9. Uma linhagem foi positiva para proteinase, *Psychrobacter fozii* (456), com índice de virulência de 1,2. Todos os isolados foram negativos para os ensaios de fosfolipase bem como positivos para o ensaio de catalase. Os 41 isolados bacterianos testados foram considerados tolerantes a pelo menos dois pHs distintos, com variações no índice médio de tolerância de 4,0 a 9,3; 2,3 a 12,3 e 2,3 a 12, nos pHs 4,0, 7,0 e pH 8,0, respectivamente. Nove isolados foram capazes de tolerar as três temperaturas testadas, 36 °C (2,6 a 23,0), 38 °C (0,6 a 16,0) e 40 °C (1,0 a 19,6). Todos os isolados foram sensíveis aos três antibióticos testados. Os resultados do presente estudo demonstraram que linhagens bacterianas recuperadas de amostras da Antártica podem ser responsáveis pela produção de compostos anticongelantes, bem como podem ser consideradas seguras para serem utilizadas em processos biotecnológicos industriais.

**Palavras-chave:** Bactérias extremófilas, Proteínas anti-congelamento, Resistência bacteriana, Virulência bacteriana.

MOREIRA, Elizandra Ribeiro Bueno. **Prospección de bacterias antárticas tolerantes a bajas temperaturas, caracterización de virulencia y resistencia a antibióticos**. 93 p. Tesis de Maestría del Programa de Posgrado en Biociencias - Universidad Federal de Integración Latinoamericana, Foz do Iguaçu, 2021.

## RESUMEN

El continente antártico alberga una gran diversidad de microorganismos psicrófilos. Debido a las adaptaciones que adquieren estos organismos a las bajas temperaturas, pueden producir compuestos de interés biotecnológico como el anticongelante. La bioprospección es una estrategia prometedora para el sector industrial, sin embargo, el uso de microorganismos potencialmente patógenos puede hacer inviable su uso a gran escala. Por lo tanto, la caracterización de las actividades bioquímicas bacterianas, incluidos los factores de virulencia, así como la evaluación de la resistencia a los fármacos antimicrobianos puede ser un enfoque utilizado para verificar el potencial patógeno de ciertos microorganismos en una eventual contaminación biológica. Así, el objetivo del presente trabajo fue evaluar el potencial biotecnológico de bacterias aisladas de muestras del continente antártico para producir compuestos anticongelantes, así como evaluar el potencial patógeno mediante ensayos de virulencia. Se reactivaron cien bacterias previamente conservadas a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  en glicerol al 20% en medio de cultivo R2B a  $15\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 15 días. Sesenta y cinco aislados reactivados fueron sometidos a pruebas para la producción de compuestos anticongelantes en medio R2B a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , durante 15 días, sin presencia del agente crioprotector (glicerol al 20%), el indicativo de producción de anticongelante fue de crecimiento sin crioprotector en estas condiciones. Se evaluó la producción de enzimas hidrolíticas fosfolipasa, proteinasa y actividad hemolítica en un medio de cultivo con indicador y se consideró como ensayos positivos la formación de halos alrededor de los aislamientos. Para la enzima catalasa, se añadió  $\text{H}_2\text{O}_2$  a las células microbianas y la formación de burbujas se consideró un ensayo positivo. El crecimiento a pH fisiológicos se llevó a cabo con pH ajustado a 4,0, 7,0 y 8,0. Los ensayos de crecimiento a temperatura corporal se realizaron en medio R2A, incubados a  $15\text{ }^{\circ}\text{C}$  como control ya  $36\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $38\text{ }^{\circ}\text{C}$  y  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 15 días. En total, 41 aislamientos se consideraron positivos para la producción de compuestos anticongelantes. Cinco cepas fueron positivas para la actividad hemolítica, *Arthrobacter* sp. (356 y 443), *Psychromonas arctica* (ESH238) y cepas no identificadas (NI) 359 y 363, con un índice de virulencia que oscila entre 1,2 y 1,9. Una cepa resultó positiva para proteinasa, *Psychrobacter fozii* (456), con un índice de virulencia de 1,2. Todos los aislamientos fueron negativos para los ensayos de fosfolipasa y positivos para el ensayo de catalasa. Los 41 aislamientos bacterianos probados se consideraron tolerantes a al menos dos pH diferentes, con variaciones en el índice de tolerancia promedio de 4.0 a 9.3; 2,3 a 12,3 y 2,3 a 12, a pH 4,0, 7,0 y pH 8,0, respectivamente. Nueve aislamientos pudieron tolerar las tres temperaturas probadas,  $36\text{ }^{\circ}\text{C}$  (2,6 a 23,0),  $38\text{ }^{\circ}\text{C}$  (0,6 a 16,0) y  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  (1,0 a 19,6). Todos los aislamientos fueron sensibles a los tres antibióticos probados. Los resultados del presente estudio demostraron que las cepas bacterianas recuperadas de muestras de la Antártida pueden ser responsables de la producción de compuestos anticongelantes, además de ser consideradas seguras para su uso en procesos biotecnológicos industriales.

**Palabras clave:** Bacterias extremófilas, Proteínas anticongelantes, Resistencia bacteriana, Virulencia bacteriana.



MOREIRA, Elizandra Ribeiro Bueno. **Prospecting of antarctic bacteria tolerant the low temperature, characterization of virulence and antibiotic resistance.** 93 p. Tesis de maestría del Programa de Posgrado en Biociencias - Universidad Federal de Integración Latinoamericana, Foz do Iguacu, 2021.

### **ABSTRACT**

The Antarctic continent is home to a vast diversity of psychrophilic microorganisms. Due to the adaptations acquired by these organisms to low temperatures, they can produce compounds of biotechnological interest such as antifreeze. Bioprospecting is a promising strategy for the industrial sector; however, the use of potentially pathogenic microorganisms can make its use on a large scale unfeasible. Thus, the characterization of bacterial biochemical activities including virulence factors, as well as the assessment of resistance to antimicrobial drugs can be an approach used to verify the pathogenic potential of certain microorganisms in an eventual biological contamination. Thus, the objective of the present work was to evaluate the biotechnological potential of bacteria isolated from samples from the Antarctic continent to produce antifreeze compounds, as well as to evaluate the pathogenic potential through virulence assays. One hundred bacteria previously preserved at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  in 20% glycerol were reactivated in R2B culture medium at  $15\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 15 days. Sixty-five reactivated isolates were subjected to tests for the production of antifreeze compounds in R2B medium at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , for 15 days, without the presence of the cryoprotective agent (20% glycerol), the indicative of production of antifreeze was from growth without cryoprotectant under these conditions. The production of hydrolytic enzymes phospholipase, proteinase and hemolytic activity were evaluated in a culture medium with indicator and the formation of halos around the isolates was considered as positive assays. For the catalase enzyme,  $\text{H}_2\text{O}_2$  was added to the microbial cells and the formation of bubbles was considered a positive assay. Growth at physiological pHs was carried out with pH adjusted to 4.0, 7.0 and 8.0. The growth assays at body temperature were carried out in R2A medium, incubated at  $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ , as a control at  $15\text{ }^{\circ}\text{C}$  and at  $36\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $38\text{ }^{\circ}\text{C}$  and  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 15 days. In total, 41 isolates were considered positive for the production of antifreeze compounds. Five strains were positive for hemolytic activity, *Arthrobacter* sp. (356 and 443), *Psychromonas arctica* (ESH238) and unidentified strains (NI) 359 and 363, with a virulence index ranging from 1.2 to 1.9. One strain was positive for proteinase, *Psychrobacter fozii* (456), with a virulence index of 1.2. All isolates were negative for the phospholipase assays as well as positive for the catalase assay. The 41 bacterial isolates tested were considered tolerant to at least two different pHs, with variations in the average tolerance index from 4.0 to 9.3; 2.3 to 12.3 and 2.3 to 12, at pH 4.0, 7.0 and pH 8.0, respectively. Nine isolates were able to tolerate the three temperatures tested,  $36\text{ }^{\circ}\text{C}$  (2.6 to 23.0),  $38\text{ }^{\circ}\text{C}$  (0.6 to 16.0) and  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  (1.0 to 19.6). All isolates were sensitive to the three antibiotics tested. The results of the present study demonstrated that bacterial strains recovered from samples from Antarctica may be responsible for the production of antifreeze compounds, as well as being considered safe to be used in industrial biotechnological processes.

**Keywords:** Extremophile bacteria, Anti-freeze proteins, Bacterial resistance, Bacterial virulence.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Divisão do Continente Antártico .....	18
<b>Figura 2</b> – Bactérias Pigmentadas Isoladas da Antártica .....	19
<b>Figura 3</b> – Estrutura das Proteínas Anticongelantes em Diferentes Organismos.....	22
<b>Figura 4</b> – Adesão das PACs ao Gelo, Inibindo o Crescimento do Cristal de Gelo .....	23
<b>Figura 5</b> – Locais de Ligação das PACs no Gelo.....	26
<b>Figura 6</b> – Crescimento Bacteriano Após Reativação em Meio de Cultura R2B .....	44
<b>Figura 7</b> – Isolados Reativados Após o Congelamento -80 °C (sem crioprotetor glicerol 20%) em Meio de Cultura R2B .....	45
<b>Figura 8</b> – Atividade Hemolítica no Ensaio Utilizando Ágar Sangue. Isolados <i>Arthrobacter</i> sp. (443); Não Identificado (363) e <i>Psychromonas arctica</i> (ESH238).....	50
<b>Figura 9</b> – Atividade de Proteinase na Linhagem <i>Psychrobacter fozii</i> (456) em Meio de Cultura R2A Enriquecido com Albumina Sérica Bovina.....	53
<b>Figura 10</b> – Formação de Bolhas no H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Quando Colocados em Contato com as Células Microbianas (Catalase Positiva).....	54
<b>Figura 11</b> – Ensaio de Tolerância dos Isolados em Diferentes pHs .....	56
<b>Figura 12</b> – Antibiograma Mostrando o Isolado <i>Psychrobacter fozii</i> (31) Sensível aos Antibióticos Testados.....	66
<b>Figura 13</b> – Produto Final da PCR em Gel de Agarose 0,8% Visualizada em Luz Ultravioleta .....	70

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1</b> – Características das PACs não Glicolisadas, numeradas na Ordem em que Foram Descobertas em Peixes.....	21
<b>Quadro 2</b> – Local de Coleta dos Isolados Positivos para Resistência ao Congelamento e Resultado da Catalase .....	37

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Organismos psicrófilos produtores de PACs e local de isolamento .....	23
<b>Tabela 2</b> – Enzimas Ativas ao Frio ou Termo-Lábeis que Possuem Patentes .....	29
<b>Tabela 3</b> – O índice da Atividade Enzimática/Hemolítica (IE/IH) Foi Determinado por Meio do Quociente Entre Halo Médio da Colônia em mm, Halo médio Enzimático/Hemolítico em mm ( $IE = HE / HC$ ) .....	50

<b>Tabela 4</b> – Resultado em mm do Teste de Sensibilidade a Antibióticos .....	67
--	----

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1</b> – Índice de Atividade Hemolítica/Enzimática (IH/IE) dos Isolados Considerados Positivos .....	51
<b>Gráfico 2</b> – Índice de Crescimento dos Isolados Tolerantes ao pH 4.0 .....	57
<b>Gráfico 3</b> – Índice de Crescimento dos Isolados Tolerantes ao pH 7.0 .....	58
<b>Gráfico 4</b> – Índice de Crescimento dos Isolados Tolerantes ao pH 8.0 .....	59
<b>Gráfico 5</b> – Índice de Crescimento dos Isolados Tolerantes aos Três pHs .....	60
<b>Gráfico 6</b> – Índice de Crescimento dos Isolados Tolerantes a 36 °C .....	62
<b>Gráfico 7</b> – Índice de Crescimento dos Isolados Tolerantes a 38 °C .....	63
<b>Gráfico 8</b> – Índice de Crescimento dos Isolados Tolerantes a 40 °C .....	63
<b>Gráfico 9</b> – Índice de Crescimento dos Isolados Tolerantes as Três Temperaturas .....	64

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ala-	Alanina
AME	Aminoglicosídeos
BRCAS	Brazilian committee on antimicrobial susceptibility testing
BSA	Albumina Sérica Bovina
CDB	Convenção sobre a Diversidade Biológica
CPA	Agentes Crioprotetores
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DRM	Divisão de Recursos Microbianos
EG	Etilenoglicol
ESBL	$\beta$ -lactamases de espectro estendido
ETEC	<i>Escherichia coli</i> Enterotoxigênica
Fig	Figura
FMD	Formamida
Gln	Glutamina
Graf	Gráfico
IBP	Ice Binding Protein (proteína de ligação ao gelo)
IE	Índice Enzimático
IH	Índice Hemolítico
INP	Proteínas de Nucleação do Gelo
IRI	Inibição da Recristalização do gelo
JCM	Coleção Japonesa de Microrganismos
kDa	Quilodauton
MCT	Ministério da Ciência e Tecnologia
MMA	Ministério do Meio Ambiente
Nd	Não Determinado
NI	Não Identificado
NIAID	Institutos Nacionais de Alergia e Doenças Infecciosas
°C	Graus Centígrados
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAC	Proteínas Anticongelantes
PBP	Penicillin binding protein
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase

PEG	Polietilenoglicol
PG	Propilenoglicol
pH	Potencial Hidrogeniônico
PVP	Polivinilpirrolidona
rRNA	Ácido Ribonucleico Ribossômico
Tab	Tabela
TH	Histerese Térmica
Thr	Threonina
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
USA	United States of America

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>15</b>
1.1 REFERENCIAL TEÓRICO .....	16
1.1.1 Importância da Bioprospecção Microbiana.....	16
1.1.2 Microbiologia da Antártica.....	18
1.1.3 Origem e Características das Proteínas Anticongelantes .....	21
1.1.4 Aplicação de Agentes Crioprotetores Sintéticos <i>versus</i> PACs .....	26
1.1.5 Ação Antropogênica na Antártica.....	30
1.1.6 Fatores de virulência e Resistencia a Antibióticos .....	31
1.2 JUSTIFICATIVA .....	35
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>36</b>
2.1 GERAL .....	36
2.2 ESPECÍFICOS.....	36
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>37</b>
3.1 LINHAGENS BACTERIANAS UTILIZADAS.....	37
3.2 PREPARO E REATIVAÇÃO DAS BACTÉRIAS .....	38
3.3 SELEÇÃO DE BACTÉRIAS POTENCIALMENTE PRODUTORAS DE COMPOSTOS ANTICONGELANTES.....	38
3.4 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE VIRULÊNCIA EM HUMANOS .....	39
3.4.1 Atividade de Proteinase.....	39
3.4.2 Atividade de Fosfolípase .....	40
3.4.3 Atividade de Catalase .....	40
3.4.4 Atividade Hemolítica .....	40
3.4.5 Índice de Atividade Enzimática/Hemolítica.....	40
3.4.6 Crescimento/Tolerância em pHs Fisiológicos .....	41
3.4.7 Avaliação do Crescimento/Tolerância em Temperaturas Corporais Humanas.....	41
3.4.8 Índice do Crescimento/Tolerância a pHs e Temperaturas Fisiológicas.....	41
3.5 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE SENSIBILIDADE/RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS COMERCIAIS .....	41

3.6 AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE GENES PRODUTORES DE COMPOSTOS ANTICONGELANTES POR SIMILARIDADE DE SEQUÊNCIA .....	42
3.6.1 Extração do DNA Genômico.....	42
3.6.2 Amplificação dos Genes por PCR.....	43
3.6.3 Eletroforese em Gel de Agarose .....	43
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	43
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>44</b>
4.1 REATIVAÇÃO DAS BACTÉRIAS PRESERVADAS EM GLICEROL 20%.....	44
4.2 SELEÇÃO DE BACTÉRIAS POTENCIALMENTE PRODUTORAS DE COMPOSTOS ANTICONGELANTES .....	44
4.3 CARACTERIZAÇÃO DA VIRULÊNCIA DOS ISOLADOS POTENCIAIS PARA PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS ANTICONGELANTE .....	49
4.3.1 Atividade de Proteinase.....	52
4.3.2 Atividade de Fosfolípase .....	54
4.3.3 Atividade de Catalase .....	54
4.3.4 Crescimento Bacteriano em pH Fisiológico Humano.....	56
4.3.5 Crescimento Bacteriano em Temperatura Corporal Humana.....	61
4.4 Potencial de Resistencia a Antibióticos Comerciais .....	66
4.5 AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE PRODUTOS DERIVADOS DA PCR.....	69
4.6 POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DAS LINHAGENS POSITIVAS PARA PRODUÇÃO DE COMPOSTOS ANTICONGELANTES .....	71
<b>5 CONCLUSÃO .....</b>	<b>72</b>
<b>6 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>73</b>

# 1 INTRODUÇÃO

A maior parte do planeta Terra passa regularmente por baixas temperaturas. Na Antártica, as baixas temperaturas são constantes durante o ano inteiro. Além do frio extremo, o continente apresenta intensa radiação ultravioleta, ventos exorbitantes e clima seco (Bialkowska et al., 2020; Panwar et al., 2020). Por apresentar essas características particulares, a Antártica é considerada um ambiente extremo, onde os fatores ambientais são diferentes dos fatores considerados normais para manter a vida da maioria dos organismos (Ortiz et al., 2020).

Apesar de ser considerado um ecossistema extremo, a Antártica não é um continente estéril (Madigan et al., 2010), é rica em biodiversidade, lá habitam organismos psicofílicos e psicrotolerantes, como as bactérias, leveduras, fungos filamentosos, líquens, pequenos invertebrados e plantas (Buzzini et al., 2012). Para enfrentar o frio, esses organismos precisaram passar por eventos adaptativos ao longo dos anos, como mudanças moleculares, alterações no metabolismo, aumento da fluidez da membrana plasmática e produção de chaperoninas para enfrentar o choque térmico (Madigan et al., 2010; Buzzini et al., 2012).

Uma das alternativas microbianas adotadas para contornar os efeitos adversos das baixas temperaturas, foi evitar o congelamento e manter os fluídos celulares abaixo do ponto de congelamento (Bakermans, 2008). O sucesso da estratégia de sobrevivência das bactérias é, em parte, devido ao seu potencial de produção de proteínas anticongelantes (PACs) que agem como um agente crioprotetor nas células (Bakermans, 2008; Buzzini et al., 2012). Essas proteínas se unem ao gelo no início da formação e interrompe o crescimento, evitam a recristalização e podem diminuir o ponto de congelamento dentro da célula (Cid et al., 2016).

Atualmente existem diversas composições de agentes crioprotetores sintéticos, utilizados para auxiliar na preservação de materiais biológicos e também para evitar o congelamento de fluídos automotivos (Zidni et al., 2020). Porém, a complexidade do preparo desses agentes químicos, o custo e o potencial poluidor, despertou o desejo dos cientistas em encontrar compostos mais apropriados para essa aplicação (Castro et al., 2011). As PACs produzidas pelas bactérias da Antártica são potencialmente úteis para aplicação industrial, porém ainda é necessário aprofundar o conhecimento sobre esses microrganismos de região tão hostil (Eskandari et al., 2020).

Com a tecnologia disponível é possível editar o DNA de bactérias patogênicas, a fim de, silenciar ou deletar os genes causadores de doenças, porém as técnicas podem se tornar lentas e onerosas para o setor biotecnológico (Padilla-Vaca et al., 2015). Desta forma, o conhecimento dos fatores de virulência às células humana, os limites de tolerância a certos antibióticos de uso comercial, bem como características fisiológicas e bioquímicas proporcionadas por microrganismos com potencial uso industrial em larga escala, tornam-se estratégias necessárias, em aplicações que



visam à utilização de produtos biológicos como as proteínas anticongelantes oriundos de células microbianas seguras, as quais poderão ser utilizadas em processos biotecnológicos.

## 1.1 REFERENCIAL TEÓRICO

### 1.1.1 Importância da Bioprospecção Microbiana

A bioprospecção microbiana pode ser descrita como a busca por microrganismos produtores de substâncias benéficas para o homem e para o meio ambiente, em todos os ecossistemas do planeta (Filho et al., 2014). A prospecção desses microrganismos pode ser realizada em ambientes extremos, onde se espera uma adaptação às condições extremas (Kohli et al., 2020). Quando se trata de bioprospecção, os vários segmentos da indústria demonstram um crescente interesse no setor produtivo ao reconhecer o valor econômico da biodiversidade (Jorquera et al., 2019).

O cenário atual de pesquisas mostra que não há limites para propagação dos microrganismos, todos os ecossistemas do planeta são habitados por distintos grupos microbianos, principalmente as bactérias (Jorquera et al., 2019; Bialkowska et al., 2020). Levantamentos realizados na década de 90 propuseram que para procariotos, incluindo bactérias e arqueas, eram conhecidas apenas 849 gêneros e 4.314 espécies, que corresponde entre 0.1% a 12% da diversidade do grupo (Dionisi et al., 2012). Estudos recentes sugerem que somente 2,1% dos táxons procarióticos foram sequenciados em nível global (Hu; Zhang, 2020). Em nível global, é estimado que a abundância de microrganismos exceda a abundância das plantas e dos animais, totalizando cerca de 60% da biomassa terrestre (Dionisi et al., 2012). Graças à biodiversidade dos procariotos é possível acessar compostos bioativos, com aplicações nos diversos setores industriais (Angelin; Kavitha, 2020; Cappelletti et al., 2020).

As bactérias são as menores formas de vida do planeta, junto com outros microrganismos constituem o maior volume de matéria viva na Terra e auxiliam na manutenção da vida de outros seres vivos através dos processos químicos (Dellagi et al., 2020). Devido sua variabilidade genética, realizam um trabalho fundamental na manutenção dos ecossistemas, nos processos biogeoquímicos e na cadeia alimentar (Dom et al., 2021).

Ocupando praticamente todos os ecossistemas do planeta, as bactérias podem ser encontradas em lugares nos quais as condições ambientais extrapolam o limite de tolerância das plantas e dos animais (Filho et al., 2014). Por apresentarem grande diversidade genética, metabólica e por sua morfologia simples, as bactérias se adaptaram para sobreviver em diversas condições ambientais, inclusive condições extremas (Gallo et al., 2021).

As bactérias vivem agregadas, em pares ou em cadeias, possuem diversas formas e uma diversidade metabólica única do ponto de vista industrial (Malajovich, 2016). Ao perceber a capacidade das bactérias, na produção de metabolitos aplicáveis, a indústria passou a prospectar esses microrganismos e, juntamente com a tecnologia disponível, desenvolveram técnicas para adquirir produtos e processos mais eficientes (Cappelletti et al., 2020).

As bactérias podem ser isoladas dos ambientes mais improváveis para a vida, como nos vulcões, com temperaturas elevadas, nos reatores nucleares, onde existe radiação intensa e no extremo ecossistema da Antártica, onde a maior parte do continente é coberta de gelo (Tanner et al., 2020). É devido ao estresse desses ambientes, que as bactérias passam por mutações e conseqüentemente evoluem mais rapidamente que as bactérias que habitam ecossistemas “normais”, tornando essas bactérias ricas fontes de produtos especializados (Li et al., 2014; Sayed et al., 2020). As bactérias são responsáveis pela manutenção das condições que mantem a vida na terra, entretanto se conhece muito pouco sobre a diversidade e biogeografia desses microrganismos (Gallo et al., 2021).

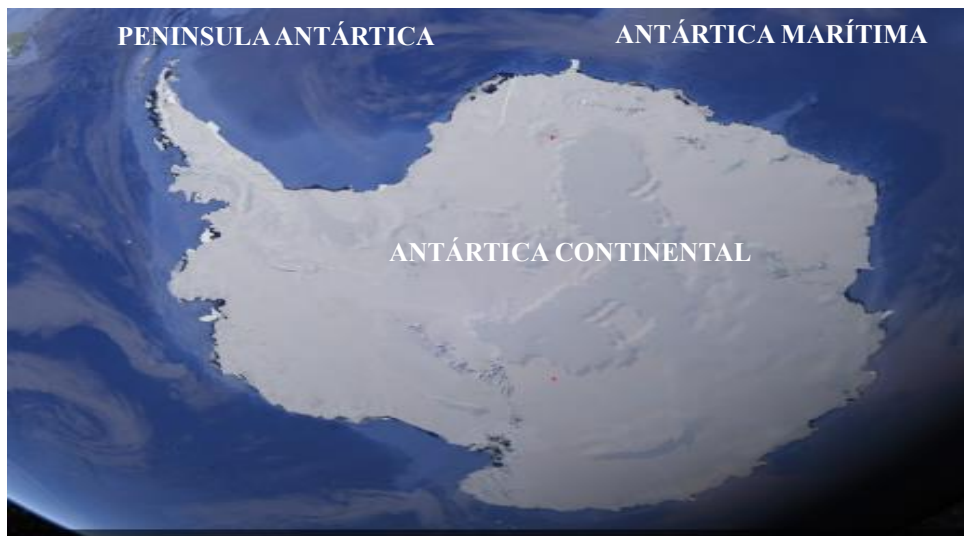
Aproximadamente 80% do planeta Terra apresenta, permanente ou frequentemente, temperaturas menores que 5 °C (Margesin; Collins, 2019). Ecossistemas frios como os mares profundos, desertos frios, habitats glaciais, entre outros, estão expostos a temperaturas baixas, sendo ecossistemas que cobrem em torno de 10% da superfície da Terra (Buzzini et. al, 2012). Os procaríotos formam a biomassa predominante em todos os ecossistemas da Antártica, graças a uma série de estratégias adotadas para manter as funções fundamentais das células em condições hostis (Di-Lorenzo et. al, 2020). Na Antártica existem bactérias psicrófilas, capazes de produzir diversas biomoléculas em baixas temperaturas (Sajjad et al., 2020). Ainda é necessário aprofundar os estudos a fim de explicar a base molecular pra produção de enzimas ativas ao frio, no entanto, já se sabe que essas enzimas apresentam maiores quantidades de estruturas secundárias de  $\alpha$ -hélice, o que confere maior flexibilidade para as proteínas nas reações catalisadoras em baixas temperaturas (Madigan et al., 2010).

Os produtos biotecnológicos têm aplicações em diversas áreas, sendo principalmente ligada ao meio ambiente, agropecuária, saúde, indústria e na área científica (Malajovich, 2016; Bialkowska et al., 2020). O avanço dos processos metodológicos de pesquisas com microrganismos, juntamente com a análise do DNA, abriu novos caminhos ao acesso de compostos com valor comercial agregado. É certo que a prospecção de microrganismos, juntamente com a biotecnologia moderna são considerados instrumentos de grande relevância, os quais vem trazendo vantagens em várias áreas da ciência (Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento- MAPA, 2011).

### 1.1.2 Microbiologia da Antártica

Ambientes extremos são àqueles com condições excessivamente elevadas ou baixas para maior parte dos seres vivos como, radiação, pH, salinidade, pressão e temperatura. São inúmeros os ambientes que apresentam tais condições, como exemplo a Antártica (Giordano, 2020). O ambiente com temperatura extremamente baixa seleciona microrganismos, como as bactérias, com características adaptativas, para sobreviver a essas condições, diminuindo o número da biodiversidade que nele se desenvolve (Jeong; Choi, 2020). O continente Antártico é dividido em três regiões, Antártica marítima, península Antártica e a Antártica continental (Fig.1).

**Figura 1-** Divisão do continente Antártico



Fonte: Google Earth, editado pelo autor.

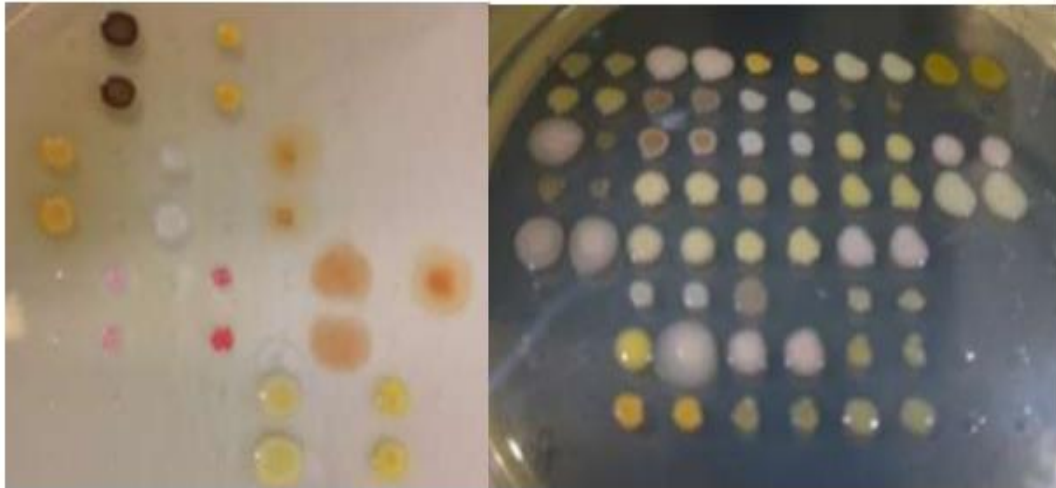
A maioria das bactérias desse ambiente são oligotróficas e pigmentadas (Fig.2), outras possuem um metabolismo variado, resistindo ao estresse do ambiente frio, como o congelamento e o descongelamento contínuo e a radiação solar, que possui alta incidência em regiões da Antártica (Styczynski et al., 2020).

Com o passar das décadas foram descritas novas espécies de bactérias na Antártica, como *Clostridium vincentii*, *Flavobacterium tegetincola*, e *Psychromonas antarcticus* (Mountfort et al., 1997, 1998; McCammon e Bowman 2000), *Hymenobacter algoricola*, *Hymenobacter antarcticus*, *Hymenobacter elongatus*, *Hymenobacter fastidiosus*, *Hymenobacter glaciei* (Klassen et al., 2010). Inclusive, foi descrita uma nova espécie identificada como *Francisella adeliensis* capaz de invadir células eucarióticas causando patogenicidade (Vallesi et al., 2018).

As bactérias psicrófilicas são capazes de sobreviver abaixo de 0 °C, onde, as psicrófilicas estritas, possuem velocidade de crescimento ótimo a 15 °C, entretanto são sensíveis a temperaturas maiores que 20 °C e as psicrófilicas facultativas crescem a 0 °C, mas apresentam

crescimento ótimo acima de 15 °C (Comerio et al., 2007; Bakermans, 2008). Os psicofílicos são encontrados em regiões com temperaturas constantemente baixas, diferente dos psicrotolerantes, que habitam regiões temperadas, onde as temperaturas aumentam com a chegada do verão e podem crescer em uma gama de temperaturas variando de 20 a 40 °C (Madigan et al., 2010).

**Figura 2** Bactérias pigmentadas isoladas da Antártica



Fonte: Silva e colaboradores (2018).

Aproximadamente 95% do continente Antártico é coberto de gelo, marcado por temperaturas extremamente baixas, sendo -94 °C a temperatura mais baixa já registrada (National Snow and Ice Data Center- NSIDC, 2013). É admirável que nessas condições adversas exista vida, mas é devido a essas condições que foi possível a seleção de macromoléculas adequadas a manutenção da vida em baixas temperaturas (Coleine et al., 2020). Ainda há necessidade de ampliar o conhecimento sobre a diversidade microbiana de regiões polares, a fim de aprofundar o conhecimento sobre mecanismos de adaptação ao frio e auxiliar na busca por compostos aplicáveis na indústria (Brasil Ministério da Ciência e Tecnologia MCT, 2009; Coleine et al., 2020).

As baixas temperaturas influenciam diretamente as funções biológicas desses organismos. Na Antártica, a vida no mar e na terra é limitada a organismos que passaram por eventos adaptativos ao longo do tempo (Tindall, 2004). Os psicofílicos apresentam menores quantidades da estrutura secundária tipo folha  $\beta$ -pregueada (estrutura rígida) e maior quantidade de  $\alpha$ -hélice, nas proteínas. A presença de  $\alpha$ -hélice em maior quantidade torna as reações catalisadoras mais flexíveis nos psicofílicos (Madigan et al., 2010).

Comparado com a baixa diversidade dos animais e das plantas, a diversidade de microrganismos tem se mostrado surpreendente na Antártica, demonstrando que as condições extremas não são uma barreira para colonização destes organismos (Ortiz et al., 2020). Os psicofílicos produzem enzimas ativas em baixas temperaturas, com número maior de aminoácidos

polares e menor número de aminoácidos hidrofóbicos, comparado com mesófilos e termófilos (Madigan et al., 2010).

As variações ambientais podem desencadear diversos mecanismos intra e extracelular nos organismos, incluindo destruição no DNA, em resposta as injúrias causadas pelas baixas temperaturas (Bialkowska et al., 2020). Os organismos interpretam esses sinais e desencadeiam uma resposta biológica apropriada, envolvendo uma sequência de alterações metabólicas, mudanças conformacionais, bem como, aumento da fluidez da membrana plasmática e síntese de compostos crioprotetores (Di-Lorenzo et al., 2020). A membrana plasmática dos organismos psicrófilos produz maior quantidade de ácidos graxos insaturados, conseqüentemente auxilia para que a membrana permaneça em estado semifluido. Como resultado, o sistema de transporte de membrana continua funcionando normalmente em baixas temperaturas (Madigan et al., 2010; Di-Lorenzo et al., 2020).

O estudo de microrganismos de ambientes frios pode oferecer informações importantes sobre bioprodutos gerados, provenientes das estratégias bioquímicas desenvolvidas para sobrevivência (Kumar et al., 2020). Algumas bactérias psicrófilas apresentam lipídeos com cadeia longa e múltiplas ligações duplas, como os ácidos graxos poli-insaturados ou outros hidrocarbonetos. Esses ácidos graxos são mais flexíveis em baixas temperaturas do que os ácidos graxos saturados ou monoinsaturados (Madigan et al., 2010; Kumar et al., 2020). Produtos derivados de microrganismos vêm trazendo diversos benefícios para humanidade. Esses produtos geralmente são obtidos através do cultivo de microrganismos isolados de amostras ambientais como solo, por exemplo (Zucconi et al., 2020).

Bactérias polares são capazes de produzir amilases, proteases (inclusive proteases ativas) e solubilizadores de fosfato em baixas temperaturas, o que tem chamado à atenção para seus mecanismos químicos e biológicos (Comerio et al., 2007). Essas características reforçam o potencial da Antártica como uma fonte de produtos biotecnológicos aplicáveis na indústria (Comerio et al., 2007; Sanchez et al., 2019). Entretanto, na Antártica assim como na maior parte dos ecossistemas, 99% dos microrganismos não podem ser cultivados por métodos convencionais. Assim, a diversidade de bactérias da Antártica permanece desconhecida, podendo oferecer uma valiosa fonte de novas biomoléculas benéficas para humanidade (Rashid; Stingl, 2015). Portanto, as perspectivas de aplicações de proteínas anticongelantes, produzidas por bactérias de ambiente frio, podem apresentar um considerável custo benefício para os diversos setores industriais (Ustun; Turhan, 2015), tendo em vista a possibilidade da descoberta de proteínas relativamente diferentes das produzidas por células microbianas de ambientes temperados. As respostas celulares frente à redução da temperatura ainda não foram completamente elucidadas, sendo assim, a bioprospecção

microbiana de ambientes frios, torna-se uma ferramenta que necessita de novas pesquisas (Khan et al., 2021).

### 1.1.3 Origem e Características das Proteínas Anticongelantes

Nos oceanos Ártico e Antártico, peixes e outros seres marinhos que vivem abaixo de  $-2^{\circ}\text{C}$ , sobrevivem nessas condições pois conseguem adotar algumas estratégias de sobrevivência ao congelamento (Near et al., 2012). Na década de 1970 foi descoberta uma classe de proteínas, em peixes de ambiente frio, capazes de influenciar a formação e crescimento de cristais de gelo, denominadas proteínas anticongelantes (PACs) (Hobbs et al., 2020). As PACs pertencem a uma subclasse de IBPs (proteínas de ligação ao gelo) que diminuem o ponto de congelamento (Voets, 2017). A descoberta das PACs em peixes foi um acontecimento de grande importância científica, reconhecido como responsável pelo sucesso adaptativo desses organismos em condições extremas (Hobbs et al., 2020).

Em peixes há diferentes PACs glicolisadas que possuem tamanho similar e possuem como característica comum, repetições tripeptídicas de Alanina-Alanina-Threonina (ala-ala-thr) e também o dissacarídeo galactose-N-acetilgalactosamina (Suris-Vall; Voets, 2019). Há também as PACs não glicolisadas sequencialmente divididas em quatro grupos e numeradas de I a IV, conforme foram descobertas. Há variabilidade na composição, tamanho e fonte da proteína (Q.1) (Venketesh; Dayananda, 2008; Suris-Vall; Voets, 2019).

**Quadro 1-** Características das PACs não glicolisadas, numeradas na ordem em que foram descobertas em peixes.

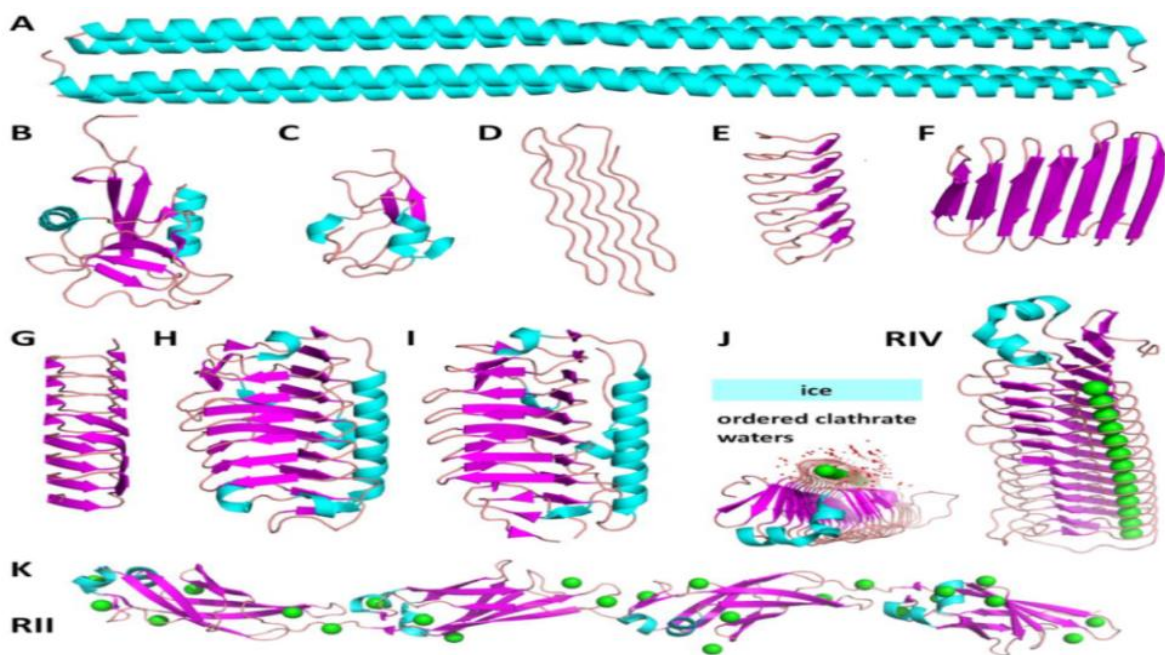
<b>PACs Não Glicolisadas</b>	
Tipo I	Ricas em alanina
Tipo II	Além de alanina, possui uma quantidade de cisteína e alguns aminoácidos aromáticos (Fenilalanina, Triptofano e Tirosina).
Tipo III	Não há predominância de um único aminoácido (estrutura mais balanceada)
Tipo IV	Estrutura altamente helicoidal e bem diferente das outras, com predominância de glutamina (Gln) e ácido glutâmico.

Fonte: Venketesh; Dayananda (2008); Suris-Vall; Voets (2019). Nota: editado pelo autor

Atualmente, existem três formas descritas de ação das PACs com os cristais de gelo, sendo elas: interferência no processo de nucleação do gelo, as PACs se ligam as substâncias nucleadoras e impede o início da cristalização (Hassas-Roudsari; Goff, 2012); histerese térmica (HT) onde ocorre o aumento de concentração de proteínas anticongelantes, com redução em até 3 °C o ponto de congelamento (Pudney et al., 2003; Qiu et al., 2013; Naing; Kim, 2019) e; inibição do processo de recristalização (IR) onde ocorre absorção das proteínas em várias partes da superfície do gelo por interações como forças de Van der Waals e ponte de hidrogênio (Cruz et al., 2009; Hassas-Roudsari; Goff, 2012).

Em peixes foram descritas atividade de histerese térmica (HT) bem como inibição da recristalização do gelo (IR). Mais tarde as PACs foram descritas em formas e tamanhos diferentes em fungos, vegetais, insetos e bactérias que eram expostos a baixas temperaturas (Tab.2) (Eskandari et. al, 2020). As PACs desempenham funções semelhantes nos organismos, no entanto, as estruturas das PACs nos organismos são diversas (Fig. 3) (Eskandari et al., 2020).

**Figura 3-** Estrutura das Proteínas anticongelantes em diferentes organismos.

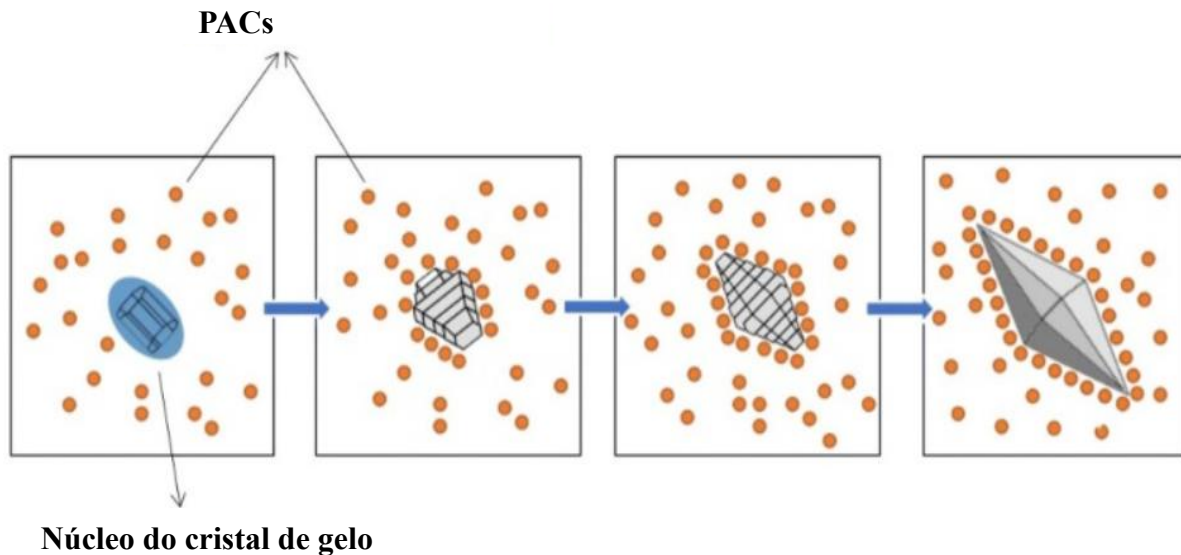


Fonte: Bialkowska e colaboradores (2020). A - C PACs de peixes; D – F PACs de inseto; G PACs de Azevém (*Lolium perenne*); H-J PACs microbianas; RIV ligação de gelo com  $\text{Ca}^{2+}$  íons em um arranjo regular e águas ordenadas.

Em vegetais as PACs são descritas como pequenas e com baixo peso molecular, em uma faixa de 19 a 36 kDa, podendo variar para mais ou para menos, sendo que, a menor já descrita foi a PAC de Azevém (*Lolium perenne*) (Fig.3g) com um peptídeo de aproximadamente 12 kDa, rico em aspargina (cerca de 25%), com 16% de valina, 15% serina e 10% treonina, em um total de 118 aminoácidos (Sidebottom et. al, 2000; Middleton et. al, 2012).

Essas proteínas atuam reduzindo o ponto de congelamento, ao se unir ao gelo inibindo o crescimento do cristal, bem como inibindo a recristalização impedindo o crescimento do gelo (fig.4) (Suris-Valls; Voets, 2019).

**Figura 4-** Adesão das PACs ao gelo em formação, inibindo o crescimento do cristal de gelo.



Fonte: Naing; Kim (2019).

Em fungos psicrófilicos foram descritas proteínas anticongelantes nas espécies *Typhula ishikariensis*, *Antarctomyces psychrotrophicus*, *Coprinus psychromorbidus* (Tab. 2). Bactérias psicrófilicas e psicrotolerantes também precisam enfrentar a baixa energia térmica, que resultaram em um metabolismo lento, e para sobreviverem esses microrganismos passaram a sintetizar as PACs (Feller; Gerday, 2003).

Em bactérias foram descritas atividade de inibição de recristalização (IR) e histerese térmica (HT) nas bactérias Gram-negativas da Antártica, *Marinomonas primoryensis*, *Collwellia* e *Flavobacterium frigidum* (Tab.1).

**Tabela 1-** Organismos psicrófilicos produtores de PACs e local de isolamento

Organismo (proteína)-Gene /Número de acesso	Massa molecular (kDa)	Atividade TH / IR	Local de Isolamento
linguado de inverno <i>Pseudopleuronectes americanus</i> ABX38716.1 / B1P0S1	19,34	+ / +  Peixes	Águas da costa oeste do Atlântico Norte, de Labrador, Canadá à Geórgia, (EUA).



caçador furtivo <i>Brachyopsis segaliensis</i> BAF37106.1 / A0ZT93	18,02	+ / +	Oceano Pacífico Noroeste
Eelpout europeu <i>Zoarces viviparus</i> ABN42205.1 / A3EYI7	6,90	+ / +	Atlântico Nordeste; Mar Báltico, Barents, Irlandês, Norte e Mar Branco.
<b>Plantas</b>			
Azevém <i>Lolium perene</i> ACG63783.1 / B5T007	13,30	+ / +	Nativo da Europa, Ásia temperada e Norte da África; amplamente distribuído em todo o mundo, incluindo América do Norte e do Sul, Europa, Nova Zelândia e Austrália.
Cenoura selvagem ( <i>Daucus carota</i> ) AAV66074.1 / Q5RLY3	36,80	+ / +	Europa, sudoeste da Ásia, América do Norte e Austrália.
<b>Fungos</b>			
<i>Typhula ishkariensis</i> (TisAFP) BAD02893.1 / Q76CE6	24,09	+ / +	Finmark (norte da Noruega), Svalbard, Islândia, oeste da Groenlândia, Sibéria.
<i>Antarctomyces psychrotrophicus</i> NA / NA	28,00	+ / +	Musgos, solos e esteiras de algas, estação da Grande Muralha, Ilha King George, Ilhas Shetland do Sul; Estação Zhongshan, Colinas Larsemann, Baía Prydz, Antártica Oriental.
<i>Coprinus psychromorbidus</i> NA / NA	23,00	+ / +	Finmark (norte da Noruega), Svalbard, Islândia, oeste da Groenlândia e Sibéria.
<b>Bactérias</b>			
<i>Collwellia</i> SLW05 (ColAFP) ABH08428.1 / A5XB26	26,35	+ / +	Gelo marinho de inverno, lado oeste da Península Antártica.
<i>Marinomonas primoryensis</i> (MpAFP) ABL74378.1 / A1YIY3	1500	+ / +	Lagos Antárticos, Vestfold Hills, Leste da Antártica.
<i>lavobacterium frigoris</i> PS1 (FfIBP) AFK13196.1 / H7FWB6	25,46	+ / +	Gelo marinho, costa de McMurdo Sound, Antártica.

Fonte: Białkowska e colaboradores (2020). Nota: Tabela modificada pelo autor

As PACs secretadas pelos microrganismos formam bolsas microscópicas de água, construindo um microhabitat para o microrganismo e, enquanto a água permanecer em estado líquido, ocorre crescimento microbiano (Madigan et al., 2010; Voets, 2017).

A falta de água líquida pode ser uma barreira para o crescimento de bactérias psicrófilas, entretanto, o congelamento não implica necessariamente em morte microbiana, pois, os microrganismos mantêm a capacidade metabólica em temperaturas inferiores daquelas que

permitem o crescimento da célula (Madigan et al., 2010). A função das PACs nos organismos é ampliar a tolerância ao congelamento, através da adesão ao gelo, conferindo proteção contra o congelamento, garantindo assim, viabilidade das células, fluidez das membranas, tradução e transcrição do material genético e o dobramento das proteínas (Davies, 2014).

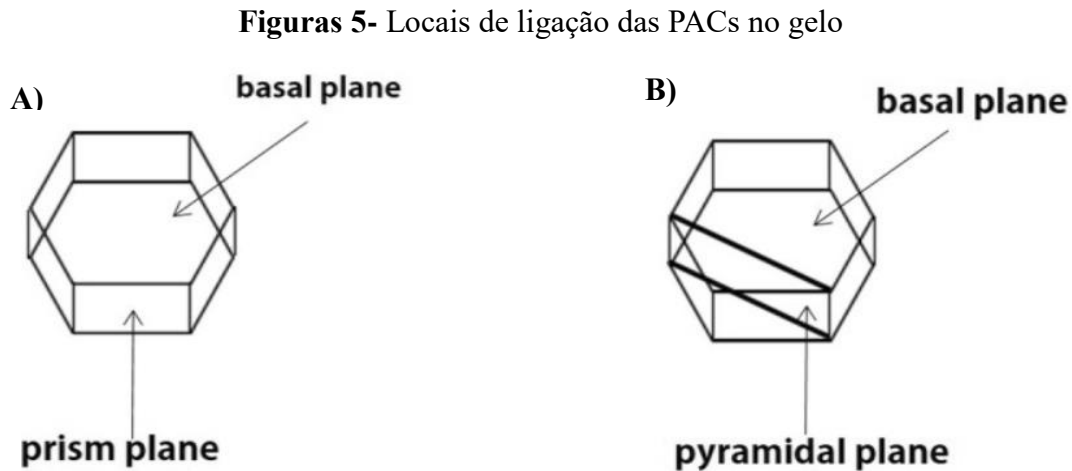
As bactérias respondem rapidamente a redução da temperatura através da indução das PACs, as quais aumentam conforme a gravidade do choque frio (Feller; Gerday, 2003; Davies, 2014). Após a resposta ao choque frio, a produção das PACs diminui e outras proteínas passam a ser produzidas, permitindo assim que as células cresçam mesmo que de forma mais lenta (Feller; Gerday, 2003). A formação de cristais de gelo dentro das células é letal para os organismos, ocasionando ruptura da membrana plasmática e consequente extravasamento do citoplasma, resultando na morte do organismo (Yoshida et al., 2020).

Segundo Costanzo; Lee (2013), organismos psicofílicos adotaram estratégias fisiológicas de sobrevivência como: evitar o congelamento por super-resfriamento, removendo os nucleadores de gelo, possibilitando que os organismos mantenham os líquidos sub-resfriados. Geralmente esse tipo de estratégia é utilizado por organismos que vivem em regiões com temperaturas constantemente baixas, diminuem o ponto de congelamento dos líquidos celulares para evitar a formação do gelo e o congelamento instantâneo, conseqüentemente, passam por estresse e tem alto gasto energético (Sinclair et al., 2007); e tolerar o congelamento, o organismo estimula a formação controlada de gelo fora da célula, geralmente organismos que usam essa estratégia, são suscetíveis a avarias provocadas pelo congelamento e o descongelamento, no entanto, essa estratégia possibilita menos gasto de energia.

Esses organismos toleram temperaturas de até  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Costanzo et al., 2008; Costanzo; Lee, 2013). Contudo, ambas as estratégias podem coexistir no mesmo ecossistema com mecanismos diferenciados (Costanzo; Lee, 2013). As PACs são classificadas como ativas ou hiperativas (Ark et al., 2012).

As PACs ativas formam um cristal hexagonal bipiramidal, devido à capacidade de se ligar no prisma e nos planos piramidais do gelo (Fig.5-A). Já as PACs hiperativas formam um cristal de gelo discoide, pois além de formarem ligações nos prisma e nos planos piramidais se ligam também no plano basal do cristal de gelo (Fig.5-B) (Naing; Kim, 2019). Estudos demonstram que as PACs aparecem envolvidas em várias respostas celulares contra diversas formas de estresse como pH, estresse osmótico, oxidativo, dentre outros, mostrando que elas possuem um papel muito mais amplo em resposta ao estresse do que se propunha inicialmente (Timonen et al., 2016). Contudo, ainda não foi completamente elucidado o modo de ação das PACs com a cristalização, mas pode se afirmar que ocorre absorção dessas proteínas na superfície do cristal de gelo, pois, em

locais do gelo onde não há PACs, a formação do cristal continua, porém mais lentamente (Provesi, Amante, 2015).



Fonte: Naing; Kim (2019). Nota: **A)** PACs ativas e **B)** PACs hiperativas

#### 1.1.4 Aplicação de Agentes Crioprotetores Sintéticos *versus* PACs

Os agentes crioprotetores (ACP) sintéticos possuem elevada solubilidade em meio aquoso, são solventes orgânicos de baixo peso molecular e possuem ação no meio interno e externo das células (Whaley et al., 2021). São classificados quanto às capacidades de penetrar ou não na célula: *i)* penetrante ou intracelular: possui capacidade de penetrar na célula e *ii)* não penetrante ou extracelular: não possui capacidade de entrar na célula (Bartolac et al., 2018). Em temperaturas baixas, os agentes intracelulares reduzem a concentração dos solutos no interior da célula, mantem a maior parte da água em seu estado líquido, tornando o ambiente menos letal para a célula (Bartolac et al., 2018; Whaley et al., 2021). O etilenoglicol (EG), dimetilsulfóxido (DMSO), formamida (FMD), propilenoglicol (PG), são exemplos de ACPs penetrantes que são amplamente utilizados em técnicas criogênicas (Best, 2015).

Os agentes crioprotetores extracelulares induzem a saída de água do meio intracelular para o meio extracelular, evitando a formação de gelo no interior da célula durante o congelamento, isso graças ao aumento da osmolaridade (Bartolac et al., 2018). O polietilenoglicol (PEG), sacarose, trealose e o polivinilpirrolidona (PVP) são os ACPs mais utilizados como agente crioprotetor extracelular, em técnicas de criopreservação (Whaley et al., 2021). Entretanto existem diversos fatores que interferem a eficiência funcional dos agentes crioprotetores sintéticos, como tipo de concentração, tempo de aplicação, diferenças celulares (animal e vegetal), tornando seu uso mais dispendioso (Best, 2015). Glicerol, trealose, sacarose e DMSO, são ACPs sintéticos utilizados na criopreservação de algumas espécies de bactérias, sendo que a concentração de trealose e sacaroses

geralmente utilizadas são de 10% a 15%, para garantir a viabilidade das bactérias (Castro et al., 2011; Zidni et al., 2020). Já o glicerol e o DMSO são usados em concentrações de até 20%, concentrações acima de 20% são altamente tóxicas para os microrganismos e demonstram efeitos letais para as bactérias, podendo ser uma barreira para a sobrevivência de linhagens durante a criopreservação (Fahy, 2010; Castro et al., 2011).

Na década de 80, alguns pesquisadores já apontavam os agentes crioprotetores sintéticos como nocivos para as células, começando então a busca por novas substâncias capazes de preservar os materiais biológicos com maior eficácia (Fahy et al., 1987). A função básica da criopreservação é diminuir a temperatura para manter células e tecidos biológicos íntegros por longos períodos com auxílio de um agente crioprotetor, permitindo que o material volte a desenvolver suas funções vitais após o armazenamento (Yoshida et al., 2020). Utilizar ACPs sintéticos decorre de uma complexa interação de diversas variáveis como, questões físicas, volume da solução de criopreservação, taxas de resfriamento e questões químicas referentes à composição da solução de criopreservação (Zidni et al., 2020). Nesse sentido, as PACs de bactérias são estudadas para uso biotecnológico na criopreservação de materiais biológicos e preservação de fluídos, para evitar o congelamento (Suris-Valls; Voets, 2019).

Muitos estudos têm sido realizados com o objetivo de resolver o problema do congelamento, usando material biológico (como as PACs) para substituir os agentes sintéticos citotóxicos. Os estudos buscam evitar a formação de gelo em aeronaves, turbinas eólicas e em metais industriais que são expostos a baixas temperaturas (Jung et al., 2020). O uso das PACs tem aplicação muito ampla no comércio industrial, atualmente a utilização das PACs se estende a processamento de materiais, (Deville, 2013) diversas aplicações médicas, aplicação automotiva, criação de superfície anti-gelo com aplicação de PACs em alumínio e vidros, propriedades anti-infecciosas (antivirulência) de PAC, aplicações agrícolas, entre muitas outras (Voets, 2017; Eskandari et al., 2020).

Diversos estudos apontaram as PACs como possibilidade de aplicação na indústria alimentícia, na preservação e conservação de alimentos, durante o armazenamento (James et al., 2015; Cheung et al., 2017; Kashyap et al., 2020). O congelamento é uma das melhores formas de preservação dos alimentos por longo tempo, porém alimentos composto por células como carnes e vegetais sofrem danos celulares devido à formação de cristais de gelo (Velickova et al., 2013). A aplicação das PACs na preservação de alimentos pode diminuir até 500 vezes a concentração da solução crioprotetora comparado com outras substâncias crioprotetoras como a sacarose e o sorbitol, por exemplo, (Provesi; Amante, 2015).

Na agricultura há a necessidade de preservar sementes e espécies vegetais, geralmente a técnica de preservação utilizada é a desidratação de sementes, no entanto, existem plantas que

possuem sementes muito sensíveis à dessecação (Panis et al., 2020). Desta forma, a criopreservação é apontada como a solução mais eficaz para esse problema, contudo, ainda é necessário contornar os obstáculos associados a essa técnica, como formação de cristais de gelo (Lin et al., 2021). Outra possibilidade de sua utilização é a introdução de genes responsáveis pela síntese das PAC nos vegetais de regiões frias, para produzir organismos transgênicos que sejam capazes de resistir às baixas temperaturas (Duman; wisniewski, 2014). Estudos ainda precisam ser aprofundados em relação à toxicidade dessa substância no organismo humano, apesar de que as características funcionais de PAC não demonstram nenhuma propriedade toxicológica aparente (Crevel et al., 2002).

Na indústria biomédica, a criopreservação é importante em várias áreas, como crio cirurgia, seleção de drogas para manutenção dos tecidos biológicos como aloenxertos, manutenção de células e órgão para transplante (Eskandari et al., 2020; Jeong et al., 2020). Os métodos criogênicos de preservação podem revolucionar o *status* atual de transplantes de órgãos, entretanto as técnicas precisam ser aprimoradas para evitar a formação de gelo e contornar os efeitos tóxicos dos ACPs (Jeong et al., 2020). Nesse sentido, a indústria biomédica pode obter benefícios no uso das PACs, para controlar a formação de gelo, bem como, para preservar células, tecidos, embriões e órgãos (Tas et al., 2021).

Atualmente, na indústria petrolífera, o uso de ACPs para controlar o congelamento de fluídos automotivos em ambientes frios é uma técnica bem empregada, porém necessita de uma grande quantidade de produtos e concentrações adequadas para que cumpra seu papel, tornando esses processos dispendiosos industrialmente (Huang et al., 2004).

O etileno glicol ( $C_2H_6O_2$ ) é um álcool com duas hidroxilas, o que o torna mais solúvel em água do que outros álcoois (Castro et al., 2011). O EG atua reduzindo a pressão do vapor de água, garantindo a diminuição do ponto de congelamento e é frequentemente utilizado como anticongelante (Medeiros et al., 2010; Iqbal et al., 2021). Portanto, é o aditivo mais utilizado em motores de combustão a diesel e em radiadores, permitindo o funcionamento e evitando o congelamento dos fluidos em baixas temperaturas (Medeiros et al., 2010).

O etilenoglicol é altamente tóxico pra o ser humano e para os animais e relativamente poluidor (Iqbal et al., 2021). Assim, as PACs podem atuar reduzindo o ponto de congelamento de combustíveis e água de radiadores de veículos, com aplicação mais seguras e sustentável na indústria automotiva (Voets, 2017).

Não somente a indústria alimentícia, biomédica e automotiva, mas também os pesquisadores precisam de formas mais eficazes na preservação do material biológico para estudo (Madeira et al., 2013). Apesar de ser considerada uma técnica eficiente, cerca de 60-70% das células são mortas na técnica de criopreservação de célula germinativa animal, pelo método

convencional, utilizando ACPs (Guthrie et al., 2002). Para criopreservar espermatozoides, são necessárias mudanças extremas de temperatura, podendo resultar em lesões criongênicas (Madeira et al., 2013; Hossen et al., 2021), como redução da integridade da membrana plasmática, motilidade e viabilidade, redução da integridade acrossomal e o potencial de membrana mitocondrial (Hossen et al., 2021).

É de extrema importância que os protocolos de criopreservação de espermatozoide sejam ajustados para inseminar o espermatozoide com alta taxa de motilidade e sobrevivência (Guthrie et al., 2002). Estudos atuais mostram que a adição de PAC, nos protocolos de congelamento de espermatozoide, pode melhorar a motilidade e aumentar a taxa de sobrevivência dos espermatozoides (Abed-Elmdoust et al., 2017; Hossen et al., 2021).

Atualmente, algumas propostas diferenciadas têm sido levantadas, inclusive, algumas já estão sendo testada para utilização das PACs, como, tecnologia de revestimento de materiais, indústria de combustível, controle do clima, entre muitos outros (Voets, 2017). Várias PACs foram descobertas em bactérias como *Collwellia* SLW05 (ColAFP), *Marinomonas primoryensis* (MpAFP), e *Flavobacterium frigidum* PS1 (FfIBP), porém, ainda não foram devidamente caracterizadas nem testadas para potencial de virulência humana (Mountfort et al., 1997, 1998; McCammon; Bowman 2000).

Já existem diversas patentes de enzimas ativas ao frio ou termolábeis provenientes das bactérias (Tab.2) (Mangiagalli et al., 2020).

**Tabela 2-** Enzimas ativas ao frio ou termo-lábeis que possuem patentes

Enzima	Organismos	Número da patente
Alfa-amilase	<i>Bacillus licheniformis</i>	US6673589
	<i>Clostridium perfringens</i>	US20170044510A1
β-D-Galactosidase	<i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i>	US6727084
Protease	<i>Rhizomucor miehei</i>	US4591565
	<i>Rhizomucor pusillus</i>	US6149950
	<i>Pseudoalteromonas</i> SM9913	CN102224938B
	<i>Flavobacterium balustinum</i> linhagem PI12 de <i>Leucosporodinium antarcticum</i>	US6200793 US8623996
Fosfatase alcalina	<i>Pandalus borealis</i>	WO2002031157A8
	<i>Collwellia psicrerythraea</i>	US20120142061A1 CN106754823A
Uracil-DNA N-Glicosilase	<i>Gadus Morhua</i>	US7037703
	<i>Psychrobacter</i> sp. HJ147	US7723093B2
	Bactéria marinha BMTU 3346	WO1997020922A1
	Bactéria marinha psicrófila	WO2017162754A1

Nuclease	<i>Vibrio salmonicida</i>	WO2013121228A1
	<i>Shewanella sp.</i> linhagem Ac10	WO2006095769A1

Fonte: Mangiagalli e colaboradores (2020)

Entretanto, ainda é necessário superar obstáculos para a aplicação comercial das PACs, como baixo rendimento e alto custo comercial (Voets et al., 2017). Com a intensão de superar esses problemas, foi proposto por vários pesquisadores, a produção de análogos moleculares e poliméricos de IBPs, que são moléculas semelhantes às PACs, feitas sob medidas que não se ligam ao gelo, mas podem inibir a recristalização do gelo (Congdon et al., 2013; Balcerzak et al., 2014; Urbańczyk et al., 2017). Porém, o baixo rendimento, alto custo comercial dificuldade no preparo e a periculosidade dos reagentes, são barreiras para produção dos análogos de IBPs (Urbańczyk et al., 2017).

Dessa forma, a utilização das PACs, oriundas de células bacterianas, pode ser uma estratégia sustentável, podendo garantir a viabilidade dos alimentos, bem como a integridade de diversos tipos de células e tecidos biológicos, reduzindo danos causados pelo congelamento (Naing; Kim, 2019).

#### 1.1.5 Ação Antropogênica na Antártica

O tratado da Antártica, assinado em 1959, é um acordo firmado entre países que desenvolvem atividades no continente Antártico (Vieira, 2006; Marinha do Brasil, 2016). O objetivo do tratado é evitar conflitos internacionais por território na Antártica, e preservar o continente. Cerca de 30 países são considerados membro consultivo por serem signatários originais ou por realizar pesquisas científica no continente (Marinha do Brasil, 2016). O “Tratado da Antártica” entre os governos de diversos países permitiu a presença constante do homem nesse continente outrora natural (Vieira, 2006).

A Antártica é considerada pelos cientistas um laboratório natural, devido à riqueza da biodiversidade que se desenvolve em condições extremas e por seu cenário espetacular (Cowan et al., 2011). Devido suas características únicas são levantadas várias propostas para exploração desse ambiente natural, entre as propostas de exploração estão à exploração de possíveis reservas minerais e projetos turísticos (Vieira, 2006; Brasil MCT, 2009). No entanto, a ação antropogênica na Antártica tem causado temor em alguns cientistas por causar ameaças ao ecossistema polar (Jara et al., 2020). O ambiente isolado e com clima extremo atrai a curiosidade de turistas e cientistas para esse ambiente selvagem, levando o aumento da presença humana e conseqüente aumento da ação antrópica (Brasil Ministério do Meio Ambiente MMA, 2006; Jara et al., 2020).

Apesar de a Antártica ter sido considerada um dos ecossistemas mais protegidos da poluição no mundo, as atividades humanas, principalmente em regiões próximas às estações de pesquisas, tem aumentado significativamente nos últimos anos (Scott et al., 2020). A ação antropogênica nas estações de pesquisas tem sido apontada como uma fonte de poluição ambiental que pode causar problemas de saúde pública (Brasil MMA, 2007; Scott et. al, 2020).

Jara e colaboradores (2020) afirmam que, em certas regiões da Antártica, onde há intensa presença humana, são encontrados isolados bacterianos resistentes a diversos grupos de antibacterianos, tanto sintéticos quanto semissintéticos. Por outro lado, em regiões com baixa ação antrópica, os isolados são altamente sensíveis às drogas.

Uma grande quantidade de poluentes, de diversas classes, está chegando à Antártica, devido à troca de substâncias contaminantes e poluidoras entre América do Sul e a Antártica (Brasil MMA, 2006; Barnes et al., 2010; Romaniuk et al., 2018). Essa troca ocorre através do ar, do mar, pela passagem humana e pela migração de aves que acontece constantemente na Antártica (Brasil MMA, 2006; NA et al., 2021). Portanto, há a necessidade de pesquisar o potencial biotecnológico das bactérias desse ambiente, bem como conhecer o potencial patogênico, antes que as propriedades naturais sejam alteradas e resulte em perda de dados e/ou apresente resultados alterados devido à ação antrópica (Brasil MMA, 2007). Portanto, para obter bioprodutos e evitar uma contaminação biológica, esses microrganismos necessitam de estudos para aplicação segura em larga escala (Trovato et al., 2020).

#### 1.1.6 Fatores de virulência e Resistência a Antibióticos

Frequentemente surgem novos patógenos que se espalham pelo mundo e causam doenças graves, a exemplo a atual pandemia causada pelo vírus SARS-CoV-2. Fatores como viagens e mudanças ambientais colaboram para o surgimento, disseminação e transmissão dos agentes infecciosos (Trovato et al., 2020). Desta forma, existe a necessidade de conhecer a capacidade das bactérias da Antártica em produzir compostos que possam debilitar a saúde humana, principalmente quando se pretende utilizar células microbianas potencialmente aplicadas aos diversos setores biotecnológicos (Andreola et al., 2016).

Microrganismos são capazes de produzir fatores de virulência em humanos, devido à capacidade de produzir enzimas hidrolíticas como proteinases e fosfolipases, bem como potencial produtor de catalase e atividade hemolítica (Karst, 2005; Rorig et al., 2009). Outro fator relacionado à atividade de virulência é a capacidade dos microrganismos em crescer em temperaturas e pHs fisiológicos humanos, o fator de virulência é aumentado quando esses microrganismos são resistentes aos antimicrobianos (Rorig et al., 2009; Maulén, 2012; Mitra et al., 2019).



As principais doenças causadoras de morte no mundo são decorrentes de infecções bacterianas (Wu et al., 2020). Algumas enzimas sintetizadas por bactérias, capazes de invadir tecidos dos hospedeiros, são causadoras de danos que podem ser fatais ao hospedeiro, caso não haja um medicamento capaz de interromper o ciclo das bactérias (Nieminen et al., 2018).

Enzimas extracelulares como as fosfolipases, que possuem a capacidade de degradar membranas epiteliais e destruir vários substratos fisiológicos, importantes para manutenção da saúde humana (Andreola et al., 2016), bem como as proteinases que são capazes de degradar proteínas do hospedeiro principalmente às relacionadas ao sistema imune como citosina e imunoglobulinas, são proteínas estudadas como fatores de virulência (Cogoni et al., 2012; Andreola et al., 2016). Essas enzimas desempenham atividade de virulência em algumas bactérias patogênicas, e são causadoras de dano tecidual e perda dos mecanismos de defesa do hospedeiro (Cogoni et al., 2012).

A catalase é uma enzima responsável pela proteção de espécies bacterianas raras ao oxigênio (ROS) (Karst, 2005). A produção de catalase nas bactérias pode alterar o efeito microbicida do peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), uma vez que esta enzima catalisa a reação onde o peróxido de hidrogênio é convertido em água e oxigênio, permitindo que a bactéria saia ileso a resposta microbicida produzida pelo  $H_2O_2$  (Jittawuttipoka et al., 2009). As propriedades químicas da catalase aumentam a sobrevivência de linhagens bacterianas nos fagócitos humano e possuem papéis, na patogenicidade bacteriana, que ainda não foram elucidados (Karst, 2005; Jittawuttipoka et al., 2009).

Por outro lado, algumas bactérias apresentam outras vias de biossíntese, podendo apresentar atividades hemolíticas facilitando a disseminação desses organismos em diversos tecidos do corpo humano e, conseqüentemente, aumentando os danos causados por eles (Andreola et al., 2016). Alguns microrganismos são capazes de realizar atividade hemolítica, rompendo as hemácias do hospedeiro acarretando em sérios problemas de saúde *in vivo* (Rorig, 2009). Microrganismos patogênicos que possuem íons de ferro, micronutriente essencial, que age como cofator enzimático no desenvolvimento da bactéria podem causar anemia e edemas no hospedeiro, devido à capacidade de produzir hemolisinas (Richard et al., 2019).

No corpo humano, o pH é controlado por homeostase, pela relação ácido-base com valor de 7.35 a 7.45. O pH do sangue e do líquido intersticial, por exemplo, é de 7.35-7.45, considerado como pH neutro (Proksch, 2018). Em mulheres saudáveis, o pH vaginal varia de 3.8-4.4, considerado pH ácido. Já a urina humana, pela manhã, o pH varia de 6.5-7.0, no decorrer do dia e, de acordo com a digestão de alimentos, o pH da urina pode chegar a 8.0, considerado alcalino (Proksch, 2018; Lykke et al., 2021). As bactérias possuem um pH ótimo de crescimento, também são capazes de resistir a pequenas flutuações tanto para baixo quanto para cima do seu pH ótimo, no

entanto, existem bactérias que são classificadas como acidófilas e alcalófilas, crescem em pH abaixo de 2.0-3.0 e acima de 9.0-10, respectivamente (Madigan et al., 2010), conseqüentemente, essas linhagens podem invadir órgãos do corpo humano e causar infecções por serem tolerantes aos respectivos pHs (O'Hanlon et al., 2013).

No corpo humano a temperatura normal varia de 36 a 37,2 °C e se mantém devido a mecanismos fisiológicos, que regulam a produção e a perda de calor (Harding et al., 2020). Alguns fatores podem elevar a temperatura corporal normal, sendo o fator mais comum para o aumento, às infecções, resultando em um estado febril no indivíduo (Garcia-Zapata; Souza-Junior, 2006). Harding e colaboradores (2020) estabeleceram as temperaturas de 37,5 °C, 38 °C, 39 °C e 40 °C como subfebre, febre, febre alta e febre muito alta respectivamente. Em laboratório, normalmente as bactérias são classificadas e incubadas nas temperaturas: de 30 °C a 37 °C, para microrganismos mesófilos; 20 °C a 30 °C para microrganismos psicrófilos e de 50 °C a 60 °C para microrganismos termófilos (Comerio et al., 2007). No entanto, essa técnica pode apresentar alguns erros nos resultados de diagnósticos, uma vez que, pode ocorrer o desenvolvimento de bactérias em temperaturas diferenciadas, tais como os psicrófilos que crescem bem no ponto de congelamento da água, com relatos de crescimento em temperaturas acima de 30 °C (Donnarumma et al., 2010).

Mitra e colaboradores (2019), enfatizam a possibilidade de erros em diagnósticos com organismos que crescem fora de temperaturas usadas em rotinas laboratoriais, constatando que uma bactéria psicrófila (*P. fluorescens*), que apresentam crescimento ótimo a 25 °C-30 °C, é capaz de sobreviver a temperatura corporal humana de até 37 °C, causando fatores de virulência. No estudo, esse isolado apresentou resistência a vários antibióticos, fator que potencializa a virulência da linhagem.

Existe um interesse nos fatores de virulência de microrganismos para que seja possível levantar medidas de prevenção e controle a saúde. A Organização Mundial de Saúde (OMS) e os Institutos Nacionais de Alergia e Doenças Infecciosas (NIAID) divulgaram uma lista de patógenos, incluindo, vírus, bactéria, protozoário e fungo, que devem ser priorizados para pesquisa, devido o potencial patogênico. Espécies introduzidas fora de sua área de distribuição natural, são consideradas espécies invasoras, ameaçam outras espécies e ecossistemas (Brasil MMA, 2006). Portanto, antes de introduzir esses isolados em um novo ambiente é necessário conhecer seus limites de tolerância, ou seja, a qual substância eles são sensíveis ou resistentes.

A partir da década de 1940, a evolução dos fármacos para combater infecções bacterianas revolucionou os tratamentos médicos, assim as doenças e as mortes reduziram rapidamente (Rang et al., 2016). Porém, ao passo que os fármacos antibacterianos evoluíram, as bactérias desenvolveram mecanismos de defesa em resposta as injúrias causadas pelos medicamentos (Rang et al., 2016; Amâncio et al., 2021). Os organismos tornam-se resistentes aos

fármacos, devido sua capacidade em contornar os efeitos inibitórios dos agentes antibacterianos ao qual anteriormente eram suscetíveis (Amâncio et al., 2021).

A presença humana e a passagem de animais migratórios na Antártica têm facilitado à chegada de bactérias resistente a antibióticos (Jara et al., 2020; Na et al., 2021). Bactérias coletadas na Antártica, onde há alta influência humana, apresentaram resistência a vários grupos de antibióticos, principalmente relacionados com a presença de genes codificadores de enzimas que modificam os aminoglicosídeos (AMEs) e  $\beta$ -lactamases de espectro estendido (ESBLs) (Jara et al., 2020).

Por possuírem um curto período de geração, as bactérias são capazes de passar por adaptações evolutivas contra injúrias causadas pelos fármacos antibacterianos, resistências que podem ser adquiridas ou até mesmo inatas (Rang et al., 2016). Devido o fator de risco ao introduzir um organismo em um ecossistema, há a necessidade de ter um controle sobre ele e reconhecer seus limites de tolerância, para que não ocorra ameaça aos ecossistemas (Brasil MMA, 2006).

Algumas bactérias apresentam resistência natural contra alguns fármacos antimicrobianos. Alguns patógenos se tornam resistentes às sulfas, responsáveis pelo bloqueio da produção de ácido fólico nas bactérias, dessa forma as bactérias mudam seu metabolismo a fim de captar ácido fólico do ambiente (Madigan et al., 2010). Em alguns microrganismos ocorre o efluxo, onde a bactéria é capaz de expelir um fármaco antimicrobiano que está entrando na célula (Lima et al., 2017). Os micoplasmas não possuem parede celular o que os tornam resistentes às penicilinas. A maioria das bactérias Gran-negativas são impermeáveis a platensimicina e a penicilina G (Madigan et al., 2010). Algumas bactérias conseguem modificar o alvo dos fármacos antimicrobianos. Alguns estafilococos produzem  $\beta$ -lactamases, enzimas responsáveis pela hidrólise do anel  $\beta$ -lactâmico da penicilina (Madigan et al., 2010; Lima et al., 2017). Outros mecanismos de resistência aos antibióticos podem ser originados através do plasmídeo R (resistência) (Lima et al., 2017), podendo transferir esse plasmídeo para outras bactérias através da interação transposons-DNA (Rang et al., 2016). Contudo a forma mais considerável de resistência foi causada pela inativação dos antibióticos  $\beta$ -lactâmico. (Lima et al., 2017). Esse mecanismo de resistência está associado à expressão da proteína de ligação à penicilina, PBP2a produzido pelo gene *mecA* (PBP, *penicillin binding protein*) (Moussallem et al., 2007).

A biologia sintética pode resolver a maioria dos problemas relacionados à virulência e a resistência aos antimicrobianos em bactérias com aplicações biotecnológicas, através da edição genética. No entanto, as técnicas necessitam de habilidade em tecnologia e processos onerosos, o que inviabilizaria a aquisição de compostos com custo reduzido para a indústria (Padilla-Vaca et al., 2015).

É incontestável o risco que a resistência bacteriana aos antibióticos, bem como, o potencial de virulência trazem para sociedade como um todo, principalmente em estudos que visam a bioprospecção de ambientes, até então considerados inexplorados, mas que, nos últimos anos vêm sofrendo ação antropogênica, causando a introdução de comunidades microbianas prejudiciais a este ecossistema prístino.

Neste sentido, o presente projeto propôs avaliar o potencial produtor de compostos anticongelantes (PACs) produzidos por bactérias isoladas da Antártica, bem como, avaliar a capacidade das linhagens potencialmente produtoras de PACs, quanto a resistência a antibióticos comerciais e a produção de fatores de virulência, visando futuras aplicações industriais biotecnológicas, utilizando linhagens microbianas consideradas seguras para a saúde humana.

## 1.2 JUSTIFICATIVA

A busca por compostos microbianos de forma sustentável e seu potencial uso como metodologia de preservação de insumos industriais e/ou alimentícios é estrategicamente favorável em estudos de bioprospecção, onde os potenciais microrganismos produtores das PACs não apresentem riscos para a saúde pública quando os mesmos forem manuseados/processados em larga escala industrial (Leuschner et al., 2010; Provesi; Amante, 2015).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 GERAL

Avaliar o potencial biotecnológico de bactérias isoladas da Antártica em produzir compostos anticongelantes, bem como verificar a segurança da utilização destes isolados em futuros estudos através da avaliação do perfil de virulência e resistência antimicrobiana.

### 2.2 ESPECÍFICOS

- Selecionar bactérias potencialmente produtoras de compostos anticongelantes;
- Avaliar da produção de fatores de virulência, resistência a diferentes temperaturas e pHs fisiológicos bem como sensibilidade a antimicrobianos de uso comercial, utilizando os isolados potencialmente produtores de compostos anticongelantes.
- Avaliar da presença de genes responsáveis pela ação anticongelante dos isolados potencialmente produtores destes compostos por similaridade de sequência.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 LINHAGENS BACTERIANAS UTILIZADAS

Foram utilizadas no presente estudo, cem (100) linhagens bacterianas, as quais foram coletadas durante a expedição à Antártica, no verão Austral de 2013 e 2015, pela equipe do MycoAntar - Programa Antártico Brasileiro, sob coordenação do Professor Luiz Rosa (UFMG). As bactérias foram cedidas pela Dra. Valéria Maia da Divisão de Recursos Microbianos DRM-CPQBA/UNICAMP. As linhagens estão armazenadas no Laboratório de Biotecnologia Ambiental da UNILA em glicerol 20% a -80 °C. As bactérias foram devidamente isoladas de diversos substratos coletados na Antártica incluindo solo com biofilme, sedimento e invertebrados marinhos (Q. 2), de acordo com Silva et al. (2018).

**Quadro 2-** Local de coleta dos isolados positivos para resistência ao congelamento e resultado da catalase

Isolado	Identificação (16S rRNA)	Produção de Compostos Anticongelantes -80° C	Catalase	Local	Fonte
30	<i>Psychrobacter luti</i>	+	+	Nd	Nd
31	<i>Psychrobacter fozii</i>	+	+	Nd	Nd
48	<i>Sporosarcina globispora</i>	+	+	Nd	Nd
56	<i>Arthrobacter antarcticus</i>	+	+	Nd	Nd
57	NI	+	+	Nd	Nd
66	NI	+	+	Nd	Nd
67	NI	+	+	Nd	Nd
68	NI	+	+	Nd	Nd
102	NI	+	+	Nd	Nd
115	<i>Sulfitobacter litoralis</i>	+	+	Nd	Nd
268	<i>Leifsonia antarctica</i>	+	+	Ilha Half Moon	Biofilme de solo
356	<i>Arthrobacter</i> sp.	+	+		
358	<i>Arthrobacter psychrochitiniphilus</i>	+	+		
359	NI	+	+		
363	NI	+	+	Ilha Punta Hannah—Livingston	Invertebrado marinho
366	<i>Arthrobacter</i> sp.	+	+	Ilha King George—Punta Turret	Solo alagado 4 °C
367	NI	+	+	Ilha Deception – Whalers baía	Solo alagado
369	NI	+	+		
372	NI	+	+	Ilha Punta Hannah—Livingston	Sea sponge

380	NI	+	+	Ilha Punta	Marine
381	NI	+	+	Hannah—Livingston	invertebrate
382	<i>Arthrobacter stackebrandtii</i>	+	+	Ilha King George — Punta Turret	Solo alagado 4 °C
383	NI	+	+		
386	NI	+	+		
408	<i>Arthrobacter</i> sp.	+	+	Ilha Punta	Marine
409	<i>Psychrobacter</i> sp.	+	+	Hannah—Livingston	invertebrate
411	<i>Arthrobacter</i> sp.	+	+		
422	<i>Psychrobacter</i> sp.	+	+	Ilha King George— Punta Turret	Solo alagado 4 °C
423	<i>Arthrobacter</i> sp.	+	+		
425	<i>Cellulophaga fucicola</i>	+	+		
426	<i>Rhodococcus</i> sp.	+	+		
427	<i>Carnobacterium</i> sp.	+	+	Ilha King George— Punta Turret	Solo alagado 1.6 °C
428	NI	+	+		
443	<i>Arthrobacter</i> sp.	+	+	Ilha King George— Punta Turret	Solo alagado 4 °C
444	<i>Sporosarcina psychrophila</i>	+	+		
445	<i>Psychrobacter</i> sp.	+	-	Ilha Punta	Invertebrado
449	<i>Carnobacterium</i> sp.	+	+	Hannah—Livingston	marinho
450	<i>Arthrobacter</i> sp.	+	+		
456	<i>Psychrobacter fozii</i>	+	+		
ES26	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	+	+	Ilha Punta	Esponja do
ESH238	<i>Psychromonas arctica</i>	+	+	Hannah—Livingston	mar
1	<i>E.coli</i>	-	+	Nd	Nd
2	<i>S. aureus</i>	-	+	Nd	Nd

Fonte: A identificação dos isolados foi realizada no trabalho descrito por da Silva e colaboradores (2018). Nota: \*NI= não identificado. \*Nd= não determinado. 1 e 2= controles positivos.

### 3.2 PREPARO E REATIVAÇÃO DAS BACTÉRIAS

Os 100 isolados bacterianos congelados foram reativados em tubos de ensaio contendo 6 mL do meio de cultivo R2B (0,05% peptona, 0,05% extrato de levedura, 0,05% glicose, 0,05% amido, 0,03% piruvato de sódio, 0,03% fosfato dipotássico, 0,005% sulfato de magnésio). As amostras foram incubadas a 15 °C por 15 dias.

### 3.3 SELEÇÃO DE BACTÉRIAS POTENCIALMENTE PRODUTORAS DE COMPOSTOS ANTICONGELANTES

A avaliação da produção de compostos anticongelantes foi realizada utilizando um ensaio de resistência microbiana ao congelamento na ausência de um agente crioprotetor, de acordo com a técnica descrita por Bircher e colaboradores (2018), com algumas adaptações. Após a

reativação das linhagens, descritas no item 3.2, um mL do meio de cultivo R2B foi transferido para tubos Eppendorf de 2.0 mL (6 tubos). As células foram centrifugadas a 4.000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado, então foi adicionado um (01) mL de água deionizada estéril ao *pellet*, em 3 tubos e 1 mL de glicerol 20% foi adicionado aos outros 3 tubos (controle), totalizando 6 tubos de 2.0 mL para cada linhagem. As amostras foram congeladas a -80°C por 15 dias.

Após o período de congelamento, as bactérias foram descongeladas em temperatura ambiente e reativadas novamente, em triplicata, em meio de cultivo R2B a 15 °C por 15 dias. O crescimento microbiano nos tubos de ensaio que foram congelados apenas em H<sub>2</sub>O foi considerado ensaio positivo, ou seja, linhagem potencialmente produtora de compostos anticongelantes. As linhagens *Cryobacterium* sp. JCM 19503 a qual mostrou atividade PAC, de acordo com Singh e colaboradores (2014) e *Escherichia coli* ETEC 5041-1, foram usadas como controle positivo e negativo respectivamente.

### 3.4 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE VIRULÊNCIA EM HUMANOS

Os isolados bacterianos que foram considerados positivos no ensaio de tolerância ao congelamento foram submetidos ao ensaio de avaliação da produção de proteinase, fosfolipase, catalase, bem como potencial de causar hemólise. Os mesmos isolados foram submetidos a ensaios de tolerância a pHs fisiológicos humanos e de tolerância a temperaturas corporais humana. Os ensaios foram realizados com a finalidade de determinar o potencial de virulência dos isolados de interesse biotecnológico. Foram utilizadas as bactérias *E. coli* ETEC 5041-1 e *Staphylococcus aureus* CBMAI 485, como controles positivos.

#### 3.4.1 Atividade de Proteinase

A produção de proteinase foi realizada conforme Andreola e colaboradores (2016) com modificações. Foi utilizado o meio de cultura Agar S (R-2A Agar) (HiMedia, Mumbai, IN) (0.05% peptona, 0,05% extrato de levedura, 0,05% glicose, 0,05% amido, 0,03% piruvato de sódio, 0,03% fosfato dipotássico, 0,005% sulfato de magnésio, ágar 1,5% e pH final após esterilização  $7,2 \pm 0,2$ ) e adicionado 0,2% de albumina sérica bovina (BSA) (Sigma–Aldrich, St Louis, USA). O isolado bacteriano foi inoculado em triplicata na placa de Petri, e incubado a 15 °C por até 15 dias. A formação de halo ao redor do isolado foi considerado como positivo para produção de proteinase.



### 3.4.2 Atividade de Fosfolípase

Para produção de fosfolípase foi utilizada a técnica descrita por Andreola e colaboradores (2016) com algumas adaptações, utilizando meio de cultura ágar nutriente (0,3% extrato de carne, 0,5% peptona, 1,5% ágar, pH final  $6,8 \pm 0,2$ ) acrescido de 10% de emulsão gema de ovo. A emulsão gema de ovo foi preparada contendo 50% de salina (NaCl 0,9%) e 50% de gema de ovo. Os isolados foram inoculados em triplicata na placa de Petri e incubados a 15 °C por 15 dias. A formação de halo ao redor do isolado foi considerada positiva para produção de fosfolípase.

### 3.4.3 Atividade de Catalase

Para o teste da catalase, cerca de 10 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foram adicionados em triplicata em placas de Petri. Em seguida, com o auxílio de uma alça de platina, células microbianas de cada isolado, previamente cultivadas em placa de Petri contendo meio de cultivo R2A foram acrescentado ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A formação de bolha no H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi considerada como isolado catalase positiva (Eklund et al., 2020).

### 3.4.4 Atividade Hemolítica

Os isolados bacterianos passaram pelo teste de atividade hemolítica conforme descrito por Suhet e colaboradores (2011), com adaptações, utilizando o meio ágar sangue (1,5% peptona de caseína, 0,5% peptona de soja, 0,5% cloreto de sódio (NaCl), 1,5% ágar e 5% de sangue). Os isolados foram dispostos em triplicata nas placas de Petri e foram incubados a 15 °C por até 15 dias. A formação de halo ao redor do isolado foi considerada como ensaio positivo para atividade hemolítica.

### 3.4.5 Índice de Atividade Enzimática/Hemolítica

Os diâmetros das colônias bacterianas e dos halos formados foram medidos com auxílio de uma régua. A atividade enzimática extracelular e a hemólise foram calculadas pela relação entre o diâmetro médio do halo e o diâmetro médio das colônias (Sharma et al., 2002). Finalmente, os isolados foram classificados como, alto índice enzimático (IE) ou alto índice hemolítico (IH) ( $IE/IH > 3$ ), moderado índice enzimático ou moderado índice hemolítico ( $IE/IH 2-3$ ) e baixo índice enzimático ou baixo índice hemolítico ( $IE/IH < 2$ ) (Ruginescu et al., 2020).

### 3.4.6 Crescimento/tolerância em pHs fisiológicos

Para determinar se as bactérias da Antártica são capazes de crescer em pHs equivalente a pHs fisiológicos humano, os isolados foram cultivados em meio de cultivo R2A com pH ajustado em três valores diferentes sendo: 4.0, 7.0 e 8.0, representando o vaginal (Lykke, 2021), do sangue e da urina (pH da urina 7,5,-8,0 conforme ocorre digestão dos alimentos) (Proksch, 2018), respectivamente. Os pHs foram ajustados com solução de hidróxido de sódio (NaOH) e/ou ácido clorídrico (HCl) (Mazareli et al., 2021). As colônias bacterianas foram inoculadas em triplicatas na placa de Petri, incubadas a 15 °C por 15 dias. O crescimento bacteriano nas placas de Petri foi considerado como isolados tolerantes aos respectivos pHs.

### 3.4.7 Avaliação do crescimento/tolerância em temperaturas corporais humanas

O ensaio de resistência à temperatura foi realizado conforme a técnica descrita por Xavier e colaboradores (2007), com adaptações. Os isolados foram inoculados em meio de cultura R2A e incubados, em triplicata, em diferentes temperaturas por até 15 dias. As temperaturas utilizadas foram 15 °C, 36 °C, 38 °C e 40 °C, representando o controle, temperatura corporal sem febre, com febre e febre muito alta, respectivamente (Harding et al., 2020). O crescimento microbiano nas placas foi considerado como ensaio positivo e o isolado tolerante às respectivas temperaturas corporais.

### 3.4.8 Índice do crescimento/tolerância a pHs e temperaturas fisiológicas

Os diâmetros das colônias bacterianas foram medidos com auxílio de uma régua e classificados quanto aos tamanhos das colônias, sendo, tolerante (colônias com diâmetro >3,0 mm), tolerância moderada (colônias com diâmetro de 2,0 a 3,00 mm) e sensível (colônias com diâmetro <2,00 mm) (Chagas Júnior et al., 2009).

## 3.5 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE SENSIBILIDADE/RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS COMERCIAIS

As bactérias crescidas em R2B tiveram densidade óptica (DO) padronizada em 0,08 em espectrofotômetro a 600 nm (Chaves et al., 2015). O teste de sensibilidade aos antibióticos foi realizado pelo método de disco de infusão, conforme orientação do Clinical and Laboratory Standards Institute- CLSI, sendo o meio ágar Mueller-Hinton substituído pelo meio de cultura Agar

médium S-R2A Agar (R2A) (HiMedia, Mumbai, IN), preparado conforme descrição do fabricante. Os antibióticos utilizados foram amoxicilina+clavulanato de potássio (500 + 125 mg L<sup>-1</sup>), azitromicina (500 mg mL<sup>-1</sup>) e cloranfenicol (250 mg L<sup>-1</sup>).

Discos de papel filtro com cerca de 2 mm de diâmetros foram mergulhados nas soluções de antibióticos comerciais e dispostos em triplicatas na placa de Petri, um disco embebido em lisofórmio foi utilizado como controle. As placas foram incubadas a 15 °C por 15 dias. Com o auxílio de uma régua foi medido os halos formados ao redor dos discos. Foi atribuída a característica de sensível/resistente mediante a comparação de tamanho dos halos, com valores pré-estabelecidos pela Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (BrCAST), 2017. CLO: Cloranfenicol ≥17mm sensível/ < 17mm resistente; Amo+Clav: Amoxicilina+Clavulanato de potássio ≥19mm Sensível/< 19mm resistente; Azi: Azitromicina ≥21mm Sensível/ <21mm Resistente.

### 3.6 AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE GENES PRODUTORES DE COMPOSTOS ANTICONGELANTES POR SIMILARIDADE DE SEQUÊNCIA

Das 41 linhagens tolerantes ao congelamento, foram selecionados sete gêneros distintos (identificados no trabalho de Silva et al., 2018) para busca de genes produtores de compostos anticongelantes por similaridade de sequência. A linhagens selecionadas foram, *Leifsonia Antarctica* (268), *Psychrobacter* sp. (409), *Arthrobacter* sp. (411), *Cellulophaga fucicola* (425), *Rhodococcus* sp. (426), *Carnobacterium* sp. (449) *Pseudoalteromonas* (ES26), também foi utilizado o controle positivo *Cryobacterium* sp. JCM 19503 a qual mostrou atividade PAC, de acordo com Singh e colaboradores (2014).

#### 3.6.1 Extração do DNA Genômico

A extração de DNA genômico foi realizado pelo método CTAB (Van Soolinger et al., 1991), com modificações. As linhagens foram cultivadas por 15 dias a 15 °C, em meio R2B. As células bacterianas foram transferidas do meio de cultura para um tubo eppendorf de 1,5 mL contendo 500 µL de TE 1X (10 mM de Tris pH 8,0 e 0,1 mM de EDTA). Após homogeneização no tampão de lavagem, o conteúdo foi centrifugado a 20 °C, a 12.000 rpm por 2 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células foram novamente suspensas em 400 µL de TE 1X, seguindo uma maceração mecanicamente (com bastão). Foram adicionados 67,5 µL de SDS 10% e 2,5 µL de proteinase K (10 mg. mL<sup>-1</sup>). As amostras foram agitadas em vortex e incubada em vortex a 65°C por 10 minutos. Em seguida, adicionou-se 100 µL de NaCl 5 M e 100 µL de solução CTAB

(brometo de cetiltrimetilamônio)/NaCl pré-aquecidos a 65 °C. As amostras foram novamente agitadas em vórtex e incubadas a 65 °C por 10 minutos. A seguir, foram adicionados 750 µL de clorofórmio/álcool isoamílico (1:24) e as amostras foram agitadas em vórtex e centrifugadas a 12.000 rpm, em 20 °C por 12 minutos. A fase aquosa foi transferida para novos tubos eppendorf com 450 µL de isopropanol e homogeneizada por inversão. O DNA foi precipitado a temperatura de - 20 °C por 10 minutos, centrifugado a 12000 rpm, em 20 °C por 5 minutos e o sobrenadante foi descartado. Foi acrescido 1 mL de etanol 70% ao *pellet* sendo realizada uma nova centrifugação. A quantificação do DNA extraído foi realizada por leitura em NanoDrop Onec (Thermo Scientific, Waltham Massachusetts, EUA).

### 3.6.2 Amplificação dos Genes por PCR

A reação de PCR foi realizada seguindo as condições propostas por Menezes e colaboradores (2010), utilizando 2,5 µL de buffer (1X), 0,75 µL de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 µL de dNTPs, 0,4 µL de Taq DNA polimerase e o par de primers forward 5'-GAYGCNACNTTYGARGCNGCNA-3' reverse 5'-TCRTCRTTNCNGTNCNGCRT-3. As condições da reação de PCR foram 30 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 50 °C por um minuto e 72 °C por 90 segundos, com uma extensão final de 72 °C por oito minutos (Guo et al. 2012).

### 3.6.3 Eletroforese em Gel de Agarose

Para verificar a presença e o tamanho de produtos derivados da PCR foi preparado o gel de agarose a 0,8% e formado poços para aplicação da amostra. Um mix de 2 µL da PCR com 3 µL de Azul de bromofenol com gel red foi preparado. O mix foi aplicado nos poços do gel de agarose e o gel de agarose foi disposto na cuba de eletroforese e coberto por TAE 1x (tampão Tris-Acetato-EDTA). A corrida foi realizada em 30 minutos e os resultados foram visualizados em luz ultravioleta (Lee et al., 2012).

## 3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas de acordo com Ottoni e colaboradores (2020), usando a análise de variância (ANOVA) e Tukey (a 5% de probabilidade) no software PAST versão 2.17c.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 REATIVAÇÃO DAS BACTÉRIAS PRESERVADAS EM GLICEROL 20%

Das cem bactérias reativadas, as quais estavam preservadas em glicerol 20% a -80 °C, 65 isolados cresceram no meio de cultivo R2B (Fig.6). Os 65 isolados reativados foram submetidos aos ensaios de seleção para a produção de compostos anticongelantes.

**Figura 6-** Crescimento bacteriano após reativação em meio de cultura R2B.



Fonte: O autor

### 4.2 SELEÇÃO DE BACTÉRIAS POTENCIALMENTE PRODUTORAS DE COMPOSTOS ANTICONGELANTES

No ensaio de seleção de linhagens produtoras de compostos anticongelantes, as quais foram submetidas a testes de resistência ao congelamento, dos 65 isolados bacterianos avaliados, 41 (63,07%) foram considerados positivos, pois apresentaram capacidade de resistir ao congelamento a -80 °C sem a presença do agente crioprotetor (glicerol 20%) (Fig.7), demonstrando seu potencial como produtor de compostos anticongelantes em temperaturas baixas.

Os invertebrados marinhos são fonte rica de produtos naturais, no entanto estudos prévios apontam que são produtores de baixo rendimento destes compostos (Harvey et al., 2015). Compostos produzidos por bactérias simbiotes, que se abrigam nesses organismos, são semelhantes ou idênticos aos compostos produzidos pelo hospedeiro, tornando essas bactérias fontes de produtos naturais biologicamente ativos (Gurgui; Piel, 2010).

**Figura 7-** Isolados reativados após o congelamento -80 °C (sem crioprotetor glicerol 20%) em meio de cultura R2B.



Fonte: O autor

As linhagens potencialmente produtoras de PAC, estudadas no presente trabalho representam 10 gêneros distintos, entre eles *Arthrobacter*, *Carnobacterium*, *Cellulophaga*, *Leifsonia*, *Pseudoalteromonas*, *Psychrobacter*, *Psychromonas*, *Rhodococcus*, *Sporosarcina* e *Sulfitobacter*, as quais foram recuperadas de diferentes substratos incluindo, biofilme de solo, invertebrado marinho, solo alagado e esponja do mar (Q.2).

Produtos antimicrobianos já foram isolados de bactérias simbiotes, de esponjas marinhas, em diversos momentos. Esse fato levantou a hipótese de que essas bactérias agem na defesa de seu hospedeiro (Webster et al., 2001). Embora não haja estudos suficientes que comprovem que bactérias psicrófilas, protegem outros organismos contra o congelamento, esses microrganismos demonstram facilitar a sobrevivência de espécies hospedeiras mais suscetíveis ao frio, inclusive a sobrevivência de outras bactérias na formação de biofilmes (Wu et al., 2012). Há relatos de bactérias psicrófilas que promove o crescimento de plantas (*P. putida* GR12-2) e bactérias psicrófilas que conferem a planta, tolerância ao sal (*P. putida* UW4) (Muryoi et al., 2004; Cheng et al., 2007).

Dessa forma, como ainda não há relatos na literatura, de esponjas marinhas produtoras de PAC, é possível levantar a hipótese, que bactérias da Antártica, produtoras de PAC, associadas a invertebrados marinhos, conferem proteção ao hospedeiro contra o congelamento, incluindo esponja marinha e outras bactérias na formação de biofilme. As comunidades microbianas nos oceanos podem estar presente na ordem de  $10^5$  a  $10^6$  bactérias por mililitro de água, somando um volume bacteriano estimado de  $10^{12}$  toneladas (Webster et al., 2001). A maioria não é cultivável, mas graças aos métodos metagenômicos, independentes de cultivo, é possível buscar informações importantes de compostos bioativos nesses organismos (Harvey et al., 2015).

As pesquisas, realizadas com bactérias para produção de PACs, avaliaram as temperaturas  $-20$  e  $-50$  °C, e foram as temperaturas mais baixas registradas em experimentos, até o momento. Sun e colaboradores (1995) testaram a bactéria *Pseudomonas putida* para o congelamento a  $-20$  e  $-50$  °C. Após o crescimento a  $5$  °C, o isolado sintetizou e secretou proteína com atividade anticongelante no meio de cultura. As análises demonstraram que se tratavam, de uma proteína principal e outras proteínas menores, no entanto, não foi possível determinar qual das proteínas apresentou atividade anticongelante.

Gilbert e colaboradores (2004), cultivaram linhagens bacterianas da Antártica a três temperaturas distintas  $5$  °C,  $15$  °C e  $25$  °C, durante sete dias. Os resultados apontaram melhor crescimento a  $15$  °C. Entretanto, no presente estudo, dois gêneros resistiram a temperaturas muito menores ( $-80$  °C) que as relatadas pelos autores, os gêneros, *Psychrobacter* e *Pseudoalteromonas* foram capazes de tolerar  $-80$  °C apenas em água, sendo uma linhagem de *Psychrobacter luti* (30), duas de *Psychrobacter fozii* (31 e 456), três linhagens de *Psychrobacter* sp. (409, 422 e 445), e uma linhagem de *Pseudoalteromonas* sp. (ES26) (tab.3). Esses isolados foram resistentes a  $-80$  °C demonstrando que são potenciais produtoras de compostos anticongelantes a temperaturas extremamente baixas, no entanto, seu mecanismo de funcionamento não foi estudado.

Contudo, já foram relatadas duas estratégias utilizadas pelos organismos (Lorv et al., 2014), sendo elas: na prevenção do congelamento os organismos necessitam de altos níveis de histerese térmica, para evitar que a temperatura ambiente caia abaixo de  $0$  °C. Geralmente essa estratégia é associada a lugares com baixa flutuação de temperaturas, ou a organismos que podem se locomover, como peixes e insetos, evitando assim, prejuízos causados pelo gelo (Gilbert et al., 2005; Middleton et al., 2012) e; tolerância ao congelamento, em locais onde ocorrem altas flutuações de temperaturas negativas é a estratégia de sobrevivência mais relatada (Wilson et al., 2006; Middleton et al., 2012). Podemos sugerir que essa estratégia pode ter sido utilizada pelos isolados tolerantes ao congelamento, nesse estudo. Nessa estratégia, a proteína busca reduzir os prejuízos causados pelo gelo no organismo. A estratégia está associada a organismos que não possuem plasticidade como as plantas e os microrganismos, que não podem fugir rápido do ambiente frio (Wilson et al., 2006; Middleton et al., 2012).

A estratégia utilizada pelo organismo varia de acordo com a força, velocidade de flutuação de temperatura e o ambiente, influenciando a força e o tipo de proteína anticongelante que serão expressas (Griffith; Ewart, 1995; Wilson et al., 2006; Lorv et al., 2014). Segundo Singh e colaboradores (2014), espécies de *Pseudoalteromonas* foram capazes de produzir moléculas potencializadoras como polissacarídeos (trealose), aminoácidos (glicina e betaína) e sais (NaCl), compostos que podem aumentar a histerese térmica (HT) das PACs.

Gilbert e colaboradores (2005) levantaram a hipótese de que bactérias da Antártica precisaram expressar PAC altamente ativa para sobreviver ao congelamento. Desta forma, podemos inferir a mesma hipótese, pois, no presente estudo, cerca de 63% dos isolados foram capazes de sobreviver após 15 dias a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  sem agente crioprotetor, isolados que podem estar produzindo e expressando certas proteínas altamente ativa para favorecer a sobrevivência.

Raymond e colaboradores (2008) testaram a capacidade de uma proteína de ligação ao gelo, de uma bactéria marinha da Antártica. Os ensaios foram conduzidos a temperatura de  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  (com variações de  $-1\text{ }^{\circ}\text{C}$  a  $+3\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Os autores obtiveram 17 isolados de crescimento rápido, sendo que, apenas uma mostrou atividade forte, oito mostram atividade fraca e o restante não mostraram atividade de ligação ao gelo.

No estudo de Singh et al. (2014), os autores constataram valores elevados de HT em torno de  $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ , nas cepas de *Pseudomonas ficuserectae*. Em nosso estudo verificamos a resistência dos isolados a uma temperatura muito baixa ( $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), apenas em água, sem qualquer fonte de nutriente ou agente crioprotetor. É interessante ressaltar que as bactérias não passaram apenas pelo estresse de congelamento, mas também pela falta de nutrientes, demonstrando que bactérias recuperadas da Antártica, são resistentes a diversas condições de estresse a que são expostas e expressam uma resposta biológica rápida e apropriada ao tipo de estresse em que se encontram.

Os primeiros relatos de atividade anticongelante foram descritos nas espécies *Micrococcus cryophilus* e *Rhodococcus erythropolis*, porem não houve relato sobre a caracterização dessas PACs. O estudo conduzido por Duman; Olsen (1993) foi o primeiro a descobrir PACs produzidos por *Rhodococcus erythropolis*. Na última década, foram relatadas PACs em diversas bactérias de ambientes frios, mas apenas a caracterização básica das proteínas foi descrita. Estudos realizados na busca de atividade anticongelante de origem bacteriana focam na inibição da recristalização do gelo (IR) e na morfologia do gelo (Lorv et al., 2014).

A primeira proteína anticongelante isolada de bactérias, veio do ambiente Ártico canadense, da espécie *Pseudomonas putida* GR12-2 (Sun et al., 1995; Lorv et al., 2014). Já, as primeiras análises realizadas com bactérias, para produção das PACs, foram realizadas por Gilbert e colaboradores (2004). Utilizando 866 linhagens, apenas 19 produziram PACs, sendo uma linhagem descrita como Bactéria antártica da água do mar, uma linhagem de *Sphingomonas* sp., *Halomonas* sp., *Pseudomonas fluorescens*, *Idiomarina loihiensis*, *Psychrobacter* sp., *Bacillus aquamarinus*, *Enterobacter agglomerans*, duas linhagens de *Pseudoalteromonas* sp., *Stenotrophomonas maltophilia* e sete linhagens de *Marinomonas protea*.

Ao que se sabe até o momento, somente duas PACs bacterianas foram bem caracterizadas e são as mais estudadas quando se trata de PAC bacteriana, a lipoglicoproteína de 164 kDa de *Pseudomonas putida* e a lipoproteína de 52 kDa de uma *Moraxella* sp. (Lorv et al.,



2014). O gene que codifica PAC foi encontrado em linhagens do gênero *Arthrobacter*, isoladas na China (Sun et al., 2016) e no solo da Antártica (See-Too et al., 2017). Além da descoberta deste gene codificador da PAC, ainda foi descoberto uma nova  $\beta$ -D-galactosidase adaptada ao frio na linhagem *Arthrobacter* sp., que foi capaz de remover a lactose de produtos lácteos em baixa temperatura, o que reforça o potencial biotecnológico desse gênero na indústria alimentícia (Hildebrandt et al., 2009).

Em ensaios de congelamento e descongelamento, já foram relatados nos gêneros *Arthrobacter* (Muñoz et al., 2017), *Psychrobacter* (isolado de permafrost), *Rhodococcus*, *Pseudoalteromonas* (Lorv et al., 2014) e *Psychromonas* (Kim et al., 2017), como produtores de PACs ou resistentes a estresse do descongelamento. Da mesma forma, os gêneros *Cellulophaga*, *Carnobacterium* (Bowman, 2017) *Sporosarcina* (Yong et al., 2008) e *Sulfitobacter* (Kim et al., 2020) foram relatados como bactérias adaptadas a ambientes frios. No entanto, até onde se sabe, reportamos o primeiro relato do potencial produtor de compostos anticongelantes por bactérias isoladas de invertebrados marinhos coletados em ambientes frios, incluindo os gêneros *Carnobacterium*, *Cellulophaga*, *Sporosarcina* e *Sulfitobacter*.

Singh e colaboradores (2014) testou a atividade PAC para o gênero *Leifsonia*, coletadas de crioconita que contém água doce (Poniecka et al., 2020), em Svalbard, Ártico, porém não houve atividade anticongelante detectada. No entanto, o oposto foi constatado no presente trabalho, onde uma linhagem de *Leifsonia antarctica* (268) associada a ambiente salino (Q.1), demonstrou tolerância ao congelamento. Algumas justificativas podem ser levantadas quanto aos resultados encontrados em ambos os trabalhos. As bactérias podem possuir o gene de PAC, mas serem fenotipicamente negativas, devido a diferenças de indução para produção da proteína, mostrando que essa proteína não está relacionada apenas à temperatura (Gilbert et al., 2004). As amostras de ambos os trabalhos foram coletadas em condições ambientais diversificadas, como valor de salinidade do ambiente, por exemplo. Apesar das PACs terem aparecido em ecossistemas muito diferentes, bactérias produtoras de PAC são mais comumente encontradas em ambientes salinos, onde o estresse é muito maior. Para corroborar a justificativa, no que diz respeito a PAC de peixes, até a presente data, só foram detectadas em peixes de água salgada, teoricamente por esses organismos estarem expostos a temperaturas abaixo do ponto de congelamento dos fluidos corporais e à maior concentração de soluto em seu ambiente (Gilbert et al., 2004).

Provesi; Amante (2015) sugere que em algumas regiões brasileiras, mais ao sul do país, existem organismos que são potenciais produtores de PACs, devido essas regiões passarem por invernos com temperaturas abaixo de zero. O Brasil pode dispor de bactérias que ofereçam compostos, iguais ou semelhantes, aos compostos produzidos por bactérias da Antártica, porém, ainda não foram descobertos. A Convenção sobre a Diversidade Biológica (CDB), criada em 1993,

deu direito a diversos países, incluindo o Brasil, de usufruir seus próprios recursos e atribuiu a eles a responsabilidade sobre a conservação. Porém, apesar do Brasil possuir uma das maiores biodiversidades do planeta, ainda é pouco explorado (Brasil MMA, 2018). Portanto, a bioprospeção de bactérias da Antártica, pode abrir novos caminhos e despertar o interesse dos cientistas em pesquisar os mesmos compostos encontrados na Antártica, no Brasil, facilitando o acesso e reduzindo o custo de aquisição dessas proteínas (Provesi; Amante, 2015; Brasil MMA, 2018).

Provesi; Amante (2015) apontam a importância das PACs para o setor alimentício, demonstrando como essas proteínas atuam de forma eficaz na inibição da formação de gelo e como elas evitam a recristalização. No entanto, o alto custo para obter as PACs de plantas e animais, ainda é uma barreira que impede a comercialização dessas proteínas em larga escala industrial (Voets, 2017). Cultivar plantas e criar animais decorre de um processo dispendioso, pois exige espaço e recursos de alto custo, mas os autores enfatizam que a descoberta de uma nova fonte de obtenção, como as bactérias, pode reduzir o custo de aquisição dessas proteínas (Cereghino et al., 2000; Voets, 2017). Quando comparado com outras formas de vida, os microrganismos apresentam um custo consideravelmente menor, o que torna essa fonte de proteínas uma ferramenta potencial na aplicação industrial (Cereghino et al., 2000).

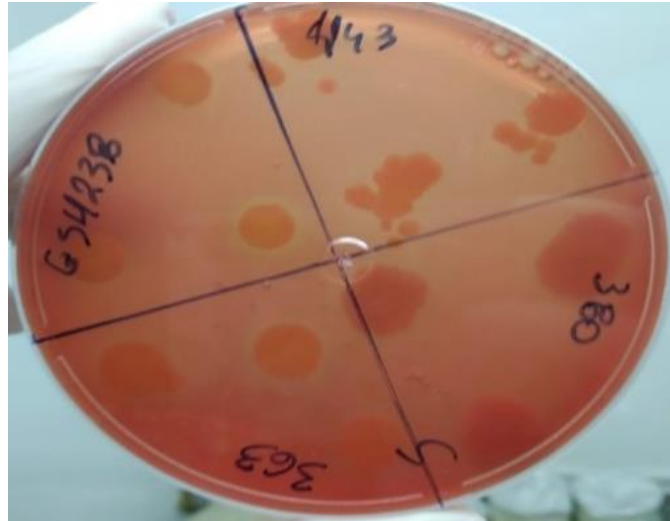
O presente estudo propôs apontar linhagens bacterianas da Antártica produtores de compostos anticongelantes em temperatura extrema (-80 °C), que sejam isolados seguros para manipulação e aplicação industrial. A descoberta das PACs em peixes desencadeou a curiosidade para novas fontes dessa proteína em outras formas de vida, desde então, são realizadas análises com propósito de demonstrar, ou não, a produção das PACs, principalmente em microrganismos. Entretanto, não há estudos suficientes que demonstram que esses isolados são seguros para aplicação industrial. Esses estudos são importantes para que seja evitada uma contaminação biológica ao introduzir um organismo desconhecido em um determinado ecossistema. Portanto o presente estudo trouxe o diferencial de, não só testar os isolados bacterianos para produção das PACs em temperatura extrema, como também, realizar análises do potencial de virulência humana e resistência a antibióticos comerciais distintos, oferecendo assim, uma maior segurança na sua manipulação e para futuras outras aplicações.

#### 4.3 CARACTERIZAÇÃO DA VIRULÊNCIA DOS ISOLADOS POTENCIAIS PARA PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS ANTICONGELANTE

Os 41 isolados potencialmente produtores de compostos anticongelantes foram submetidos ao teste de atividade hemolítica. Cinco de 41 isolados (12,1%) mostraram resultados

positivos para atividade hemolítica, ou seja, produziram um halo de hemólise ao redor da colônia (Fig.8). O índice de atividade hemolítica variou de 1,13 a 1,92 no ensaio (Tab.3).

**Figura 8-** Atividade hemolítica no ensaio utilizando ágar sangue. isolados *Arthrobacter* sp. (443); não identificado (363) e *Psychromonas arctica* (ESH238).



Fonte: O autor

**Tabela 3-** O índice da atividade hemolítica (IH) foi determinado por meio do quociente entre Halo médio da colônia (HC), halo médio hemolítico (HH) ( $IH = HC/HH$ ).

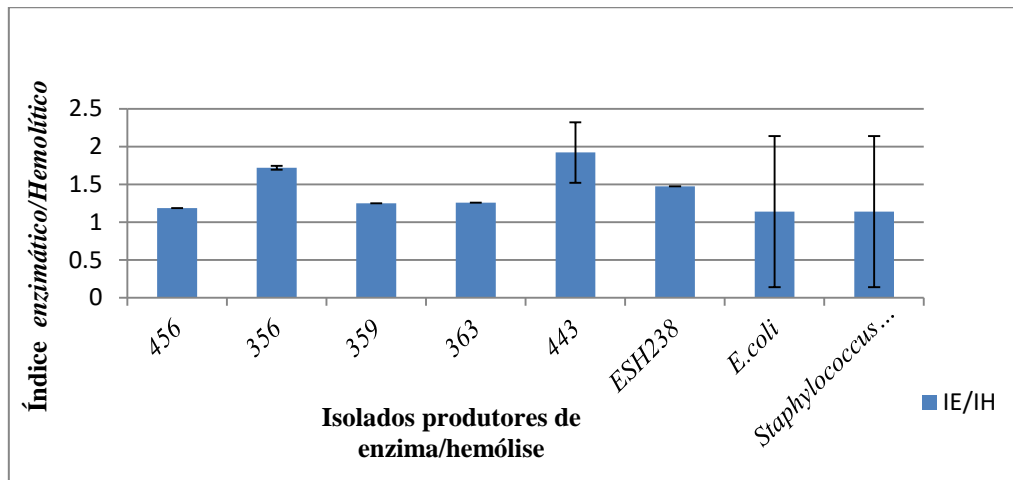
<b>Índice de Atividade Enzimática</b>			
<b>Enzimas</b>	<b>HC</b>	<b>HH</b>	<b>IE</b>
<b>Proteínase</b>			
456 <i>Psychrobacter fozii</i>	9	10,6	1,17
<b>Atividade Hemolítica</b>			
356 <i>Arthrobacter</i> sp.	9,3	15,6	1,67
359 NI	8	10	1,25
363 NI	9	11,33	1,25
443 <i>Arthrobacter</i> sp.	8,66	16,66	1,92
ESH238 <i>Psychromonas arctica</i>	7	10,33	1,47
<b>Controles</b>			
<i>E.coli</i>	14,33	16,33	1,13
<i>Staphylococcus aureus</i>	14,33	16,33	1,13

Fonte: O autor. O índice da atividade hemolítica/enzimática é a média das triplicatas de cada isolado avaliado

A segurança da linhagem é um dos principais critérios ao selecionar microrganismos para uso biotecnológico. A análise estatística mostrou que houve uma diferença significativa para a atividade hemolítica de *Arthrobacter* sp. 443 (Graf.1) em comparação com outros isolados que apresentaram a mesma atividade, devido ao maior índice relacionado à sua atividade. No entanto,

este isolado foi considerado baixo produtor de virulência, devido o índice hemolítico ser  $<2$ , conforme classificado no item 3.4.5 (IH  $<2$ ).

**Gráfico1-** Índice de atividade hemolítica/enzimática (IH/IE) dos isolados considerados positivos



Fonte: O autor. Nota: isolado 356 foi produtor de proteinase

Linhagens de *Arthrobacter* (Actinobactéria de grande aplicação biotecnológica) recuperadas de ambientes frios já foram avaliadas, entretanto, a atividade hemolítica não foi observada (Nam et al., 2011; Mogrovejo-Aruas et al., 2020), porém, esse gênero já foi relatado como tendo capacidade de causar infecção em humanos, demonstrando a importância de estudar a virulência de microrganismos, quando se pretende utilizar linhagens bacterianas em aplicações biotecnológicas (O'Brien et al., 2004; Yamamoto et al., 2017).

As linhagens *Arthrobacter* sp. 356 e 443, *Psychromonas arctica* ESH238 e as linhagens não identificadas (NI) 359 e 363 mostraram atividade hemolítica em meio de cultura enriquecido com sangue humano, com índice de virulência variando de 1,1 a 1,9 mm (Tab.3) sendo assim considerados baixos produtores de fator de virulência (Graf. 1).

A determinação da hemólise em *Psychromonas arctica* foi realizada pela primeira vez no presente estudo. No entanto, o gênero *Psychromonas* já foi descrito com potencial de degradar lipídeos e proteínas, bem como, portador de um gene codificador de fosfatase, porém foi relacionado à degradação de sedimentos marinhos (Pelikan et al., 2021), considerando que a membrana plasmática das hemácias é uma bicamada fosfolipídica (Cloos et al., 2020), podemos inferir que o método utilizado pela linhagem, para formação do halo no meio de cultura, foi degradar a membrana plasmática causando lise das hemácias e conseqüentemente formando o halo de degradação no meio de cultura (Madigan et al., 2010). Inclusive o gênero *Psychrobacter* codificou uma esterase/lipase, secretada para digerir lipídios do ambiente extracelular (Pelikan et al., 2021). Portanto, os resultados apresentados para essa linhagem foram considerados relevantes,

pois, se essa linhagem sobreviver às condições do corpo humano, ela poderá causar danos nas células do hospedeiro (Hu; Zhang, 2020; Pelikan et al., 2021).

Zhu e colaboradores (2016) relataram a presença de dois genes, que codificam hemolisina no genoma de *Carnobacterium* sp., mas não encontraram nenhum gene codificando toxinas, fatores de virulência ou ilhas de patogenicidade. No presente estudo as linhagens *Carnobacterium* sp. (427/449) não formaram halo de degradação no meio de cultura, portanto foram consideradas como linhagens negativas para atividade hemolítica, há a possibilidade de o gene estar presente, mas não estar sendo expresso (Madigam et al., 2010).

Há a necessidade de aprimorar as análises para detectar atividade de virulência humana, uma vez que, os resultados aqui apresentados são inéditos. Além de não possuir dados prévios na literatura, que apontam o gênero *Psychrobacter* como patogênicos, não existem estudos suficientes dessa categoria com bactérias da Antártica.

Contudo, não se pode ignorar a possibilidade que os resultados estejam diretamente relacionados à produção de virulência pelas linhagens estudadas. Estudos atuais recomendam realizar análise molecular para detectar os genes *hly-A* e *ehx-A*, responsáveis em produzir  $\alpha$ -hemólise e entero-hemólise respectivamente (Noumi et al., 2020), nos isolados bacterianos, para garantir que a formação de halo no meio de cultura foi produzida por fatores de virulência (Mirsepasi-Lauridsen et al., 2016; Noumi et al., 2020).

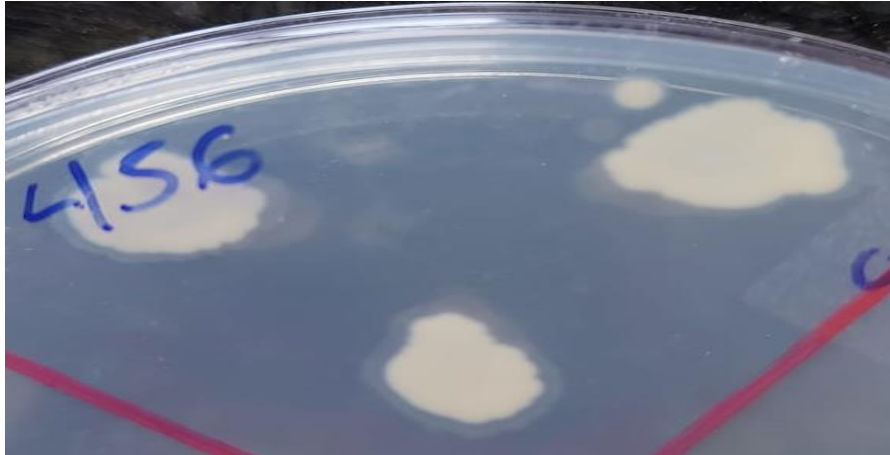
Se os dados aqui apresentados fossem confirmados como virulência, isso não seria uma barreira para utilização desses isolados, pois os isolados *Arthrobacter* sp. 356 e 443, *Psychromonas arctica* ESH238 e os dois isolados não identificados (NI) 359 e 363, apresentaram baixa produção de hemólise, além, disso as linhagens não apresentaram nenhuma outra atividade enzimática testada, além da catalase, que não está relacionada à virulência em todas as bactérias (Tondo et al., 2020).

#### 4.3.1 Atividade de Proteinase

Uma linhagem de *Psychrobacter fozii* (456) mostrou atividade de proteinase (Fig.9), com índice de virulência de 1,2 considerado baixo produtor de proteinase (Graf.1), conforme classificado no item 3.4.5 (IH <2).

Nos últimos anos algumas linhagens de *Psychrobacter* foram descritas como patógenos oportunistas em humanos (Ortiz-Alcántara et al., 2016; Bonwitt et al., 2018). Linhagens desse gênero podem ser isoladas de diversas fontes, porém são mais relacionadas a substratos marinhos, como crustáceos, peixes, mamíferos marinhos, algas marinhas e frutos do mar (Bonwitt et al., 2018).

**Figura 9-** Atividade de proteinase da linhagem *Psychrobacter fozii* (456) em meio de cultura R2A enriquecido com albumina sérica bovina (BSA)



Fonte: O autor

Os danos causados por esses patógenos dependem dos locais onde ocorrem as infecções e podem se estender a bacteremias, meningite, infecção de feridas e infecções oculares. Em 2009 foi relatado um caso de bacteremia associado à transfusão sanguínea, causada por *Psychrobacter arenosus* (Caspar et al., 2013). Os primeiros testes para identificação do isolado foram inconclusivos, pois o laboratório utilizou técnicas de rotina laboratoriais para identificar microrganismos mesófilos. Então, foi realizada a identificação molecular, as sequências de DNA mostraram 99,7% de homologia com a sequência 16SrDNA de *P. arenosus* (Romanenko et al., 2004; Caspar et al., 2013).

Em 2012, uma linhagem de *Psychrobacter* foi isolada de pacientes clínicos, na cidade de Nova York, a linhagem foi relatada como uma nova espécie, *Psychrobacter sanguinis*, e caracterizada como um patógeno oportunista (Wirth et al., 2012). Em 2014 a espécie foi relatada em um paciente com meningite, na França (Le Guern et al., 2014). Em 2016, no México, um microrganismo com 98% de identidade (16S rRNA) relacionado com *P. sanguinis* foi relatada em outro paciente com meningite (Ortiz-Alcántara al., 2016). O último relato de caso com *P. sanguinis* publicado, foi de um paciente dos EUA, com infecção de ferida, decorrente de uma laceração na mão (Bonwitt et al., 2018). A linhagem *P. sanguinis* foi descrita como suscetível a diversos antibióticos (Le Guern et al., 2014), na maior parte dos casos, os pacientes puderam ser tratados com antimicrobianos e se recuperaram totalmente (Wirth et al., 2012; Le Guern et al., 2014). Entretanto, *Psychrobacter* spp. mostraram resistência a penicilina (Bonwitt et al., 2018).

A linhagem *Psychrobacter fozii*, positiva para proteinase neste estudo, foi descrita em 2003 (Bozal et al., 2003) e desde então são estudadas para aplicação biotecnológica, porém, não foram testadas para atividade de proteinase ou outros fatores de virulência, tornando esse estudo inédito

para essa linhagem. Linhagens do gênero *Psychrobacter* raramente são descritos como patógenos humanos, devido o número limitado de relatos de casos publicados (Bonwitt et al., 2018). Segundo Caspar e colaboradores (2013) o espectro de infecções humanas, associadas às diferentes espécies do gênero *Psychrobacter* pode mudar rapidamente, com o aparecimento de novos relatos de infecções.

#### 4.3.2 Atividade de Fosfolípase

Nenhum isolado apresentou atividade fosfolipásica, pois não houve formação de halo no meio de cultura.

#### 4.3.3 Atividade de Catalase

Todos os isolados avaliados foram positivos para catalase (Q. 2), pois foram capazes de formar uma camada de bolha quando colocados em contato com o  $H_2O_2$  (Fig. 10).

**Figura 10-** Formação de bolhas no  $H_2O_2$  quando colocados em contato com as células microbianas (Catalase positiva).



Fonte: O autor

Como este estudo objetivou pesquisar o potencial patogênico de linhagens bacterianas, potencialmente produtoras de compostos anticongelantes, foi considerado relevante testar os isolados quanto à produção de catalase.

Estudos ainda precisam ser realizados para explicar como a catalase age na defesa e na resistência de estipes. Romaniuk e colaboradores (2018) afirmam que ecossistemas com características extremas, como a Antártica, favorecem a propagação de espécies que reagem ao oxigênio.

KatA é a principal catalase que desintoxica o  $H_2O_2$  de linhagens bacterianas, é necessária para a adaptação ao estresse peróxido e para a virulência de linhagens bacterianas, são críticas em respostas ao estresse, bem como as adaptações *in vitro* e podem se igualar em ambientes hostis e desfavoráveis para as bactérias (Su et al., 2014).

Os resultados apresentados neste estudo, para catalase, confirmam os dados da literatura, uma vez que, 100% das linhagens analisadas foram capazes de produzir uma resposta (formando bolhas) quando em contato com o  $H_2O_2$  e foram coletadas de um ambiente altamente estressante.

Neste estudo foi avaliada uma linhagem de *Rhodococcus* sp. (426) capaz de reagir ao  $H_2O_2$ . Alguns estudos atribuem, ao gênero *Rhodococcus*, a característica de patógeno animal (raramente em humanos), devido seu potencial de produzir catalase (Bargen; Haas, 2009; Bidaud et al., 2012). Bidaud e colaboradores (2012) determinaram que na linhagem *Rhodococcus equi*, KatA é a principal catalase, envolvida na capacidade extrema de resistência ao  $H_2O_2$ , inclusive essa linhagem é considerada um patógeno intracelular facultativo que afeta a saúde de potros com até 6 meses de vida.

O gênero *Pseudoalteromonas* foi descrito como produtor da enzima catalase, inclusive foi relatado que a produção da catalase, pela linhagem, é potencializada quando as bactérias estão sob estresse como baixa temperatura e alta salinidade (Dimitrieva et al., 2006), a linhagem *Pseudoalteromonas* sp. (ES26) utilizada neste estudo foi coletada de esponjas e outros invertebrados marinhos, na Antártica (Q. 1), ou seja, essa linhagem enfrenta as duas condições de estresse associadas à produção da catalase, descritas pelos autores, como frio e salinidade.

Uma linhagem de *Leifsonia antarctica* foi avaliada neste estudo e considerada positiva para produção da catalase. Essa linhagem foi descrita por Pindi e colaboradores (2009), como catalase positiva, e até a presente data não há estudos publicados sobre o potencial patogênico de *Leifsonia Antarctica*.

No entanto, a literatura apresenta uma linhagem de *Leifsonia xyli* (mesófila) como um microrganismo fitopatogênico e fastidioso que habita os vasos do xilema de seus hospedeiros, a virulência nas plantas é, em parte, atribuída a capacidade da espécie em reagir ao oxigênio (Tondo et al., 2010; Faria et al., 2020).

Neste estudo foram avaliadas 10 linhagens do gênero *Arthrobacter*, sendo uma linhagem de *Arthrobacter antarcticus* (56), sete linhagens de *Arthrobacter* sp. (356/366/408/411/423/443/450), uma linhagem de *Arthrobacter psychrochitiniphilus* (358) e uma linhagem de *Arthrobacter stackebrandtii* (382).

O gênero *Arthrobacter* é frequentemente associado a locais estressantes, como gelo, solos congelados, ambientes contaminados com metais pesados e compostos orgânicos, considerados poluentes ambientais (Romaniuk et al., 2018). Assim como neste estudo, vários outros, descreveram as linhagens de *Arthrobacter* como bactérias catalase-positivas, em alguns casos com a capacidade de causar infecções em humanos (O'Brien et al., 2004; Yamamoto et al., 2017; Romaniuk et al., 2018).



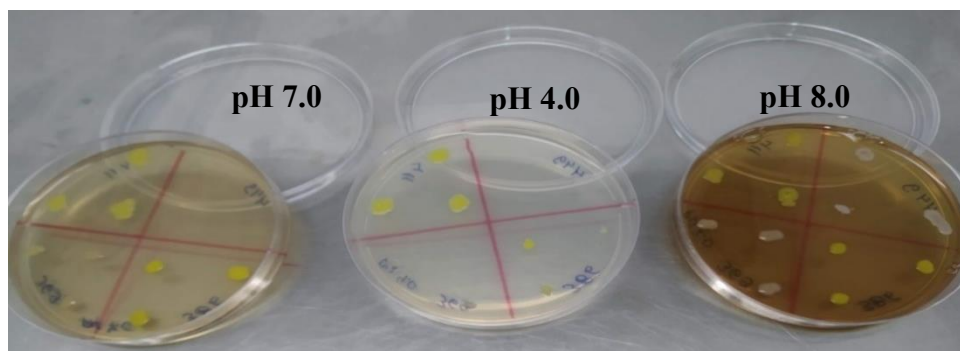
Bozal e colaboradores (2003) realizaram a caracterização fenotípica de algumas linhagens de *Psychrobacter* isoladas de ambientes Antárticos, duas linhagens são equivalentes as linhagens analisadas neste estudo, sendo *Psychrobacter fozii* (456/31) e *Psychrobacter luti*, (30), na caracterização os autores constataram que as duas linhagens são catalase positiva. No mesmo sentido os gêneros *Sporosarcina* (Sun et al., 2017), *Cellulophaga* (Nedashkovskaya et al 2004), *Sulfitobacter* (Ryeong et al., 2007), *Psychromonas* (Groudieva et al., 2003) e *Carnobacterium* (Ostlie et al., 2021) também já foram relatados como catalase positiva na literatura. No entanto, não há estudos relacionados ao potencial patogênico dessas linhagens.

Alguns autores discordam que o papel da catalase esteja diretamente envolvido com o potencial patogênico das bactérias, assim, estudos têm sido realizados na tentativa de elucidar esse caso (Messina et al., 2002; Corrente et al., 2013; Tondo et. al, 2020). O genoma das bactérias é moldado conforme as necessidades do microrganismo (Madigan et al., 2010). A catalase precisa dos metais ferro e manganês, e quando as bactérias estão em ambientes deficientes desses metais, a enzima pode não desempenhar sua função de forma adequada (Mishra et al., 2012). Portanto, as catalases podem apresentar uma resposta diferente em cada patógeno, dependendo do ambiente ou tecido em que está presente (Tondo et al., 2020), sendo assim, a expressão do gene pode depender dos fatores ambientais (Aaltonen et al., 2020; Castro-Moretti et al., 2021).

#### 4.3.4 Crescimento Bacteriano em pH Fisiológico Humano

Todos os 41 isolados bacterianos testados foram considerados tolerantes a pelo menos dois pHs distintos (Graf.2), sendo capazes de crescer e formar colônias nas placas (Fig.11), com

**Figura 11-** Ensaio de tolerância dos isolados em diferentes pHs.

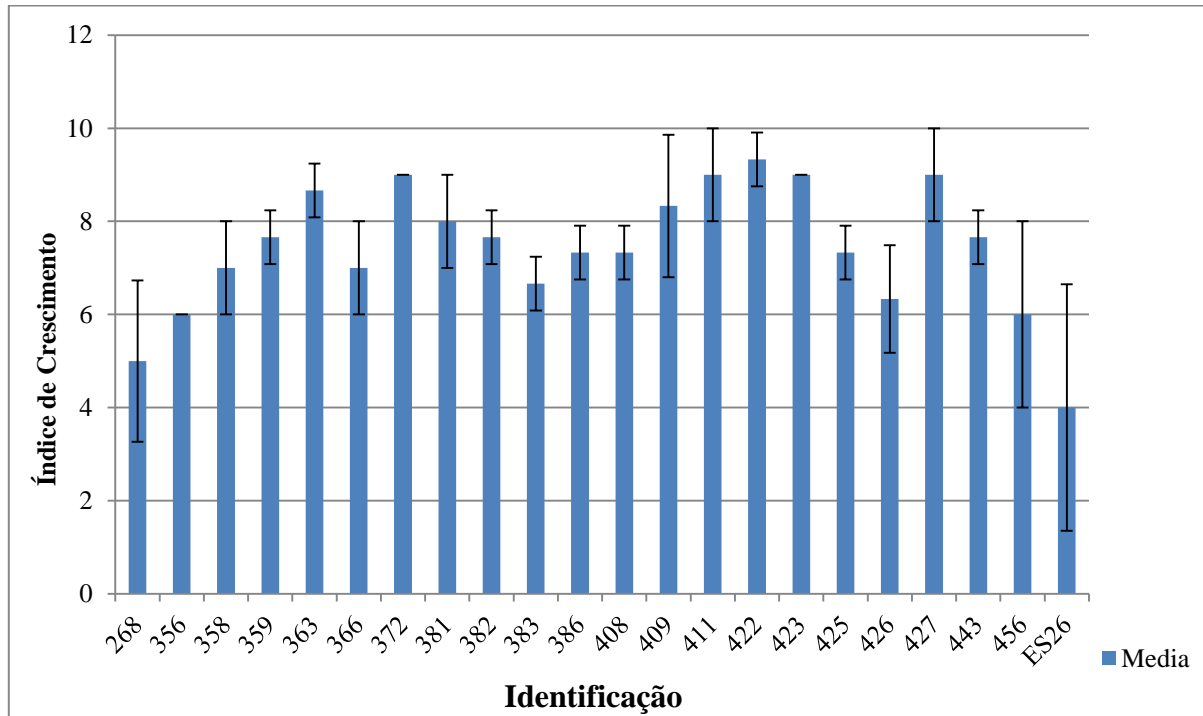


Fonte: O autor

variações no índice médio de tolerância para cada pH, sendo o índice médio de 4- 9,3, no pH 4.0 (Graf.2), 2,3- 12,3, no pH 7.0 (Graf.3) 2,3-12, no pH 8.0 (Graf.4), incluindo isolados que apresentaram atividades hemolíticas e proteinase (356, 359, 363, 443, ESH238 e 456).

De um total de 41 isolados avaliados, 22 (53.6%) dos isolados foram capazes de tolerar o pH 4.0, formando colônias maiores que 3mm de diâmetros, portanto foram considerados tolerantes ao pH vaginal (Graf.2), conforme classificação do item 3.4.8.

**Gráfico 2-** Índice de crescimento dos isolados tolerantes ao pH 4.0



Fonte: O autor. Nota: O índice de crescimento é a média das triplicatas de cada isolado

A análise estatística mostrou que houve diferença significativa para o crescimento no pH 4.0. O isolado *Pseudoalteromonas* sp. (ES26), foi o único isolado que formou colônia <5, todos os demais isolados apresentaram colônias >5, além disso sete isolados sendo duas linhagens não identificadas (363, 372), duas linhagem de *Psychrobacter* sp. (409/422), duas linhagens de *Arthrobacter* sp.(411/423) e uma linhagem de *Carnobacterium* sp. (427) apresentaram crescimento ultrapassando >8, bem acima dos valores estipulados como tolerante (>3).

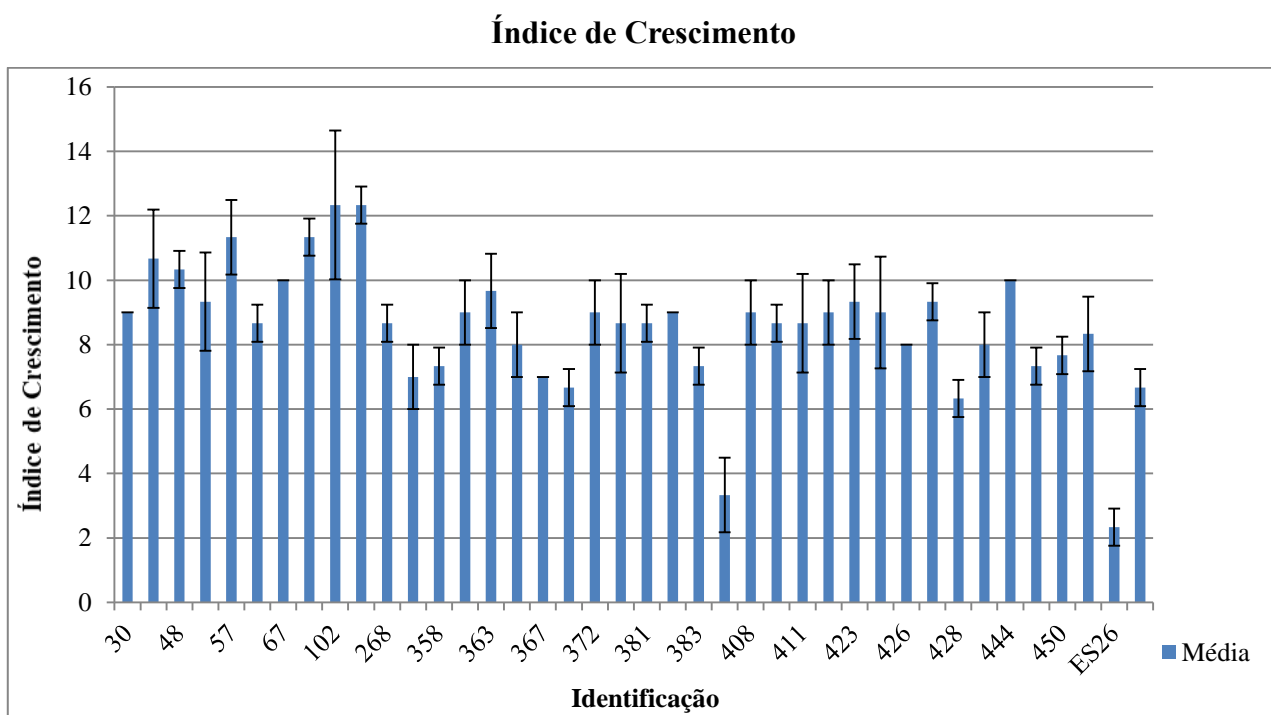
Linhagens bacterianas, não-nativas, capazes de sobreviver no ecossistema vaginal podem degradar a mucosa do hospedeiro e conseqüentemente facilitar o desenvolvimento de infecções que se não forem tratadas podem resultar em infertilidade e parto prematuro em gestantes (Smith; Ravel, 2017).

Dezenove linhagens (cerca de 46%) foram consideradas sensíveis ao pH vaginal, pois não foram capazes de formar colônias em meio de cultura ajustado com pH 4.0, inclusive a linhagem de *Psychromonas arctica* (ESH238) que apresentou atividade hemolítica. Sendo assim, essas linhagens não são capazes de invadir o ecossistema vaginal (Madigan et al., 2010).

A microbiota vaginal é composta por comunidades microbianas benéficas, produtoras de ácido lático, que mantém o pH da vagina ácido (<4,5), esse ambiente ácido protege o hospedeiro contra a invasão de patógenos ou microrganismos não indígenas (Smith; Ravel, 2017). Portanto, o pH <4.0 pode ser uma barreira, para a proliferação de estirpes sensíveis, em órgãos do corpo humano que possuem o pH ácido, como a vagina (pH<4.5) e o estômago (pH 2.0) por exemplo (Machado et al., 2004; Madigan et al., 2010).

Quarenta isolados (cerca de 97%), apresentaram crescimento em meios de cultivo ajustado para o pH 7.0 (pH fisiológico do sangue) (Graf. 3).

**Gráfico 3-** Índice de crescimento dos isolados tolerantes ao pH 7.0



Fonte: O autor. Nota: O índice de crescimento é a média das triplicatas de cada isolado

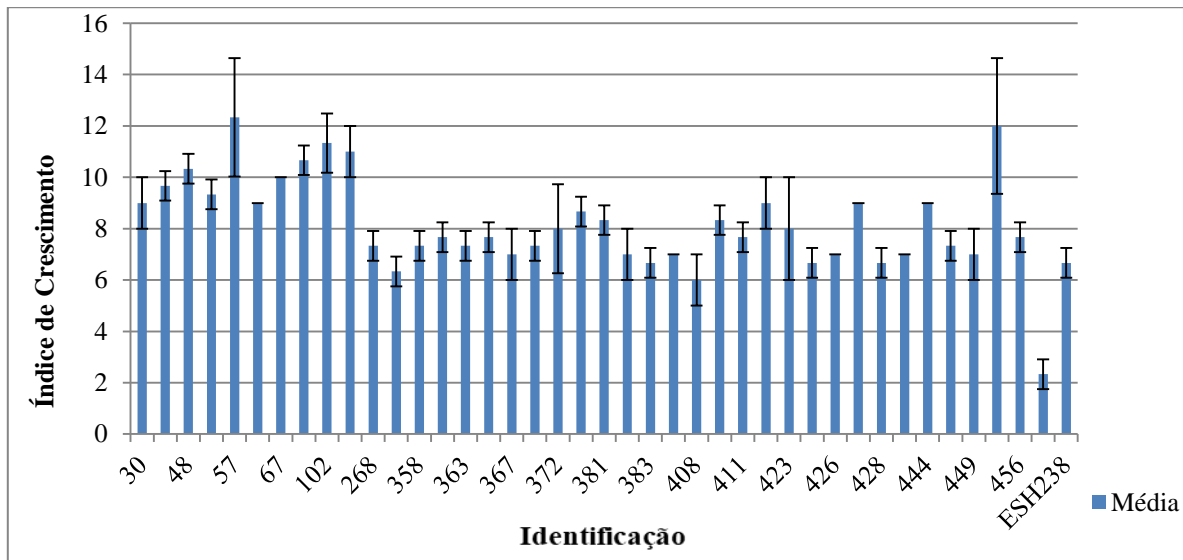
O isolado *Pseudoalteromonas* sp. (ES26) foi considerado como tolerante moderado, com índice de crescimento de 2,3 (conforme classificação do item 3.4.8). Todas as demais linhagens apresentaram índice e crescimento >3, por isso foram consideradas tolerantes ao pH 7.0.

Houve diferença significativa no índice de crescimento, com exceção das linhagens não identificadas (386) e *Pseudoalteromonas* sp. (ES26), todos os demais isolados foram capazes de formar colônias com índice de crescimento >5. Duas linhagens, sendo uma linhagem não identificada (102) e uma linhagem *Leifsonia antarctica* (268) apresentaram índice de crescimento >12 mm de diâmetros (Graf.3), bem acima dos valores estipulados como tolerante (>3). A capacidade, de linhagens bacterianas, em tolerar o pH do sangue levanta a preocupação de que essas células possam causar bacteremia no hospedeiro. Segundo Madigan e colaboradores (2010) a

bacteremia é incomum em indivíduos saudáveis, porém pode ocorrer devido a processos invasivos no corpo, como traumas, cirurgias ou doenças, a presença prolongada de bactérias no sangue, pode se tornar uma infecção sistêmica. A infecção sistêmica por sua vez, pode facilitar a septicemia, onde o patógeno invade diversos tecidos do hospedeiro causando novas infecções que podem ser irreversíveis caso não haja um medicamento capaz de deter a proliferação do patógeno (Madigan et al., 2010; Yamamoto et al., 2017). O isolado *Carnobacterium sp* (449) foi sensível ao pH do sangue, pois não foi capaz de crescer e formar colônia, portanto essa linhagem não seria capaz de causar bacteremia em humanos, pois além do pH, precisa enfrentar às defesas naturais do corpo humano para causar infecções (madigan et al., 2010).

Para o pH fisiológico da urina (8.0), 51% (n=21) dos isolados apresentaram tolerância, sendo que, o isolado *Pseudoalteromonas sp* (ES26) foi o único considerado tolerante moderado,

**Gráfico 4-** Índice de crescimento dos isolados tolerantes ao pH 8.0



Fonte: O autor. Nota: O índice de crescimento é a média das triplicatas de cada isolado

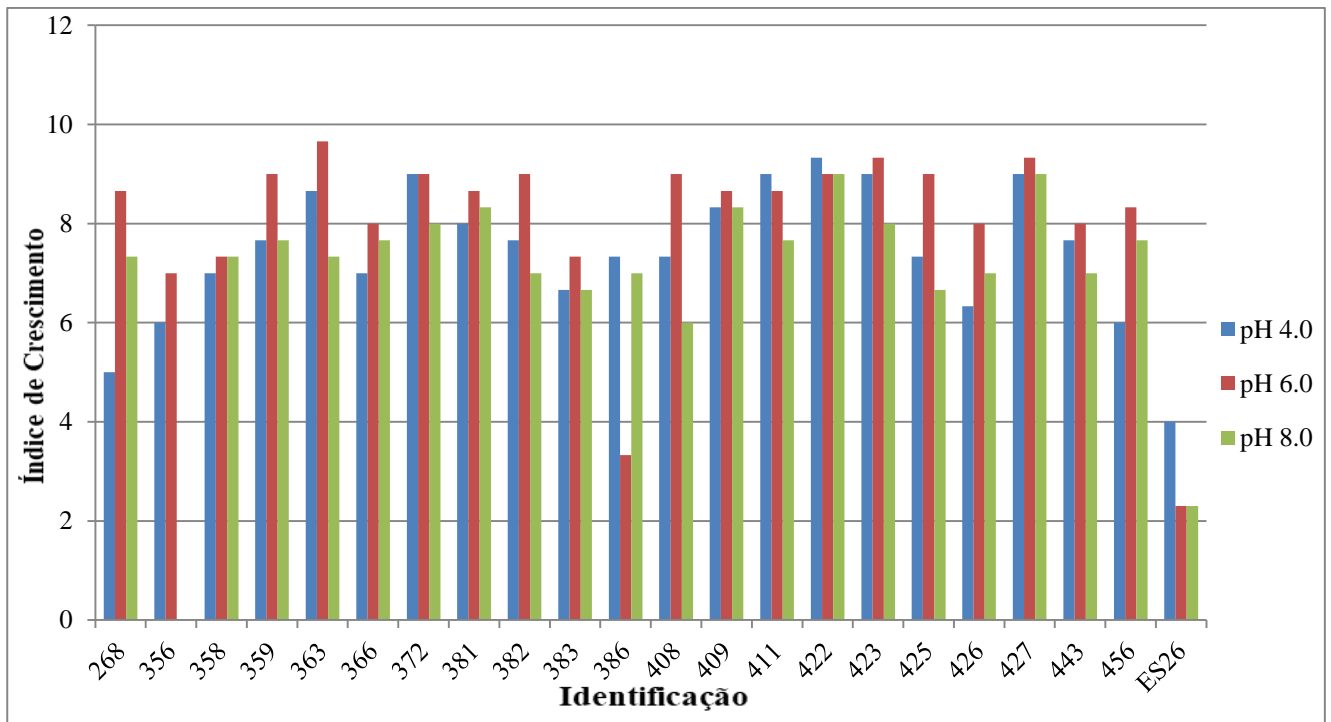
pois apresentou índice de crescimento de 2,3 no pH 8.0. A análise estatística demonstrou que ocorreu crescimento significativo na linhagem não identificada (57) e na linhagem *Arthrobacter sp.* (450), ambas apresentaram índice de crescimento  $\geq 12$  (Graf.4).

O termo microbioma urinário é utilizado para descrever a presença de bactérias, na urina humana, sem a capacidade de causar infecções (Bhide et al., 2020). A bexiga não é um órgão estéril, é habitada por comunidades de microrganismos que mantêm a homeostase do órgão (Ackerman; Chai, 2019). A uretra também é colonizada por algumas linhagens de microrganismos benéficos ao corpo humano, no entanto, quando ocorrem alterações fisiológicas no corpo, alguns microrganismos oportunistas podem invadir e se multiplicar nestes órgãos tornando-se patogênicos (Madigan et al., 2010; Bhide et al., 2020). Esses patógenos frequentemente causam infecções no

trato urinário, mais comumente em mulheres, utilizando diferentes estratégias para desencadear a virulência (Pietrucha-Dillanchian; Hooton, 2021).

De um total de 41 isolados avaliados, 22 (53.6%) foram capazes de tolerar os três pHs testados (4.0, 6.0 e 8.0), sendo os gêneros *Leifsonia*; *Arthrobacter*; *Psychrobacter*; *Cellulophaga*; *Rhodococcus*; *Carnobacterium* e *Pseudoalteromonas* (Graf. 5).

**Gráfico 5-** Índice de crescimento dos isolados tolerantes aos três pHs



Fonte: O autor. Nota: O índice de crescimento é a média das triplicatas de cada isolado

Foi considerado relevante destacar os isolados tolerantes aos três pHs, pois frequentemente a sepse ocorre devido complicações de infecções preexistentes, por exemplo, uma bactéria capaz de tolerar os três pHs, pode iniciar uma infecção vaginal, se estender a urina (pH básico) e chegar ao sangue (pH neutro) causando a septicemia (Almeida et al., 2012).

Microrganismos de ambientes frios já foram relatados com a capacidade de tolerar distintos valores de pH, variando de 2,0 a 14,0 (Dhakar; Pandey, 2016). O organismo humano possui diversas formas de combate a infecções bacterianas, sendo elas: *i*) barreiras naturais contra infecções como pH e temperatura; *ii*) imunidade inata incluindo moléculas extracelulares (proteína C reativa, e do complemento), células NK, neutrófilos, macrófagos, quimosinas e citosina; *iii*) imunidade adquirida, com anticorpos e citosinas produzidas por células T (Machado et al., 2004).

Portanto, a capacidade das células bacterianas em tolerar diferentes pHs não significa obrigatoriamente que a bactéria seja patogênica para o ser humano, ainda mais se a linhagem não

produzir uma quantidade significativa de enzimas hidrolíticas, e não for capaz de ultrapassar as barreiras fisiológicas (Machado et al., 2004; Madigan et al., 2010).

Otoni e colaboradores (2020) testaram algumas linhagens isoladas da Antártica quanto a tolerância ao pH. As linhagens *Arthrobacter* sp. e *Psychrobacter luti* apresentaram crescimentos em pH 4.0, sendo assim, consideradas bactérias halotolerantes adaptadas ao frio. Ganzert e colaboradores (2011) identificaram duas novas cepas bacterianas de *Arthrobacter kerguelensis* e *Arthrobacter psychrophenicus*, isoladas de solo coberto de musgo da Ilha de Livingston, Antártica, que foram tolerantes a uma amplitude de pH, variando de 4.0 a 9,5. Romanenko e colaboradores (2004) descreveram a capacidade de algumas linhagens de *Psychrobacter* tolerar faixas de pHs de 5.0-10.0.

Navarro-torre e colaboradores (2020) descreveram uma nova espécie, *Pseudoalteromonas rhizosphaerae* capaz de toletar pHs na faixa de 5.0-9.0. Algumas linhagens de *Leifsonia* já foram relatadas como tolerantes a pHs de 6.0-12 (Reddy et al., 2003). Pindi e colaboradores (2009) descreveram linhagens do gênero *Leifsonia* como tendo um pH 7.5, ótimo para crescimento, mas que pode ocorrer variações no pH. Linhagens de *Rhodococcus* coletadas na Antártica foram relatadas com crescimento de 6.0 a 9.0 (Ibrahim et al., 2020).

O gênero *Carnobacterium* é conhecido como inibidor de bactérias patogênicas em alimentos, por muito tempo foram descritas como linhagens não patogênicas em humanos (Leisner et al., 2007). Entretanto, em 2008 foi publicado um relato de caso, onde ocorreu o isolamento de *C. piscícola* de amostra de pus, após amputação traumática da mão de um paciente hospitalar (Chmelař et al., 2008). Em 2010 foi relatada a presença de *Carnobacterium* sp. em uma cultura de sangue humano, a contaminação foi decorrente do consumo de frutos do mar, segundo os autores, pode ter sido a linhagem causadora de infecções no hospedeiro (Hoenigl et al., 2010). Em 2015 foi relatada a presença de *C. divergens* na hemocultura de uma paciente hospitalar, a contaminação bacteriana foi relacionada à sonda alimentar (Smati et al., 2015).

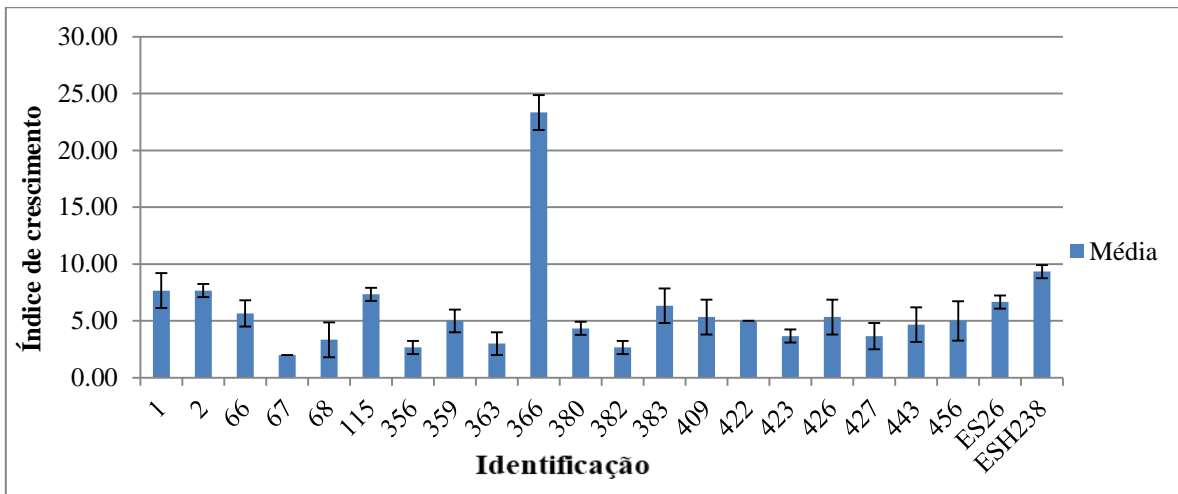
Smati e colaboradores (2015) alertam sobre o risco de utilizar linhagens bacterianas, “aparentemente” seguras na indústria, ainda recomendam monitorar relatos de casos de infecções associadas a essas linhagens.

#### 4.3.5 Crescimento Bacteriano em Temperatura Corporal Humana

Dos 41 isolados testados, onze (26,82%) não foram capazes de tolerar a nenhuma das temperaturas, pois não foram capazes de crescer e formar colônias, doze (29,26%) toleraram apenas uma temperatura, nove (21,95%) foram capazes de tolerar a duas temperaturas distintas e outros

nove isolados (21,95%) foram capazes de tolerar as três temperaturas testadas (Graf.9). O índice de crescimento celular nas temperaturas de 36 °C variou de 2,6 a 23,0 (Graf.6).

**Gráfico 6-** Índice de crescimento dos isolados tolerantes a 36 °C.



Fonte: O autor. Nota: O índice de crescimento é a média das triplicatas de cada isolado. Nota: Isolado 366 com crescimento ultrapassando todos os isolados considerados tolerantes (>3)

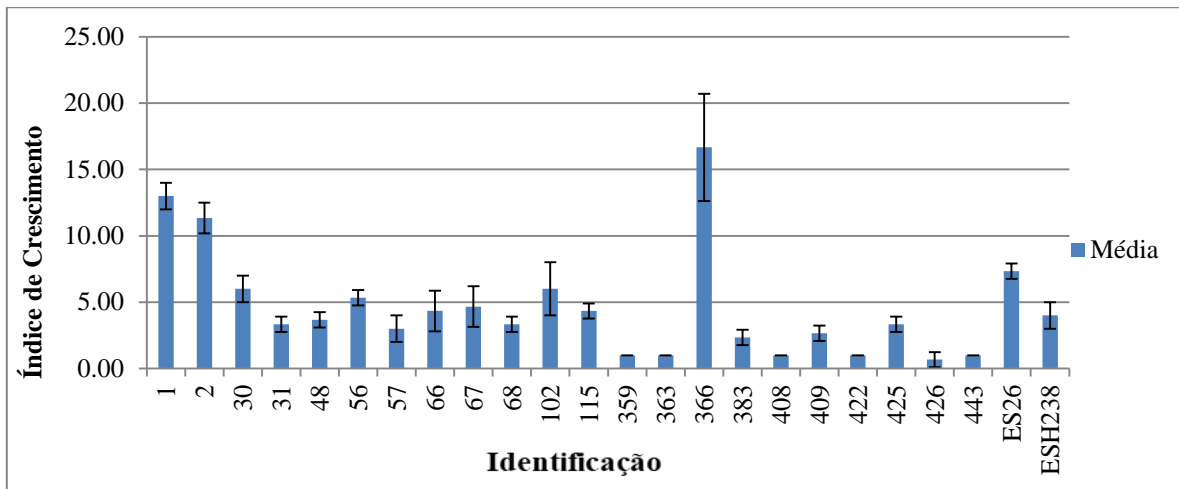
Quando cultivadas a 36 °C (n=20, 48%) não foram capazes de crescer e formar colônias, portanto foram considerados isolados sensíveis para temperatura corporal normal. Cerca de 9,7% (n=4) foram considerados tolerantes moderados a temperatura de 36 °C, sendo os isolados, não identificado (67), *Arthrobacter* sp. (356), *Arthrobacter stackebrandtii* (382) e o isolado *Sporosarcina psychrophila* (444), pois apresentaram índice de crescimento entre 2 e 3 mm.

Cerca de 41% (n=17) dos isolados foram considerados tolerantes a temperatura de 36 °C, pois apresentaram índice de crescimento >3 (conforme classificação do item 3.4.8). Os resultados das análises estatísticas mostraram que houve diferença significativa nos ensaios para o efeito da temperatura de 36 °C, no crescimento microbiano, devido ao alto crescimento de *Arthrobacter* sp. 366 (Graf. 6), a única linhagem que extrapolou a taxa de crescimento (>20) dos isolados considerados tolerantes a 36°C (>3).

Quando cultivadas a 38 °C (um corpo com febre) (n=12, 36,5%) dos isolados foram considerados sensíveis, pois não foram capazes de formar colônias ou apresentaram índice de crescimento <2. N=3, 7,3% dos isolados foram considerados tolerantes moderados a um corpo febril, sendo os isolados 57, 367, 383 (não identificados). N=17, 26,8% dos isolados foram considerados tolerantes a temperatura de 38 °C, pois foram capazes de crescer e apresentaram índice de crescimento >3 (conforme classificação do item 3.4.8). Os resultados das análises estatísticas também mostraram que houve diferença significativa nos ensaios para o efeito das temperaturas de 38 e 40 °C no crescimento microbiano de *Arthrobacter* sp. 366, devido ao alto

crescimento desta linhagem, a única linhagem que ultrapassou a taxa de crescimento dos controles *E. coli* e *S. aureus*.

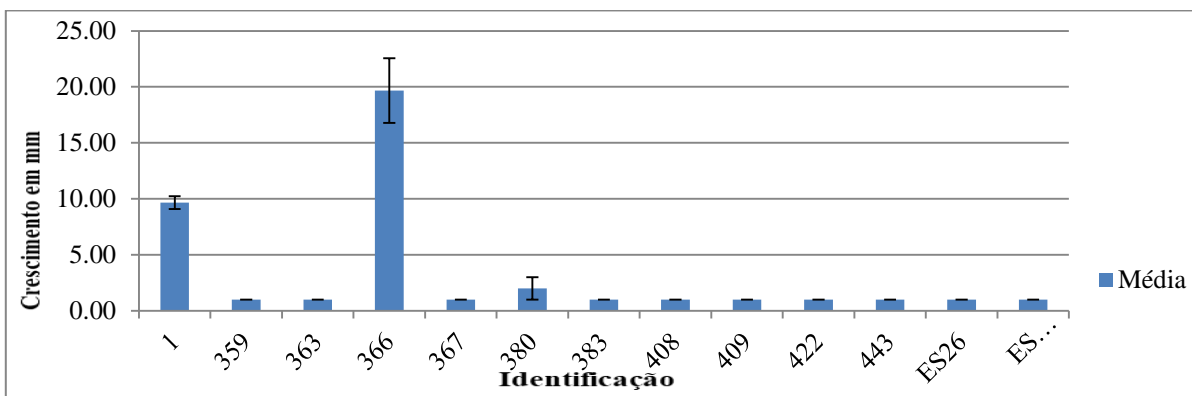
**Gráfico 7-** Índice de crescimento dos isolados tolerantes a 38 °C.



Fonte: O autor. Nota: O índice de crescimento é a média das triplicatas de cada isolado. Isolado 366 com crescimento ultrapassando os controles (1-2)

Portanto, podemos dizer que a linhagem *Arthrobacter* sp. (366) é um isolado capaz de crescer em temperaturas mais elevadas, em comparação com a temperatura ambiente da Antártica, também foi considerado tolerante aos três pHs estudados e foi considerado catalase-positiva, mas não apresentou potencial de virulência em relação à proteinase, fosfolipase e atividade hemolítica. N=39, 95,1% dos isolados foram considerados sensíveis a temperatura de 40°C (corpo com febre muito alta), pois não cresceram, ou apresentaram índice de crescimento <2. N=1, 2,4% dos isolados foi considerado tolerante moderado, trata-se do isolado não identificado (380) que apresentou índice de crescimento 2. N=12, 4% dos isolados foi considerado tolerante, isolado *Arthrobacter* sp. (366) apresentou índice de crescimento de 19,6 (Graf.8).

**Gráfico 8-** Índice de crescimento dos isolados tolerantes a 40 °C.



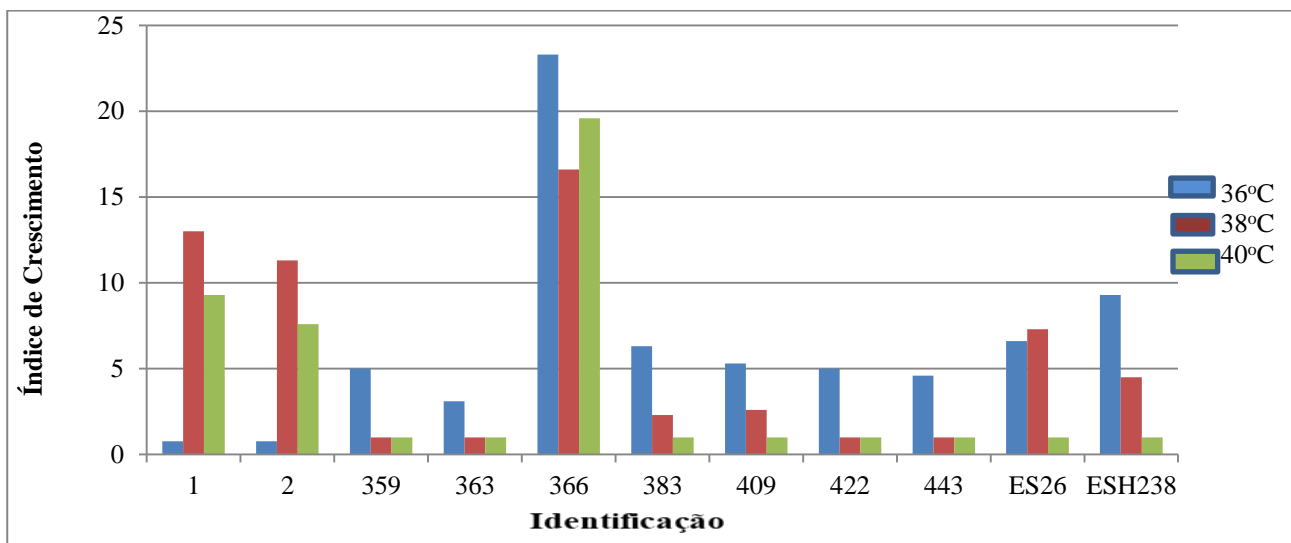
Fonte: O autor. Nota: O índice de crescimento é a média das triplicatas de cada isolado. Nota: Isolado 366 com crescimento ultrapassando os controles (1-2)



O controle da temperatura corporal é considerado uma forma rápida e comum de avaliar a saúde de uma pessoa, um leve aumento na temperatura corporal é benéfico para humanos, pois pode retardar o crescimento de microrganismos patogênicos e estimular respostas imunológicas apropriadas no corpo (Bartfai; Conti, 2010).

O gráfico nove mostra os isolados que foram tolerantes as três temperaturas estudadas. É possível observar como diminuiu a quantidade de isolados tolerantes a 40 °C em contraste com 36 °C e 38 °C (Graf. 9), devido a sensibilidade de organismos psicrotolerantes a temperaturas elevadas (Madigan et al., 2010).

**Gráfico 9-** Índice de crescimento dos isolados tolerantes as três temperaturas



Fonte: O autor. Nota: O índice de crescimento é a média das triplicatas de cada isolado. Isolado 366 com índice de crescimento ultrapassando os controles (1-2) nas temperaturas de 38 e 40 °C.

A maioria dos isolados (n=29, 71%) potencialmente produtores de agentes anticongelantes são organismos psicrotolerantes, pois podem crescer em baixas e elevada temperaturas. Os resultados demonstram que bactérias de ambientes frios podem tolerar temperaturas elevadas similares as da temperatura corporal humana (Graf.9). Variações de temperatura de 0,2-0,4 °C são normais no decorrer do dia no corpo humano, porém, valores mais elevados podem ativar respostas termorreguladoras (Schortgen, 2012). Por muito tempo a febre foi considerada uma vantagem para sobrevivência, no entanto, quando ocorre um aumento elevado na temperatura pode aumentar o risco de vida do indivíduo, por isso, a temperatura de pacientes hospitalares, com infecções, é frequentemente controlada (Schortgen, 2012).

A febre aparece como resposta a infecções, devido à produção de metabólitos endógenos ou exógenos, produzidos por microrganismos. O metabólito mais comum produzido por microrganismos em infecções é a endotoxina lipopolissacarídica (LPS) produzida por bactérias Gram-negativas (Ogoina, 2011; Schortgen, 2012).

Apesar de a febre ser considerada um processo evolutivo para sobrevivência de organismos mamíferos, ela pode acelerar a morte do indivíduo se os microrganismos causadores da infecção forem tolerantes a altas temperaturas (Ogoina, 2011). Em resumo, a febre é responsável em eliminar ou retardar o crescimento de linhagens bacterianas invasoras/patogênicas no organismo humano infectado, entretanto existem controvérsias quanto a essa afirmação, uma vez que existem bactérias patogênicas que resistem a temperaturas elevadas (Schortgen, 2012). Conseqüentemente as altas temperaturas corporais podem causar desnaturação de proteínas nas células do hospedeiro, resultando na morte do indivíduo infectado (Zhang; Calderwood, 2011).

Os aumentos graduais das temperaturas na Antártica, devido a mudanças climáticas, podem ser o motivo pelo qual a maior parte das bactérias, coletadas na Antártica, são psicrotolerantes e não psicofílicas (Dennis et al., 2019; Edwards et al., 2020). Os resultados obtidos nesse estudo demonstram que esses isolados, tem potencial de tolerar a temperaturas mais elevadas do que as encontradas em ambientes frios, mas que temperaturas acima de 38 °C podem ser uma barreira para maioria dos isolados (Rinnan et al., 2009). A maioria dos trabalhos com bactérias da Antártica, enfatizam a temperatura de 15 °C como a ideal para o crescimento microbiano, entretanto, outros trabalhos descrevem 28 °C como uma boa temperatura de crescimento para esses microrganismos (Gallardo et al., 2014; Plaza et al., 2016; Gran-Scheuch et al., 2017). Dennis e colaboradores (2019) apontam as mudanças climáticas, como fator responsável pela diversidade microbiana do solo na Antártica e enfatizam que as mudanças ambientais, como o aumento de temperatura pode elevar o número de espécies bacterianas nos solos da região, aumentando a biodiversidade e produtividade do ecossistema terrestre.

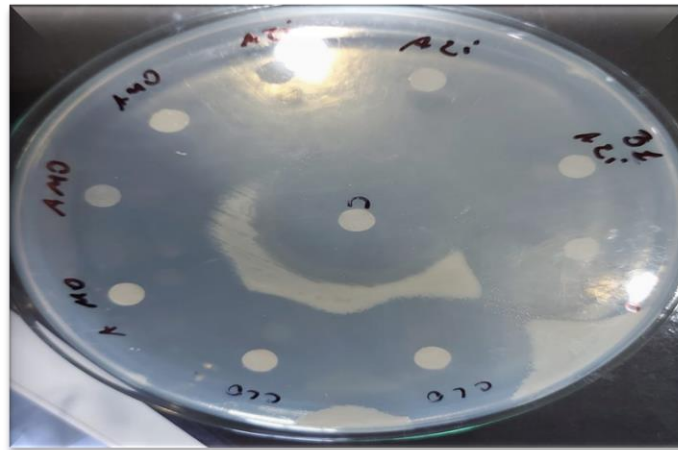
Linhagens de *Psychrobacter* sp. já foram relatadas com crescimento em uma faixa de -10 a 38 °C (Ciok; Dziewit, 2019). É importante destacar que as linhagens bacterianas de *Psychrobacter*, coletadas de pacientes clínicos, para diagnóstico, se mostraram relutantes em crescer em temperaturas maiores que 30 °C, utilizando técnicas de cultivo em laboratório, para microrganismos mesófilos, dificultando resultados para diagnósticos (Le Guern et al., 2014; Bonwitt et al., 2018). Espécies desse gênero são psicofílicas/psicrotolerantes e geralmente crescem em temperaturas de 4 a 30 °C em laboratório (mas, já foram relatadas no corpo humano), o que pode dificultar resultados de diagnósticos laboratoriais (Bozal et al., 2003; Donnarumma et al., 2010). As condições do corpo humano podem estar oferecendo melhores condições, para sobrevivência da bactéria, do que as técnicas de cultivos para organismos mesofílicos (Ciok; Dziewit, 2019; Mitra et al., 2019). Este estudo demonstra a importância de aprimorar as técnicas, de cultivo de microrganismos, para diagnósticos de infecções. Uma sugestão, seria padronizar protocolos utilizando culturas em baixas temperaturas como controle, para detectar possíveis linhagens psicrotolerantes que estejam causando infecções em pacientes clínicos, esse método seria

essencial para evitar erros e acelerar diagnósticos clínicos de infecções com microrganismos psicrotolerantes.

#### 4.4 POTENCIAL DE RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS COMERCIAIS

Em relação à resistência aos antibióticos comerciais, os resultados demonstraram que todos os isolados avaliados foram sensíveis (n=41) aos antibióticos amoxicilina + clavulanato de potássio, azitromicina e cloranfenicol (Fig.12).

**Figura 12-** Antibiograma mostrando o isolado *Psychrobacter fozii* (31) sensível aos antibióticos testados.



Fonte: O autor. Nota: Antibióticos utilizados: Azitromicina, cloranfenicol e amoxicilina+clavulanato de potássio.

Do total de 41 isolados avaliados, aproximadamente 44% (n=18) foram tão sensíveis aos antibióticos que não houve crescimento microbiano nas placas durante o ensaio (Tab.4). A análise estatística demonstrou diferença significativa no crescimento das bactérias avaliadas.

Assim como neste estudo, linhagens de *Psychrobacter* já se mostraram sensíveis a diversos antimicrobianos em outros estudos, como amoxicilina, ticarcilina, cefepima, ceftazidima, imipenem, meropenem, amicacina, ciprofloxacina e trimetoprim-sulfametoxazol (Le-guern et al., 2014) cefazolina, cefepima, cefoxitina, ceftriaxona, ciprofloxacina, meropenem, penicilina e tetraciclina (Bonwitt et al., 2018).

Embora neste estudo as linhagens avaliadas tenham se mostrado sensíveis a antibióticos comerciais estudados, já foram relatadas linhagens resistentes a  $\beta$ -lactâmicos como tetraciclina, trimetoprima-sulfonamida e aminoglicosídeos, as amostras foram coletadas em diversos ecossistemas da Antártica, incluindo estações de pesquisa (Rabbia et al., 2009).

Estudos vêm demonstrando a resistência bacteriana a antibióticos, no ambiente Antártico, incluindo genes de resistência a antibióticos em substratos como solo, água e sedimentos

marinhos (Scott et al., 2020; Jara et al., 2020; Na et al., 2021). Power e colaboradores (2016) enfatizam que o lançamento de esgoto, não tratado, em ambientes Antárticos pode ser considerado um risco de introdução de microrganismos patogênicos no continente, o esgoto introduz linhagens de *E. coli* de origem humana contendo genes de resistência a antibióticos e fatores de virulência, sendo consideradas linhagens potencialmente prejudiciais a diversidade das comunidades microbianas nativas do continente (Power et al., 2016; Rabbia et al., 2016).

**Tabela 4-** Resultado em mm do teste de sensibilidade a antibióticos

Isolado	Identificação (16S rRNA)	Antibiograma			
		Amo	Clo	Azi+clav potássio	C. Lis
1	<i>E.coli</i>	-	-	-	-
2	<i>S. aureus</i>	-	-	-	-
30	<i>Psychrobacter luti</i>	30	32	32,3	29
31	<i>Psychrobacter fozii</i>	40	31	40	40
48	<i>Sporosarcina globispora</i>	35	31	31	30
56	<i>Arthrobacter antarcticus</i>	31	30	40	40
57	NI	28	38	33	37
66	NI	35	35	35	35
67	NI	40	31	30	30
68	NI	Nd	Nd	Nd	Nd
102	NI	30	30	30	35
115	<i>Sulfitobacter litoralis</i>	29	31	37	35
268	<i>Leifsonia antarctica</i>	Nd	Nd	Nd	Nd
356	<i>Arthrobacter</i> sp.	Nd	Nd	Nd	Nd
358	<i>Arthrobacter psychrochitiniphilus</i>	Nd	Nd	Nd	Nd
359	NI	43	29	41	37
363	NI	Nd	Nd	Nd	Nd
366	<i>Arthrobacter</i> sp.	Nd	Nd	Nd	Nd
367	NI	Nd	Nd	Nd	Nd
369	NI	36	33	27	28
372	NI	Nd	Nd	Nd	Nd
380	NI	Nd	Nd	Nd	Nd
381	NI	Nd	Nd	Nd	Nd
382	<i>Arthrobacter stackebrandtii</i>	Nd	Nd	Nd	Nd
383	NI	40	30	40	40
386	NI	35	35	35	35
408	<i>Arthrobacter</i> sp.	38	34	40	43
409	<i>Psychrobacter</i> sp.	36	36	35	38
411	<i>Arthrobacter</i> sp.	41	35	31	40

422	<i>Psychrobacter</i> sp.	36	31	43	30
423	<i>Arthrobacter</i> sp.	Nd	Nd	Nd	48
425	<i>Cellulophaga fucicola</i>	21	35	39	20
426	<i>Rhodococcus</i> sp.	35	35	35	30
427	<i>Carnobacterium</i> sp.	Nd	Nd	Nd	Nd
428	NI	Nd	Nd	Nd	Nd
443	<i>Arthrobacter</i> sp.	Nd	Nd	Nd	Nd
444	<i>Sporosarcina psychrophila</i>	32	32	41	23
445	<i>Psychrobacter</i> sp.	Nd	Nd	Nd	Nd
449	<i>Carnobacterium</i> sp.	40	40	40	40
450	<i>Arthrobacter</i> sp.	Nd	Nd	Nd	Nd
456	<i>Psychrobacter fozii</i>	Nd	Nd	Nd	Nd
ES26	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	12	18	11	40
ESH238	<i>Psychromonas arctica</i>	Nd	Nd	Nd	Nd

Fonte: O autor. Nota: Medidas dos halos em mm da atividade antimicrobiana, comprovada com a formação e comparação de tamanho dos halos com valores pré-estabelecidos pela Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (BrCAST), 2017. CLO: Cloranfenicol  $\geq 17$ mm sensível/  $< 17$ mm resistente; AMO+CLAV: Amoxicilina+Clavulanato de potássio  $\geq 19$ mm sensível/  $< 19$ mm resistente; AZI: Azitromicina  $\geq 21$ mm sensível/  $< 21$ mm resistente. \*Nd= não determinado

Ulloa e colaboradores (2018) realizaram um estudo onde avaliaram a presença e distribuição de bactérias resistentes á antibióticos na água do mar perto de diferentes bases de operações na Antártica. Foram isoladas 70 linhagens de *E. coli*, sendo 34 resistentes a pelo menos um antibiótico, 20 resistentes à ampicilina e 12 resistentes a múltiplos agentes microbianos. A resistência a 16 dos 17 antibióticos testados nas cepas estudadas foi observada. Os autores concluíram que a presença de bactérias resistentes a diferentes agentes antimicrobianos, no ambiente Antártico, mostra uma situação global generalizada de resistência a antibióticos, possivelmente influenciados pela ação antropogênica.

Até o momento, existem inúmeros relatos de bactérias resistentes a diversas classes de antimicrobianos na Antártica, a maioria afirma que a resistência é devido à entrada de genes de resistência através da ação antrópica. As amostras utilizadas nessa pesquisa foram coletadas relativamente longe de locais com presença humana constante, isso pode justificar a alta sensibilidade a antibióticos apresentada pelas bactérias neste estudo (Power et al., 2016; Ulloa et al., 2018; Jara et al., 2020).

Power e colaboradores (2016) fizeram um estudo comparativo de *E. coli* coletadas na Antártica, com *E. coli* de humanos e animais não-Antárticos. Os autores constataram que a distribuição dos grupos filogenéticos e frequência de 11 fatores de virulência, entre os isolados antárticos, foram características de linhagens de *E. coli*, mais comumente associadas à presença humana. No mesmo sentido, Shimada e colaboradores (2021) detectaram alguns gêneros

potencialmente patogênicos, mas com baixa abundância no ambiente natural, a maioria das detecções desses gêneros ocorreu na estação de pesquisa na Antártica, novamente associada à presença humana. Com base nos dados apresentados até o momento na literatura, é possível afirmar que isolados patogênicos, coletados na Antártica, são de espécies bacterianas introduzida no continente seja por ação antrópica ou passagem de animais migratórios (Na et al., 2021).

A entrada de genes de resistência a antibióticos na Antártica é considerada como uma poluição ambiental (Yuan et al., 2019), e vem aumentando gradualmente nos últimos anos. O verão curto e o inverno prolongado na Antártica forçam a migração de aves e outros animais, facilitando a troca de bactérias, que carregam genes de resistência, entre continentes (Hernández et al., 2019; Na et al., 2021).

O interessante em bactérias, de ambiente frio como o da Antártica, é que linhagens capazes de produzir compostos bioativos a 15 °C podem continuar produzindo os mesmos compostos, mesmo quando expostas a temperaturas mais elevadas (Plaza et al., 2016), ou seja, considerando a aplicação tecnológica, essas bactérias podem ser estudadas em temperatura ambiente, favorecendo aplicações biotecnológicas com menor gasto de energia. Por outro lado, o uso de células potencialmente produtoras de compostos anticongelantes recuperadas da Antártica, que foram potencialmente não-virulentas ao homem, torna-se uma estratégia biotecnológica na busca por novos compostos, os quais podem ser utilizados como substitutos de agentes químicos sintéticos tóxicos ao homem bem como ao meio ambiente.

#### 4.5 AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE PRODUTOS DERIVADOS DA PCR

Após extração do DNA genômico das linhagens bacterianas, de gêneros distintos, os resultados da PCR em gel de agarose mostraram que nenhum produto da reação da enzima polimerase pôde ser observado. Os procedimentos descritos nos itens 3.6.2 e 3.6.3 foram repetidos, então foi possível observar fluorescência em dois poços, no gel de agarose, se tratando do controle positivo JCM e da amostra *Arthrobacter* sp. (411), no entanto, não foi constatada a corrida desse produto no gel, pressupõe-se que a fluorescência pode ter aparecido pela sobra de *primers* ou excesso de DNA, como produto final da PCR (Fig.13).

Vários problemas podem ser encontrados ao tentar amplificar genes responsáveis pela síntese de proteínas funcionais ou envolvidas em atividades biológicas, como concentrações de reagentes utilizados na extração do DNA, concentrações de reagentes utilizados na reação da PCR, composição nucleotídica dos *primers*, condições para amplificações, parâmetros dos equipamentos até mesmo a ausência dos genes de interesse no organismo estudado (De Simone et al., 2020).

**Figura 13-** Produto final da PCR em gel de agarose 0,8% visualizada em luz ultravioleta



Fonte: O autor. Nota: a fluorescência no poço é referente às amostras *Cryobacterium* sp. JCM (controle positivo) e *Arthrobacter* sp. (411). Nenhum resultado satisfatório foi detectado.

Outra hipótese é que bactérias evoluem rapidamente em diferentes condições ambientais, levando a variações genômicas intraespecíficas e interespecífica dificultando o sequenciamento (Muryoi et al., 2004).

Identificar os genes que codificam as proteínas anticongelantes facilitaria a elucidação das estratégias utilizadas para sobrevivência das bactérias a temperaturas extremas (Fields, 2001), no entanto, a maioria dos genes bacterianos, em que as PACs são derivadas, não são homólogos, dificultando a caracterização dos genes codificadores de PACs, por isso, esses genes permaneceram um mistério para ciência por muito tempo (Gilbert et al., 2004).

Também há a possibilidade de a mesma região do gene estar codificando diferentes proteínas (ou proteínas com sequência de aminoácidos distintos), resultando em múltiplas interpretações do que está sendo expresso (Muryoi et al., 2004). Contudo, com o avanço das técnicas de sequenciamento genômico, a compreensão sobre organismos psicofílicos tem melhorado (De Maayer et al., 2014). D'Amico e colaboradores (2006) informaram que já existe a disponibilidade do genoma completo de três bactérias psicofílicas, sendo *Desulfotalea psychrophila*, *Colwellia psychrerythraea* e *Pseudoalteromonas haloplanktis*. A disponibilidade de genomas completos/incompletos, de organismos psicofílicos e de parentes filogenéticos mesofílicos, permitiu a comparação da presença/ausência de genes sendo expressos em diferentes temperaturas, revelando quais genes estão envolvidos nas respostas a tolerância as baixas temperaturas (De Maayer et al., 2014).

Por exemplo, através da genômica comparada, Math e colaboradores (2012) fizeram a comparação de *Alteromonas* sp. com o genoma de duas linhagens mesofílicas de *Alteromonas macleodii*, a comparação revelou a presença de 15 ilhas genômicas específicas para a linhagem *Alteromonas* sp., os autores determinaram, que essas ilhas genômicas conferem aptidão ecológica para linhagem, no ambiente marinho frio.

Vários autores atribuem a tolerância ao congelamento a um conjunto de fatores (além das PACs) como fluidez de membrana, produção de catalase, redução de aminoácidos que realizam múltiplas ligações, produção de outros compostos crioprotetores (como o glicerol), dentre muitas

outras, dificultando a análise e função das PACs nos organismos psicrófilos (Fields, 2001; Gilbert et al., 2004; D'Amico et al., 2006; De Maayer et al., 2014).

Apesar dos avanços, nas técnicas moleculares, ainda são encontradas barreiras para o acesso aos genes produtores de PACs, como alto custo, eficácia dos kits comerciais e erros de protocolos, tornando estudos dessa categoria muito relevantes (Guo et al., 2012; De Simone et al., 2020).

#### 4.6 POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DAS LINHAGENS POSITIVAS PARA PRODUÇÃO DE COMPOSTOS ANTICONGELANTES

No presente estudo, dez gêneros bacterianos foram considerados potencialmente produtores de compostos anticongelantes, dos quais, sete gêneros foram considerados seguros para aplicações biotecnológicas, sendo os gêneros, *Carnobacterium*, *Cellulophaga*, *Leifsonia*, *Pseualteromonas*, *Rhodococcus*, *Sporosarcina* e *Sulfitobacter* (Q.1).

Apesar de muitos estudos terem sido realizados, na busca por enzimas ativas a frio, ainda existem poucas enzimas disponíveis no mercado (Dalmaso et al., 2013; Jin et al., 2019; Mazareli et al., 2021). Às necessidades desafiadoras de crescimento dos psicrófilos tem limitado a exploração de enzimas ativas ao frio, felizmente com as técnicas moleculares é possível obter informações diretamente do genoma, facilitando a identificação dessas enzimas (Jin et al., 2019).

Os procariontes possuem um metabolismo flexível a condições extremas e nas últimas décadas os centros de pesquisa têm voltado à atenção para as enzimas e outros produtos biologicamente ativos, derivados desses microrganismos (Vermelho et al., 2013; Jin et al., 2019). Esses organismos microscópicos fazem diversos setores da economia mundial girar, em 2013 o mercado global de enzimas industriais ficou em torno de 4,8 bilhões de dólares (Dalmaso et al., 2013).

O valor econômico agregado a produtos derivados de microrganismos é alto, pois são facilmente cultivados, sendo possível ter um processo reprodutivo elevado em um baixo intervalo de tempo (Vermelho et al., 2013). As enzimas oriundas de ambientes frios (enzimas adaptadas ao frio) economizam energia e podem ser produzidas com baixo custo, ainda mantem a qualidade de diversos produtos. Segundo Jin e colaboradores (2019) os microrganismos psicrófilos são uma fonte promissora de enzimas ativas a frio com importância industrial.



## 5 CONCLUSÃO

Os objetivos do presente estudo foram alcançados, pois foi possível demonstrar o potencial biotecnológico de bactérias não virulentas ao homem, recuperadas da Antártica, na produção de compostos anticongelantes. No presente estudo, 35 linhagens podem ser consideradas aptas a serem utilizadas em processos industriais em escalas maiores. Por mais que essas linhagens possam ter crescido em diferentes pHs e temperaturas, este fato, não necessariamente torna esses isolados potencialmente patogênicos ao homem sem a relação da produção de algum tipo de hidrólise avaliada, fato que foi observado apenas em 6 (14.6%) das linhagens potencialmente produtora de compostos anticongelantes. Também vale ressaltar que 100% dos isolados positivos para produção de compostos anticongelantes são sensíveis pelo menos a três antibióticos comerciais.

Os ensaios moleculares na busca por genes envolvidos na expressão de proteínas anticongelantes não apresentaram resultados satisfatórios, possivelmente pela inespecificidade do par de primer utilizado. Entretanto, não foi descartada a possibilidade da existência de genes responsáveis pela biossíntese de compostos com atividade anticongelante, a qual foi demonstrada no presente estudo. Desta forma, estudos futuros incluindo a caracterização dos genes responsáveis pela produção de compostos anticongelantes, identificação e otimização destes compostos bem como a busca por genes responsáveis pelos fatores de virulência, precisam ser realizados, para confirmar e dar robustez aos resultados presentes deste trabalho.

O continente Antártico vem cada vez mais sendo influenciado negativamente com a ação antropogênica proporcionada por práticas de turismo bem como de atividades de exploração do ecossistema estudado. Entretanto, podemos dizer que a Antártica ainda pode ser considerada um ambiente potencialmente promissor na busca por compostos bioativos os quais podem ser utilizados em processos industriais e/ou relacionados a melhoria da saúde humana.

## 6 REFERÊNCIAS

AALTONEN K et al. Streptococcus halichoeri. Comparative Genomics of an Emerging Pathogen. **Int J Genomics**, v.2020. Fevereiro, 2020. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/ijg/2020/8708305/>>. Acesso em 04 Julh. 2021.

ABED-ELMDOUST A et al. Metabolic changes in droplet vitrified semen of wild endangered Persian sturgeon *Acipenser persicus* (Borodin, 1997). **Cryobiology**, v.76, p.111-118. Junho, 2017. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S001122401630390X?via%3Dihub>>. Acesso em 04 Julh. 2021.

ACKERMAN AL, CHAI TC. The Bladder is Not Sterile: an Update on the Urinary Microbiome. **Curr Bladder Dysfunct Rep**. 2019; v. 14. Ed.4, p. 331-341. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7328282/>>. Acesso em 04 Julh. 2021.

ALMEIDA AA de et al. Fatores associados a bacteremia por *Klebsiella* spp. Em hospital universitário. **Evidência**, Joaçaba, v.12, n.2, p. 165-174. Dezembro, 2012.

AMÂNCIO RFL et al. Fenótipos de resistência antimicrobiana epidemiologicamente importantes em culturas de vigilância de um serviço terciário de saúde em Aracaju-SE. **Vigilância Sanitária em Debate: Sociedade, Ciência & Tecnologia (Health Surveillance under Debate: Society, Science & Technology)** – Visa em Debate, [S. l.], v. 9, n. 2, p. 111-116. Maio, 2021. Disponível em: <https://visaemdebate.incqs.fiocruz.br/index.php/visaemdebate/article/view/1480>>. Acesso em 04 Julh. 2021.

ANDREOLA P et. al. Estudo comparativo entre a produção de fosfolipases extracelulares e proteinases do gênero *Candida* isoladas a partir de infecções de cavidade oral. **Revista de Odontologia da Unesp**, Caxias do Sul, RS, v.45, ed.4, p.219-226, Agosto, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1807-2577.26115>>. Acesso em 04 Julh. 2021.

ANGELIN, J. KAVITHA M. Exopolysaccharides from probiotic bacteria and their health potential. **Int J Biol Macromol**. V. 1, n. 162, p.853-865. Novembro, 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S014181302033631X?via%3Dihub>>. Acesso em 04 Julh. 2021.

ARK KS et al. Characterization of the ice-binding protein from Arctic yeast *Leucosporidium* sp. AY30. **Cryobiology**, v.64, ed.3, p.286-296. Junho, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2012.02.014>>. Acesso em 04 Julh. 2021.

BAKERMANS C. Limits for Microbial Life at Subzero Temperatures. Em: Margesin R., Schinner F., Marx JC., Gerday C. (eds) **Psychrophiles: from Biodiversity to Biotechnology**. Springer, Berlim, Heidelberg, p 17-28. 2008. Disponível em: [https://doi.org/10.1007/978-3-540-74335-4\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-540-74335-4_2)>. Acesso em 04 Julh. 2021.

BALCERZAK K et al. Designing ice recrystallization inhibitors: from antifreeze (glyco)proteins to small molecules, **RSC Adv**, v.4, p.42682-42696. Setembro, 2014. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/Content/ArticleLanding/RA/2014/C4RA06893A>>. Acesso em 04 Julh. 2021.

BARGEN KV. HAAS A. Molecular and infection biology of the horse pathogen *Rhodococcus equi*. **FEMS Microbiology Reviews**, v.33, ed.5, p. 870–891. Setembro, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00181.x>>. Acesso em 04 Julh. 2021.

BARNES DKA et al. Macroplastics at sea around Antarctica. **Marine Environmental Research**, v.70, ed.2, p.250-252. Agosto, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2010.05.006>>. Acesso em 04 Julh. 2021.

BARTFAI T, Conti B. Fever. **Scientific World Journal**, v.16, ed.10, p.490-503. Março, 2010. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/tswj/2010/636738/>>. Acesso em 04 Julh. 2021.

BARTOLAC LK et al. Effect of different penetrating and non-penetrating cryoprotectants and media temperature on the cryosurvival of vitrified in vitro produced porcine blastocysts. **Anim Sci J**, v.89, ed.9, p.1230-1239. Setembro, 2018. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/asj.12996>>. Acesso em 04 Julh. 2021.

BEST BP. “Cryoprotectant Toxicity: Facts, Issues, and Questions. **Rejuvenation research**, v.18, ed.5, p. 422-36. Outubro, 2015. Disponível em: <<https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/rej.2014.1656>>. Acesso em 04 Julh. 2021.

BHIDE, A et al. “Interstitial cystitis/bladder pain syndrome and recurrent urinary tract infection and the potential role of the urinary microbiome.” **Post reproductive health**, v. 26, ed.2, p.87-90. Julho, 2020. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7521016/>>. Acesso em 10 Julh. 2021.

BIAŁKOWSKA A et al. Ice Binding Proteins: Diverse Biological Roles and Applications in Different Types of Industry. **Biomolecules**. Poland, v. 10, 2. Ed. p. 274, Fevereiro, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/biom10020274>>. Acesso em 10 Julh. 2021.

BIDAUD P et al. *Rhodococcus equi*'s extreme resistance to hydrogen peroxide is mainly conferred by one of its four catalase genes. **PLoS One**, v.7, ed.8, n.42396. Agosto, 2012. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0042396>>. Acesso em 10 Julh. 2021.

BIRCHER L et al. “Effect of cryopreservation and lyophilization on viability and growth of strict anaerobic human gut microbes.” **Microbial biotechnology**, v.11, ed.4, p.721-733. Julho, 2018. Disponível em: <<https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/1751-7915.13265>>. Acesso em 10 Julh. 2021.

BONWITT J et al. *Psychrobacter sanguinis* Wound Infection Associated with Marine Environment Exposure, Washington, USA. **Emerg Infect Dis**. 2018 (10):1942-1944. Disponível em: <[https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/24/10/17-1821\\_article](https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/24/10/17-1821_article)>. Acesso em 10 Julh. 2021.

BOWMAN JP. Genomics of psychrophilic bacteria and archaea. **Psychrophiles: from biodiversity to biotechnology** p.345-387. 2017

BOZAL N et al. Characterization of several *Psychrobacter* strains isolated from Antarctic environments and description of *Psychrobacter luti* sp. nov. and *Psychrobacter fozii* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** v.53, ed.4, p.1093-1100. Julho, 2003. Disponível em: <<https://doi.org/10.1099/ijs.0.02457-0>>. Acesso em 10 Julh. 2021.

BRASIL, Ministério da Ciência e Tecnologia. **Ciência Brasileira no IV Ano Polar Internacional**. 1ª edição. Brasília: Ministério da Ciência e Tecnologia/Conselho Nacional de Desenvolvimento Científica e Tecnológico. 2009.

BRASIL, Ministério do Meio Ambiente. **Especies Exóticas Invasoras Situação Brasileira**, 2ª Edição. Brasília, Instituto do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, 2006.

BRASIL, Ministério do Meio Ambiente. **O Brasil e o Meio Ambiente Antártico**, 2ª Edição. Brasília, Ministério do Meio Ambiente, 2007.

BRASIL, MMA – Ministério do Meio Ambiente. 2018. Disponível em: <<https://www.mma.gov.br/biodiversidade/convenção-da-diversidade-biológica>>. Acesso em 02 de Set. 2020.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Biotecnologia: estado da arte e aplicações na agropecuária**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, p. 730, 2011., il. color.

BRCAS- Brazilian committee on antimicrobial susceptibility testing. **Método de Disco-Difusão para Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos**, Versão 6.0. Janeiro, 2017.

BUZZINI P et al., Psychrophilic yeasts from worldwide glacial habitats: diversity, adaptation strategies and biotechnological potential, **FEMS Microbiology Ecology**, v. 82, ed. 2, Pages 217–241, November, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2012.01348.x>>. Acesso em 02 de Set. 2020.

CAPPELLETTI M et al. Biotechnology of Rhodococcus for the production of valuable compounds. **Appl Microbiol Biotechnol**. V.104, n.20, p. 8567-8594. Outubro, 2020. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-020-10861-z>>. Acesso em 02 de Set. 2020.

CASPAR Y et al. “Psychrobacter arenosus bacteremia after blood transfusion, France.” **Emerging infectious diseases**, v.19, ed.7, 1118-20. Julho, 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3713977/>>. Acesso em 02 de Set. 2020.

CASTRO SV. et. al. Agentes crioprotetores intracelulares: características e utilização na criopreservação de tecido ovariano e oócitos. **Acta Scientiae Veterinariae**, Fortaleza, v. 39, ed.2, p 957, January 2011.

CASTRO-MORETTI FR et al. “Targeted Metabolic Profiles of the Leaves and Xylem Sap of Two Sugarcane Genotypes Infected with the Vascular Bacterial Pathogen *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*.” **Metabolites**, v.11, ed.4, p.234., Abril, 2021. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2218-1989/11/4/234>>. Acesso em 02 de Set. 2020.

CEREGHINO JL et al. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*, **FEMS Microbiology Reviews**, v.24, ed.1, p.45–66. Janeiro, 2000. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2000.tb00532.x>>. Acesso em 02 de Set. 2020.

CHAGAS-JÚNIOR AF et al. Tolerância à acidez e alumínio tóxico por isolados de rizóbios de solos no Amazonas, Brasil. **Acta Amaz**, v.39, ed.2. 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0044-59672009000200028>>. Acesso em 02 de Set. 2020.

CHAVES VA et al. Desenvolvimento Inicial de Duas Variedades de Cana-de-açúcar Inoculadas com Bactérias Diazotróficas. **Rev Bras de Ciência do Solo**, Viçosa, v.39, n.6. Dezembro, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/01000683rbc20151144>>. Acesso em 02 de Set. 2020.

CHENG ZE et al. "1-Aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase from *Pseudomonas putida* UW4 facilitates the growth of canola in the presence of salt, **Canadian Journal of Microbiology**, v.53, n. 7, p. 912–918. Agosto, 2007. Disponível em: <<https://doi.org/10.1139/W07-050>>. Acesso em 02 de Set. 2020.

CHEUNG RCF et al. Antifreeze Proteins from Diverse Organisms and their Applications: An Overview. **Curr Protein Pept** v.18, ed.3, p.262-283. Janeiro, 2017 Disponível em: <<https://www.eurekaselect.com/146230/article>>. Acesso em 02 de Set. 2020.

CHMELARĀ D et al. Isolation of *Carnobacterium piscicola* from human Pus—Case report. **Folia Microbiol** v.47, p.455–457. Janeiro, 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/BF02818708>>. Acesso em 02 de Set. 2020.

CID FP et al. Properties and biotechnological applications of ice-binding proteins in bacteria, **FEMS Microbiology Letters**, V. 363, 11. Ed. June 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/femsle/fnw099>>. Acesso em 02 de Set. 2020.

CIOK A, DZIEWIT L. Exploring the genome of Arctic *Psychrobacter* sp. DAB\_AL32B and construction of novel *Psychrobacter*-specific cloning vectors of an increased carrying capacity. **Archives of microbiology**, v.201, ed.5, p. 559–569. Novembro, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00203-018-1595-y>>. Acesso em 02 de Set. 2020.

CLOOS AS et al. Interplay Between Plasma Membrane Lipid Alteration, Oxidative Stress and Calcium-Based Mechanism for Extracellular Vesicle Biogenesis From Erythrocytes During Blood Storage. **Front Physiol**, v. 3, ed.11, p.712. Julho, 2020. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphys.2020.00712/full>>. Acesso em 02 de Set. 2020.

CLSI- Clinical and Laboratory Standards Institute. **Padrões de desempenho para testes de susceptibilidade antimicrobiana**; Vigésimo quarto suplemento informativo. Padrões de desempenho para testes de susceptibilidade antimicrobiana; Vigésimo quarto suplemento informativo (2014).

COGONI V et al. “*Treponema denticola* chymotrypsin-like proteinase (CTLP) integra espiroquetas nas comunidades microbianas orais.” **Microbiology**, v.158, ed. 3, p. 759-770. Março, 2012. Disponível em: <<https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/mic.0.055939-0>>. Acesso em 02 de Set. 2020.

COLEINE C et al. “Uncovered Microbial Diversity in Antarctic Cryptoendolithic Communities Sampling three Representative Locations of the Victoria Land. **Microorganisms**, v. 8, ed.6, n. 942. Junho, 2020. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2076-2607/8/6/942>>. Acesso em 02 de Set. 2020.

COMERIO R et al. Buscado Bacterias Sicrofílas em la Antártida. **Ciencia Hoy**. v.17, p. 10-21. Janeiro, 2007.

CONGDON T et al. Antifreeze (Glyco) protein Mimetic Behavior of Poly (vinyl alcohol): Detailed Structure Ice *Recrystallization* Inhibition Activity Study, **Biomacromolecules**, v. 14, ed.5, p.1578–

1586. Março, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/bm400217j>>. Acesso em 02 de Set. 2020.

CONSTANZO JP et al. Physiological ecology of overwintering in hatchling turtles. **Jez-A Eco Inte Phy**, v.309A, ed.6, p.297-379. Julho, 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/jez.460>>. Acesso em 02 de Set. 2020

CONSTANZO JP, LEE, Júnior, R E. Avoidance and tolerance of freezing in ectothermic vertebrates. **J Exp Biol**, v.216, ed.11, p. 1961–1967. Junho, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1242/jeb.070268>>. Acesso em 10 de Set. 2020.

CORRENTE M et al. Characterisation of a catalase-negative methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolate from a dog, **Veterinary Microbiology**, v.167, ed.3–4, p. 734-736. Dezembro, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.09.020>>. Acesso em 10 de Set. 2020.

COWAN DA et al. Non-Indigenous Microorganisms in Antarctica: Assessing the Risks. **Trends in Microbiology**, v.19, ed.11, p. 540-548. Novembro, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.tim.2011.07.008>>. Acesso em 10 de Set. 2020.

CREVEL RWR, FEDYK, J. K., SPURGEON, M. J. Antifreeze proteins: characteristics, occurrence and human exposure. **Food and Chemical Toxicology**, Amsterdam, V. 40, ed. 7, p. 899-903. Junho, 2002. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(02\)00042-X](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(02)00042-X)>. Acesso em 10 de Set. 2020.

CRUZ RMS et al. The response of watercress (*Nasturtium officinale*) to vacuum impregnation: effect of an antifreeze protein type I. **Journal of Food Engineering**, Amsterdam, v. 95, ed. 2, p. 339-345, 2009. Novembro, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2009.05.013>>. Acesso em 10 de Set. 2020.

DALMASO GZL et al. “Marine extremophiles: a source of hydrolases for biotechnological applications.” *Marine drugs* v.13, ed.4, n.1925-65. Abril, 2015. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1660-3397/13/4/1925>>. Acesso em 10 de Set. 2020.

D'AMICO S et al. “Psychrophilic microorganisms: challenges for life.” **EMBO reports**, v.7, ed.4, p.385-9. Abril, 2016. Disponível em: <<https://www.embopress.org/doi/full/10.1038/sj.embor.7400662>>. Acesso em 10 de Set. 2020.

DAVIES PL Ice-binding proteins: a remarkable diversity of structures for stopping and starting ice growth. **Trends Biochem. Sci**, v 39, p. 548–555. Novembro, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.tibs.2014.09.005>>. Acesso em 10 de Set. 2020.

DE MAAYER P, Anderson, D., Cary, C., & Cowan, D. A. (2014). Some like it cold: understanding the survival strategies of psychrophiles. **EMBO reports**, v.15, ed.5, p.508–517. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/embr.201338170>>. Acesso em 10 de Set. 2020.

DE-SIMONE G et al. Contaminations in (meta) genome data: An open issue for the scientific community. **IUBMB Life**, v.72, ed.4, p.698-705. Abril, 2020. Disponível em: <[https://iubmb.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/iub.2216?utm\\_campaign=RESR\\_MRKT\\_Researcher\\_inbound&af=R&utm\\_medium=referral&utm\\_source=researcher\\_app&sid=researcher](https://iubmb.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/iub.2216?utm_campaign=RESR_MRKT_Researcher_inbound&af=R&utm_medium=referral&utm_source=researcher_app&sid=researcher)>. Acesso em 10 de Set. 2020.

DELLAGI A et al. Beneficial soil-borne bacteria and fungi: a promising way to improve plant nitrogen acquisition. **J Exp Bot.** V.25, n71, ed.15, p. 4469-4479. Julho, 2020. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jxb/article/71/15/4469/5802758?login=true>>. Acesso em 10 de Set. 2020.

DENNIS PG et al. "Soil bacterial diversity is positively associated with air temperature in the maritime Antarctic." **Scientific reports**, v.9, ed.1, p.2686. Fevereiro, 2019. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41598-019-39521-7>>. Acesso em 10 de Set. 2020.

DEVILLE S. Ice-templating, freeze casting: Beyond materials processing. **Journal of Materials Research**, Cambridge University Press (CUP), v.28. ed17, p.2202-2219. 2013. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1557/jmr.2013.105>>. Acesso em 20 de Set. 2020.

DHAKAR K, Pandey A. Wide pH range tolerance in extremophiles: towards understanding an important phenomenon for future biotechnology. **Applied microbiology and biotechnology** v.100, p.2499-2510. Janeiro, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00253-016-7285-2>>. Acesso em 20 de Set. 2020.

DI-LORENZO F et al. A Estrutura do Lípido A de Bactérias Gram-Negativas Adaptadas ao Frio Isoladas de Ambientes Antárticos. **Drogas Marinhas**, v.18, ed.12, p. 592. Março, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/md18120592>>. Acesso em 20 de Set. 2020.

DIMITRIEVA GY et al. The nature of plant growth-promoting effects of a pseudoalteromonad associated with the marine algae *Laminaria japonica* and linked to catalase excretion. **J App Microbiology**, v.100, ed.5, p.1159-1169. Maio, 2006.

DIONISI HM et al. Bioprospection of Marine Microorganism: Biotechnological applications and methods. **Rev. Argentina de microbiología**. V. 44, n. 1, p. 49-60. Março, 2012. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22610288/>>. Acesso em 20 de Set. 2020.

DOM S P et al. Linking prokaryotic community composition to carbon biogeochemical cycling across a tropical peat dome in Sarawak, Malaysia. V.11, n.1, p. 6416. Março, 2021. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41598-021-81865-6>>. Acesso em 21 de Set. 2020.

DONNARUMMA G et al. Effect of temperature on the change of *Pseudomonas Fluorescens* from an environmental microorganism to a potential human pathogen. **International Journal of Immunopathology and Pharmacology**, v.23, ed.1, p. 227-234. Janeiro, 2010. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20378008/>>. Acesso em 21 de Set. 2020.

DUMAN GJ, Wisniewski M J. The use of antifreeze protein for frost protection in sensitive crop plants. **Env and Exp Botany**, v.106, p.60-69. Outubro, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2014.01.001>>. Acesso em 21 de Set. 2020.

DUMAN JG, Olsen TM. Thermal hysteresis protein activity in bacteria, fungi, and phylogenetically diverse plants, **Cryobiology**, v.30, ed.3, p. 322-328. Junho, 1993. Disponível em: <<https://doi.org/10.1006/cryo.1993.1031>>. Acesso em 21 de Set. 2020.

EDWARDS A et al. Microbial genomics amidst the Arctic crisis. **Microb Genom.**v.6, ed.5, n.e000375. Maio, 2020. Disponível em: <<https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/mgen/10.1099/mgen.0.000375>>. Acesso em 21 de Set. 2020.

EKLUND M et al. Comparison of *Streptococcus halichoeri* isolates from canine and fur animal infections: biochemical patterns, molecular characteristics and genetic relatedness. **Acta Vet Scan**, v. 62, n.26. Junho, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s13028-020-00525-3>>. Acesso em 21 de Set. 2020.

ESKANDARI A et al. “Antifreeze Proteins and Their Practical Utilization in Industry, Medicine, and Agriculture. **Biomolecules**. vol. 10, ed.12, n. 1649. Dezembro, 2020. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2218-273X/10/12/1649>>. Acesso em 21 de Set. 2020.

FAHY GM. Cryoprotectant toxicity neutralization. **Cryobiology**, v.60, ed.3, p. s45-s53. Julho, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2009.05.005>>. Acesso em 21 de Set. 2020.

FAHY GM et al. Some emerging principles underlying the physical properties, biological actions, and utility of vitrification solutions. **Cryobiology**, v.24, ed.3, p.196–213. Junho, 1987. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/0011-2240\(87\)90023-X](https://doi.org/10.1016/0011-2240(87)90023-X)>. Acesso em 21 de Set. 2020.

FARIA RSCA et al. “Characterization of genes responsive to osmotic and oxidative stresses of the sugarcane bacterial pathogen *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*.” **Brazilian journal of microbiology**, v.51, ed.1, p.77-86. Março, 2020. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs42770-019-00163-6>>. Acesso em 21 de Set. 2020.

FELLER G, Gerday C. Psychrophilic enzymes: hot topics in cold adaptation. **Nat Rev Microbiol**, v.1, p.200–208. Dezembro, 2003. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/nrmicro773>>. Acesso em 21 de Set. 2020.

FIELDS PA. Review: Protein function at termal extremes: balancing stability and flexibility. **Molecular & Integrative Physiology**, v. 129, ed 2–3, p. 417-431. Junho, 2001). Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S1095-6433\(00\)00359-7](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(00)00359-7)>. Acesso em 21 de Set. 2020.

FILHO SA et al. Bioprospecção e Biotecnologia. **Pacérias Estratégicas**. v. 19, p. 45–80, 2014.

GALLARDO CJP et al. Low-temperature biosynthesis of fluorescent semiconductor nanoparticles (CdS) by oxidative stress resistant Antarctic bacteria, **Journal of Biotechnology**, v.187, p. 108-115. Outubro, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.07.017>>. Acesso em 21 de Set. 2020.

GALLO G et al. “Extremophiles, a Nifty Tool to Face Environmental Pollution: From Exploitation of Metabolism to Genome Engineering.” **Jornal internacional de pesquisa ambiental e saúde pública**. Basel, Suíça. v. 18, n.10 p.5228. Maio, 2021. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1660-4601/18/10/5228>. Acesso em 21 de Set. 2020.

GANZERTT BF et al. *Arthrobacter livingstonensis* sp. nov. and *Arthrobacter cryotolerans* sp. nov., salt-tolerant and psychrotolerant species from Antarctic soil. **Int J of systematic and evolutionary microbiology**, v.61, ed.4, p.979-984. Abril, 2011 Disponível em: <<https://doi.org/10.1099/ijs.0.021022-0>>. Acesso em 21 de Set. 2020.

GARCIA-ZAPATA MTA, Souza Junior E S. Aspectos fisiopatológicos da febre nas doenças infecto-parasitárias. *Universitas: Ciências da Saúde*, v.4, n.1/2. 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.5102/ucs.v4i1.26>>. Acesso em 21 de Set. 2020.



GILBERT JA et al. Demonstration of antifreeze protein activity in Antarctic lake bacteria. *Microbiology Society*, v.150, ed. 1. Janeiro, 2004. Disponível em: <<https://doi.org/10.1099/mic.0.26610-0>>. Acesso em 21 de Set. 2020.

GILBERT JÁ et al. A hyperactive, Ca<sup>2+</sup>-dependent anticongel protein in an Antarctic bacterium, *FEMS Microbiology Letters*, v. 245, ed.1, p. 67–72. Abril, 2005. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.02.022>>. Acesso em 21 de Set. 2020.

GIORDANO D. Bioactive Molecules from Extreme Environments. *Mar Drugs*, v.18, ed.12, p.640. Dezembro, 2020. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1660-3397/18/12/640>>. Acesso em 21 de Set. 2020.

GRAN-SCHEUCH A et al. Isolation and Characterization of Phenanthrene Degrading Bacteria from Diesel Fuel-Contaminated Antarctic Soils. *Front. Microbiol*, v.8, p. 1634. Agosto, 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5581505/>>. Acesso em 21 de Abr. 2020.

GROUDIEVA T et al. *Psychromonas arctica* sp. nov, uma nova bactéria formadora de biofilme psicrotolerante isolada de Spitzbergen. *Microbiology Society*, v.53, ed.2. Março, 2003

GRIFFITH M; Ewart KV. Antifreeze proteins and their potential use in frozen foods, *Biotechnology Advances*, v.13, n.3, p. 375–402, 1995. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/0734-9750\(95\)02001-J](https://doi.org/10.1016/0734-9750(95)02001-J)>. Acesso em 21 de Set. 2020.

GUO S et al. Re-Evaluation of a Bacterial Antifreeze Protein as an Adhesin with Ice-Binding. *Activity. PLoS ONE* v.7, ed.11, e48805. 2012. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0048805>>. Acesso em 21 de Set. 2020.

GURGUI C, Piel J. Metagenomic Approaches to Identify and Isolate Bioactive Natural Products from Microbiota of Marine Sponges. Em: Streit W., Daniel R. (eds) *Metagenomics. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*. *Humana Press*, Totowa, NJ v. 668, p. 247-26. Agosto, 2010. Disponível em: <[https://doi.org/10.1007/978-1-60761-823-2\\_17](https://doi.org/10.1007/978-1-60761-823-2_17)>. Acesso em 23 de Set. 2020.

GUTHRIE HD et al. Osmotic Tolerance Limits and Effects of Cryoprotectants on Motility of Bovine Spermatozoa, *Biology of Reproduction*, v. 67, ed.6, Pages 1811-1816. Dezembro, 2002. Disponível em: <[https://doi.org/ 10.1095 / produto biológico 67.6.1811](https://doi.org/10.1095 / produto biológico 67.6.1811)>. Acesso em 23 de Set. 2020.

HARDING C et al. “Fever Incidence Is Much Lower in the Morning than the Evening: Boston and US National Triage Data. *The western journal of emergency medicine*, v.21, ed.4, p. 909-917. Junho, 2020. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7390559/>>. Acesso em 23 de Set. 2020.

HARVEY A et al. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. *Nat Rev Drug Discov*, v.14, p.111–129 (2015). Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/nrd4510>>. Acesso em 23 de Abr. 2020.

HASSAS -ROUDSARI M, GOFF, D. Ice structuring proteins from plants: mechanism of action and food application. *Food Research International*, Amsterdam, v. 46, n. 1, p. 425-436. Abril, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.12.018>>. Acesso em 23 de Abr. 2020.

HERNÁNDEZ F et al. Occurrence of antibiotics and bacterial resistance in wastewater and sea water from the Antarctic. **Journal of hazardous materials**, v.363, p.447-456. Fevereiro, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.07.027>>. Acesso em 23 de Abr. 2020.

HILDEBRANDT P et al. A new cold-adapted  $\beta$ -D-galactosidase from the Antarctic *Arthrobacter* sp. 32c – gene cloning, overexpression, purification and properties. **BMC Microbiol** v.9, n.151 Julho, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-151>>. Acesso em 23 de Abr. 2020.

HOBBS SH. et al. “Antifreeze protein dispersion in eelpouts and related fishes reveals migration and climate alteration within the last 20 Ma.” **PloS one** v.15, ed.12, n. 243273. Dezembro 2020. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0243273>>. Acesso em 23 de Abr. 2020.

HOENIGL M et al. Isolation of *Carnobacterium* sp. from a human blood culture. **Microbiology society**, v.59, ed.4, p.493-495. Abril, 2010. Disponível em: <<https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/jmm.0.016808-0#tab2>>. Acesso em 23 de Mai. 2020.

HOSSEN S et al. Effects of Antifreeze Protein III on Sperm Cryopreservation of Pacific Abalone, *Haliotis discus hannai*. **Int J Mol Sci**, v.22, ed.8, p.3917. Abril, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/ijms22083917>>. Acesso em 23 de Mai. 2020.

HU Z, ZHANG W. Signaling Natural Products from Human Pathogenic Bacteria. **ACS Infect Dis**. V.6, ed.1, p.:25-33. Janeiro, 2020. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsinfectdis.9b00286>>. Acesso em 28 de Mai. 2020.

HUANG KD et al. Effects of anti-freeze concentration in the engine coolant on the cavitation temperature of a water pump. **Applied Energy**, v.79, ed.3, p.261-273. Novembro, 2004. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2004.01.004>>. Acesso em 23 de Mai. 2020.

IBRAHIM S et al. “Biosurfactant Production and Growth Kinetics Studies of the Waste Canola Oil-Degrading Bacterium *Rhodococcuserythropolis* AQ5-07 from Antarctica.” **Molecules (Basel, Switzerland)** v.25, ed.17, n.3878. 26 Agosto, 2020. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7503493/>>. Acesso em 23 de Mai. 2020.

IQBAL A et al. Ethylene Glycol Toxicity. StatPearls [Internet]. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537009/>>. Acesso em 15 de Junho de 2021.

JAMES C et al. A Review of Novel and Innovative Food Freezing Technologies. **Food Bioprocess Technol**, v.8, p.1616–1634. Junho, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11947-015-1542-8>>. Acesso em 15 de Junh. de 2021.

JARA D et al. Antibiotic resistance in bacterial isolates from freshwater samples in Fildes Peninsula, King George Island, Antarctica. **Sci. Rep**, v.10, n.3145. Fevereiro, 2020. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41598-020-60035-0>>. Acesso em 15 de Junh. de 2021..

JEONG SW, Choi YJ. Extremophilic Microorganisms for the Treatment of Toxic Pollutants in the Environment. **Molecules**. V.25, ed.21 p.4916. Outubro, 2020. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1420-3049/25/21/4916>>. Acesso em 15 de Junh. de 2021..

JIN M et al. “Properties and Applications of Extremozymes from Deep-Sea Extremophilic Microorganisms: A Mini Review.” **Marine drugs**, v.17, ed.12, p.656. Novembro, 2019. Disponível em: < <https://www.mdpi.com/1660-3397/17/12/656>. Acesso em 15 de Junh. de 2021..

JITTAWUTTIPOKA T et al. The catalase-peroxidase KatG is required for virulence of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in a host plant by providing protection against low levels of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. **J Bacteriol**, v.191, n.23, 7372-7. Dezembro, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1128/JB.00788-09>>. Acesso em 15 de Junh. de 2021..

JORQUERA MA et al. Editorial: Bioprospecting and Biotechnology of Extremophiles . **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology** .v. 7, p. 204. Agosto, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00204>>. Acesso em 15 de Junh. de 2021.

JUNG W et al. Antifreeze Protein-Covered Surfaces. **Antifreeze Proteins** Volume 2. Springer, Cham, p.307-326. Julho, 2020. Disponível em: <[https://doi.org/10.1007/978-3-030-41948-6\\_13](https://doi.org/10.1007/978-3-030-41948-6_13)>. Acesso em 15 de Junh. de 2021..

KLASSEN JL, Foght JM. Characterization of *Hymenobacter* isolates from Victoria Upper Glacier, Antarctica revela cinco novas espécies e substancial evolução não vertical dentro deste gênero. **Extremophiles**, v. 15, p. 45–57 (2011). Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00792-010-0336-1>>. Acesso em 15 de Junh. de 2021.

KARST MJ. **Encyclopedia of Toxicology**. 2<sup>a</sup> edição, 2005. *Staphylococcus aureus*, p. 86-87

KASHYAP P et al. Performance of antifreeze protein HrCHI4 from *Hippophae rhamnoides* in improving the structure and freshness of green beans upon cryopreservation. **Food Chem**, v.320, p.126599. Agosto, 2020. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0308814620304611>>. Acesso em 15 de Junh. de 2021..

KHAN NM et al. “Characterization of microbial antifreeze protein with intermediate activity suggests that a bound-water network is essential for hyperactivity.” **Scientific reports**, v.11, ed.1, p.5971. Março, 2021. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41598-021-85559-x>>. Acesso em 15 de Junh. de 2021..

KIM HJ et al. Marine antifreeze proteins: structure, function, and application to cryopreservation as a potential cryoprotectant. **Marine drugs**, v.15, ed. 2, p.27. Janeiro, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/md15020027>>. Acesso em 15 de Junh. de 2021..

KIM S et al. Distribution and Control of Bacterial Community Composition in Marian Cove Surface Waters, King George Island, Antarctica during the Summer of 2018. **Microorganisms**, v.8, ed.8, p.1115. Julho, 2020. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2076-2607/8/8/1115>>. Acesso em 15 de Junh. de 2021.

KOHLI I et al. Extremophile - An Adaptive Strategy for Extreme Conditions and Applications. **Curr Genomics** .v. 21, n. 2, p. 96-110. Fevereiro, 2020. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7324872/>>. Acesso em 15 de Fev. de 2021.

KUMAR S. Psychrophilic *Pseudomonas helmanticensis* proteome under simulated cold stress. **Cell Stress Chaperones**, n.25, ed.6, p.1025-1032. Novembro, 2020. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s12192-020-01139-4>>. Acesso em 15 de Fev. de 2021.

LEE PY et al. Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. **J Vis Exp**, v.20, ed.62, p.3923. Abril, 2012. doi: 10.3791/3923. Disponível em: <<https://www.jove.com/t/3923/agarose-gel-electrophoresis-for-the-separation-of-dna-fragments?text=agarose&>>. Acesso em 15 de Fev. de 2021.

LE GUERN R et al. Psychrobacter sanguinis: an unusual bacterium for nosocomial meningitis. **J Clin Microbiol**, v.52, ed.9 p.3475-7. Setembro de 2014.

LEISNER JJ, Laursen BG, Prévost H, Drider D, Dalgaard P. Carnobacterium: positive and negative effects in the environment and in foods. **FEMS Microbiol** v.31, ed.5, p.592-613. Setembro, 2007. Disponível em: <<https://academic.oup.com/femsre/article/31/5/592/2367677>>. Acesso em 15 de Fev. de 2021.

LEUSCHNER RG et al. Qualified presumption of safety (QPS): a generic risk assessment approach for biological agents notified to the European Food Safety Authority (EFSA). **Trends in Food Science & Technology**, v. 21, ed.9, p. 425-435. Setembro, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2010.07.003>>. Acesso em 15 de Fev. de 2021.

LI S et al. Microbial communities evolve faster in extreme environments. **Sci Rep**. V. 4, p. 6205. Agosto, 2014. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/srep06205>>. Acesso em 15 de Fev. de 2021.

LIMA CC et al. Mecanismo de resistência bacteriana frente aos fármacos: uma revisão. **CuidArte, Enferm** , v.11, ed.1, p.105-113, janeiro, 2017.

LIN L et al. “Lipid Remodeling Confers Osmotic Stress Tolerance to Embryogenic Cells during Cryopreservation. **International journal of molecular Sciences**, v.22, ed.4, p. 2174. Fevereiro 2021. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1422-0067/22/4/2174>>. Acesso em 15 de Fev. de 2021.

LORV JSH et al. Bacterial ice crystal controlling proteins. **Scientifica**, v.2014, Artigo ID 976895 , p.20, 2014 . Disponível em: <<https://doi.org/10.1155/2014/976895>>. Acesso em 15 de Fev. de 2021.

LYKKE MR et al. Vaginal, Cervical and Uterine pH in Women with Normal and Abnormal Vaginal Microbiota. **Pathogens**, Dinamarca, v.10, ed.2, p.90. Janeiro, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/pathogens10020090>>. Acesso em 15 de Fev. de 2021

MACHADO PRL et al. Mecanismos de resposta imune às infecções. **An. Bras. Dermatol**, v.79 ed.6. Dezembro, 2004. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0365-05962004000600002>>. Acesso em 15 de Fev. de 2021

MADEIRA EM et. al. Avaliação de diferentes crioprotetores intra e extracelulares na criopreservação de sêmen de touros. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.65, n.2, p.415-420, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0102-09352013000200017>>. Acesso em 15 de Julh. de 2021

MADIGAN MT et. al. **Microbiologia de Brock**. 12<sup>a</sup> ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

MALAJOVICH M A. **Biotecnologia**. 2<sup>a</sup> edição. Rio de Janeiro: Agencia Brasileira do ISBN, 2016.

MANGIAGALLI M et al. The “cold revolution”. Present and future applications of cold-active enzymes and ice-binding proteins, **New Biotechnology**, v.55, p. 5-11. Março, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.nbt.2019.09.003>>. Acesso em 15 de Fev. de 2021

MARGESIN R, Collins T. Microbial ecology of the cryosphere (glacial and permafrost habitats): current knowledge. **Appl Microbiol Biotechnol**. V.103, n.6, p.2537-2549. Fevereiro, 2019. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-019-09631-3>>. Acesso em 15 de Julh. de 2021

MARINHA DO BRASIL- **Tratado da Antártica e Protocolo de Madri / Marinha do Brasil**. Comissão Interministerial para os Recursos do Mar. Secretaria da Comissão. - 2ª edição. Brasília, DF: SECIRM, 2016. 72p.

MATH RK et al. Comparative genomics reveals adaptation by *Alteromonas* sp. SN2 to marine tidal-flat conditions: cold tolerance and aromatic hydrocarbon metabolism. **PLoS One**, v.7, ed.4, e35784. Abril, 2012.

MAULÉN NP. Factores de virulencia de *Mycobacterium tuberculosis* [Virulence factors of *Mycobacterium tuberculosis*]. **Rev Med Chil**, v.139, ed. 12, p: 1605-10. Dezembro, 2011.

MAZARELI RC da S et. al. Enzymatic routes to hydrogen and organic acids production from banana waste fermentation by autochthonous bacteria: Optimization of pH and temperature. *Int Journal of Hydrogen Energy*, v.46, ed.12, p. 8454-8468. Fevereiro, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2020.12.063>>. Acesso em 15 de Fev. de 2021.

MCCAMMON SA, Bowman JP. Taxonomy of antarctic Flavobacterium species: Description of *Flavobacterium gillisiae* sp. nov., *Flavobacterium tegetincola* sp. nov. and *Flavobacterium xanthum* sp. nov., nom. rev. and reclassification of [*Flavobacterium*] *salegens* as *Salegentibacter salegen*. **Int J Syst Evol Microbiol**. v.50, ed. 3. Maio, 2000. Disponível em: <<https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/00207713-50-3-1055>>. Acesso em 15 de Fev. de 2021.

MEDEIROS PSG et al. Propriedades Termofísicas de Fluidos Secundários à Base de Álcool para Termoacumulação. **Holos**, v.4, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.15628/holos.2010.413>>. Acesso em 20 de Junh. de 2021.

MENEZES CB et al. Microbial diversity associated with algae, ascidians and sponges from the north coast of São Paulo state, Brazil. **Microbiological Research**, v.165, ed.6, p.466-482. 2010.

MESSINA CGM et al. Catalase negative *Staphylococcus aureus* retain virulence in mouse model of chronic granulomatous disease, **FEBS Letters**, v.518, ed.1–3, p.107-110. Maio, 2002. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(02\)02658-3](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(02)02658-3)>. Acesso em 20 de Junh. de 2021.

MIDDLETON AJ et al. Antifreeze protein from freeze-tolerant grass has a betaroll fold with an irregularly structured ice-binding site. **J Mol Biol**, v. 416, ed.4, p. 713-724. Março, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2012.01.032>>. Acesso em 20 de Junh. de 2021.

MIRSEPASI-LAURIDSEN HC et al. Secretion of Alpha-Hemolysin by *Escherichia coli* Disrupts Tight Junctions in Ulcerative Colitis Patients. *Clin Transl Gastroenterol*, v.7, ed3, p.149. Março, 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4822097/>>. Acesso em 20 de Junh. de 2021.

MISHRA S, Imlay J. Review Why do bacteria use so many enzymes to scavenge hydrogen peroxide? **Arch Biochem Biophys**, v.525, ed.2, p.145-60. Setembro, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.abb.2012.04.014>>. Acesso em 20 de Junh. de 2021.

MITRA S et al. Eye infection by a psychrophile: *Pseudomonas fluorescens*. **Indian J Med Microbiol**, v. 37, ed.2, p. 289–291. Junho, 2019. Disponível em: <<[https://www.researchgate.net/publication/337327725\\_Ocular\\_Infection\\_by\\_a\\_Psychrophile\\_Pseudomonas\\_fluorescens](https://www.researchgate.net/publication/337327725_Ocular_Infection_by_a_Psychrophile_Pseudomonas_fluorescens)>. Acesso em 20 de Junh. de 2021.

MOGROVEJO-ARIAS DC et al. Potentially pathogenic 541 bacteria isolated from diverse habitats in Spitsbergen, Svalbard. **Environmental Earth Sciences** v.79, p.1-9. 2020.

MOUNTFORT DO et al. *Clostridium vincentii* sp. nov., a new obligately anaerobic, saccharolytic, psychrophilic bacterium isolated from low-salinity pond sediment of the McMurdo Ice Shelf, Antarctica. **Arch Microbiol** v.167, p.54–60. Janeiro, 1997. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs002030050416>>. Acesso em 20 de Junh. de 2021.

MOUNTFORT DO et al. *Psychromonas antarcticus* gen. nov., sp. nov., a new aerotolerant anaerobic, halophilic psychrophile isolated from pond sediment of the McMurdo Ice Shelf, Antarctica. **Arch Microbiol**, v.169, p.231–238. Fevereiro, 1998. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s002030050566>>. Acesso em 20 de Junh. de 2021.

MOUSSALLEM BC et al. Detecção dos genes *mecA* e *femA*, marcadores moleculares de resistência a meticilina, em *Staphylococcus* spp. isolados de pacientes admitidos em uma Unidade Neonatal de Tratamento Intensivo. **Revista Científica da FMC**, Rio de Janeiro - v. 2, n. 2. Março, 2007.

MUÑOZ PA et al. Structure and application of antifreeze proteins from Antarctic bacteria. **Microbial Cell Factories**, v.16, n.138, p 1-13. Agosto, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s12934-017-0737-2>>. Acesso em 20 de Junh. de 2021.

MURYOI N et. al. Cloning and Expression of *afpA*, a Gene Encoding an Antifreeze Protein from the Arctic Plant Growth-Promoting Rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2. **J of Bact American Society for Microbiology**, , Canada , v. 186, n. 17, p. 5661-5671. Setembro, 2004. Disponível em: <<https://doi.org/10.1128/JB.186.17.5661-5671.2004>>. Acesso em 20 de Junh. de 2021.

NA G et al. Occurrence and antibacterial resistance of culturable antibiotic-resistant bacteria in the Fildes Peninsula, Antarctica. **Marine Pollution Bulletin**, v.162. Janeiro, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2020.111829>>. Acesso em 20 de Junh. de 2021.

NAING AH, Kim CK. A brief review of applications of antifreeze proteins in cryopreservation and metabolic genetic engineering. **3 Biotech**, v.9, ed.9, p.329. Setembro, 2019. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s13205-019-1861-y>>. Acesso em 20 de Junh. de 2021.

NAM ES et al. Isolation and characterization of a psychrophilic bacterium producing cold active lactose hydrolyzing enzyme from soil of Mt. Himalaya in Nepal. **African Journal of Microbiology Research**, v.5, n.16, p. 2198-2206. Agosto, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.5897/AJMR10.609>>. Acesso em 23 de Ago. 2021

- NAVARRO-TORRE Sa et al. “*Pseudoalteromonas rhizosphaerae* sp. nov., a novel plant growth-promoting bacterium with potential use in phytoremediation.” **International journal of systematic and evolutionary microbiology** v. 70, ed.5 p.3287-3294. Abril, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004167>>. Acesso em 23 de Mai. 2021
- NEAR TJ et al. Ancient climate change, antifreeze, and the evolutionary diversification of Antarctic fishes. **Proc Natl Acad Sci USA**. v.109, ed.9, p.3434-9. Fevereiro, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1073/pnas.1115169109>>. Acesso em 23 de Ago. 2021.
- NEDASHKOVSKAYA OI et al. *Cellulophaga pacifica* sp. nov. **Microbiology Society**, v.54, ed.2. Março, 2004. Disponível em: <<https://doi.org/10.1099/ijms.0.02737-0>>. Acesso 07 Junh. 2021.
- NIAID Emerging Infectious Diseases/Pathogens. (2020). Disponível em: <<https://www.niaid.nih.gov/research/emerging-infectious-diseases-pathogens>>. Acesso 07 Junh. 2021.
- NIEMINEN M et al. *Treponema denticola* chymotrypsin-like proteinase may contribute to orodigestive carcinogenesis through immunomodulation. **Br J Cancer**, v.118, p.428–434. Fevereiro, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/bjc.2017.409>>. Acesso em 23 de Agosto de 2021.
- NOUMI E et al. “Phenotypic and Genotypic Characterization with MALDI-TOF-MS Based Identification of *Staphylococcus* spp. Isolated from Mobile Phones with their Antibiotic Susceptibility, Biofilm Formation, and Adhesion Properties.” **Int journal of env research and public health**, v. 17, ed.11, p. 3761. Maio, 2020. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1660-4601/17/11/3761>> Acesso em 23 de Ago. 2021.
- NSIDC, National Snow and Ice Data Center. Landsat 8 helps unveil the coldest place on Earth. Disponível em: [https://nsidc.org/news/newsroom/2013\\_ColdestPlace\\_PR.html](https://nsidc.org/news/newsroom/2013_ColdestPlace_PR.html). Acesso em 23 de Agosto de 2021.
- O'BRIEN A et al. Antarctic bacteria inhibit growth of food-borne microorganisms at low temperatures, **FEMS Microbiology Ecology**, v. 48, ed. 2, p. 157-167. Maio, 2004. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.femsec.2004.01.001>>. Acesso em 04 de junh 2021.
- OGOINA D. Fever, fever patterns and diseases called 'fever'--a review. **J Infect Public Health**, v.4, ed.3, n.108-24. Agosto, 2011. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1876034111000256?via%3Dihub>>. Acesso em 04 de junh 2021.
- O'HANLON DE et al. Vaginal pH and Microbicidal Lactic Acid When Lactobacilli Dominate the Microbiota. **PLoS ONE**, v. 8, ed.11, e80074. Novembro, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080074>>. Acesso em 04 de junh 2021.
- ORTIZ M. et al. “Microbial Nitrogen Cycling in Antarctic Soils.” **Microorganisms**, v. 8, ed.9, n, 1442. Setembro, 2020. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2076-2607/8/9/1442>>. Acesso em 04 de junh 2021.
- ORTIZ-ALCÁNTARA JM et al. Fatal *Psychrobacter* sp. infection in a pediatric patient with meningitis identified by metagenomic next-generation sequencing in cerebrospinal fluid. **Arch Microbiol**, v.198, ed.2, p.129-135. Março, 2016.

OSTLIE HM et al. Investigation of the microbiota associated with ungerminated and germinated Norwegian barley cultivars with focus on lactic acid bacteria. *I J Food Microbiology*, v.341. Março, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109059>>. Acesso em 04 de junho 2021.

OTTONI JR et al. Characterization of amylase produced by cold-adapted bacteria from Antarctic samples. *Biocatalysis and agricultural biotechnology*, v.23: 101452.2020

PADILLA-VACA F, Anaya-Velázquez F, Franco B. Synthetic biology: Novel approaches for microbiology. *Int Microbiol.* v. 18, ed. 2, p.71-84. Junho, 2015. Disponível em: <<http://revistes.iec.cat/index.php/IM/article/viewFile/139212/137876>>. Acesso em 04 de junho 2021.

PANIS B et al. "Challenges and Prospects for the Conservation of Crop Genetic Resources in Field Genebanks, in In Vitro Collections and/or in Liquid Nitrogen. *Plants* Basel, Switzerland, v. 9, ed.12, p.1634. Novembro, 2020. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2223-7747/9/12/1634>>. Acesso em 04 de junho 2021.

PANWAR P. et al. Influence of the polar light cycle on seasonal dynamics of an Antarctic lake microbial community. *Microbiome*. Australia, v.8, 1.ed, n. 116. Agosto, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s40168-020-00889-8>>. Acesso em 04 de junho 2021.

PELIKAN C et al. Anaerobic bacterial degradation of protein and lipid macromolecules in subarctic marine sediment. *Isme J*, V,15, ed.3, p.833-847. Março, 2021. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8027456/>> Acesso em 04 de junho 2021.

PIETRUCHA-DILLANCHIAN P, Hooton TM. Diagnosis, treatment, and prevention of Urinary tract infection. *Microbiology Spectrum*, v.4, n.6. Janeiro, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1128/microbiolspec.UTI-0021-2015>> Acesso em 04 de junho 2021.

PINDI PK et al. Description of *Leifsonia kafniensis* sp. nov. and *Leifsonia antarctica* sp. nov. *Microbiology Society*, v. 59, ed.6. Junho, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1099/ijs.0.006643-0>>. Acesso em 23 ago. 2021.

OMS-Organização Mundial da Saúde, **Plano de P&D** .(2020). Disponível em: <https://www.who.int/activities/prioritizing-diseases-for-research-and-development-in-emergency-contexts>>. Acesso em 04 de junho 2021.

PLAZA DO et al. Biological synthesis of fluorescent nanoparticles by cadmium and tellurite-resistant Antarctic bacteria: exploring new natural nanofactories. *Microb Cell Fact*, v 15, n.76. Maio, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s12934-016-0477-8>>. Acesso em 23 ago. 2021.

PONIECKA EA et al. "Physiological Capabilities of Cryoconite Hole Microorganisms." *Frontiers in microbiology*, v.11, n.1783. Julho, 2020. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2020.01783/full>>. Acesso em 23 ago. 2021.

POWER ML et al. *Escherichia coli* out in the cold: Dissemination of human-derived bacteria into the Antarctic microbiome. *Environmental Pollution* v.215, p.58-65. Agosto, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.04.013>>. Acesso em 23 ago. 2021.



PROKSCH E. pH in nature, humans and skin. **Journal of Dermatology**, Germany , v. 45, ed .9, p:1044–1052. Abril, 2018. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/1346-8138.14489>>. Acesso em 23 ago. 2021.

PROVESI JG, Amante, E. R. Revisão: Proteínas anticongelantes – uma tecnologia emergente para o congelamento de alimentos. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 18, n. 1, p. 2-13. Março, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/1981-6723.7714>>. Acesso em 23 ago. 2021.

PUDNEY PDA et. al. The physico-chemical characterization of a boiling stable antifreeze protein from a perennial grass (*Lolium perenne*). **Archives of Biochemistry and Biophysics**, San Diego v. 410, ed. 2, p.238-245. Fevereiro, 2003. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0003-9861\(02\)00697-5](https://doi.org/10.1016/S0003-9861(02)00697-5)>. Acesso em 23 ago. 2021.

QIU L et al. A novel function: thermal protective properties of an antifreeze protein from the summer desert beetle *Microdera punctipennis*. **Cryobiology**, Amsterdam, v. 66, ed.1, p.60-68. Fevereiro, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2012.11.005>>. Acesso em 23 ago. 2021.

RABBIA V et al. Antibiotic resistance in *Escherichia coli* strains isolated from Antarctic bird feces, water from inside a wastewater treatment plant, and seawater samples collected in the Antarctic Treaty area. **Polar Science**, v.10, ed.2, p.123-131. Junho, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.polar.2016.04.002>>. Acesso em 23 ago. 2021.

RANG HP. et al. **Farmacologia**. 8a edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.

RASHID M, Stingl U. Contemporary Molecular Tools in Microbial Ecology and their application to advancing biotechnology. **Biotechnology Advances**, v.33, ed.8, p. 1755-1773. Dezembro, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.09.005>>. Acesso em 23 ago. 2021.

RAYMOND JA et al. A bacterial ice-binding protein from the Vostok ice core. **Extremophiles**, v.12, p. 713-717. Julho, 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00792-008-0178-2>>. Acesso em 23 ago. 2021.

REDDY GSN et al. *Sporosarcina macmurdoensis* sp. nov., de uma amostra de tapete de cianobactéria de uma lagoa nos Vales Secos de McMurdo, Antártica. **Int J Syst Evol Microbiol** v.53 , p.1363 -1367.

RICHARD KL et al. “Heme Uptake and Utilization by Gram-Negative Bacterial Pathogens.” **Frontiers in cellular and infection microbiology** v. 9, ed. 81. Março, 2019. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2019.00081/full>>. Acesso em 26 ago. 2021.

RINNAN R et al. Temperature adaptation of soil bacterial communities along an Antarctic climate gradient: predicting responses to climate warming. **Global Change Biology** v.15, ed.11, p.2615-2625. Novembro, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2009.01959.x>>. Acesso em 26 ago. 2021.

ROMANENKO LA et al. *Psychrobacter maritimus* sp. nov. and *Psychrobacter arenosus* sp. nov., isolated from coastal sea ice and sediments of the Sea of Japan. **Int J Syst Evol Microbiol**, v.54, ed.5. Setembro, 2004. Disponível em: <<https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijjs.0.63096-0#tab2>>. Acesso em 26 ago. 2021.

ROMANIUK K et al. “Insight Into the Diversity and Possible Role of Plasmids in the Adaptation of Psychrotolerant and Metalotolerant *Arthrobacter* spp. to Extreme Antarctic Environments.” **Frontiers in microbiology**, v. 9, n. 3144. Dezembro, 2018. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2018.03144/full>>. Acesso em 26 ago. 2021.

RORIG KCO et al. Produção de fatores de virulência in vitro por espécies patogênicas do gênero *Cândida*. **Rev da Soc Bras de Med Tropical**, Toledo-PR, v.42, ed.2, p. 225-227. Abril, 2009.

RUGINESCU R et al. “Bioprospecting for Novel Halophilic and Halotolerant Sources of Hydrolytic Enzymes in Brackish, Saline and Hypersaline Lakes of Romania.” **Microorganisms**, v. 8, ed. 12, p.1903. Novembro, 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33266166/>>. Acesso em 26 ago. 2021.

RYEONG PJ et al. *Sulfitobacter litoralis* sp. nov., a marine bacterium isolated from the East Sea, Korea. **I J Sistematic Evolucionary Microbiology**, v.57, ed.4. Abril, 2007. Disponível em: <<https://doi.org/10.1099/ijms.0.64267-0>>. Acesso em 26 ago. 2021.

SAJJAD W. et al. Pigment production by cold-adapted bacteria and fungi: colorful tale of cryosphere with wide range applications. **Extremophiles**.v.24, ed.4, p 447-473. Junho, 2020 Disponível em: <<https://www.readcube.com/articles/10.1007%2Fs00792-020-01180-2>>. Acesso em 26 ago. 2021.

SANCHEZ AC et al. Heterologous expression and biochemical characterization of a novel cold-active  $\alpha$ -amylase from the Antarctic bacteria *Pseudoalteromonas* sp. 2-3. **Protein Expr Purif**, v.155, p.78-85. Março, 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30496815/>>. Acesso em 25 ago. 2021.

SAYED AM. et al. Extreme environments: microbiology leading to specialized metabolites. **J Appl Microbiol**. Março, 2020 v.128, n.3, p.630-657. Disponível em: <<https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/jam.14386>>. Acesso em 25 ago. 2021.

SCHORTGEN F. Fever in sepsis. **Minerva Anesthesiol**, v.78, ed.1, n.1254-64. Novembro, 2012

SCOTT LC et al. Antibiotic Resistance in Minimally Human-Impacted Environments. **Int Journal of Env Research and Public Health** v.17, ed.11. Junho, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/ijerph17113939>>. Acesso em 25 ago. 2021.

SEE-TOO WS et al. Complete genome of *Arthrobacter alpinus* strain R3. 8, bioremediation potential unraveled with genomic analysis. **Standards in genomic sciences**, v.12, n.52. Setembro, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s40793-017-0264-0>>. Acesso em 25 ago. 2021.

SHARMA R. et. al. Purification and Characterisation of a Thermostable Alkaline Lipase from a New Thermophilic *Bacillus* sp. RSJ-1. **Process Biochemistry**, India, v. 37, n. 10, p. 1075–1084. Maio, 2002. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(01\)00316-8](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(01)00316-8)>. Acesso em 25 ago. 2021.

SHIMADA S et al. Pathogens in Antarctic Human-Made and Natural Environments, with Special Reference to *Legionella* spp. **Appl Environ Microbiol**, v.87, ed.2, n.e02247-20. Janeiro, 2021 Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33097517/>>. Acesso em 25 ago. 2021.

SIDEBOTTOM C et al. Heat-stable antifreeze protein from grass . **Nature** v.406, ed.256. Julho, 2000. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/35018639//>>. Acesso em 25 ago. 2021.

SILVA TR. et. al. Bacteria from Antarctic environments: diversity and detection of antimicrobial, antiproliferative, and antiparasitic activities. **Polar Biology**, Campinas-SP , v.41, p.1505-1519. Março, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00300-018-2300-y//>>. Acesso em 25 ago. 2021.

SINCLAIR BJ, et al. Climatic variability and the evolution of insect freeze tolerance. **Biologicals reviews**, v.78, ed.2, p.181-195. Maio, 2007. Disponível em: <<https://doi.org/10.1017/S1464793102006024//>>. Acesso em 25 ago. 2021.

SINGH P et al. Antifreeze protein activity in Arctic cryoconite bacteria. **FEMS microbiology letters**, v.351, ed.1, p.14-22. Fevereiro, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/1574-6968.12345//>>. Acesso em 25 ago. 2021.

SMATI, M et al. “Carnobacterium divergens Bacteremia in woman.” **Emerging infectious diseases** vo.21, ed.6. Junho, 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25988484//>>. Acesso em 25 ago. 2021.

SMITH SB, Ravel J. The vaginal microbiota, host defence and reproductive physiology. **J Physiol**, v.;595, ed.2, p.451-463. Janeiro, 2017. Disponível em: <<https://physoc.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1113/JP271694/>>. Acesso em 25 ago. 2021.

STYCZYNSKI M. et al. “Genome-Based Insights into the Production of Carotenoids by Antarctic Bacteria, Planococcus sp. ANT\_H30 and Rhodococcus sp. ANT\_H53B. **Molecules** (Basel, Switzerland) v. 25, n.19, p 4357. Setembro, 2020. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1420-3049/25/19/4357/>>. Acesso em 25 ago. 2021.

SU S et al. “Catalase (KatA) plays a role in protection against anaerobic nitric oxide in Pseudomonas aeruginosa.” **PloS one**, v. 9, ed.3, n.91813. 24 Março. 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24663218/>>. Acesso em 25 ago. 2021.

SUHET MI. Hemolytic activity and resistance to antimicrobials by Aeromonas species isolated from intensive rearing of Nile tilapia (Oreochromis niloticus). **ARS Veterinaria**, Jaboticabal, SP , v.27, n.1, p. 036-044. 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.15361/2175-0106.2011v27n1p036-044>>. Acesso em 25 ago. 2021.

SUN H et al. Complete genome sequence of a psychrotrophic Arthrobacter strain A3 (CGMCC 1.8987), a novel long-chain hydrocarbons producer. **Journal of biotechnology**, v. 222, p. 23-24. Março, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.02.010>>. Acesso em 25 ago. 2021.

SUN H et al. *Sporosarcina terrae* sp. nov., isolated from orchard soil. **I J Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 67, ed. 7. Julho, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001835>>. Acesso em 25 ago. 2021.

SUN XM et al. Low temperature growth, freezing survival, and production of antifreeze protein by the plant growth promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2, Canadian Journal of Microbiology, v. 41, n. 9, p. 776-784. Setembro, 1995. Disponível em: <<https://doi.org/10.1139/m95-107>>. Acesso em 25 ago. 2021.

SURÍS-VALLS R, Voets IK. Peptidic antifreeze materials: Prospects and challenges. **Int. J. Mol. Sci**, v.20, ed.20, p.5149. Outubro, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/ijms20205149>>. Acesso em 25 ago. 2021.

TANNER K. et al. “Extremophilic microbial communities on photovoltaic panel surfaces: a two-year study.” **Microbial biotechnology** v.13, n. 6, p.1819-1830. Novembro, 2020. Disponível em: <<https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/1751-7915.13620>>. Acesso em 25 ago. 2021.

TAS RP et al. “From the freezer to the clinic: Antifreeze proteins in the preservation of cells, tissues, and organs.” **EMBO reports** v. 22, ed.3, p. e52162. Março, 2021. Disponível em: <<https://www.embopress.org/doi/full/10.15252/embr.202052162>>. Acesso em 25 ago. 2021.

TIMONEN RK.. et. al. Cold Shock Proteins: A Minireview with Special Emphasis on Cps-family of Enteropathogenic Yersinia, **Frontiers in Microbiology**, Helsinki, Finland, v.7, p. 1151, Julho, 2016. Disponível em: < <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2016.01151/full>>. Acesso em 25 ago. 2021.

TINDALL BJ. Prokaryotic Diversity in the Antarctic: The Tip of the Iceberg. **Microb Ecol**, n.47, p.271–283. Abril, 2004. Disponível em: < <https://link.springer.com/article/10.1007/s00248-003-1050-7>>. Acesso em 25 ago. 2021.

TONDO ML et al. KatE From the Bacterial Plant Pathogen *Ralstonia solanacearum* Is a Monofunctional Catalase Controlled by HrpG That Plays a Major Role in Bacterial Survival to Hydrogen Peroxide. **Front Plant Sci**, Julho, 2020. Disponível em: < <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2020.01156/full>>. Acesso em 25 ago. 2021.

TONDO ML et al. The monofunctional catalase KatE of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* is required for full virulence in citrus plants. **PLoS One**, v. 5, ed.5, p.10803. Maio, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010803>>. Acesso em 25 ago. 2021.

TROVATO M et al. Viral Emerging Diseases: Challenges in Developing Vaccination Strategies. **Front Immunol**, v.11. Setembro, 2020. Disponível em: < <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2020.02130/full>>. Acesso em 25 ago. 2021.

ULLOA NC et al. Resistencia a antibióticos en bacterias recolectadas en agua de mar en las proximidades de bases antárticas. **Anales Instituto Patagonia**, Punta Arenas, v.46, n.3. Dezembro, 2018. Disponível em: <[https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S0718-686X2018000300029&lng=pt&nrm=iso](https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0718-686X2018000300029&lng=pt&nrm=iso)>. Acesso em 25 ago. 2021.

URBAŃCZYK M et al. Antifreeze glycopeptides: from structure and activity studies to current approach in chemical stents, **Amino Acids**, v.49, p.209–222. Dezembro, 2017. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s00726-016-2368-z>>. Acesso em 25 ago. 2021.

USTUN NS, Turhan, S. Antifreeze Proteins: Characteristics, Function, Mechanism of Action, Sources and Application to Foods. **J. Food Process. Preserv**, v.39, ed.6 p. 3189–3197. Dezembro, 2015. Disponível em: < <https://www.readcube.com/articles/10.1111/jfpp.12476>>. Acesso em 25 ago. 2021.

VALLESI A et al. Uma nova espécie de  $\gamma$ -Proteobacterium *Francisella*, *F. adeliensis* Sp. Nov., Endocytobiont in an Antarctic Marine Ciliate and Potential Evolutionary Forerunner of Pathogenic

Species. **Microb Ecol**, v. 77, p: 587–596 (2019). Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s00248-018-1256-3>>. Acesso em 25 ago. 2021.

VAN SOOLINGEN D et al. Ocorrência e estabilidade de sequências de inserção em cepas do complexo *Mycobacterium tuberculosis*: avaliação de um polimorfismo de DNA dependente da sequência de inserção como ferramenta na epidemiologia da tuberculose. **J clin microbiol**. v. 29, n. 11, pág. 2578-2586, 1991.

VELICKOVA E et al. Effect of vacuum infused cryoprotectants on the freezing tolerance of strawberry tissues. **LWT - Food Science and Technology**, v.52, ed.2, p.146-150. Julho, 2013. Disponível em: <[https://www.researchgate.net/publication/251483749\\_Effect\\_of\\_vacuum\\_infused\\_cryoprotectants\\_on\\_the\\_freezing\\_tolerance\\_of\\_strawberry\\_tissues](https://www.researchgate.net/publication/251483749_Effect_of_vacuum_infused_cryoprotectants_on_the_freezing_tolerance_of_strawberry_tissues)>. Acesso em 25 ago. 2021.

VENKETESH S, Dayananda C. Properties, Potential, and Prospects of Antifreeze Proteins. **Crit. Rev. Biotechnol**, v.28, ed.1, p.57-82. Outubro, 2008. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/07388550801891152?journalCode=ibty20>>. Acesso em 25 ago. 2021.

VERMELHO AB et al. Diversity and biotechnological applications of prokaryotic enzymes. In: Rosenberg E., DeeLong E.F., Lory S., Stackebrandt E., Thompson F., editors. **The Prokaryotes**, Berlin, Germany. p. 213–240, 2013.

VIEIRA, FB. O Tratado da Antártica: Perspectivas Territorialista e Internacionalista. **Brazilian Journal of Latin American Studies**, v.5, ed.9, p.49-82. Novembro, 2006. Disponível em: <<https://www.revistas.usp.br/prolam/article/view/81808>>. Acesso em 25 ago. 2021.

VOETS IK. From ice-binding proteins to bio-inspired antifreeze materials. **Royal Society of Chemistry**. V.13, ed.28, p. 4808-4823. Junho, 2017. Disponível em: <<https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2017/sm/c6sm02867e>>. Acesso em 25 ago. 2021.

WANG LH et al. The stability during low-temperature storage of an antifreeze protein isolated from the roots of cold-acclimated carrots. **Cryobiology**, Amsterdam, v. 44, n. 3, p. 307-310, 2002. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12237096/>. Acesso em 25 ago. 2021.

WEBSTER NS et al. Bacterial community dynamics in the marine sponge *Rhopaloeides odorabile* under in situ and ex situ cultivation. **Mar. Biotechnol**, v.13, p.296–304. Abril, 2001. Disponível em: <https://espace.library.uq.edu.au/view/UQ:718184>. Acesso em 25 ago. 2021.

WHALEY D et al. “Cryopreservation: An Overview of Principles and Cell-Specific Considerations.” **Cell transplantation** v. 30, 963689721999617. Março, 2021. Disponível em: <<https://journals.sagepub.com/doi/full/10.1177/0963689721999617>> . Acesso em 25 ago. 2021.

WILSON SL et al. Ice-active characteristics of soil bacteria selected by ice-affinity, **Env Microbiology**, v.8, n.10, p. 1816–1824, Junho, 2006. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16958762/>>. Acesso em 25 ago. 2021.

WIRTH SE et al. *Psychrobacter sanguinis* sp. nov., recovered from four clinical specimens over a 4-year period. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 62, p.49-54. Janeiro de 2012.

WU Z et al. Biofilm, ice recrystallization inhibition and freeze-thaw protection in an epiphyte community. **Appl Biochem Microbiol**, v.48, p.363–370 Julho, 2012. < Disponível em:

<[https://www.researchgate.net/publication/232085183\\_Biofilm\\_ice\\_recrystallization\\_inhibition\\_and\\_freeze-thaw\\_protection\\_in\\_an\\_epiphyte\\_community](https://www.researchgate.net/publication/232085183_Biofilm_ice_recrystallization_inhibition_and_freeze-thaw_protection_in_an_epiphyte_community)> Acesso em 25 ago. 2021.

XAVIER R et al. Tolerância de Rizóbio de feijão-caupi a salinidade e a temperatura em condição in vitro. **Rev Caatinga**, v.20, n.4, p. 1-9. Dezembro, 2007.

YAMAMOTO K et al. Bacteremia due to *Arthrobacter creatinolyticus* in an elderly diabetic man with acute cholangitis. **J J Infec Diseases**, v.70, n.2, p.201-202, 2017. Disponível em: <[https://www.jstage.jst.go.jp/article/yoken/70/2/70\\_JJID.2016.033/\\_article](https://www.jstage.jst.go.jp/article/yoken/70/2/70_JJID.2016.033/_article)>. Acesso em 25 ago. 2021.

YONG Yu et al. *Sporosarcina antarctica* sp. nov., a psychrophilic bacterium isolated from the Antarctic. **Microbiology Society**, v.58, ed.9. Setembro, 2008. Disponível em: <<https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijjs.0.65838-0#tab2>>. Acesso em 25 ago. 2021.

YOSHIDA K et al. “Cryoprotective enhancing effect of very low concentration of trehalose on the functions of primary rat hepatocytes.” **Regenerative therapy** v. 15, p.173-179. Setembro, 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2352320420300687> Acesso em 25 ago. 2021.

YUAN K et al. Chen B. Metagenomic characterization of antibiotic resistance genes in Antarctic soils. **Ecotoxicol Environ Saf**, v. 30, ed.176, p.300-308. Julho, 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30947033/>>. Acesso em 25 ago. 2021.

ZHANG Y, Calderwood SK. Autophagy, protein aggregation and hyperthermia: a mini-review. **Int J Hyperthermia**, v.27, ed.5, n.409-14. 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4083499>> Acesso em 25 ago. 2021.

ZHU, S et al. “Complete Genome Sequence of Hemolysin-Containing *Carnobacterium* sp. Strain CP1 Isolated from the Antarctic.” **Genome announcements** v.4, ed.4 e00690-16. Julho, 2016. Disponível em: <<https://journals.asm.org/doi/10.1128/genomeA.00690-16>> Acesso em 25 ago. 2021.

ZIDNI, I. et al. “Effects of Cryoprotective Medium Composition, Dilution Ratio, and Freezing Rates on Spotted Halibut (*Verasper variegatus*) Sperm Cryopreservation.” **Animals : an open access journal from MDPI** v. 10,11 2153. 19 Novembro, 2020. Disponível em: <https://www.readcube.com/articles/10.3390%2Fani10112153>. Acesso em 25 ago. 2021.

ZUCCONI L. et al. Extracellular Enzymes and Bioactive Compounds from Antarctic Terrestrial Fungi for Bioprospecting. **Int J Environ Res Public Health**, v.17, ed.18, n.6459. Setembro, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/ijerph17186459>>. Acesso em 25 ago. 2021.