



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E BIOCÊNCIAS

Joana Camila Lopes

PROSPECÇÃO DE PROTEÍNAS ANTICONGELANTES (AFP) EM MICRORGANISMOS  
DA ANTÁRTICA VISANDO APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS

Florianópolis

2020

Joana Camila Lopes

PROSPECÇÃO DE PROTEÍNAS ANTICONGELANTES (AFP) EM MICRORGANISMOS  
DA ANTÁRTICA VISANDO APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS

Dissertação submetida ao Programa de Pós-  
Graduação em Biotecnologia e Biociências da  
Universidade Federal de Santa Catarina para a  
obtenção do Grau de Mestre em Biotecnologia  
e Biociências; área de  
concentração: Microbiologia  
Orientador: Prof. Dr. Rubens Tadeu Delgado  
Duarte

Florianópolis  
2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Lopes, Joana Camila  
PROSPECÇÃO DE PROTEÍNAS ANTICONGELANTES (AFP) EM  
MICROORGANISMOS DA ANTÁRTICA VISANDO APLICAÇÕES  
BIOTECNOLÓGICAS / Joana Camila Lopes ; orientador, Rubens  
Tadeu Delgado Duarte, 2020.  
114 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós  
Graduação em Biotecnologia e Biociências, Florianópolis,  
2020.

Inclui referências.

1. Biotecnologia e Biociências. 2. proteínas  
anticongelantes. 3. Antártica. 4. microrganismos. 5.  
extremófilos. I. Duarte, Rubens Tadeu Delgado . II.  
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós  
Graduação em Biotecnologia e Biociências. III. Título.

Joana Camila Lopes

PROSPECÇÃO DE PROTEÍNAS ANTICONGELANTES (AFP) EM MICRORGANISMOS  
DA ANTÁRTICA VISANDO APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora  
composta pelos seguintes membros:

Prof.(a) Diogo Robl, Dr.(a)

Instituição UFSC

Prof.(a) Amanda Gonçalves Bendia, Dr.(a)

Instituição USP

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado  
adequado para obtenção do título de “Mestre em Biotecnologia e Biociências” e aprovada em  
sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências.

---

Prof.(a) Glauber Wagner , Dr.(a)

Coordenador(a) do Programa

---

Prof.(a) Rubens Tadeu Delgado Duarte, Dr.(a)

Orientador(a)

Florianópolis, 2020.

*“O papel do infinitamente pequeno na natureza é infinitamente grande”  
Louis Pasteur*

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente aos meus pais, por tornar esse sonho possível.

Agradecer ao meu namorado Thiago pelo apoio nesses dois anos de mestrado.

Agradecer aos meus sogros, Márcia e Luís, pelo apoio.

Agradecer ao Professor Rubens pelo apoio, incentivo e ensinamentos em microbiologia.

Agradecer ao Professor Diogo pelos ensinamentos na área de proteínas.

Agradecer à Sheila por compartilhar todos os momentos bons e ruins no laboratório.

Agradecer ao Lander por ajudar com a parte de biologia molecular.

Agradecer à Paola e Renata pela ajuda com a parte de proteínas.

Agradecer à Sayonara e Rosane pela companhia e apoio.

Agradecer à Juliana pela ajuda com a parte de identificação e filogenia.

Agradecer às meninas do LEMEx (Camila, Bruna, Mariana, Marianne, Allana, Aline e Cândice) por todo apoio.

Agradecer ao LAMEB pelo uso dos equipamentos e tornar os experimentos possíveis.

Agradecer ao laboratório de Protozoologia, em especial a Professora Patrícia e o Professor Mário.

## RESUMO

Aproximadamente 80% da Biosfera está a temperaturas abaixo dos 15 °C. Microrganismos nestas condições apresentam uma série de adaptações morfológicas e fisiológicas que surgiram ao longo da evolução em organismos que vivem nestas condições de extremo frio. Ecossistemas com temperaturas permanentemente ou sazonalmente abaixo de zero abrigam microrganismos que toleram a falta de água líquida para o metabolismo, bem como espécies resistentes ao congelamento. Algumas proteínas foram identificadas como inibidoras de formação de gelo intracelular, denominadas de proteínas anticongelantes - antifreeze proteins (AFP). Estas proteínas têm ação na modificação da estrutura do cristal de gelo, diminuem o ponto de congelamento e inibem a atividade de recristalização. O objetivo do estudo foi isolar e identificar bactérias da Antártica produtoras de proteínas anticongelantes (AFP), caracterizando qualitativamente a produção de AFP para fins biotecnológicos. Foram isolados 165 microrganismos, dos quais 106 foram identificados por meio do sequenciamento do gene RNAr 16S e 135 extratos proteicos bacterianos foram submetidos ao teste de Inibição de Recristalização (IR). Os resultados indicaram um total de 7 isolados foram positivos para a produção de proteínas anticongelantes. Esses isolados foram caracterizados quanto a coloração de Gram, que indicou que os isolados FBGS3001, BGS3002, P27, P46, P48 são bactérias Gram negativas, enquanto BGS03 é Gram positiva. Os três isolados positivos e 37 não positivos foram submetidos ao teste de resistência ao congelamento. Os resultados indicaram que alguns isolados apresentaram 50% de sobrevivência na contagem de UFC antes e depois do congelamento 1 isolado positivo e 11 isolados não positivos no teste IR. Esses resultados apresentados indicam o potencial de microrganismos para a presença de AFP e resistência ao congelamento que podem ser usadas para fins biotecnológicos futuramente.

Palavras chave: *Antártica, microrganismos, proteínas anticongelantes*

## ABSTRACT

Approximately 80% of the Biosphere is at temperatures below 15 °C. Microorganisms in these conditions have a series of morphological and physiological adaptations that have emerged over the course of evolution in organisms that live in these extremely cold conditions. Ecosystems with temperatures permanently or seasonally below zero are habitat to microorganisms that tolerate lack of liquid water for metabolism, as well as resistant to freezing species. Some proteins have been identified as inhibitors of intracellular ice formation, called antifreeze proteins - antifreeze proteins (AFP). These proteins act to modify the structure of the ice crystals, decrease the freezing point and inhibit the recrystallization activity. The objective of the study was to isolate and identify Antarctic bacteria that produce antifreeze proteins (AFP), qualitatively characterizing the production of AFP for biotechnological purposes. A total of 165 microorganisms were selected, 106 of which were used for sequencing the 16S rRNA gene and 135 bacterial protein extracts were subjected to the recrystallization inhibition (IR) test. The results indicated a total of 7 isolates were positive for the production of antifreeze proteins. These isolates were characterized for Gram staining, which indicated that isolates FBGS3001, BGS3002, P27, P46, P48 are Gram negative bacteria, while BGS03 is Gram positive. The three positive and 37 non-positive isolates were submitted to the freeze resistance test. The results indicated that some isolates had more 50% the survive in UFC count dilution before and after freezing 1 positive isolate and 11 non-positive isolates in the IR test. These results show the potential of microorganisms for the presence of AFP and resistance to freezing that can be used for biotechnological purposes in the future.

Keywords: *Antarctica, microorganisms, antifreeze proteins*



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Mapa da Antártica mostrando as zonas morfológicas: oriental, ocidental e península.....	19
<b>Figura 2.</b> Modelo de inibição-adsorção da atividade anticongelante. Representação esquemática do (a) modelo original no sentido da direção lateral (pinagem) e (b) modelo adaptado da inibição-adsorção no sentido da direção normal por fixação na superfície. ....	23
<b>Figura 3.</b> Locais de ligação de algumas proteínas anticongelantes a superfícies de cristais de gelo e formas de cristais de gelo.....	24
<b>Figura 4.</b> Atividade anticongelante de <i>Flavobacterium xanthum</i> . Atividade de inibição de recristalização do extrato proteico (0,1 mg.mL <sup>-1</sup> ) comparado ao controle após 30 minutos. ..	26
<b>Figura 5.</b> Platina acoplada a um microscópio. A – tubos conectados no microscópio, B- platina de resfriamento e C- modelo esquemático da platina.....	28
<b>Figura 6.</b> Atividade anticongelante de <i>Flavobacterium xanthum</i> . a) Cristal de gelo observado à temperatura próxima ao ponto de fusão, b) controle com água destilada e c) crescimento de um cristal dendrítico no extrato proteico a 0.1 mg/mL. ....	29
<b>Figura 7.</b> Visão geral das estruturas de AFP e sua atividade de ligação de gelo: hiperativa ou moderadamente ativa. A – proteínas anticongelantes que não possuem o domínio DUF3494 , B- proteínas anticongelantes que possuem o domínio DUF3494. Quadrados vermelho -peixes, triângulos verdes - plantas, hexágonos azuis- insetos, estrelas azuis - artrópodes e círculos – microorganismos. ....	30
<b>Figura 8.</b> Simulação da proteína anticongelante (sbwAFP) em uma superfície de gelo que ilustra o efeito Gibbs-Thomson. Três moléculas do sbwAFP são mostradas ligadas à superfície do gelo. O gelo (padrão hexagonal) se eleva entre as AFP adsorvidas à medida que a temperatura cai. Os hexágonos são moléculas de água e as AFP estão representadas em colorido.....	33
<b>Figura 9.</b> AFP alfa-hélice. A) wfAFP tipo I do peixe solha de inverno; b) Representação de um plano piramidal e das moléculas que interagem com o local de ligação ao gelo do wfAFP em uma estrutura hexagonal de um cristal de gelo com quatro vetores indicados: eixo c-prisma e vetores - a1, a2 e a3.....	34
<b>Figura 10.</b> Visão geral de várias AFP com estrutura secundária de β-hélice. (a) proteína de inseto TmAFP; b) proteína de inseto RiAFP; (c) proteína de planta lpAFP e (d) proteína de bactéria dependente de cálcio MpAFP. ....	35

<b>Figura 11.</b> Hélice de Poliprolina II contendo AFP e glicoproteínas anticongelantes. a) figura mostrando seis hélices curtas de poliprolina do tipo II; b) Estrutura química das AFGP. ....	36
<b>Figura 12.</b> Localização dos pontos de coleta. A- localização da Península Antártica, B- Ilha Rei George e C- pontos amostrados no estudo. Os triângulos representam as geleiras Collins e Baranowski, o pentágono representa o permafrost e círculo representa o sedimento marinho. Base de dados: Quantartica, 2017. Sistema de referência de coordenadas: WGS_84_Antarctic_Polar_Stereographic; Projeção: Stereographic_South_Pole; Sistema de Coordenada Geográfica: GCS_WGS_1984; e Datum: D_WGS_1984 (Mapa elaborado por Joana Camila Lopes e MSc Thiago Fossile). ....	50
<b>Figura 13.</b> Pontos de coleta de solo na geleira Baranowski. Base de dados: Quantartica, 2017. Sistema de referência de coordenadas: WGS_84_Antarctic_Polar_Stereographic; Projeção: Stereographic_South_Pole; Sistema de Coordenada Geográfica: GCS_WGS_1984; e Datum: D_WGS_1984 (Mapa elaborado por Joana Camila Lopes e MSc Thiago Fossile). ....	51
<b>Figura 14.</b> Pontos de coleta de solo na geleira Collins. Base de dados: Quantartica, 2017. Sistema de referência de coordenadas: WGS_84_Antarctic_Polar_Stereographic; Projeção: Stereographic_South_Pole; Sistema de Coordenada Geográfica: GCS_WGS_1984; e Datum: D_WGS_1984 (Mapa elaborado por Joana Camila Lopes e MSc Thiago Fossile). ....	52
<b>Figura 15.</b> Pontos de coleta de sedimento marinho e permafrost. Base de dados: Quantartica, 2017. Sistema de referência de coordenadas: WGS_84_Antarctic_Polar_Stereographic; Projeção: Stereographic_South_Pole; Sistema de Coordenada Geográfica: GCS_WGS_1984; e Datum: D_WGS_1984 (Mapa elaborado por Joana Camila Lopes e MSc Thiago Fossile). ....	53
<b>Figura 16.</b> Dendograma dos padrões de bandas do isolados. ....	61
<b>Figura 17.</b> Gêneros identificados em relação ao número de isolados. ....	62
<b>Figura 18.</b> Número de isolados identificados em relação as amostras da Antártica ....	69
<b>Figura 19.</b> Meios de cultura em relação ao número de isolados identificados. ....	69
<b>Figura 20.</b> Relação de número de isolados e temperatura de incubação. ....	70
<b>Figura 21.</b> Gêneros identificados em relação ao número de isolados a 25 °C. ....	71
<b>Figura 22.</b> Gêneros identificados em relação ao número de isolados a 15 °C. ....	71
<b>Figura 23.</b> Varredura das concentrações da AFP tipo III. ....	86
<b>Figura 24.</b> Varredura da proteína albumina do soro bovino (BSA) ....	87
<b>Figura 25.</b> Comparação das varreduras do controle positivo (AFP III) e dos controles negativos (Branco, BSA e E. coli). ....	87
<b>Figura 26.</b> Leitura de diferentes concentrações de AFP III e BSA a 500 nm. ....	88
<b>Figura 27.</b> Extratos proteicos bacterianos positivos para AFP no teste IR. ....	89

<b>Figura 28.</b> Extratos proteicos bacterianos positivos para AFP no teste IR. ....	89
<b>Figura 29.</b> Coloração de gram dos isolados positivos no teste IR. A- BGS3002; B- BGS03; C- FBGS3001; D- M1 25°C e E- P27.....	92
<b>Figura 30.</b> Árvore filogenética dos isolados da Antártica com base na sequência do gene RNAr 16S. ....	94
<b>Figura 31.</b> Relação de isolados e sobrevivência ao congelamento.....	95

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Resumo da atividade IR e TH em bactérias.....	44
<b>Tabela 2.</b> Coordenadas dos pontos amostrados na frente das geleiras. Amostras “C” indicam solos da Geleira Collins, enquanto amostras “BGS” indicam aquelas coletadas na Geleira Baranowski. Datum: WGS84 .....	48
<b>Tabela 3.</b> Coordenadas dos pontos amostrados de sedimento marinho e permafrost. Datum: WGS84 .....	49
<b>Tabela 4.</b> Número de isolados em relação ao meio de cultura utilizado .....	59
<b>Tabela 5.</b> Número de isolados em relação a temperatura .....	59
<b>Tabela 6.</b> Identificação dos isolados pela região de RNAr 16S. ....	63
<b>Tabela 7.</b> Grupos de bactérias identificados pela região do RNAr 16S encontrados na literatura e neste estudo. ....	81
<b>Tabela 8.</b> Relação de gêneros identificados e o gradiente da geleira Collins.....	82
<b>Tabela 9.</b> Relação de gêneros identificados e o gradiente da geleira Baranowski .....	82
<b>Tabela 10.</b> Identificação dos isolados e sua respectiva fonte de isolamento .....	96

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFP – *anti-freeze proteins* (proteínas anticongelantes)

AFPG – glicoproteínas anticongelantes

IR – Inibição de Recristalização

TH – Histerese Termal

INP – *Ice nucleating proteins*

IBP – *Ice Binding proteins*

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	15
2. OBJETIVOS .....	17
2.1 Objetivo geral.....	17
2.2 Objetivos específicos.....	17
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
3.1 Ambientes extremos.....	18
3.2 Microrganismos adaptados ao frio .....	20
3.3 Características físico-química do congelamento da água .....	21
3.4 Proteínas anticongelante (AFP).....	22
3.4.1 Atividade de Inibição de Recristalização (IR).....	25
3.4.2 Atividade de Histerese Termal (TH).....	27
3.4.3 Mecanismos de ligação ao gelo das proteínas anticongelantes .....	32
3.4.4 Estrutura das proteínas anticongelantes .....	34
3.5 Diversidade de Proteínas anticongelantes .....	36
3.5.1 Proteínas anticongelantes em animais.....	37
3.5.2 Proteínas anticongelantes em algas .....	38
3.5.3 Proteínas anticongelantes em fungos .....	39
3.5.4 Proteínas anticongelantes em bactérias .....	40
3.6 Aplicações biotecnológicas .....	45
4. METODOLOGIA .....	48
4.1 Amostras ambientais da Antártica.....	48
4.2 Isolamento e caracterização de bactérias.....	53
4.3 Seleção e identificação dos isolados por biologia molecular .....	55
4.3 Seleção ( <i>screening</i> ) de bactérias produtoras de AFP pela atividade inibidora de recristalização	56
4.4 Teste de sobrevivência ao congelamento .....	58
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	59
5.1 Isolamento e identificação dos isolados.....	59
5.2 Seleção de bactérias produtoras de AFP .....	86
5.2.1 Varredura do controle positivo e negativo .....	86
5.2.2 Ensaio de Inibição de Recristalização .....	88
5.2.3 Teste de sobrevivência ao congelamento .....	95
6. CONCLUSÕES.....	97
7. REFERÊNCIAS .....	98

## 1. INTRODUÇÃO

Ambientes extremos são descritos como locais onde um ou mais parâmetros ambientais estão próximos dos níveis inferiores ou superiores dos limites conhecidos por sustentar a vida (DUARTE et al., 2012). Nesses ambientes encontram-se microrganismos que toleram esse amplo espectro de parâmetros ambientais e são chamados de extremófilos. Extremófilos são definidos como organismos adaptados a ambientes extremos, capazes de operar metabolicamente e bioquimicamente a estas condições (MERINO et al., 2019).

A temperatura na superfície da Terra pode variar de  $-89\text{ }^{\circ}\text{C}$  em locais ultra-frios na Antártida Oriental (SCAMBOS et al., 2018) a  $495\text{ }^{\circ}\text{C}$  nas fontes hidrotermais oceânicas (MCDERMOTT et al., 2018), sendo que a faixa de temperatura em que os microrganismos são metabolicamente ativos está atualmente entre  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  a  $122\text{ }^{\circ}\text{C}$  (TAKAI et al., 2008; MYKYTCZUK et al., 2012; MYKYTCZUK et al., 2013).

Os ecossistemas terrestres na Antártica são caracterizados por condições ambientais extremas, que resultam em ambientes com poucos nutrientes, expostos ao congelamento e à falta de água líquida (KIM et al., 2019). Em ambientes permanentemente ou sazonalmente congelados como a Antártica, bactérias são expostas várias condições extremas. Nestes ambientes, o acesso à água líquida torna-se escasso devido à desidratação, dessecação ou alteração do estado físico na formação de cristais de gelo, representando uma grave ameaça à sobrevivência dos organismos (BEALL, 1983). Esses microrganismos apresentam uma série de adaptações tais como eficiente metabolismo em baixas temperaturas, manutenção da fluidez da membrana plasmática, proteção de biomoléculas contra o congelamento, entre outras estratégias (CHRISTNER, 2010). Estas adaptações surgiram ao longo da evolução dos organismos que frequentam regiões frias como geleiras, solos, lagos e o ambiente marinho da Antártica e do Ártico. Nestas regiões predominam diversas populações bacterianas adaptadas estritamente (psicrofílicas) ou moderadamente (psicrotróficas) às baixas temperaturas, e que modulam seu metabolismo principalmente em função da disponibilidade de água líquida.

Algumas bactérias podem produzir proteínas que interagem com a água e influenciam a dinâmica do seu estado físico. Enquanto algumas proteínas apresentam alto nível de nucleação de gelo, outras podem inibir a formação de cristais de gelo intra ou extracelular, evitando danos a integridade e funcionamento da célula (RUSSELL, 1997; CHATTOPADHYAY, 2006).

As proteínas capazes de inibir a formação do gelo são chamadas de *proteínas anticongelantes* (*antifreeze proteins* - AFP) ou *proteínas de ligação ao gelo* (*ice binding*

*proteins* - IBP). As AFPs foram inicialmente descobertas no plasma sanguíneo de peixes antárticos que vivem a baixas temperaturas (DEVRIES; KOMATSU; FEENEY, 1970), mas estão presentes também em plantas (GRIFFITH et al., 1992), insetos (WU et al., 1991), fungos (HOSHINO et al. 2003; LEE et al. 2010; XIAO et al. 2010) e bactérias (DUMAN & OLSEN, 1993; SUN et al., 1995; XU et al., 1998; MILLS, 1999; KAWAHARA et al., 2001; RAYMOND & FRITSEN, 2001; YAMASHITA et al., 2002).

Segundo Gilbert et al. (2004), a origem e evolução das AFP provavelmente está correlacionada à adaptação dos organismos submetidos a períodos regulares de baixa temperatura e congelamento. As regiões polares, que possuem temperatura continuamente abaixo dos 10 °C, são ambientes que naturalmente exercem pressão seletiva para a evolução das AFP de bactérias extremófilas.

Apesar de existir uma grande variedade de bactérias produtoras de AFP, ainda existem poucos estudos que elucidam o papel destas proteínas na sobrevivência e adaptação das bactérias ao frio extremo. Além disso, as AFP bacterianas apresentam um enorme potencial a ser explorado para fins biotecnológicos nas áreas da saúde, da agricultura e da indústria.



## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Obter e caracterizar bactérias da Antártica capazes de produzir proteínas anticongelantes (AFP), caracterizando quali- e quantitativamente, e selecionar bactérias produtoras de AFP que apresentem potencial biotecnológico

### 2.2 Objetivos específicos

- a) Isolar, a partir de amostras de solo das Geleiras Collins e Baranowski, *permafrost* e musgos da Ilha Rei George na Antártica, microrganismos adaptados ao crescimento em baixas (psicrofílicas e psicrotolerantes), e médias (mesofílicas) temperaturas;
- b) Avaliar qualitativamente a produção de AFP nos diferentes isolados bacterianos, selecionando linhagens produtoras de AFP para ensaios quantitativos;
- c) Identificar os isolados bacterianos através de métodos moleculares (sequenciamento do gene RNAr 16S);
- d) Avaliar a sobrevivência dos isolados bacterianos ao congelamento;
- e) Quantificar o potencial anticongelante das AFP através do experimento de Inibição de Recristalização de gelo (IR).

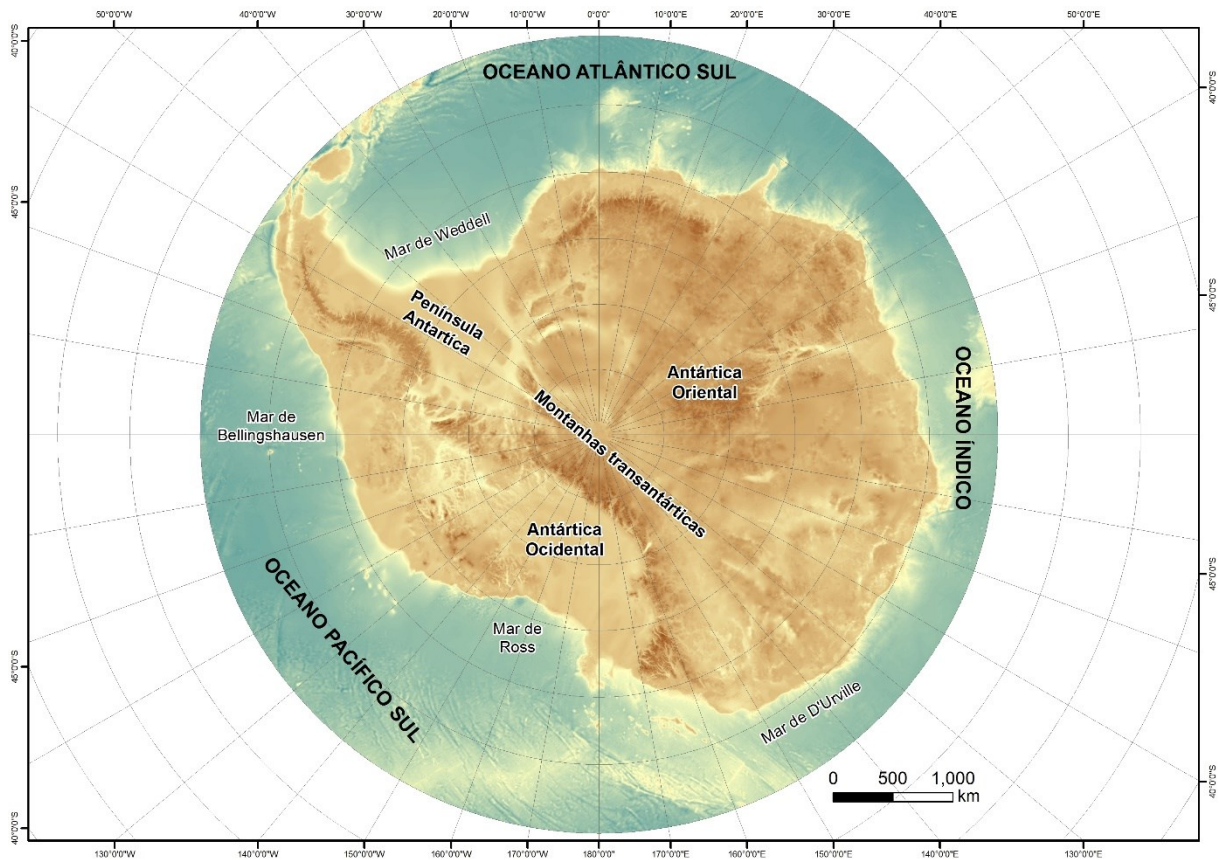
### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Ambientes extremos

Ambientes extremos são descritos como locais onde um ou mais parâmetros ambientais estão próximos dos níveis inferiores ou superiores dos limites conhecidos por sustentar a vida (DUARTE et al., 2012). Um exemplo é a temperatura, a qual na superfície do planeta Terra varia de  $-89\text{ }^{\circ}\text{C}$  em locais ultrafrios no leste da Antártica a  $495\text{ }^{\circ}\text{C}$  em fontes hidrotermais no fundo do mar (SCAMBOS et al., 2018; MCDERMOTT et al., 2018).

A Antártica é um continente caracterizado pela presença de temperaturas baixas durante o ano inteiro, com média anual de  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$  a  $-57\text{ }^{\circ}\text{C}$  na região costeira, e a menor temperatura registrada de  $-89,2\text{ }^{\circ}\text{C}$  na Estação Vostok da Rússia. A região apresenta clima seco com precipitação média de 166 mm/ano e ventos intensos, e elevação média de 2.200 m ( $14 \times 10^6\text{ km}^2$ ), que corresponde a cerca de 10% da superfície terrestre (KIM et al., 2019; TURNER et al., 2009). O continente é coberto pelo manto de gelo ( $30 \times 10^6\text{ km}^3$ ) cobrindo cerca de 99,6% do território (FOX & COOPER, 1994). O manto de gelo é composto de três zonas morfológicas distintas: a Antártica Oriental ( $10,35 \times 10^6\text{ km}^2$ ), a Antártica Ocidental ( $1,97 \times 10^6\text{ km}^2$ ) e a Península Antártica ( $0,52 \times 10^6\text{ km}^2$ ) (TURNER et al., 2009) (**Figura 1**).

**Figura 1.** Mapa da Antártica mostrando as zonas morfológicas: oriental, ocidental e península.



Fonte: Thiago Fossile e Autora

A Península Antártica é a única parte do continente que se estende de maneira significativa para o norte a partir do manto de gelo, alcançando a latitude 63 °S. É uma região montanhosa estreita que se estende no sentido norte-sul tendo influência nas circulações oceânicas e atmosféricas, com altura e largura média de 1.500 km e 70 km, respectivamente. (TURNER et al., 2009). A temperatura na Península Antártica ao longo dos anos vem aumentando devido as mudanças climáticas (CARRASCO, 2013). A região é característica pela formação de geleiras que são geradas pela deposição de neve em sua superfície, que permanece congelada durante o ano. A neve acumulada passa a comprimir as camadas mais inferiores, transformando-as em uma neve compactada chamada *firn*. Posteriormente, as pressões das camadas superiores transformam o *firn* em gelo glacial, um processo que captura os gases atmosféricos dissolvidos na geleira e servem como um registro químico de paleoclimas e ambientes passados (TURNER et al., 2009).

A Ilha Rei George é a maior ilha do arquipélago das Shetlands do Sul, localizada na Península Antártica. O verão na ilha é caracterizado por temperaturas em torno de -1.3 °C a 2.7 °C. Já o inverno é caracterizado por temperaturas em torno de -15 °C a -1 °C (FERRON;

SIMÕES; AQUINO, 2001). Cerca de 90% da Ilha Rei George é coberta por geleiras (OSMANOĞLU et al., 2013). Algumas geleiras, tais como Ecology, Collins e Baranowski, tem sido foco em estudos de retração de geleira, onde o solo é exposto a cada ano por conta das Mudanças Climáticas (DUARTE, 2010). Além dos solos expostos por derretimento e retração das geleiras, a Ilha Rei George apresenta solos permanentemente congelados chamados de *permafrost*.

O *permafrost* é definido como solo, rocha, ou outros materiais de sedimentação que permanecem abaixo de 0 °C por dois anos consecutivos (SUMGIM et al., 1940; MULLER, 1947; VAN EVERDINGEN, 1998). O solo de regiões polares é constituído por uma porção superficial chamada de camada ativa (que congela no inverno, mas está sujeita a temperaturas acima de 0 °C no verão) e camadas mais profundas que constituem o *permafrost*, as quais permanecem congeladas por milhares a milhões de anos. A camada ativa é mais estreita ou mais larga conforme a latitude do solo, por exemplo na Antártica a camada ativa tem 30-50 cm de espessura nos Vales Secos de McMurdo (latitude 77 °S) e uma espessura de 3,6 m na Ilha Rei George (latitude 62 °S). O *permafrost* varia de 240 a 900 m de espessura na Antártica continental e de 15 a 180 m de espessura na Antártica marítima, e ocorre esporadicamente nas Ilhas Shetland do Sul e nas Ilhas Órcades do Sul. A temperatura do *permafrost* é de -12 a -24 °C na Antártica continental, enquanto na Antártica marítima ele está próximo de 0 °C. Tanto o solo quanto o *permafrost* apresentam uma variedade de microrganismos que toleram ou são estritamente adaptados ao frio (TURNER et al., 2009).

### 3.2 Microrganismos adaptados ao frio

Em ambientes extremos, encontram-se microrganismos que podem sobreviver a um amplo espectro de parâmetros ambientais tais como temperatura (ex.: -20 °C à 113 °C), radiação ionizante ultravioleta, pressão (0 até 400 atm), pH (0 a 14), e a condições do espaço (MERINO et al, 2019; HORNECK et al., 2010; YAMAGISHI et al., 2018). Esses microrganismos são chamados de extremófilos, que são organismos altamente adaptados às condições do ambiente em que vivem e que são capazes de operar metabolicamente e bioquimicamente (MERINO et al, 2019). Em ambientes que estão permanentemente ou sazonalmente congelados há microrganismos que podem tolerar uma determinada faixa de temperatura. A faixa de temperatura em que os microrganismos são metabolicamente ativos está entre -20 °C a 122 °C,

e a temperatura mais baixa em que um isolado de cultura pura é capaz de crescer é de  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ , com salinidade de 18% (TAKAI et al., 2008; MYKYTCZUK et al., 2012; MYKYTCZUK et al., 2013). Os microrganismos adaptados ao frio são classificados em dois grupos: Psicofílicos são aqueles cuja temperatura ideal de crescimento é abaixo dos  $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ , mas toleram até  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; e os psicotróficos (ou psicrotolerantes) cuja temperatura ideal de crescimento está entre  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ - $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ , mas sobrevivem a  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  ou menos (MORITA, 1975).

Em ambientes permanentemente ou sazonalmente congelados como a Antártica, os microrganismos são expostos a condições extremas. Nesses ambientes, devido a temperaturas baixas, estão sujeitos a limitações físico-químicas em nível celular que influenciam de forma negativa na integridade celular, como viscosidade da água, fluidez da membrana e cinética enzimática, entre outros (RODRIGUES & TIEDJE, 2008; PIETTE et al., 2011). A sobrevivência desses organismos em tais condições depende de uma série de adaptações morfológicas e fisiológicas, como eficiente metabolismo em baixas temperaturas, manutenção da fluidez da membrana plasmática, proteção de biomoléculas contra o congelamento, otimização da cinética enzimática no frio, entre outras estratégias (CHRISTNER, 2010). O acesso à água líquida torna-se difícil devido à alteração do estado físico da água, da fase líquida para fase sólida gerando cristais de gelo, representando uma grave ameaça à sobrevivência dos organismos (BEALL, 1983).

### 3.3 Características físico-química do congelamento da água

O congelamento da água ocorre em duas etapas que consiste em um evento inicial de formação do núcleo de congelamento e o crescimento subsequente deste núcleo em um cristal macroscópico (EICKHOFF et al., 2019). Na primeira etapa os núcleos de congelamento podem ser formados pela chamada nucleação homogênea ou heterogênea, promovidas por partículas chamadas de ativadores de nucleação de congelamento – que podem ser de natureza biogênica. Na segunda etapa todos os cristais de gelo podem crescer a partir de seus núcleos de congelamento devido à ligação de moléculas de água livre (HEW & YANG, 1992). Os cristais são inicialmente formados no espaço extracelular, enquanto o espaço intracelular requer uma taxa de congelamento de  $1\text{ a }10\text{ }\mu\text{C min}^{-1}$  em bactérias (MAZUR, 1970). Taxas de congelamento acima deste valor, como na ordem de  $10\text{--}100\text{ }\mu\text{C min}^{-1}$ , podem danificar a membrana citoplasmática e comprometer a viabilidade celular (KAWAHARA, 2017). Algumas bactérias podem produzir moléculas com alto nível de nucleação de congelamento, mas também podem

produzir inibidores que tem ação direta na formação de cristais de gelo intra ou extracelular evitando danos a integridade celular bacteriana (RUSSELL, 1997; CHATTOPADHYAY, 2006).

### 3.4 Proteínas anticongelante (AFP)

Algumas substâncias como trealose, glicerol e sorbitol são classicamente conhecidas como agentes crioprotetores para células bacterianas submetidas ao congelamento (FEENEY & YIN, 1978; STOREY & STOREY, 1986). Além dessas substâncias, algumas proteínas foram identificadas com a capacidade de interagir com a água e influenciar a formação de gelo intra e extracelular. De acordo com o tipo de interação, essas proteínas podem ser classificadas em dois grupos: proteínas nucleadoras de gelo (*Ice Nucleating Proteins* – INP), que desencadeiam a formação de cristais de gelo; e proteínas anticongelante (*Antifreeze Proteins* – AFP), que impedem a formação do gelo (KAWAHARA, 2017).

Microrganismos adaptados ao frio são capazes de produzir INP e AFP para controlar a formação de gelo e a disponibilidade de água líquida para o metabolismo. Embora ambas as proteínas interajam com a água, suas funções são diferenciadas por algumas características como o tamanho. As INP são longas e formam grandes agregados na membrana celular em tamanhos de MDa (mega daltons), enquanto as AFP são tipicamente pequenas e solúveis em água. Um exemplo é a MpAFP que possui um tamanho de 1,5 MDa e que o domínio responsável pela função de ligação ao gelo tem um tamanho de 34 kDa (BAR DOLEV, BRASLAVSKY & DAVIES, 2016).

As INP estão entre os materiais mais eficientes na nucleação de congelamento (QIU et al., 2019). As INP de *Pseudomonas syringae* e *Pseudomonas borealis* se ligam ao gelo através de matrizes altamente conservadas de motivos TxT, onde T é treonina e x é um aminoácido não conservado. As AFP ligam ao gelo através dos mesmos motivos TxT que as INP (DAVIES, 2014; HUDAIT et al., 2018). Vários trabalhos têm sido relatados demonstrando o mesmo tipo de função. Um exemplo foi de Eickhoff e colaboradores (2019) que investigaram duas proteínas anticongelantes de ocorrência natural, uma de peixe, AFP tipo III, e uma de besouro, TmAFP. Os experimentos mostraram que, além da inibição do crescimento do gelo, ambos também podem desencadear a nucleação de congelamento. Outro exemplo foi de Qiu e colaboradores (2019) onde usaram simulações moleculares e a teoria da nucleação para elucidar como o tamanho, a forma, a força da ligação ao gelo e a agregação de proteínas determinam a temperatura na qual as proteínas se ligam ao gelo. Os autores demonstraram que a proteína

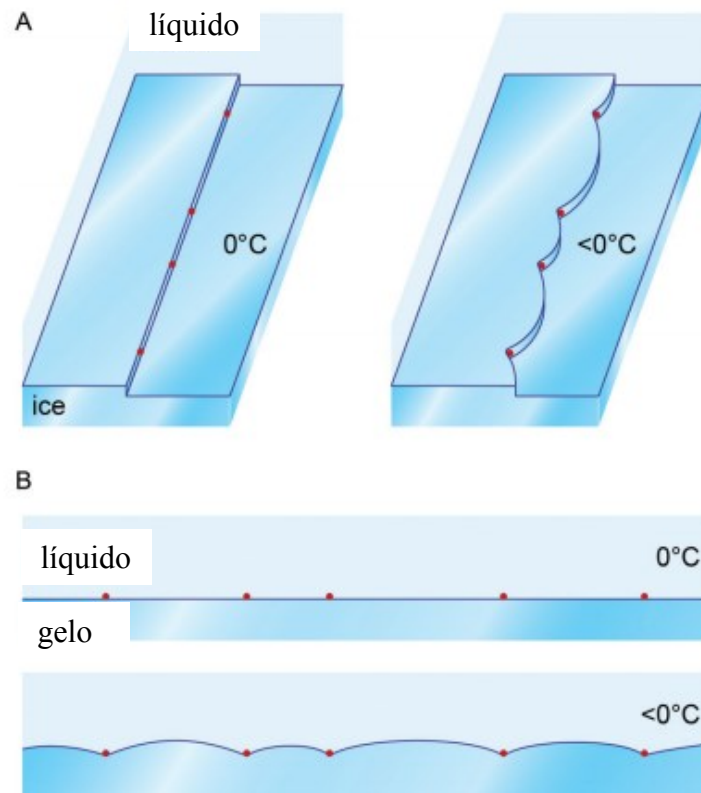
anticongelante TmAFP usa a mesma superfície de ligação ao gelo para interromper e promover o crescimento dos cristais (NAULLAGE et al., 2018).

A atividade anticongelante é a função mais importante das AFP, pois impede o crescimento de cristais de gelo pela adição de moléculas de água livre (RAHMAN, 2019). Normalmente esta atividade é quantificada pela faixa de temperatura na qual o crescimento de cristais de gelo é efetivamente bloqueado (OUDE VRIELINK et al., 2016).

A explicação físico-química da atividade anticongelante baseia-se no fato de a adsorção de AFP aumentar as curvaturas do gelo, tornando-o energeticamente menos favorável para as moléculas de água se adicionarem à estrutura de gelo (Figura 2). Esse processo resulta na diminuição do ponto de congelamento (de forma não coligativa) e um aumento no ponto de fusão que pode ser explicado pelo efeito de Gibbs-Thompson (KNIGHT, CHENG & DEVRIES, 1991).

O efeito de Gibbs-Thompson é um fenômeno onde ocorre variação no potencial químico através de uma superfície curvada ou de interface em uma superfície de gelo. Alguns fatores podem interferir na redução do ponto de congelamento como a adição de quaisquer moléculas de soluto à água o que aumenta a entropia da solução; e a energia de tensão superficial na interface água-gelo (BAR DOLEV, BRASLAVSKY & DAVIES, 2016).

**Figura 2.** Modelo de inibição-adsorção da atividade anticongelante. Representação esquemática do (a) modelo original no sentido da direção lateral (pinagem) e (b) modelo adaptado da inibição-adsorção no sentido da direção normal por fixação na superfície.

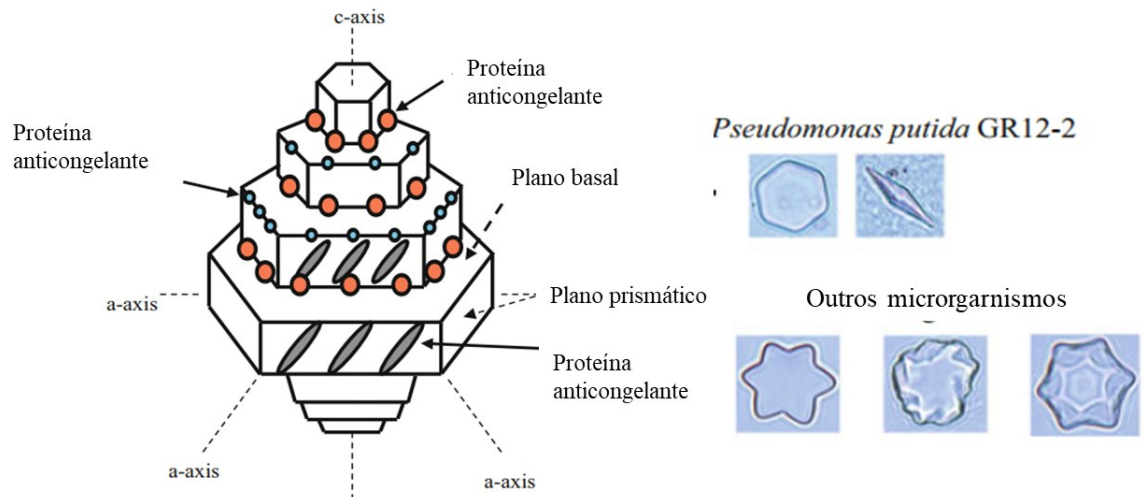


Fonte: Knight, Cheng & Devries, 1991 e Vrieling et al., 2016.

Além do efeito de Gibbs-Thompson, as AFP possuem a capacidade de adsorver um ou mais planos de gelo. O gelo, durante a sua formação, possui planos de cristais de gelo com morfologias diferentes, e as AFP ligam-se a pelo menos um dos planos. Ao se ligarem a um plano de cristal, as AFP diminuem o crescimento nas proximidades pelo mecanismo de adsorção, fornecendo mais planos de ligação para outras proteínas. A formação do gelo não é a principal função da AFP, mas uma consequência de sua adsorção. Sem a presença de AFP, o gelo é moldado em um disco plano apresentando planos basais. Já com a presença de AFP a morfologia do gelo pode ser alterada por várias formas hexagonais – planos piramidais e prismáticos (**Figura 3**) (BAR DOLEV, BRASLAVSKY & DAVIES, 2016).

**Figura 3.** Locais de ligação de algumas proteínas anticongelantes a superfícies de cristais de gelo e formas de cristais de gelo.





Fonte: KAWAHARA, 2017.

Embora tenham sido descobertas há quase 40 anos, pouco se conhece sobre o mecanismo de ação das AFP. Uma das hipóteses sugere que estas proteínas se aderem de forma complementar à superfície do gelo, inibindo seu crescimento, e que a diversidade de AFP existentes pode ser um reflexo das diversas formas de interação dessas proteínas ao gelo (JIA; DAVIES, 2002). Independente do mecanismo de ação, dois efeitos foram observados na atividade físico-química das AFP: a Inibição da Recristalização (IR) e a Histerese Termal (TH) (diminuição do ponto de congelamento).

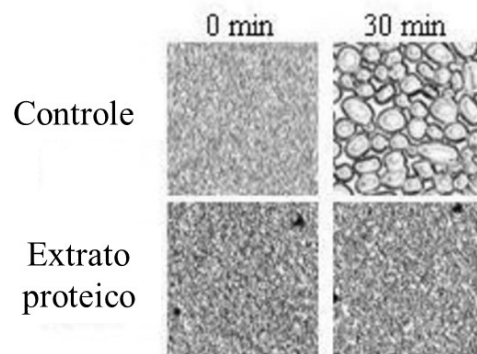
#### 3.4.1 Atividade de Inibição de Recristalização (IR)

Uma das propriedades das AFP é a inibição da recristalização do gelo (IR) em temperaturas abaixo de  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$  (KNIGHT; HALLETT; DEVRIES, 1988). A recristalização é um fenômeno na qual moléculas de água migram de cristais de gelo pequenos para cristais grandes, resultando em uma forma mais estável do gelo. A atividade IR é explicada como a propriedade de uma molécula em prevenir a formação de cristais de gelo grandes ao custo de cristais pequenos, ou seja, uma AFP com atividade IR é capaz de inibir que cristais grandes cresçam absorvendo moléculas de água dos cristais menores (KNIGHT et al. 1986).

A IR usualmente é medida através da observação do tamanho dos cristais de gelo em um microscópio de contraste de fase adaptado para funcionar em salas frias abaixo de  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  (GRIFFITH; YAISH, 2004) (**Figura 4**). Os ensaios quantitativos de IR usam solutos de baixo

peso molecular, como sais ou sacarose, para acelerar os processos de recristalização e garantir uma fração não congelada suficientemente grande para evitar falsos positivos (SURIS-VALLS & VOETS, 2019). Neste caso, a recristalização do gelo é um fenômeno observado como o aumento no tamanho do cristal de gelo em um material já congelado. Para considerar uma AFP de alto potencial, a inibição dos cristais do gelo é ocasionada em concentrações sub-milimolares, ou seja, quanto menor a concentração e maior o efeito sobre o gelo, mais eficiente é a proteína (RAHMAN et al., 2018). Nesse sentido, a função anticongelante de uma AFP tem uma origem puramente cinética, onde há especificidade na ligação ao gelo a certos planos cristalográficos de pequenos cristais que possam existir no sistema (HAJI-AKBARI, 2016).

**Figura 4.** Atividade anticongelante de *Flavobacterium xanthum*. Atividade de inibição de recristalização do extrato proteico ( $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) comparado ao controle após 30 minutos.



Fonte: KAWAHARA et al., 2007.

Um bloco de gelo é constituído por um número virtualmente infinito de cristais de gelo, cujo tamanho e forma não são uniformes (HOBBS, 1974). A taxa (ou velocidade) de recristalização é avaliada usando o princípio da Maturação de Ostwald, representado formalmente pela equação 1.

$$r^3 = r_0^3 + kt \quad (1)$$

onde  $r$  é o raio médio de um cristal de gelo,  $r_0$  é o raio médio de um cristal de gelo no tempo 0, e  $k$  é a velocidade de recristalização ( $\mu\text{m}^3 \cdot \text{min}^{-1}$ ) (HAGIWARA et al., 2006). A expansão do tamanho dos cristais de gelo rompe fisicamente a estrutura de qualquer material biológico, tanto por dentro como por fora, principalmente durante o ciclo de congelamento e degelo que ocorre em regiões polares (RAHMAN et al., 2018).

Rahman e colaboradores (2018) estudaram a eficiência da IR e a afinidade ao plano de gelo para a AFP-III tipo selvagem, uma isoforma AFPIII defeituosa e uma isoforma de AFP fúngica. Houve uma diferença significativa na eficiência da atividade IR entre as amostras, sendo que a AFP fúngica possuía a atividade com a menor concentração (0,27  $\mu\text{M}$ ) exibindo afinidade com vários planos de gelo. Esses resultados sugerem que a eficiência do IR é maximizada quando as AFP se ligam a todo um conjunto de planos do gelo.

Convencionalmente, a adsorção de proteínas em uma superfície sólida é impulsionada principalmente pelas interações polares entre os resíduos hidrofílicos da proteína e a água interfacial da superfície sólida. Chakraborty & Jana (2019) estudaram o mecanismo de reconhecimento de interface gelo-água pela AFP do tipo III. Neste estudo foi identificado que a AFP tipo III se liga a planos piramidais e não ao plano basal do gelo, sugerindo que as estruturas da proteína que se ligam ao gelo sejam hidrofóbicas.

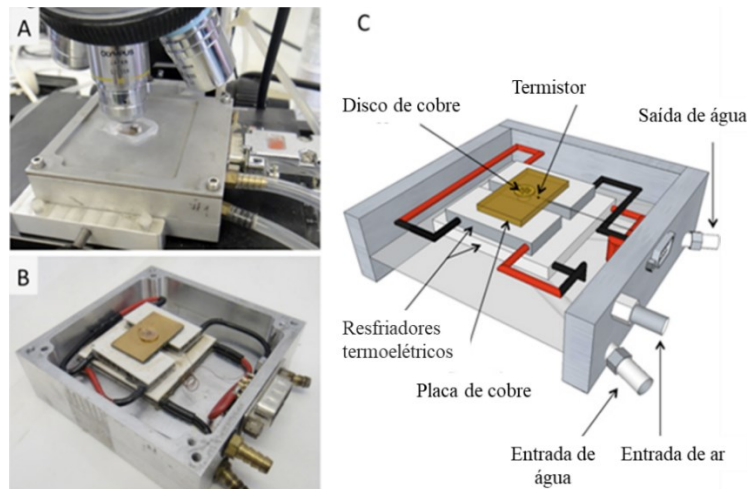
#### 3.4.2 Atividade de Histerese Termal (TH)

As AFP diminuem o ponto de congelamento da água (na presença de cristais de gelo) de forma não coligativa, isto é, a ação das AFP está restrita à diminuição da temperatura de congelamento, não tendo efeitos sobre o ponto de derretimento do gelo (BARRETT, 2001). É importante notar que para muitas substâncias o ponto de congelamento (de líquido para sólido) e de derretimento (de sólido para líquido) não necessariamente é o mesmo. Por exemplo, o mercúrio congela e derrete a exatos 234,32 K (-38,83 °C), enquanto o ágar bacteriológico derrete a 85 °C e solidifica entre 31-40 °C. Tal diferença resulta da influência de fatores como temperatura e pressão, e é denominada de Histerese Termal (*Thermal Hysteresis* - TH). No caso da água, o ponto de derretimento do gelo a 1 atm de pressão é exato 0 °C. Entretanto, na ausência de núcleos ou cristais de gelo, a água pode entrar em estado de superfusão e somente congelaria a -42 °C (MOORE; MOLINERO, 2011). Desta forma, as AFPs são moléculas com atividade TH na água, desempenhando um papel importante na sobrevivência de organismos a ambientes extremamente frios. Avaliar o efeito TH de uma proteína AFP é uma das formas de estudo da eficiência anticongelante destas proteínas (GUO et al. 2012).

O método padrão para medir a atividade TH das AFP em água (a diferença entre o ponto de fusão e a temperatura na qual o cristal de gelo começa a crescer) utiliza uma platina acoplada a um microscópio com saída de vídeo, no qual um único cristal é formado e o ponto de fusão é determinado com a análise de imagens. A temperatura do sistema é então diminuída

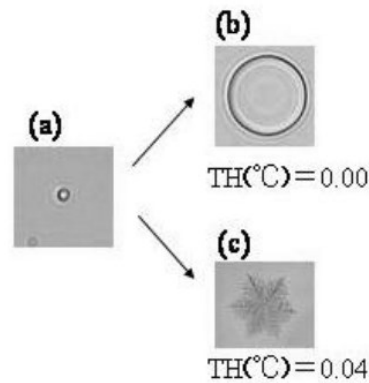
gradualmente, a uma taxa fixa, até que o cristal de gelo sofra uma súbita explosão de crescimento, o que marca o ponto de congelamento. O tempo que separa a formação de um único cristal e o início do crescimento é definido como o "tempo de exposição" do cristal. Durante o tempo de exposição, as AFP podem ser adsorvidas na superfície do cristal de gelo (KUBOTA, 2011; BRASLAVSKY & DRORI, 2013) (**Figura 5 e 6**). Na presença de proteínas com atividade TH, como no caso das AFP, a morfologia do crescimento do gelo difere consideravelmente quando comparada à do crescimento do gelo em água pura. Cristais bipirimidais e espículas colunares são formados sob condições de baixas temperaturas. Esta fixação local da superfície induz um micro curvatura do resto da superfície de gelo entre as posições fixas, e torna a associação de outras moléculas de água desfavorável do ponto de vista termodinâmico, diminuindo o ponto de congelamento da água (BARETT, 2001).

**Figura 5.** Platina acoplada a um microscópio. A – tubos conectados no microscópio, B- platina de resfriamento e C- modelo esquemático da platina.



Fonte: BRAVSLAVSKY e DRORI, 2013.

**Figura 6.** Atividade anticongelante de *Flavobacterium xanthum*. a) Cristal de gelo observado à temperatura próxima ao ponto de fusão, b) controle com água destilada e c) crescimento de um cristal dendrítico no extrato proteico a 0.1 mg/mL.

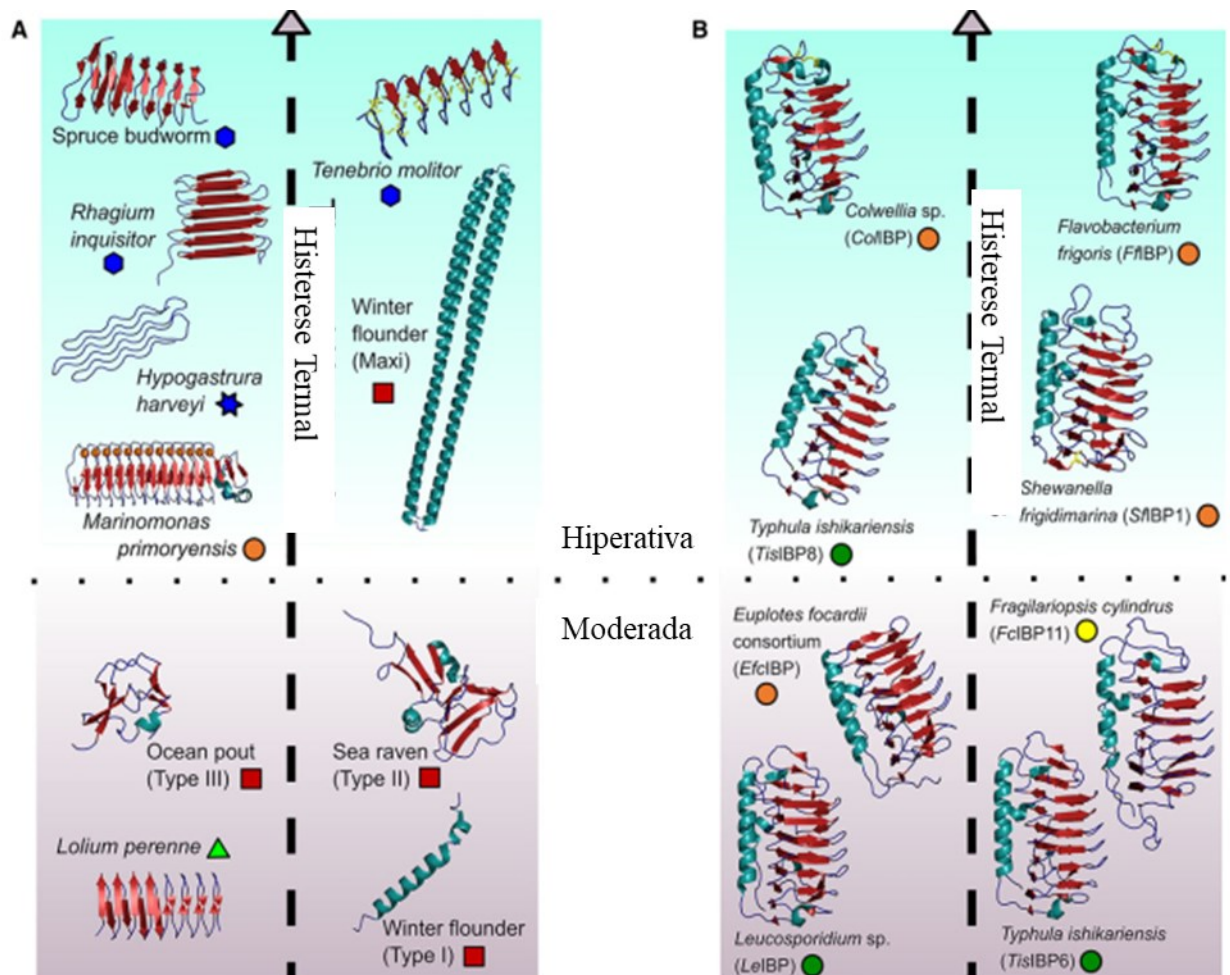


Fonte: KAWAHARA et al., 2007.

No entanto, proteínas que não apresentam TH também podem inibir a recristalização do gelo, uma vez que se ligam às extremidades do cristal e impedem a mobilidade de moléculas de água. Sendo assim, as duas propriedades já relatadas dessas proteínas não dependem uma da outra. Uma AFP pode ser positiva para o teste IR, mas não ter uma atividade TH eficiente, ou ser negativa para o teste IR e ter uma atividade TH eficiente (KNIGHT; WEN; LAURSEN, 1995).

As AFP são classificadas com base em sua eficácia na atividade TH (MANGIAGALLI et al., 2017). As AFP podem ser classificadas de acordo com o potencial de TH em hiperativas e moderadas, onde as AFPs moderadas têm TH até 1 °C em concentrações milimolares enquanto as AFP hiperativas produzem TH mais altas em concentrações micromolares (SCOTTER et al, 2006; CELIK et al., 2010). Além da concentração, o modo de ação das AFPs moderadas e hiperativas é diferente. As AFP moderadas se ligam a prismas e/ou planos piramidais, já as AFP hiperativas são eficientes em ligarem-se com o plano basal do cristal de gelo (**Figura7**) (DRORI et al., 2014; PERTAYA et al., 2008; KNIGHT et al., 1991; PARK et al., 2012; VANCE et al., 2018).

**Figura 7.** Visão geral das estruturas de AFP e sua atividade de ligação de gelo: hiperativa ou moderadamente ativa. A – proteínas anticongelantes que não possuem o domínio DUF3494, B- proteínas anticongelantes que possuem o domínio DUF3494. Quadrados vermelho -peixes, triângulos verdes - plantas, hexágonos azuis- insetos, estrelas azuis - artrópodes e círculos –microorganismos.



Fonte: VANCE et al., 2018.

Drori e colaboradores (2014) compararam a dependência do tempo da atividade TH para AFP hiperativas e moderadamente ativas. Os autores descobriram que a atividade TH de AFP hiperativas eram dependentes do tempo, enquanto a atividade de TH de uma AFP moderada era quase insensível ao tempo. Medições realizadas em microscopia de fluorescência revelaram que, apesar de sua maior atividade de TH, AFP hiperativas de dois insetos (mariposa e besouro) demoravam mais para se acumular na superfície do gelo do que uma AFP de peixe moderadamente ativa. Com esses resultados mostrou-se uma correlação entre a cinética de acumulação da AFP hiperativa no plano basal e a sensibilidade temporal da TH medida.

Drori e colaboradores (2014) testaram uma AFP hiperativa derivada da bactéria antártica *Marinomonas primoryensis* (MpAFP) de 38 kDa. A adsorção cinética de MpAFP ao gelo foram distintas da AFP III de peixe. A atividade TH foi dependente do tempo de exposição apenas em baixas concentrações (2,4 mM) de MpAFP-GFP. Em maior concentração (4,2 mM), a atividade TH aumentou significativamente durante exposição curta e não aumentou ao longo do tempo com concentrações muito altas (8–55 mM). O grau de super-resfriamento da solução durante a exposição e as medições de TH não afetaram a atividade TH das soluções MpAFP.

Meister e colaboradores (2018) usaram microscopia de fluorescência e técnicas de microfluídica para investigar a natureza da ligação de isoformas grande (1-5) na concentração de 0,2 mg.mL<sup>-1</sup> e pequena (7-8) na concentração de 0,92 mg.mL<sup>-1</sup> de AFP. Os autores descobriram que ambas as isoformas de AFP se ligam irreversivelmente ao gelo, apresentando atividade TH de 0,1 °C e 0,02 °C, respectivamente. Relataram ainda que a medição da taxa de adsorção da isoforma grande AFP é 50% mais rápida do que a AFP tipo III. Os pesquisadores afirmam que a velocidade de adsorção de AFP ao gelo é crucial para a capacidade de inibição do crescimento de gelo.

Kubota (2011) estudou a cinética de adsorção e dessorção de AFP, resultando em uma função de Langmuir que correlacionou a cobertura da superfície com o tempo, podendo ser expressa pela equação 2.

$$\frac{d\theta}{dt} = k_1(1 - \theta)c - k_2\theta \quad (2)$$

Onde  $\theta$  é a superfície de cobertura em função do tempo,  $k_1$  e  $k_2$  são constantes de adsorção e dessorção,  $c$  é a concentração de AFP em solução aquosa e  $h$  é a cobertura da superfície em função do tempo  $t$ .

Além da cinética de adsorção e dessorção, a equação da atividade TH é definida como a diferença entre o ponto de fusão e a temperatura na qual um cristal de gelo começa a crescer (KUBOTA, 2011). Seguindo essa definição, a equação da atividade TH é obtida pela equação 3.

$$\Delta T - \Delta T_{eq(c=\infty)} \left( \frac{Kc}{1 + Kc} \right) \left[ 1 - \exp \left( -\frac{t_A}{\tau} - \frac{\Delta T - \Delta T_A}{R\tau} \right) \right] = 0 \quad (3)$$

Onde  $R$  é a taxa de resfriamento,  $\Delta T$  é o tempo de anelamento e  $\Delta T_A$  é o tempo de sobrearrefecimento do anelamento,  $t$  é o tempo,  $c$  é a concentração de AFP (em  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) e  $K$  é a constante de adsorção.

A equação da atividade TH pode ser simplificada pela equação 4:

$$TH = T_m - T_f \quad (4)$$

Onde  $T_m$  é o ponto de fusão do gelo próximo a  $0^\circ\text{C}$  e  $T_f$  é ponto do momento visível da observação de cristais de gelo. A TH é calculada pela diferença entre  $T_m$  e  $T_f$ . Extratos proteicos contendo valores altos de TH são considerados AFP altamente eficientes (BRASLAVSKY & DRORI, 2013).

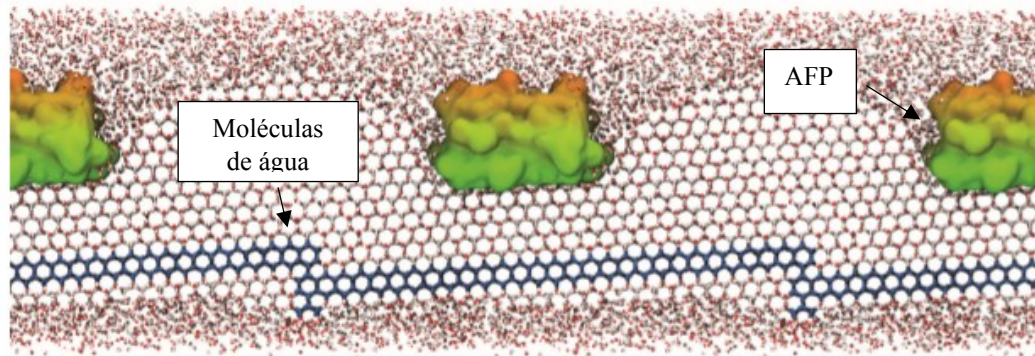
### 3.4.3 Mecanismos de ligação ao gelo das proteínas anticongelantes

As AFP têm afinidade por cristais de gelo e, ao se adsorverem à superfície do cristal, impedem o seu crescimento. Os mecanismos de ligação da AFP ao cristal de gelo foram investigados por alguns autores, entretanto ainda não há um modelo definitivo e aparentemente diferentes AFP possuem mecanismos próprios de ligação. Yang, Chakrabartty & Hew (1988) propuseram um mecanismo de ligação de proteínas anticongelantes às superfícies de gelo que demonstrou a importância da formação de ligações de hidrogênio envolvendo cadeias laterais de aminoácidos polares regularmente espaçadas (principalmente Thr) da hélice. Interações hidrofóbicas são significativamente importantes na contribuição da adsorção de AFP à superfície do gelo.

A hipótese de adsorção-inibição proposta por Raymond & DeVries (1997) sugeriu como as AFP inibem o crescimento de gelo com base no efeito Gibbs-Thomson (Figura 8). As AFP se ligam a superfície de onde há crescimento de cristais de gelo, o que dificulta a adição de água na formação dos cristais no local onde as proteínas são adsorvidas. O gelo pode continuar a crescer a partir de uma superfície plana com raio finito, porém à medida que o gelo cresce, a borda do cristal se torna redonda, resultando em um raio crítico no qual o crescimento se torna energeticamente desfavorável (KNIGHT, 2000; BAR DOLEV, BRASLAVSKY & DAVIES, 2016).



**Figura 8.** Simulação da proteína anticongelante (sbwAFP) em uma superfície de gelo que ilustra o efeito Gibbs-Thomson. Três moléculas do sbwAFP são mostradas ligadas à superfície do gelo. O gelo (padrão hexagonal) se eleva entre as AFP adsorvidas à medida que a temperatura cai. Os hexágonos são moléculas de água e as AFP estão representadas em colorido.



Fonte: BAR DOLEV, BRASLAVSKY & DAVIES (2016).

A hipótese da água clatrada ancorada é outra forma de explicar como as AFP se ligam ao gelo (GARNHAM et al., 2011). Os autores sugerem que as AFP se organizam com as moléculas de água em estado líquido e se fundem antes do processo de congelamento, desacelerando o crescimento de gelo a baixa temperatura (RAHMAN, 2019; BAR DOLEV, BRASLAVSKY & DAVIES, 2016; NUTT & SMITH, 2008; SHARP, 2014).

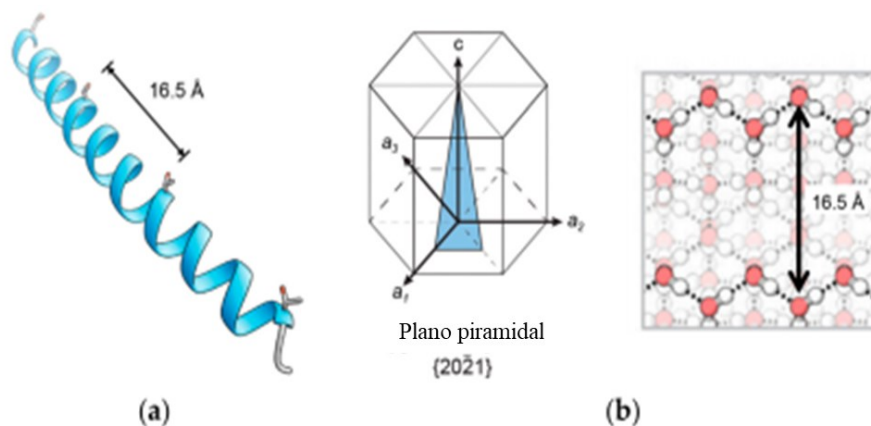
A técnica desenvolvida por Knight e colaboradores (1991) para estudo da ligação ao gelo permitiu a identificação de planos de cristais de gelo aos quais as AFP se ligam. A técnica envolve a fixação de um único cristal de gelo, seguido pela imersão do cristal de gelo em solução diluída de AFP. Depois de permitir o crescimento, o cristal de gelo é removido e transferido para uma sala fria. A superfície do cristal de gelo é lavada para remover os resíduos de AFP e mantida por várias horas para evaporação. Após a conclusão de todas as etapas, as áreas vinculadas à AFP aparecem como manchas brancas, enquanto as áreas não vinculadas a AFP não mostram manchas (KNIGHT, CHENG & DEVRIES, 1991). O método descrito acima foi ainda modificado por Garnham e colaboradores (2011) envolvendo o uso de AFP marcadas com fluorescência com corante covalente. Os autores denominaram o método como afinidade no plano de gelo com base fluorescente (GARNHAM et al., 2010; RAHMAN, 2019).

### 3.4.4 Estrutura das proteínas anticongelantes

As AFP podem reconhecer e se ligar a planos específicos do gelo mantendo o crescimento dos cristais sob controle. Existem duas classes de proteínas amplamente estudadas: as proteínas anticongelantes (AFP) e glicoproteínas anticongelantes (AFGP - *Antifreeze glycoproteins*) (SURIS-VALLS & VOETS, 2019). As estruturas das proteínas desempenham importante função no sítio específico de ligação. Em termos de estrutura as AFP podem ser alfa-hélices, beta-hélices e glicosiladas (AFGP).

AFP helicoidais são encontradas em peixes e possuem uma estrutura  $\alpha$ -hélice composta por 37 aminoácidos dispostos em uma sequência de três repetições de 11 resíduos de treonina separados principalmente por resíduos de alanina (HARDING et al., 1999; HARDING et al., 2003) (**Figura 9**).

**Figura 9.** AFP alfa-hélice. A) wfAFP tipo I do peixe solha de inverno; b) Representação de um plano piramidal e das moléculas que interagem com o local de ligação ao gelo do wfAFP em uma estrutura hexagonal de um cristal de gelo com quatro vetores indicados: eixo c- prisma e vetores - a1, a2 e a3.

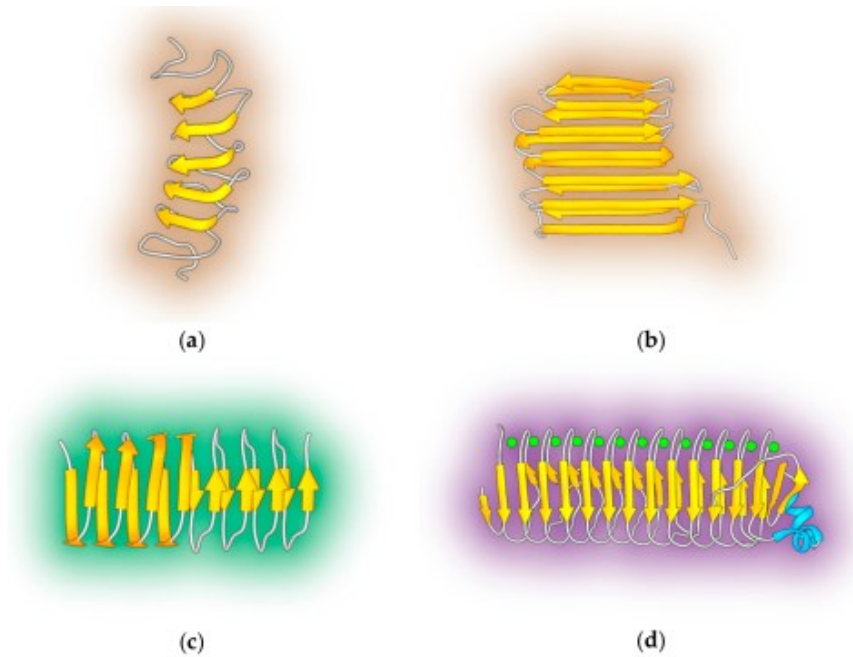


Fonte: SURIS-VALLS & VOETS (2019).

A AFP da bactéria antártica *Marinomonas primoryensis* é um exemplo de uma  $\beta$ -hélice. O domínio de ligação ao gelo faz parte de uma adesina, dependente de cálcio, com um peso molecular total de 1,5 MDa. Cinco regiões distintas com diferentes funções (ancoragem, extensão, reconhecimento de peptídeo, reconhecimento de açúcar e ligação de gelo) foram

identificadas em toda a estrutura, da qual a região IV é responsável pela ligação de gelo (SURIS-VALLS & VOETS, 2019) (**Figura 10**).

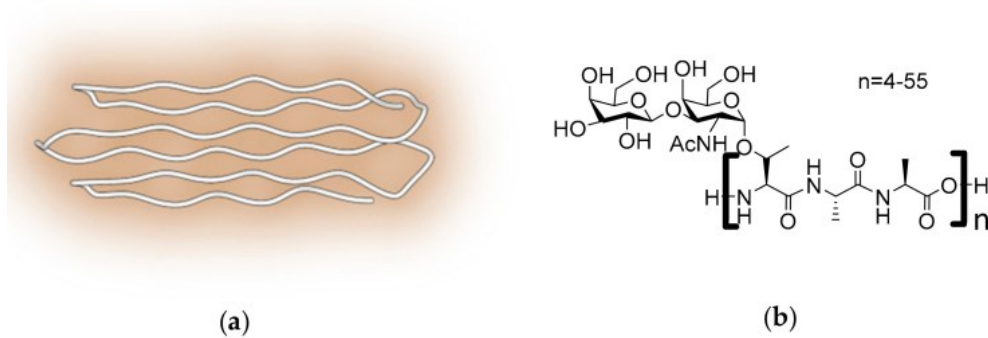
**Figura 10.** Visão geral de várias AFP com estrutura secundária de  $\beta$ -hélice. (a) proteína de inseto TmAFP; b) proteína de inseto RiAFP; (c) proteína de planta lpAFP e (d) proteína de bactéria dependente de cálcio MpAFP.



Fonte: SURIS-VALLS & VOETS (2019).

As AFGP são um grupo de oito glicoproteínas estruturalmente relacionadas, presentes no soro sanguíneo de peixes antárticos e do bacalhau do norte (*Eleginus gracilis*). Essas proteínas consistem em 4-55 unidades tripeptídicas de AAT que são O-glicosiladas nas cadeias laterais de treonina com o dissacarídeo  $\beta$ -D-galactosil (1-3)  $\alpha$ -N-acetil-D-galactosamina (SURIS-VALLS & VOETS, 2019). AFGP1 é a maior glicoproteína e tem um peso molecular de aproximadamente 34 kDa, enquanto a AFGP8 é a menor com um peso molecular de 2,6 kDa (SURIS-VALLS & VOETS, 2019) (**Figura 11**).

**Figura 11.** Hélice de Poliprolina II contendo AFP e glicoproteínas anticongelantes. a) figura mostrando seis hélices curtas de poliprolina do tipo II; b) Estrutura química das AFGP.



Fonte: SURIS-VALLS & VOETS (2019).

### 3.5 Diversidade de Proteínas anticongelantes

As AFP podem ser encontradas em peixes antárticos que vivem a baixas temperaturas (DEVRIES; KOMATSU; FEENEY, 1970), plantas (GRIFFITH et al., 1992), insetos (WU et al., 1991), fungos (HOSHINO et al. 2003; LEE et al. 2010; XIAO et al. 2010), anfíbios (LE TRI et al., 2019), algas (KIM et al., 2017; JUNG et al., 2012; JUNG et al., 2014) e bactérias (DUMAN & OLSEN, 1993; SUN et al., 1995; XU et al., 1998; MILLS, 1999; KAWAHARA et al., 2001; RAYMOND & FRITSEN, 2001; YAMASHITA et al., 2002). As AFP se originaram independente em diferentes organismos eucariontes e procariontes a condições extremamente frias. O sucesso da sobrevivência desses organismos foi resultado de uma evolução convergente sob forte pressão seletiva do ambiente (CHEN, DEVRIES & CHENG, 1997; LOGSDON & DOOLITTLE, 1997).

As AFP são caracterizadas por diversos tipos de estruturas e funções e apesar de compartilharem a mesma função apresentam diferenças na sequência de aminoácidos e na estrutura terciária (RAHMAN, 2019). Além dessas diferenças, podem apresentar valores de TH e IR em concentrações sub-mili-molares a miligramas. A eficiência da proteína é estritamente medida em relação a concentração, quanto menor a concentração e presença de atividade TH ou IR mais eficiente é a proteína.

### 3.5.1 Proteínas anticongelantes em animais

As AFP foram inicialmente descobertas no plasma sanguíneo de peixes nototóides da Antártica que vivem a baixas temperaturas (DEVRIES; KOMATSU; FEENEY, 1970). Esta primeira AFP de peixe foi caracterizada como uma glicoproteína anticongelante (AFGP) e tem sido isolada de organismos da Antártica e do Ártico (RAHMAN, 2019; BARRET, 2001). As AFGP são compostas de repetições de um monômero simples de glicotripeptídeo (Thr-Ala / Pro-Ala-) com um dissacarídeo ligado a cada resíduo de treonina (KIM et al., 2017). As AFGP podem ser divididas em AFP I, II, III e IV. A classe das AFP I estruturalmente apresenta uma cadeia longa, rica em alanina e tem estrutura de  $\alpha$ -hélice e tem sido bem estudada e documentada em linguados. A classe das AFP tipo II são moléculas globulares, ricas em cisteína (até 9,1 moles%), embora a alanina seja frequentemente o aminoácido dominante (até 14,4% em moles). A classe das AFP tipo III é uma proteína globular e sua estrutura não é dominada por nenhum aminoácido em particular. A classe das AFP IV apresenta quatro hélices anfipáticas e podem ser dispostas com um feixe antiparalelo com faces hidrofóbicas e hidrofílicas (BARRETT, 2001). A maioria das AFP de peixes apresentam atividades TH de 0,5-1,5 °C em concentração milimolar (RAHMAN, 2019).

Além de presente nos peixes polares, as AFP também podem ser encontradas em alguns anfíbios. A AFP Fr10 é uma proteína secretora e responsiva ao congelamento que foi encontrada no sapo da madeira (*Rana sylvatica*). No estudo de Le Tri e colaboradores (2019) foi caracterizado as propriedades da Fr10 em relação à atividade TH e IR. A atividade TH foi avaliada por fluorimetria de varredura diferencial, com valor de Tm de  $50,8 \pm 0,1$  °C. A atividade IR de Fr10 foi avaliada usando um ensaio colorimétrico baseado em nanopartículas, em que Fr10 exibia a capacidade de impedir a agregação induzida por congelamento de nanopartículas de ouro. Na presença de 30  $\mu$ M de Fr10, foi observada uma redução de 40% no tamanho médio dos cristais de gelo em relação às amostras de controle.

Proteínas anticongelantes também podem ser encontradas em certos artrópodes. Desde 1984 foram relatados diversos estudos com AFP de insetos, sendo 33 espécies com representantes das ordens Coleoptera, Collembola, Plecoptera, Orthoptera, Hemiptera, Mecoptera, Lepidoptera e Diptera com atividade de histerese termal (DUMAN et al., 2004).

Wu e colaboradores (1991) caracterizaram quatro proteínas anticongelantes de larvas do besouro *Dendroides canadenses*. As quatro AFP são semelhantes na composição de aminoácidos, tendo alto conteúdo de aminoácidos hidrofílicos (45-55 mol%) e cisteína (~ 16

mol% de Cys). Aproximadamente metade dos resíduos Cys formam pontes dissulfeto e ambos as pontes dissulfeto e sulfidrilos livres são essenciais para a atividade anticongelante.

Duman e colaboradores (2004) foram os primeiros pesquisadores a relatar insetos e aranhas de regiões polares (Alasca) que produziam proteínas anticongelantes. De 75 espécies de insetos e 6 espécies de aranhas, 18 espécies de insetos (10 eram besouros) e 3 de aranhas demonstraram a presença de AFP com base na atividade de Histere Termal. Das 10 espécies de besouros, dois apresentaram valores altos de TH: *Hypnoidus bicolor* (2.92 °C) e *Cucujus clavipes* (4.62 °C), além dos besouros, a aranha *Philodromus* sp. apresentou TH de 1.46 °C a concentração de 1-8 µL.

A primeira AFP de artrópode foi relatada em larvas do besouro *Tenebrio molitor* (TmAFP). A estrutura da TmAFP é formada por β-hélice e seu tamanho é de 8,4 kDa, sendo rica em resíduos de treonina e cisteína e apresenta motivos T-x-T (LIOU et al., 2000).

Graether e colaboradores (2000) caracterizaram uma AFP produzida pelo *Choristoneura fumiferana*. A proteína tem um tamanho de 9 kDa, sendo uma estrutura β-helicoidal rica em resíduos Thr- e Cys- e o local de ligação ao gelo contém 9 das 14 treoninas acessíveis, organizadas em motivos TxT que correspondem à estrutura de gelo tanto no plano basal quanto prismático.

Duas isoformas de AFP foram isoladas da pulga de neve *Hypogastrura harveyi* com tamanhos de 6,5 e 15,7 kDa, que apresentavam atividade TH de 5,8 °C em seu extrato corporal. A estrutura da isoforma é composta por seis hélices antiparalelas do tipo poliprolina II e a isoforma maior possui 13 hélices do tipo poliprolina II (GRAHAM & DAVIES, 2005; MOK et al., 2010).

Recentemente Kong, Al-Khdhairawi e Tejo (2020) projetaram peptídeos com base na AFP de *Rhagium inquisitor*. Seis peptídeos (RiAFP1–6) com comprimentos diferentes, variaram entre 912 resíduos com base no motivo TxTxTxT de ligação ao gelo da proteína original. Todos os peptídeos projetados exibiram atividade de TH entre 0,03–0,10 °C e atividade de inibição de recristalização (IR) entre 0,17–1,04 µm a concentração de 10 mM.

### 3.5.2 Proteínas anticongelantes em algas

Proteínas anticongelantes tem sido relatada em algas. Genes responsáveis pela expressão de AFP foram encontrados em diversas diatomáceas polares marinhas (*Chaetoceros*

*neogracile*, *Berkeleya* sp., *Navicula* sp., *Fragiciniopsis* sp. e *Nitzschia frustulum*) (KIM et al., 2017; JANECH et al., 2006; KRELL et al., 2008; BAYER-GIRALDI et al., 2011; UHLIG et al., 2011). A expressão de genes AFP em algas é regulada em resposta a condições de estresse como temperatura fria e alta salinidade. Além dessas espécies também foi encontrada uma AFP em uma clorófito psicrófila da Antártica chamada *Pyramimonas gelidicola*. Jung e colaboradores (2014) identificaram, caracterizaram e clonaram duas isoformas da AFP da clorófito. As isoformas Pg-1-AFP (26,4 kDa) e Pg-2-AFP (27,1 kDa) foram identificadas pela análise de expressão gênica e sequenciamento do cDNA após crescimento em temperatura de 4 °C (JUNG et al., 2012). As duas isoformas foram clonadas em *Escherichia coli* para análise da TH das proteínas recombinantes purificadas. As duas isoformas apresentaram comportamentos distintos na interação com os cristais de gelo, sendo que Pg-1-AFP gerou cristais no formato de floco de neve com valor de TH de  $0,6 \pm 0,02$  °C a  $15 \text{ mg.mL}^{-1}$ , enquanto Pg-2-AFP criou um padrão de gelo dendrítico com valor de TH de  $0,25 \pm 0,02$  °C na mesma concentração proteica.

Gwak e colaboradores (2009) produziram a primeira proteína recombinante da diatomácea *Chaetoceros neogracile* (Cn-AFP) e testaram sua atividade anticongelante. A atividade TH da Cn-AFP recombinante foi de  $0,8$  °C a  $1 \text{ mg.mL}^{-1}$ .

### 3.5.3 Proteínas anticongelantes em fungos

Proteínas anticongelantes podem ser encontradas em fungos. Fungos que produzem AFP foram descobertos e encontrados em regiões frias, como a neve, exibindo atividade patogênica em plantas em estado de dormência cobertas pela neve (SNIDER et al., 2000).

Kawahara, Takemura e Obata (2006) investigaram a produção de AFP em fungos (Ascomycota) isolados da Antártica. De um total de 40 isolados foram testados para produção de AFP, 7 isolados apresentaram alguma atividade anticongelante exibindo alteração morfológica nos cristais de gelo, porém com valores baixos de TH. Um destes isolados fúngicos (*Penicillium bilaiae*) foi identificado com alto nível da atividade anticongelante, sendo um material anticongelante diferente do que já foi descrito como as AFP, apresentando resistência a tratamentos proteico e térmico (100 °C por 1 hora).

Xiao e colaboradores (2010) testaram a atividade IR e TH em 23 espécies de fungos (Ascomycota). Das 23 espécies, as espécies *Antarctomyces psychrotrophicus* e *Typhula ishikariensis* se destacaram na produção de AFP com atividade IR e TH. As duas espécies apresentaram valores de atividade TH de  $0,42$  °C e  $2$  °C em solução de 48 mm, sendo que *T.*

*ishikariensis* o valor de atividade TH é comparado com os valores de atividade TH encontrados em insetos.

Hoshino e colaboradores (2003) investigaram a produção de AFP em 24 espécies de fungos isolados de regiões polares (Ártico). Das 24 espécies, *Coprinus psychromorbidus* e *Typhula ishikariensis* produziram AFP no espaço extracelular com tamanho molecular de 22 e 23 kDa, respectivamente. Os autores observaram ainda que as AFP desses fungos não formam padrões hexagonais nos cristais de gelo para inibir seu crescimento, e se ligam de maneira irregular aos cristais.

Lee e colaboradores (2010) foram os primeiros a relatar presença da AFP LeIBP em *Glaciozyma* sp. AY30, que foi isolada de uma amostra de gelo de um lago de água doce perto da Estação Dasan, arquipélago de Svalbard na Noruega. A proteína LeIBP possui uma estrutura  $\beta$ -helicoidal e uma atividade TH de 0,42 ° C (KIM et al., 2017).

O fungo mofo da neve *Typhula ishikariensis* foi identificado por expressar sete isoformas de proteínas anticongelantes. Das sete isoformas, TisAFP6 apresentou atividade moderada e TisAFP8 mostrou hiperatividade (XIAO et al., 2010; KIM et al., 2017).

A levedura psicrófila *Glaciozyma antarctica* foi isolada do gelo marinho, na Estação de Pesquisa Casey da Antártica, sendo descrita com atividade anticongelante pela primeira vez em 2012. Hashim e colaboradores (2012) caracterizaram a proteína Afp1 que apresentou atividade TH e IR. A Afp1 possui quatro  $\alpha$ -hélices, onde cada peptídeo helicoidal possui atividade anticongelante (SHAH et al., 2012). Em 2014, foi identificada outra AFP (Afp4) que possui 93% de similaridade de aminoácidos com LeIBP e possui uma atividade TH de 0,8 ° C na concentração de 5 mg.mL<sup>-1</sup> (KIM et al., 2017; HASHIM et al., 2014).

### 3.5.4 Proteínas anticongelantes em bactérias

Apesar de terem sido encontradas em uma grande variedade de organismos, algumas espécies de bactérias vem sendo caracterizadas como produtoras de AFP, que incluem: *Rhodococcus erythropolis* isolado do trato intestinal de larvas de besouros (DUMAN; OLSEN, 1993), *Micrococcus cryophilus* isolado de alimentos congelados (DUMAN; OLSEN, 1993), *Marinomonas protea* isolada de lagos congelados da Antártica (MILLS, 1999), *Pseudomonas putida* isolada de solos do Canadá (LIFSHITZ et al. 1986), *Moraxella* sp. isolada de solos secos da Antártica (YAMASHITA et al. 2002) e um isolado de *Flavobacterium xanthum* de solos



úmidos da Antártica (KAWAHARA et al. 2007). Além destas, um outro estudo obteve 19 isolados de Alfa- e Gamma-Proteobacteria oriundos de lagos da Antártica e que apresentaram AFP com alta atividade IR, porém sem identificação ao nível de espécie (GILBERT et al. 2004). Outros microrganismos obtidos de regiões polares que produzem AFP incluem *Marinomonas primoryense* isolada de um lago da Antártica (GILBERT et al. 2005), *Colwellia* isolada de amostras de água marinha da Antártica (RAYMOND et al., 2007), *Pseudomonas ficuserectae* (SINGH et al., 2013), *Flavobacterium frigoris* (DO et al., 2014), 32 isolados bacterianos isolados de *Deschampsia antártica* (CID et al., 2016), *Sphigomonas*, *Pseudomonas* e *Plantibacter* (MUNOZ et al., 2017) e *Shewanella frigidimarina* (VANCE et al., 2018).

A primeira AFP identificada em bactérias foi de *Pseudomonas putida* GR12-2, uma bactéria associada à rizosfera de plantas no Ártico, que produz e exterioriza para o meio uma AFP de 164-kDa e que promove a tolerância desta bactéria em temperaturas de até -50 °C (SUN et al. 1995; XU et al. 1998). Muryoi et al. (2004) estudaram esta AFP com maiores detalhes e descobriram que ela também possui baixos níveis de atividade nucleante, isto é, esta proteína também é capaz de promover o crescimento do gelo. Estes autores sugerem que *P. putida* GR12-2 seja capaz de controlar a formação ou inibição de cristais de gelo através da concentração da AFP secretada no meio, ou através de modificações pós-traducionais na proteína.

Gilbert e colaboradores (2005) estudaram uma proteína anticongelante hiperativa da bactéria *Marinomonas primoryensi* isolada de um lago antártico. O estudo caracterizou preliminarmente a AFP hiperativa, revelando propriedades incomuns como a dependência de íons  $\text{Ca}^{2+}$ . O extrato proteico bruto contendo  $11 \text{ mg.mL}^{-1}$  apresentou uma atividade TH de 0.8 °C.

Do e colaboradores (2014) estudaram uma proteína hiperativa de ligação ao gelo codificada pela bactéria antártica *Flavobacterium frigoris* PS1 (FfIBP). No estudo foi avaliado as propriedades de Inibição de Recristalização e Histerese Termal da proteína. A FfIBP exibiu atividades de TH de 2,2 C a 5mM e 2,5 C a 50 mM, além de inibir efetivamente a recristalização do gelo. Os ensaios de atividade do IR foram realizados em três concentrações diferentes de FfIBP. Mesmo a uma concentração de 1,05 mM, o FfIBP mostrou atividade eficiente da IR. Os autores afirmam que FfIBP possui alta atividade de IR e atividade TH.

Uma AFP identificada de uma bactéria da Antártica *Colwellia* sp. A ColAFP é homóloga às AFPs de uma ampla variedade de microrganismos psicofílicos. Para entender a função anticongelante da ColAFP, Hanada e colaboradores (2014) caracterizaram sua atividade

anticongelante e determinaram a estrutura cristalina dessa proteína. A ColAFP recombinante exibiu atividade TH de 4 °C a uma concentração de 0,14 mM e induziu rápido crescimento de cristais de gelo na direção hexagonal. A análise de afinidade do plano de gelo baseado em fluorescência mostrou que o ColAFP se liga a vários planos de gelo, incluindo o plano basal. Essas observações mostram que o ColAFP é uma AFP hiperativa. A estrutura cristalina do ColAFP determinada na resolução de 1,6 Å revelou uma estrutura  $\beta$ -helicoidal irregular, semelhante a homólogos conhecidos. Os autores ainda sugeriram que o ColAFP exerce atividade anticongelante por meio de um composto IBS que difere dos IBS característicos compartilhados por outros AFP hiperativas.

Singh e colaboradores (2013) estudaram 14 cepas bacterianas isoladas de sedimento em buracos de crioonita das geleiras do Ártico quanto a atividade de proteínas anticongelantes. As cepas pertenciam a cinco gêneros: *Cryobacterium*, *Leifsonia*, *Polaromonas*, *Pseudomonas* e *Subtercola*. Das 14 cepas, 8 apresentaram alguma atividade AFP. Dentre os isolados identificados *Pseudomonas fuscovirens* exibiu uma alta atividade TH (2 °C a 2 mg mL<sup>-1</sup>) e inibiu a recristalização do gelo eficientemente na concentração de 0,05 mg.mL<sup>-1</sup>.

A AFP de *Moraxella* sp. foi a primeira proteína anticongelante estudada de um microrganismo da Antártica (YAMASHITA et al. 2002). Esta AFP foi caracterizada como uma lipoproteína de 52-kDa produzida no ponto ótimo em pH 7.0 e temperatura de 5 °C. Em contraste à AFP de *P. putida*, a lipoproteína de *Moraxella* sp. não apresentou atividade nucleante. O sequenciamento N-terminal dos aminoácidos desta AFP demonstraram alta similaridade com proteínas de membrana de *Branhamella catarrhalis*, sugerindo que a proteção anti-congelamento de *Moraxella* sp. ocorre pela inibição de formação de gelo na superfície celular.

Estudos com a bactéria *Flavobacterium xanthum* isolada da Antártica revelaram que esta produz uma AFP intracelular de 59-kDa, conferindo proteção contra o congelamento do citoplasma e metabólitos internos (KAWAHARA et al. 2007). Além disso, a AFP de *F. xanthum* apresentou alta atividade TH (1,19 °C a 0,86  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>) e IR (inibição < 1 min a 0,20 mg.mL<sup>-1</sup>) simultaneamente, sendo a AFP com maiores atividades já descrita em bactérias. Ainda não está claro se estas propriedades estão relacionadas a adaptações específicas da espécie *F. xanthum* ou se é resultado da evolução de populações bacterianas no extremo frio da Antártica (KAWAHARA et al. 2007).

A bactéria *Shewanella frigidimarina* isolada da Antártica produz uma AFP denominada SfIBP\_1 de 25kDa pertencente ao domínio de ligação ao gelo DUF3494. No estudo de Vance e colaboradores (2018) testaram a atividade TH e IR desta AFP. Os resultados indicaram atividade TH de 2 °C a 80 µM e atividade IR a uma concentração de 50 e 5 nM.

Pesquisadores identificaram um ciliado psicrofílico de natação livre chamado *Euplotes focardii* da Baía da Terra Nova na Antártica, que vive em simbiose com bactérias. A análise do metagenoma dos simbiontes de *E. focardii* revelou uma sequência de codificação para uma AFP (EfcIBP) (PUCCIARELLI et al., 2014). Esta proteína contém um domínio chamado DUF3494 e uma sequência de sinal N-terminal para o transporte de proteínas (MANGIAGALLI et al., 2017). A atividade TH foi de 0,53 °C a 50 µM, que é classificada como moderadamente ativa, e a concentração de 2,5 nM inibiu a recristalização do gelo, tornando-o um dos mais potentes agentes IR descritos (KALEDA et al., 2018).

Estudos mais recentes no qual o objetivo era analisar a estrutura da comunidade microbiana e atividade de inibição de recristalização de bactérias isoladas da filosfera de *Deschampsia antártica*, uma gramínea da Antártica, mostrou que as ordens dominantes eram Pseudomonadales (*Pseudomonas* e *Psychrobacter*) e Rhizobiales (*Agrobacterium* e *Aurantimonas*) em todas as amostras analisadas. A respeito da atividade de IR em extratos de proteínas, 32 isolados apresentaram atividade IR de culturas bacterianas aclimatadas no frio e 5 isolados de culturas não aclimatadas (CID et al., 2016).

No trabalho de Muñoz e colaboradores (2017) microrganismos de diferentes locais da Antártica foram selecionados para avaliação da histerese termal em seus extratos brutos. Os isolados GU1.7.1, GU3.1.1 e AFP5.1 apresentaram maior histerese térmica (TH: 0.50, 0.46 e 0.41 °C, respectivamente) e foram identificados como dos gêneros *Pseudomonas*, *Platibacter* e *Sphingomonas*. Neste mesmo estudo foi utilizado amostras de pepino e abobrinha para aplicação das proteínas, e mostraram proteção celular quando as amostras foram tratadas com AFP parcialmente purificados ou com uma AFP comercial, como foi determinado usando azul de toluidina O e coloração com vermelho neutro (MUÑOZ et al., 2017).

Musgos são considerados a flora dominante na Antártica, mas seus mecanismos de sobrevivência ao frio extremo não haviam sido compreendidos. Raymond (2015) estudou o musgo *Byrum argenteum* com abordagem metagenômica. Os resultados revelaram presença de genes de bactérias (principalmente Actinobacteria e Bacteroidetes) que codificam o domínio DUF3494 associado a ligação ao gelo pelas proteínas anticongelantes sendo secretadas por

bactérias epítíficas. Esse estudo é um exemplo de relação comensal onde o musgo fornece alimento para as bactérias e em troca protege o musgo contra o congelamento.

O resumo da atividade IR e TH das AFP em bactérias, pode ser observado na **Tabela 1**.

**Tabela 1.** Resumo da atividade IR e TH em bactérias

Gênero/ Espécie/Isolado	Fonte	Gram	Atividade IR	Atividade TH	Referência
<i>Colwellia</i> sp.	Mar Antártico	-	+	4 °C	Raymond et al., 2007 e Hanada et al., 2014
<i>Flavobacterium frigidum</i> PS1	Antártica	-	+	2,2 °C	Do et al., 2014.
<i>Pseudomonas ficuserecetae</i>	Ártico	-	+	2 °C	Singh et al., 2013
<i>Shewanella frigidimarina</i>	Antártica	-	+	2 °C	Vance et al., 2018
<i>Flavobacterium xanthum</i>	Solo antártico	-	+	1,19 °C	Kawahara et al., 2007
<i>Marinomonas primoryensi</i>	Lago antártico	-	+	0,8 °C	Gilbert et al., 2005.
GU1.7.1 <i>Sphingomonas</i>	Solo antártico	-	-	0,5 °C	Munoz et al., 2017
GU3.1.1 <i>Plantibacter</i>	Solo antártico	+	-	0,46 °C	Munoz et al., 2017
AFP5.1 <i>Pseudomonas</i>	Solo antártico	-	-	0,41 °C	Munoz et al., 2017
<i>Moraxella</i> sp.	Solo antártico	-	+	0,104 °C	Yamashita et al., 2002
<i>Marinomonas protea</i>	Lago congelado da Antártica	-	+	-	Mills, 1999
<i>Pseudomonas putida</i>	Solo do Canadá	-	+	-	Lifshitz et al. 1986
19 isolados de Alfa- e Gamma-Proteobacteria	Lago da Antártica	-	+	-	Gilbert et al., 2004
32 isolados	<i>Deschampsia antarctica</i>	*	+	-	Cid et al., 2016

\* Isolados que incluem bactérias Gram positivas e negativas.

As bactérias até o momento relatadas, em sua grande maioria, são Gram negativas. Porém, ainda não existem estudos mostrando a relação entre a adaptação ao frio e o tipo de parede ou a taxonomia das bactérias. Isto pode ser explicado pelo fato de que bactérias são hábeis em manter a fluidez da membrana plasmática e seu metabolismo em temperaturas abaixo de zero. A fluidez da membrana em várias bactérias Gram negativas e positivas são efetivamente alteradas por mudanças na composição de ácidos graxos dos lipídios da membrana (KAWAHARA et al., 2001). Em 2020, Wang e colaboradores estudaram a adaptação de *Rhodococcus* sp. CNS16 em temperaturas de 30, 20 e 10 °C. A composição de ácidos graxos em diferentes as temperaturas apresentavam ácido palmítico (C16:0), ácido esteárico (C18:0), ácido hexadecenóico (C16:1) e ácido octadecenóico (C18:1). O grupo de bactérias que foi cultivada a 10 °C apresentou aumento na quantidade de ácidos graxos insaturados (C16:1 e C18:1). O que seria um provável mecanismo de adaptação a temperaturas baixas.

Adaptação ao frio em arqueias psicrófilas também tem sido relatada. A membrana plasmática, em arqueias, aumenta a quantidade de ácidos graxos insaturados em condições de temperatura baixa para permitir sua fluidez (CAVICCHIOLI, 2006).

Apesar de ser bem documentada em peixes, o conhecimento das AFP relatadas e descritas de espécies de bactérias é relativamente escasso. Desta forma, estudos que correlacionem as propriedades das proteínas (atividade TH e IR), sua estrutura (se são AFP tipo I, II, III e IV), os mecanismos de ligação ao gelo e se são hiperativas ou moderadas toma importância para o avanço do conhecimento sobre as AFP bacterianas e suas aplicações. Até o momento os estudos apresentam o potencial dessas proteínas qualitativamente e poucos quantitativamente.

### 3.6 Aplicações biotecnológicas

Além do estudo do papel das AFP na sobrevivência das espécies em regiões extremamente frias, estas proteínas também podem ser exploradas para fins biotecnológicos nas áreas da saúde, da agricultura e da indústria.

Na biomedicina as AFP podem ser aplicadas com finalidade de criopreservação, já que melhoram a preservação de células e tecidos congelados por longos períodos de tempo. Órgãos criopreservados com AFP podem ser utilizados para transplantes (CHAO; DAVIES; CARPENTER, 1996; AMIR *et al.* 2003) e aumentam a eficácia da criocirurgia (MULDREW *et al.*, 2001), por exemplo. Outra aplicação promissora é na área de produção e armazenamento de vacinas. Embora haja poucos estudos, resultados preliminares indicam que vacinas liofilizadas com crioprotetores de membrana (ex. proteínas AFP) apresentam maior estabilidade após o congelamento (REXROAD *et al.* 2002).

As proteínas anticongelantes podem ser aplicadas para melhorar a qualidade e viabilidade do armazenamento a curto e longo prazo de gametas e embriões. A possibilidade do uso de AFP em protocolos de criopreservação, reduz a quantidade de crioprotetores tóxicos, proporcionando eficiência e segurança dos protocolos de criopreservação. Em um estudo recente realizado demonstrou efeitos positivos na motilidade espermática e na integridade da membrana após uma suplementação de  $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de AFP (QADEER *et al.*, 2016). As AFP já foram testadas em células espermáticas em várias espécies de animais. Sabe-se que o processo de congelamento e descongelamento durante a criopreservação é prejudicial à função espermática e, conseqüentemente, à fertilidade. Em carneiros, chimpanzés, bovinos, búfalos e

peixes, a qualidade do esperma foi melhorada após a criopreservação e o armazenamento refrigerado pelo uso de AFP (QADEER et al., 2016; ZANDIYEH et al., 2018).

Na agricultura há trabalhos direcionados à geração de plantas geneticamente modificadas para produzirem AFP, aumentando a tolerância de suas folhas e raízes contra o frio (FAN et al., 2002; HIGHTOWER et al., 1991). Outra estratégia interessante é a transformação genética de bactérias da filosfera (que habitam naturalmente a folha de plantas) com os genes que produzem e regulam a expressão de AFP (GLICK; BASHAN, 1997). Estas bactérias são re-inoculadas sobre as plantas e atuam inibindo a formação de gelo sobre a superfície foliar durante eventos de geada. Balamurugan et al. (2018) com o estudo de aplicação de AFPs afirmaram que a superexpressão do gene AFP do capim-centeio (*Lolium perenne*) em plantas de tomate resultou em uma tolerância ao congelamento significativamente maior do que em plantas de tipo selvagem. Lin et al. (2011) confirmaram que a integração da AFP de inseto em *Arabidopsis* transgênica reduziu sua temperatura de congelamento de 2 a 3 °C em comparação com plantas do tipo selvagem.

As AFP também tem sido aplicada na conservação de alimentos congelados, melhorando sua qualidade e validade (GRIFFITH; EWART, 1995). Em um outro estudo de aplicação de AFP, foi feita a extração da proteína de extratos de folhas de *Drimys angustifolia* e posteriormente foram aplicadas em carambolas por técnicas de filtração a vácuo e imersão a uma concentração de 0,1 mg.mL<sup>-1</sup> e submetidas ao congelamento. Os resultados indicaram que a técnica de filtração a vácuo permitiu a firmeza das carambolas mantidas no degelo após 60 dias de armazenamento (PROVESI et al., 2019).

Kim e colaboradores (2019) clonaram a AFP da bactéria antártica *Flavobacterium frigoris* PS1 (FIBP) em *E. coli* e a cresceram em biorreator de escala de 7 e 30 L. A transferência de oxigênio foi o fator mais importante que influenciou o crescimento celular e a produção de FIBP durante a fermentação em escala piloto. O rendimento final de FfIBP recombinante produzida por *E. coli* contendo sistema vetorial pET28a-FIBP foi de 1.6 g.L<sup>-1</sup>. Este resultado é 3,8 vezes maior que usando o sistema vetorial pCold 1-FUBP e a atividade TH foi de 2,5 °C a 9,7 μM. Estes resultados podem ser aplicados à produção em larga escala e à aplicação biotecnológica da AFP recombinante.

Zhang e colaboradores (2018) projetaram peptídeos de 12 aminoácidos como miméticos das AFP e testaram a atividade anticongelante. A sequência de peptídeos projetada (DTASDAAAAAAL) para a base anticongelante foi inspirada na AFP I, que é rica em resíduos

de Ala, tendo estrutura  $\alpha$ -hélice como sua estrutura secundária e o local de ligação ao gelo são compostos de resíduos de Thr, Ala e Ala. Este é o primeiro estudo em que peptídeos curtos são aplicados com sucesso na fabricação de superfícies anticongelamento, o que certamente é vantajoso em comparação com os revestimentos anticongelamento como as AFP relatados anteriormente.

## 4.METODOLOGIA

### 4.1 Amostras ambientais da Antártica

Diversas amostras ambientais da Antártica foram utilizadas como fonte para o isolamento dos microrganismos. Amostras de solo e musgo foram coletadas na Antártica durante os verões 2014/2015 e 2015/2016 no âmbito do projeto MICROSFERA (CNPq#407816/2013-5). Estas amostras foram coletadas na Ilha Rei George (Península Antártica), na área das geleiras Baranowski e Collins (**Figuras 12, 13 e 14**) e **Tabela 2**, representando o solo que foi exposto após o derretimento e recuo da frente das geleiras. Foram coletadas amostras subglaciais (base da geleira) e amostras distribuídas no solo perpendicular à frente das geleiras. As amostras de solo compreenderam 6 pontos de coleta, dispostos em um gradiente em relação à frente de cada geleira (0 m, 50 m, 100 m, 200 m, 300 m, e 400 m). As amostras de solo foram coletadas em triplicatas, sendo cada uma destas composta de aproximadamente 500 g de solo, e posteriormente armazenadas sob refrigeração (-20 °C) até o laboratório. No local da amostragem foram obtidos os dados de temperatura do solo.

**Tabela 2.** Coordenadas dos pontos amostrados na frente das geleiras. Amostras “C” indicam solos da Geleira Collins, enquanto amostras “BGS” indicam aquelas coletadas na Geleira Baranowski. Datum: WGS84

<b>Amostra</b>	<b>Longitude</b>	<b>Latitude</b>
C-0m	58°55'22.404"W	62°9'49.278"S
C-50m	58°55'25.792"W	62°9'49.277"S
C-100m	58°55'30.217"W	62°9'48.223"S
C-200m	58°55'36.002"W	62°9'47.403"S
C-300m	58°55'42.801"W	62°9'46.54"S
C-400m	58°55'49.639"W	62°9'45.151"S
BGS-0m	58°26'56.2"W	62°11'55.6"S
BGS-50m	58°26'52.758"W	62°11'55.72"S
BGS-100m	58°26'49.105"W	62°11'55.571"S
BGS-200m	58°26'42.899"W	62°11'54.315"S
BGS-300m	58°26'37.293"W	62°11'53.456"S
BGS-400m	58°26'28.24"W	62°11'51.683"S

As amostras de *permafrost* foram coletadas nas proximidades da Estação Russa “Bellingshausen”, também na Ilha Rei George, durante a 54ª Expedição Antártica da Rússia no verão 2008/2009 (**Figura 15**). A coleta dessas amostras fez parte de um projeto conjunto entre o Laboratório de Ecologia Microbiana (Instituto Oceanográfico – USP) e o Laboratório de Criossolos do Instituto de Problemas Físico-químicos e Biológicos do Solo (Moscow State



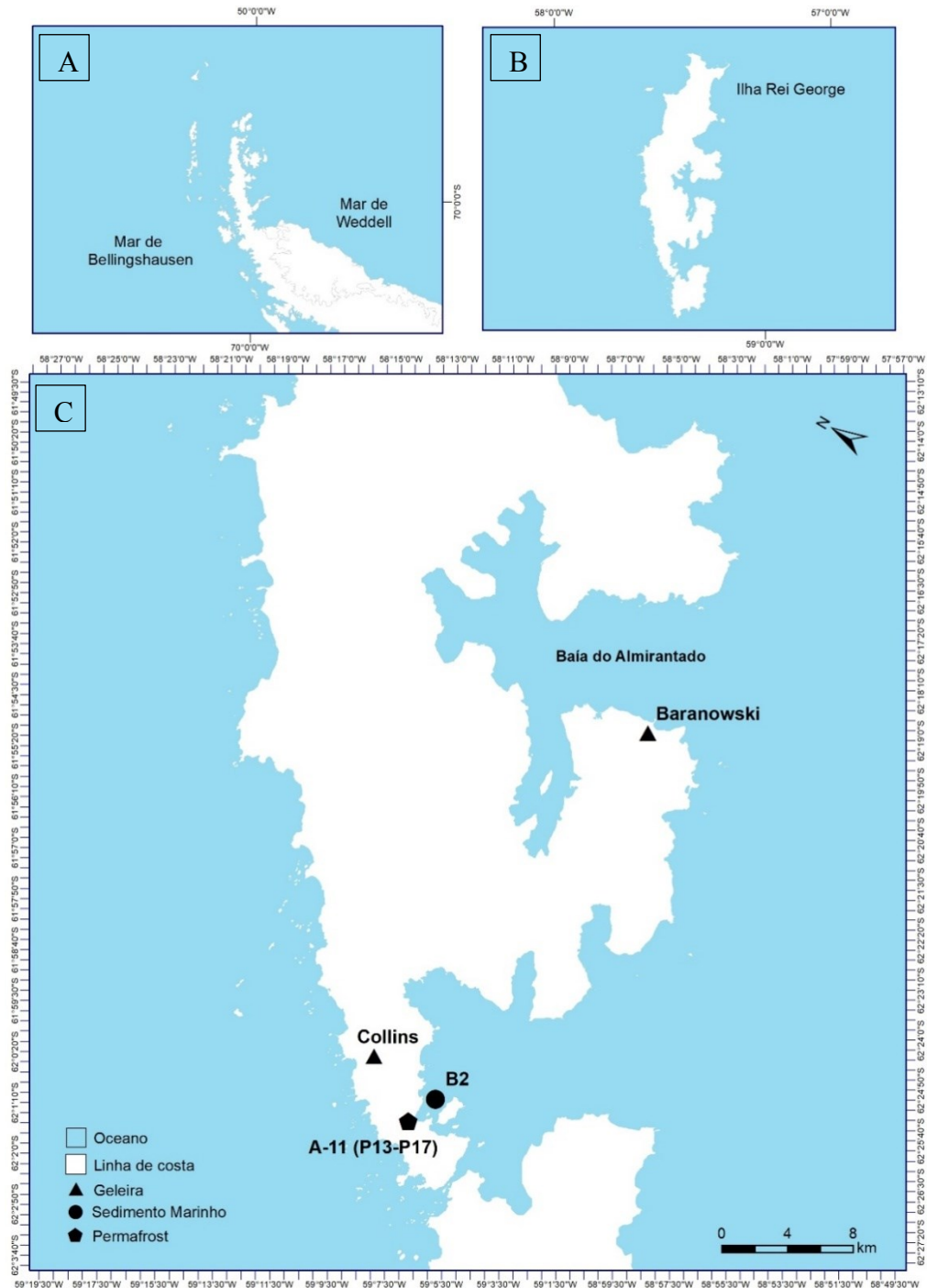
University, Rússia). A amostragem compreendeu de 5 estratos de profundidades entre 4,6 e 9,2 metros abaixo da superfície do solo, constituindo a perfuração de código A1-09 da 54ª Expedição Antártica Russa. Além destes, uma amostra de superfície do sedimento marinho da Baía Maxwell, denominada B2, foi coletada no verão 2011/2012 por pesquisadores do Laboratório de Criosolos, de modo a representar o sedimento marinho moderno para comparações entre as comunidades microbianas do presente e do passado. As amostras de *permafrost* foram datadas com rádio-isótopos e revelaram estar congeladas desde 2250 a 7500 anos atrás (**Tabela 3**) (ABRAMOV et al., 2011; DUARTE, 2010).

**Tabela 3.** Coordenadas dos pontos amostrados de sedimento marinho e *permafrost*. Datum: WGS84

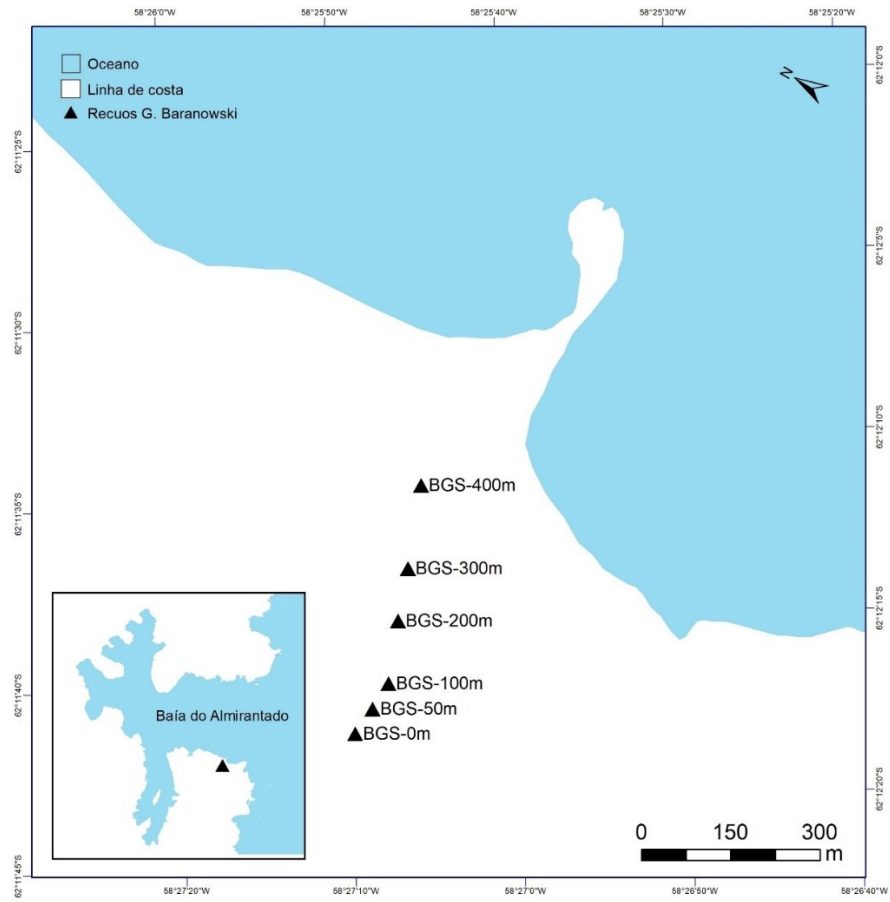
<b>Amostra</b>	<b>Longitude</b>	<b>Latitude</b>	<b>Profundidade</b>	<b>Idade estimada</b>
B2	58°55'42.424"W	62°12'14.641"S	0 m	Sedimento marinho
P13	58°57'50.907"W	62°11'48.872"S	4,6 m	2.250 anos
P14	58°57'50.907"W	62°11'48.872"S	5,8 m	3.100 anos
P15	58°57'50.907"W	62°11'48.872"S	6,9 m	4.300 anos
P16	58°57'50.907"W	62°11'48.872"S	8,1 m	5.600 anos
P17	58°57'50.907"W	62°11'48.872"S	9,2 m	7.500 anos

Todas as amostras foram mantidas em freezer -20 °C do momento de coleta até a chegada ao Laboratório de Ecologia Molecular e Extremófilos (LEMEx-UFSC).

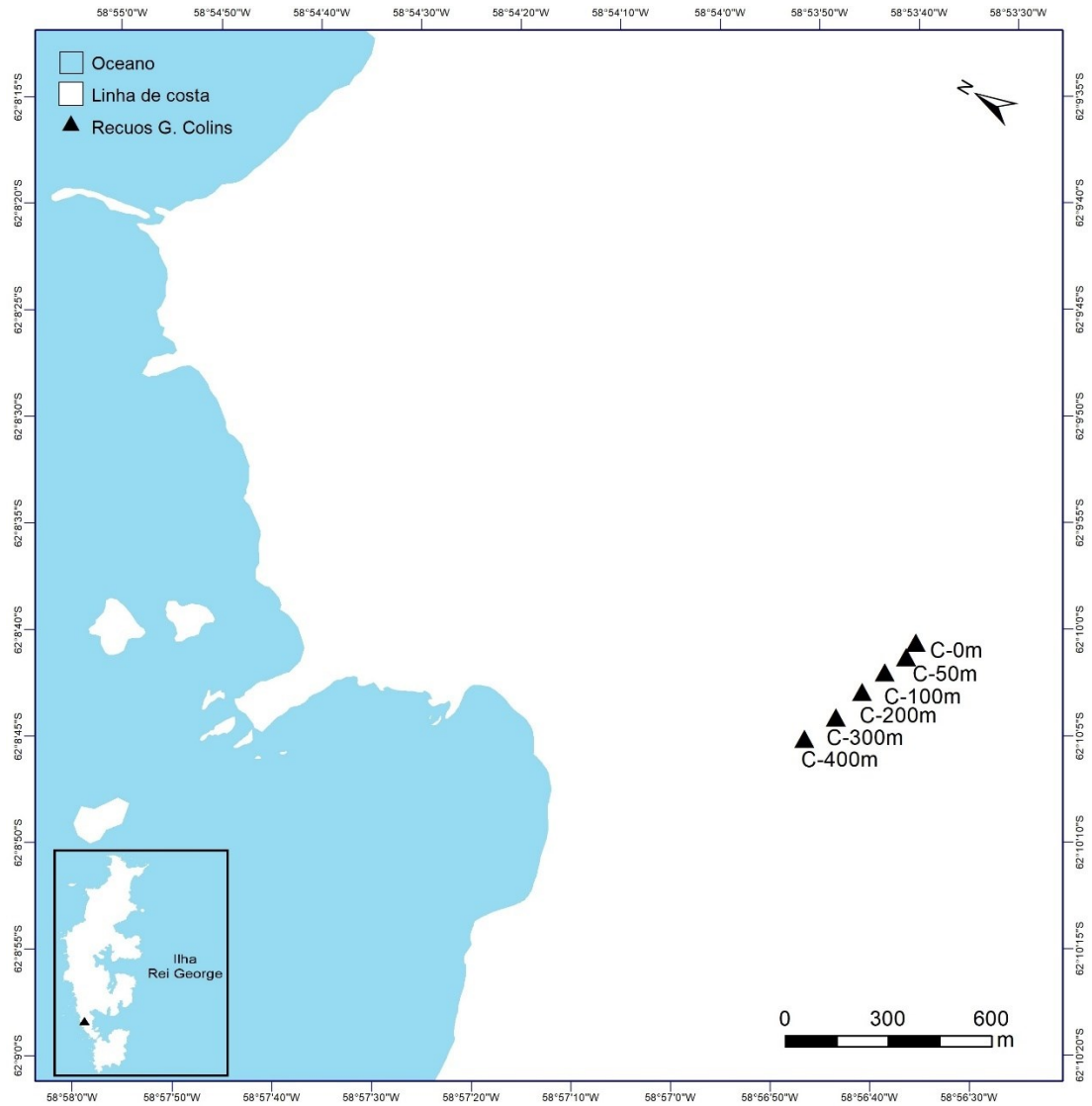
**Figura 12.** Localização dos pontos de coleta. A- localização da Península Antártica, B- Ilha Rei George e C- pontos amostrados no estudo. Os triângulos representam as geleiras Collins e Baranowski, o pentágono representa o *permafrost* e círculo representa o sedimento marinho. Base de dados: Quantartica, 2017. Sistema de referência de coordenadas: WGS\_84\_Antarctic\_Polar\_Stereographic; Projeção: Stereographic\_South\_Pole; Sistema de Coordenada Geográfica: GCS\_WGS\_1984; e Datum: D\_WGS\_1984 (Mapa elaborado por Joana Camila Lopes e MSc Thiago Fossile).



**Figura 13.** Pontos de coleta de solo na geleira Baranowski. Base de dados: Quantartica, 2017. Sistema de referência de coordenadas: WGS\_84\_Antarctic\_Polar\_Stereographic; Projeção: Stereographic\_South\_Pole; Sistema de Coordenada Geográfica: GCS\_WGS\_1984; e Datum: D\_WGS\_1984 (Mapa elaborado por Joana Camila Lopes e MSc Thiago Fossile).



**Figura 14.** Pontos de coleta de solo na geleira Collins. Base de dados: Quantartica, 2017. Sistema de referência de coordenadas: WGS\_84\_Antarctic\_Polar\_Stereographic; Projeção: Stereographic\_South\_Pole; Sistema de Coordenada Geográfica: GCS\_WGS\_1984; e Datum: D\_WGS\_1984 (Mapa elaborado por Joana Camila Lopes e MSc Thiago Fossile).



**Figura 15.** Pontos de coleta de sedimento marinho e *permafrost*. Base de dados: Quantartica, 2017. Sistema de referência de coordenadas: WGS\_84\_Antarctic\_Polar\_Stereographic; Projeção: Stereographic\_South\_Pole; Sistema de Coordenada Geográfica: GCS\_WGS\_1984; e Datum: D\_WGS\_1984 (Mapa elaborado por Joana Camila Lopes e MSc Thiago Fossile).



#### 4.2 Isolamento e caracterização de bactérias

Para as amostras de solo das geleiras Collins e Baranowski, o isolamento consistiu em diluir uma porção da amostra (3,0 g de solo úmido) em um tubo Falcon de 50 mL contendo 27 mL de tampão PBS 1x (NaCl 8 g, KCl 0,2 g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,44 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,24 g para 1000 mL de água destilada). A suspensão de solo foi agitada por 30 segundos em vórtex e 100 µL foram inoculados em placas contendo os meios de cultura R2A (Ágar 18 g, Extrato de levedura 0,5 g,

Caseína hidrolisada 0,5 g, Glicose 0,5 g, Amido solúvel 0,5 g,  $K_2HPO_4$  0,3 g, Piruvato de sódio 0,3 g, Peptona 0,25 g e  $MgSO_4$  heptahidratado 0,05 g para 1000 mL de água destilada) nas concentrações de 100% e 10% (m/v), bem como Meio Extrato de Solo contendo 20% do extrato do solo das geleiras Collins ou Baranowski diluído em água destilada esterilizada. O preparo do extrato do solo consistiu em 192,5 g de solo e 0,5 g de carbonato de cálcio para 500 mL de água destilada por 1 h a 121°C, posteriormente a solução foi filtrada com lã de vidro e armazenada em Erlenmeyer. Para preparo do meio de cultura foi utilizado a solução do extrato 20%. As placas foram incubadas nas temperaturas de 15 e 25 °C em condições aeróbias até o surgimento de colônias.

Para o isolamento de microrganismos endofíticos foram utilizadas as amostras de musgos coletadas nas frentes das geleiras Baranowski e Collins. A metodologia para inóculo foi seguida conforme Rosa *et al.* (2009). Inicialmente foram retiradas áreas de 1 cm x 1 cm do musgo e realizada a assepsia para remoção de contaminantes externos utilizando etanol 70% (v/v) por 1 minuto, hipoclorito de sódio 2% (m/v) por 3 minutos e água destilada esterilizada por 2 minutos. As porções do musgo descontaminadas foram colocadas em meio de cultura R2A 100% e 10% incubados a 15 e 25 °C em condição de aerobiose. O inóculo foi feito em triplicatas.

Para o isolamento dos microrganismos do *permafrost* foi utilizada a metodologia desenvolvida por Vishnivetskaya *et al.* (2000) para recuperação e isolamento de bactérias de amostras de *permafrost* da Sibéria congelados a 3 milhões de anos. Essa estratégia é chamada de Enriquecimento NPS (enriquecimento de sedimento natural do *permafrost*) onde os sedimentos foram descongelados a 6 °C e mantidos em repouso (sem perturbação) nesta temperatura por 2, 6 e 12 semanas antes do plaqueamento. Essa estratégia dá aos microrganismos uma chance de crescer sem o gelo circundante em seu ambiente natural. Para o enriquecimento NPS, o sedimento de *permafrost* (1,0 g) foi adicionado aos tubos estéreis e incubado a 6 °C sem agitação ou abertura dos tubos por 2, 6 e 12 semanas. Em cada um destes períodos, alíquotas de 100 µL foram plaqueadas nos meios R2A 10% e TSA 10% (m/v) contendo osmoprotetores (NaCl 2% ou 10%) e incubadas a 6 °C até o surgimento de colônias.

As colônias obtidas das amostras de solo, musgo e *permafrost* foram contadas e caracterizadas considerando sua forma, tamanho e pigmento. Colônias aleatórias de cada amostra foram selecionadas para a busca de produtoras de AFP, sendo que pelo menos um morfotipo de cada colônia foi escolhido. A forma, arranjo e o tipo de parede bacteriana foram determinados em microscopia óptica pelo método de coloração de Gram.

### 4.3 Seleção e identificação dos isolados por biologia molecular

Após a seleção dos isolados, estes foram diferenciados geneticamente por comparação do perfil de bandas de DNA repetitivo gerado pela técnica de BOX-PCR (VERSALOVIC *et al.* 1994). Para isso, o DNA total das bactérias foi extraído pelo método da fervura (1 colônia diluída em 20  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  MilliQ esterilizada, seguido de fervura a 99 °C por 3 min), seguido da amplificação por PCR com primer para região de DNA repetitiva “BOX” conforme descrito em Versalovic *et al.* (1994). A reação da PCR para o volume de 25  $\mu\text{L}$  consistiu em 2,5  $\mu\text{L}$  de Tampão 10X, 1,9  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  50 mM, 1,25  $\mu\text{L}$  de DMSO 100%, 0,595  $\mu\text{L}$  de *primer* Box-A1R a 25,2  $\mu\text{M}$ , 0,2  $\mu\text{L}$  de dNTPs 100 mM, 0,1  $\mu\text{L}$  de Taq Polimerase 5 U.  $\mu\text{L}^{-1}$  e 1  $\mu\text{L}$  do DNA extraído. A condição de amplificação iniciou com o *hotstart* de 94 °C por 7 min; seguido por 35 ciclos de 94 °C por 7 min, 53 °C por 1 min, 72 °C por 8 min e extensão final de 15 min a 72 °C. Os produtos da PCR foram verificados por eletroforese em gel de agarose 1% em TAE 1x a 40V por 3 horas, corados com GelRed (Invitrogen) segundo recomendações do fabricante, expostos em um transiluminador UV Chemidoc MP (LAMEB) e fotografados no software ImageLab. O produto de PCR foi separado em eletroforese com gel de agarose 1% (m/v) gerando um perfil de bandas específico para cada espécie. O padrão de bandas dos isolados foram agrupados por similaridade e um dendrograma foi construído com o método de UPGMA e coeficiente de Dice no software BioNumerics v.5.10 (Applied Maths, Bélgica). Os filotipos que se apresentarem distintos foram selecionados para identificação a partir do sequenciamento do gene RNAr 16S.

O DNA dos isolados selecionados no dendrograma foram submetidos à reação de PCR com *primers* degenerados que amplificam o gene RNAr 16S de Bacteria, sendo eles 27F (LANE *et al.* 1991) e 1492R (TURNER *et al.* 1999). A reação foi realizada conforme descrita em Turner *et al.* (1999). A reação da PCR para o volume final de 25  $\mu\text{L}$  consistiu em 0,75 $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  50 mM, 0,20  $\mu\text{L}$  de dNTPs 100 mM, 0,25  $\mu\text{L}$  de *primer* 27F a 20  $\mu\text{M}$ , 0,25  $\mu\text{L}$  de *primer* 1401R a 20  $\mu\text{M}$ , 0,10  $\mu\text{L}$  de Taq Polimerase 5 U.  $\mu\text{L}^{-1}$  e 1  $\mu\text{L}$  de DNA extraído. As condições de amplificação foram seguidas conforme Sakamoto (2001) e iniciou-se o *hotstart* de 95 °C por 10 min; seguido por 30 ciclos de 30s de desnaturação a 94 °C, 30s de anelamento a 55 °C e 30s de extensão a 72 °C e a extensão final de 72 °C por 10 min. Um controle positivo contendo DNA extraído de *E. coli* (25 ng) e um controle negativo (substituindo o volume do DNA por água MiliQ) também foram preparados. Todas as amplificações foram realizadas no termociclador Eppendorf 950000040 Mastercycler® personal Thermal Cycler. Os produtos da

PCR foram verificados por eletroforese em gel de agarose 1% em TAE 1x a 60V, corados com GelRed, expostos em um transiluminador UV Fotodocumentador Chemidoc MP (LAMEB) e fotografados no software ImageLab. Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese juntamente com 200 ng de marcadores de peso molecular 100 pb DNA Ladder (Ludwig Biotecnologia). Após a observação de bandas, as amostras amplificadas foram submetidas a uma purificação conforme Green & Sambrook (2017). Após a purificação as amostras foram avaliadas por eletroforese e quantificadas via NanoDrop. Amostras de DNA contendo um mínimo de 30 ng foram enviados para sequenciamento na empresa Macrogen (Coréia do Sul).

As sequências de DNA foram identificadas junto ao banco de dados do SILVA (QUAST *et al.*, 2013). Inicialmente as sequências foram avaliadas no software Mothur (SCHLOSS *et al.* 2009) para análise de qualidade do sequenciamento. Nucleotídeos com Phred score inferior a 20 foram desconsiderados. As sequências foram identificadas com o comando classify.seqs do Mothur sobre o banco de dados do SILVA 138. Após a identificação, sequências únicas foram utilizadas na construção uma árvore filogenética será criada no software ARB (LUDWIG *et al.* 2004) com o método Maximum Likelihood, correção de Felsenstein e bootstrap de 1000 repetições. Sequências de microrganismos mais próximos foram incorporadas na árvore.

#### 4.3 Seleção (*screening*) de bactérias produtoras de AFP pela atividade inibidora de recristalização

Os isolados foram avaliados quanto a produção de AFP segundo o método modificado de Gilbert *et al.* (2004), sendo que a presença de AFP foi detectada pela atividade inibidora de recristalização (IR).

Inicialmente um extrato celular foi preparado a partir da cultura das bactérias em frascos contendo 100 mL da versão líquida do meio de cultura (R2B) incubada na temperatura de 4 ou 15 °C por 1 semana sob constante agitação. A lise celular foi feita com adição de tampão de inibidor de protease (25 mM Tris-HCl, pH 7,0, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF em etanol, 2 mg Pepstaina A.mL<sup>-1</sup> em metanol) com 0,3 g de pérolas de vidro (Sigma) em vórtex por 1 min e resfriado em gelo por 1 min (repetindo 5 vezes). O sobrenadante foi transferido para tubos novos e congelados em freezer -20 °C. A concentração de proteínas foi determinada em espectrofotômetro Multileitora Infinite M200 TECAN a 500 nm pelo método de Bradford com curva padrão de BSA (Hammond e Kruger, 1988). Para o método Bradford foram adicionados 20 µL do reagente e 80 µL do extrato proteico bruto. A leitura da placa foi feita após 5 minutos



da reação. Para a curva BSA foi utilizado as concentrações de 4 a 64 mg.mL<sup>-1</sup>. Todos os extratos foram lidos em triplicatas. A concentração de cada extrato foi padronizada em 0,5 mg.mL<sup>-1</sup> para o teste de Inibição de Recristalização.

O extrato celular (50 µL) de cada isolado foi misturado ao mesmo volume de uma solução de sacarose 60% (m/v) e distribuída em uma placa de 96 poços. O controle positivo foi preparado com proteína anticongelante AFP III, (A/F Protein Inc., USA) (0,5 mg.mL<sup>-1</sup> em sacarose 30%) e o controle negativo foi feito com sacarose 30%+ extrato proteico de *E. coli* JM109. Uma solução aquosa de sacarose 30% (m/v) foi utilizada como branco.

O comprimento de onda utilizado na detecção das AFP foi selecionado de acordo com Cid et al. (2017). Inicialmente, uma varredura de absorvância foi realizada nos comprimentos de onda de 300 a 650 nm utilizando uma placa de 96 poços com as soluções: controle positivo (AFP III em sacarose 30%) nas concentrações de 0,01 a 1,0 mg.mL<sup>-1</sup>; controle negativo (extrato de *E. coli* JM109 0,5 mg.mL<sup>-1</sup> em sacarose 30%) e solução branco (BSA em sacarose 30% nas concentrações de 0,2 a 1,0 mg.mL<sup>-1</sup>). As leituras foram realizadas em triplicata no espectrofotômetro Multileitora Infinite M200 TECAN (LAMEB). A concentração de 0,5 mg.mL<sup>-1</sup> de AFP III foi selecionada para a varredura dos comprimentos de onda. Após os resultados da varredura, o comprimento de onda de 500 nm foi selecionado para realização dos testes de IR sendo este o mesmo comprimento de onda observado em Cid et al. (2017).

O screening por AFP nos extratos proteicos foi realizado utilizando a concentração de 0,5 mg.mL<sup>-1</sup> em 30% de sacarose, como padronizado para o controle positivo de AFP III. Uma placa de 96 poços contendo os extratos protéicos e controles em triplicata foi congelada a -80°C por 15 minutos, seguido de incubação a -6 °C no Criostato Thermo Scientific HM525 NX (LAMEB) por 2 dias para a formação e estabilização dos cristais de gelo. Posteriormente foi feito a leitura das placas no espectrofotômetro Multileitora Infinite M200 TECAN a um comprimento de onda de 500 nm segundo a metodologia de Cid et al. (2017).

Os resultados foram interpretados segundo o princípio da recristalização do gelo: a presença de AFP em uma solução irá limitar o crescimento de cristais de gelo grandes, favorecendo a formação de pequenos cristais de gelo (GARNHAM et al. 2008). Soluções congeladas com cristais longos são translúcidas (ausência de AFP), enquanto soluções com cristais pequenos são turvas (presença de AFP). Absorvâncias com valores maiores comparado ao controle negativo (extrato de *E. coli*) foram consideradas como positivo para presença de AFP pelo teste de Dunnet ( $p < 0.05$ ).

#### 4.4 Teste de sobrevivência ao congelamento

Os resultados do teste IR foram confirmados com o teste de sobrevivência ao congelamento. Este experimento consistiu no cultivo do isolado em 20 mL de caldo R2B à temperatura de 15 °C por 14 dias seguido do congelamento de uma alíquota de 100 µL da cultura adicionados a 900 µL de PBS 1X e realizado diluições até  $10^{-7}$ . O volume de 10 µL foi colocado em placa R2A 100%, em triplicata. Após o procedimento, as diluições foram acondicionadas por 24 h em freezer -20 °C. Após o este período, a cultura foi descongelada e novas diluições foram preparadas conforme descrito acima, e inoculadas novamente em meio R2A para contagem de células viáveis a 15 °C por 14 dias. A contagem de UFC (unidades formadoras de colônias) das placas foi realizada com as células antes e depois do congelamento, em triplicatas.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Isolamento e identificação dos isolados

Após o procedimento do meio de enriquecimento foram isolados 165 microrganismos, dentre os quais, foram isolados 102 de amostras de solos das geleiras Collins (62) e Baranowski (41), 3 foram isolados de musgos, e 60 foram isolados do *permafrost* (Tabela 4 e 5).

**Tabela 4.** Número de isolados em relação ao meio de cultura utilizado

Número de isolados	Meio utilizado
77	R2A 100%
18	R2A 10%
60	TSA
10	Extrato do solo

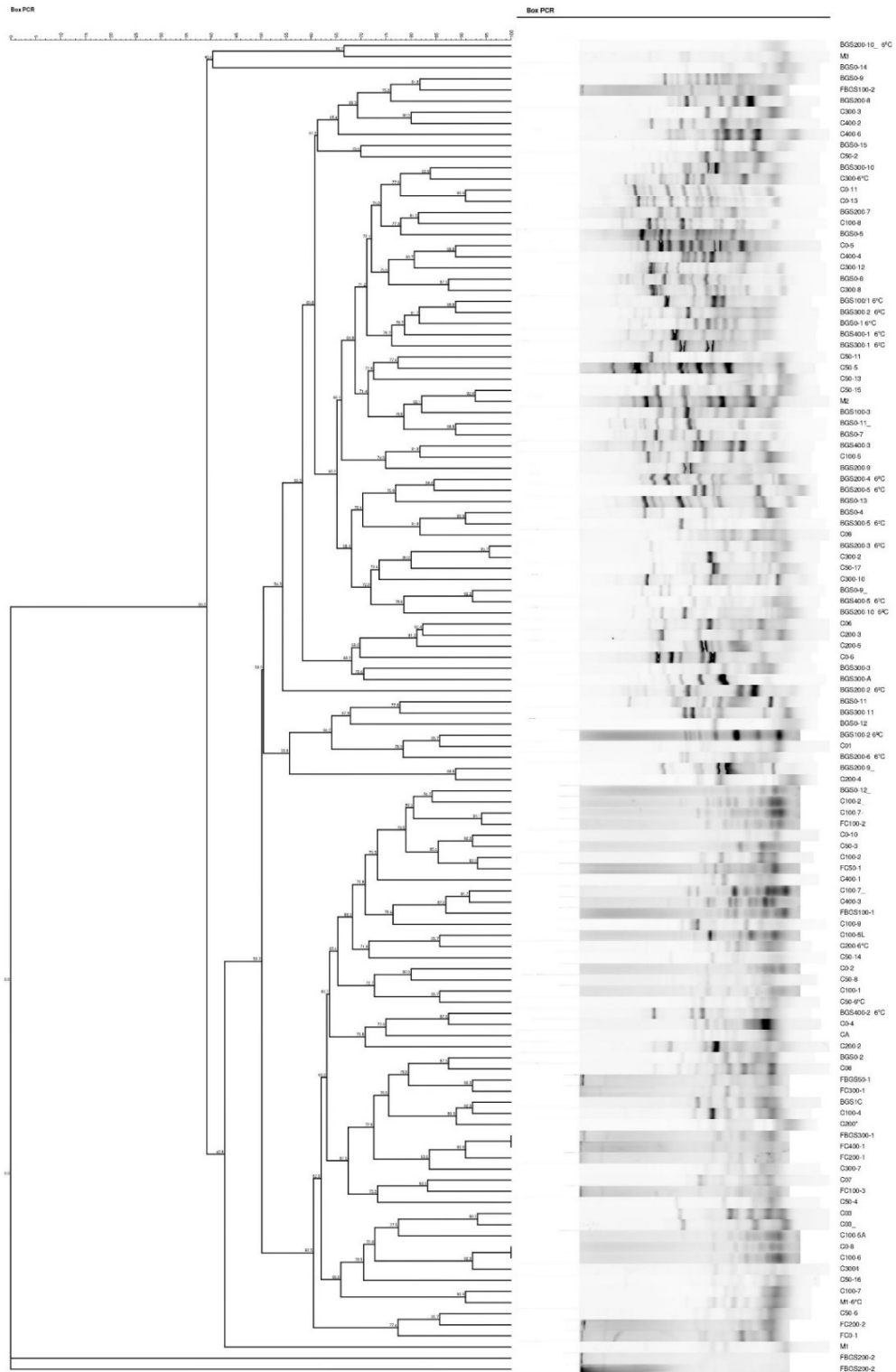
**Tabela 5.** Número de isolados em relação a temperatura

Número de isolados	Temperatura
88	25 °C
76	15 °C

Os resultados obtidos em relação ao meio de cultura utilizado mostraram que um meio com as concentrações em 100% propicia o crescimento de uma variedade maior de microrganismos (coloração e tamanho), enquanto meios que utilizam 10% da concentração e somente os nutrientes do solo da Antártica propicia o crescimento de microrganismos mais adaptados a condições de poucos nutrientes, ou seja, ambientes oligotróficos. Os resultados em relação a temperatura também refletiram na variedade de microrganismos, uma vez que os microrganismos isolados a 25 °C apresentavam tamanho e colorações diversas (rosa, amarelo, marrom), enquanto os cultivados a 15 °C apresentavam colorações brancas e amarelas e mesmo tamanho de colônias. Este resultado pode ser comparado ao estudo de Belov e colaboradores (2020) onde foram isoladas bactérias de amostras de *permafrost* e de gelo a temperatura ambiente e fria. Os autores concluíram que para todas as amostras estudadas, foi detectado um aumento na biodiversidade da comunidade bacteriana cultivável a temperaturas mesofílicas (25 °C), em oposição a psicofílicas (10 °C).

Os resultados da BOX PCR mostraram quatro grupos de filotipos distintos (**Figura 16**). Poucos filotipos apresentaram similaridade no padrão das bandas de 95%. Este resultado pode ser comparado com o estudo de Cid et al (2016) onde os isolados apresentaram similaridade abaixo de 95%, portanto, sendo diferentes entre si.

Figura 16. Dendograma dos padrões de bandas do isolados.



Fonte: Autora.

Cento e seis isolados de bactérias foram identificados por meio do sequenciamento do gene RNAr 16S (**Tabela 6**). A identificação dos isolados apresentou um total de 27 gêneros, sendo os mais representativos: *Arthrobacter* (15 isolados), *Pseudoarthrobacter* (11 isolados), *Nocardioides* (8 isolados), *Pseudomonas* (7 isolados), *Cryobacterium*, *Planococcus* e *Pedobacter* (6 isolados), *Psychrobacter* (5 isolados), *Deinococcus*, *Rhodococcus* e *Salinibacterium* (4 isolados), *Sphingomonas*, *Micobacterium*, *Frigoribacterium* e *Flavobacterium* (3 isolados), *Paenibacillus* e *Paeniglutamicibacter* (2 isolados). Os demais gêneros *Achromobacter*, *Allochromatium*, *Amycolatopsis*, *Flexibacteraceae*, *Friedmanniella*, *Gryllotalpicota*, *Leifsonia*, *Marisediminicola*, *Phyllobacterium* e *Pseudoxanthomonas* apresentaram apenas um único representante (**Figura 17**).

**Figura 17.** Gêneros identificados em relação ao número de isolados.

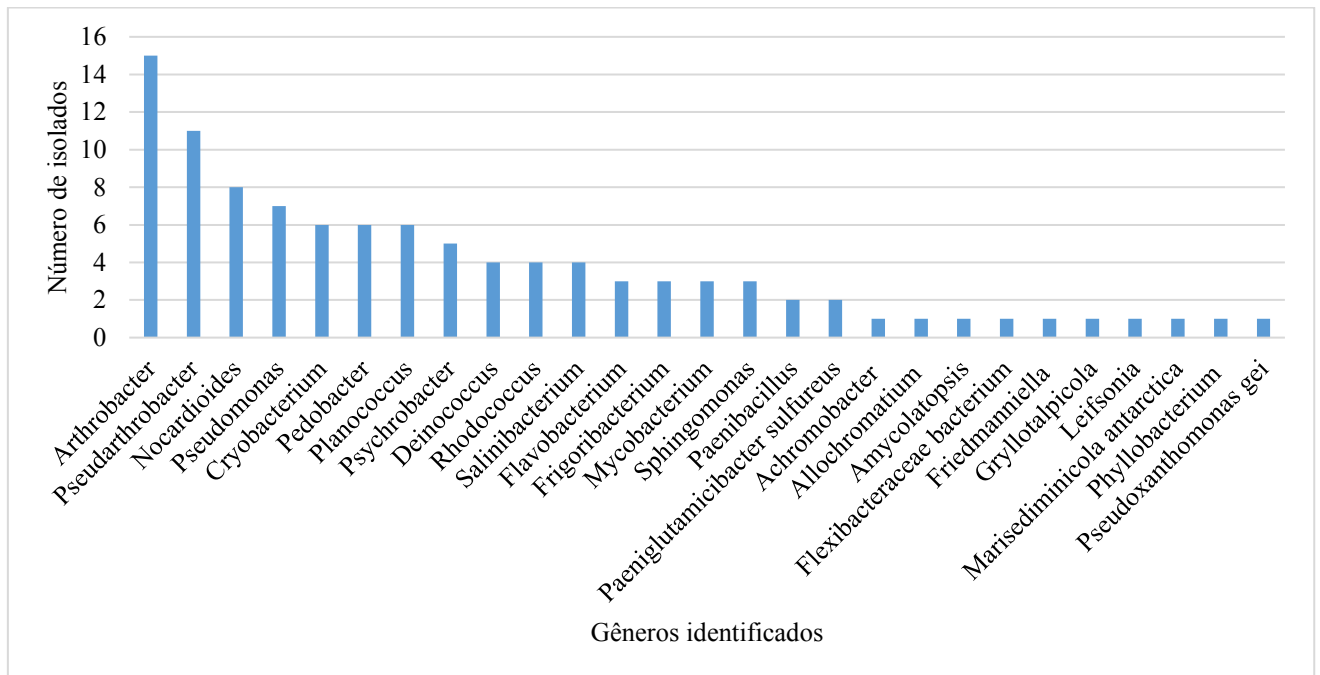


Tabela 6. Identificação dos isolados pela região de RNAr 16S.

<b>Isolado</b>	<b>Tipo de amostra</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Meio de cultura</b>	<b>Identificação</b>
M3	Musgo	25 °C	R2A 100%	<i>Paenibacillus</i> sp.
C200/2	Collins 200 m	25 °C	R2A 100%	<i>Frigoribacterium</i> sp.
C400/6	Collins 400 m	25 °C	R2A 100%	<i>Arthrobacter</i> sp.
C100/6	Collins 100 m	25 °C	R2A 100%	<i>Nocardioides</i> sp.
C0/8	Collins 0 m	25 °C	R2A 100%	<i>Sphingomonas</i> sp.
C100/7	Collins 100 m	25 °C	R2A 100%	<i>Nocardioides</i> sp.
C100/2	Collins 100 m	25 °C	R2A 100%	<i>Nocardioides</i> sp.
C50/3	Collins 50 m	25 °C	R2A 100%	<i>Arthrobacter scleromae</i>
C400/2	Collins 400 m	25 °C	R2A 100%	<i>Pseudarthrobacter siccitolerans</i>
C50/2	Collins 50 m	25 °C	R2A 100%	<i>Cryobacterium psychrotolerans</i>
AB2	Baranowski	25 °C	TSA	<i>Achromobacter</i> sp.
BGS01	Baranowski 0 m	15 °C	R2A 100%	<i>Salinibacterium</i> sp.
BGS013	Baranowski 0 m	25 °C	R2A 100%	<i>Arthrobacter antarcticus</i>
BGS014	Baranowski 0 m	25 °C	R2A 100%	<i>Deinococcus</i> sp.
BGS015	Baranowski 0 m	15 °C	R2A 100%	<i>Arthrobacter</i> sp.
BGS02	Baranowski 0 m	25 °C	R2A 100%	<i>Planococcus kocurii</i>

**Tabela 6. Continuação.** Identificação dos isolados pela região de RNAr 16S

BGS04	Baranowski 0 m	25 °C	R2A 100%	<i>Arthrobacter</i> sp.
BGS05	Baranowski 0 m	25 °C	R2A 100%	<i>Pseudomonas mandelii</i>
BGS08	Baranowski 0 m	25 °C	R2A 10%	<i>Pseudomonas mandelii</i>
BGS1001	Baranowski 100 m	15 °C	R2A 100%	<i>Arthrobacter ginsengisoli</i>
BGS10011	Baranowski 100 m	15 °C	R2A 100%	<i>Paeniglutamicibacter sulfureus</i>
BGS100L	Baranowski 100 m	25 °C	R2A 100%	<i>Planococcus faecalis</i>
BGS20010	Baranowski 200 m	25 °C	Extrato do solo	<i>Rhodococcus kyotonensis</i>
BGS20011	Baranowski 200 m	25 °C	Extrato do solo	<i>Rhodococcus</i> sp.
BGS2002	Baranowski 200 m	15 °C	R2A 100%	<i>Rhodococcus yunnanensis</i>
BGS2003	Baranowski 200 m	15 °C	R2A 100%	<i>Arthrobacter</i> sp.
BGS2004	Baranowski 200 m	15 °C	R2A 100%	<i>Leifsonia</i> sp.
BGS2005	Baranowski 200 m	15 °C	R2A 100%	<i>Nocardioides</i> sp.
BGS2007	Baranowski 200 m	15 °C	R2A 100%	<i>Pseudoxanthomonas gei</i>
BGS2009L	Baranowski 200 m	25 °C	R2A 10%	<i>Pedobacter</i> sp.
Bgs2009V	Baranowski 200 m	25 °C	R2A 10%	<i>Arthrobacter</i> sp.
BGS3001	Baranowski 300 m	15 °C	R2A 100%	<i>Pseudoarthrobacter scleromae</i>
BGS30010	Baranowski 300 m	15 °C	R2A 100%	<i>Paeniglutamicibacter sulfureus</i>
BGS3002	Baranowski 300 m	15 °C	R2A 100%	<i>Arthrobacter</i> sp.



**Tabela 6. Continuação.** Identificação dos isolados pela região de RNAr 16S

BGS3005	Baranowski 300 m	15 °C	R2A 100%	<i>Pedobacter</i> sp.
BGS300A	Baranowski 300 m	15 °C	R2A 100%	<i>Marisediminicola antarctica</i>
BGS4002	Baranowski 400 m	15 °C	R2A 100%	<i>Arthrobacter</i> sp.
BGS4004	Baranowski 400 m	25 °C	R2A 100%	<i>Pedobacter</i> sp.
BGS4005	Baranowski 400 m	15 °C	R2A 100%	<i>Pedobacter</i> sp.
C013	Collins 0 m	25 °C	R2A 100%	<i>Deinococcus</i> sp.
C026 °C	Collins 0 m	15 °C	R2A 100%	uncultured <i>Flavobacterium</i> sp.
C04	Collins 0 m	25 °C	R2A 100%	<i>Nocardioides</i> sp.
C06	Collins 0 m	25 °C	R2A 100%	<i>Frigoribacterium</i> sp.
C0 6 °C	Collins 0 m	15 °C	R2A 100%	<i>Flavobacterium</i> sp.
C08A	Collins 0 m	25 °C	R2A 100%	<i>Sphingomonas</i> sp.
C100	Collins 100 m	25 °C	R2A 100%	<i>Flexibacteraceae bacterium</i>
C10010	Collins 100 m	25 °C	R2A 100%	<i>Mycobacterium</i> sp.
C1004	Collins 100 m	25 °C	R2A 100%	<i>Pseudarthrobacter</i> sp.
C1005A	Collins 100 m	25 °C	R2A 100%	<i>Gryllotalpicola</i> sp.
C1006	Collins 100 m	25 °C	R2A 100%	<i>Frigoribacterium</i> sp.
C1008	Collins 100 m	25 °C	R2A 100%	<i>Pseudomonas</i> sp.

**Tabela 6. Continuação.** Identificação dos isolados pela região de RNAr 16S

C1009	Collins 100 m	25 °C	R2A 100%	<i>Mycobacterium hodleri</i>
C20012	Collins 200 m	25 °C	R2A 100%	<i>Pseudomonas</i> sp.
C20016 °C	Collins 200 m	15 °C	R2A 100%	<i>Arthrobacter ginsengisoli</i>
C2003	Collins 200 m	25 °C	R2A 100%	<i>Rhodococcus</i> sp.
C2004	Collins 200 m	25 °C	R2A 100%	<i>Pseudarthrobacter</i> sp.
C300 6 °C	Collins 300 m	15 °C	R2A 100%	<i>Flavobacterium</i> sp.
C3001	Collins 300 m	25 °C	R2A 100%	<i>Pseudarthrobacter</i> sp.
C30010	Collins 300 m	25 °C	R2A 100%	<i>Arthrobacter oryzae</i>
C3008	Collins 300 m	25 °C	R2A 100%	<i>Pseudomonas mandelii</i>
C4001	Collins 400 m	25 °C	R2A 100%	<i>Deinococcus claudionis</i>
C4002	Collins 400 m	25 °C	R2A 100%	<i>Pseudarthrobacter</i> sp.
C4003	Collins 400 m	25 °C	R2A 100%	<i>Pseudarthrobacter</i> sp.
C4005	Collins 400 m	25 °C	R2A 100%	<i>Pseudarthrobacter</i> sp.
C5011	Collins 50 m	25 °C	R2A 100%	<i>Arthrobacter scleromae</i>
C5013	Collins 50 m	25 °C	R2A 100%	<i>Sphingomonas</i> sp.
C5014	Collins 50 m	25 °C	R2A 100%	<i>Friedmanniella</i> sp.
C5015	Collins 50 m	25 °C	R2A 100%	<i>Mycobacterium</i> sp.
C5016	Collins 50 m	25 °C	R2A 100%	<i>Pedobacter</i> sp.

**Tabela 6. Continuação.** Identificação dos isolados pela região de RNAr 16S

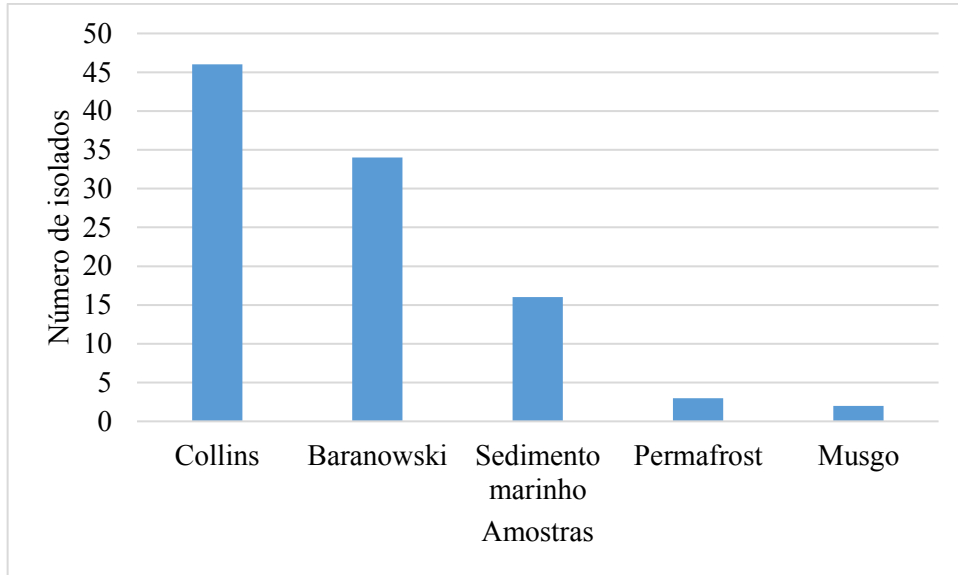
C5017	Collins 50 m	25 °C	R2A 100%	<i>Pedobacter</i> sp
C503	Collins 50 m	25 °C	R2A 100%	<i>Pseudarthrobacter</i> sp
C504	Collins 50 m	25 °C	R2A 100%	<i>Nocardioides</i> sp.
C506	Collins 50 m	25 °C	R2A 100%	<i>Nocardioides</i> sp.
FBGS1002	Baranowski 100 m	15 °C	R2A 100%	<i>Nocardioides</i> sp.
FBGS2002	Baranowski 200 m	15 °C	R2A 100%	<i>Amycolatopsis</i> sp.
FBGS3001	Baranowski 300 m	15 °C	R2A 100%	<i>Pseudarthrobacter sulfonivorans</i>
FC1002	Collins 100 m	15 °C	R2A 100%	<i>Pseudarthrobacter sulfonivorans</i>
FC1003	Collins 100 m	15 °C	R2A 100%	<i>Cryobacterium</i> sp.
M1 6 °C	Musgo	15 °C	R2A 100%	<i>Paenibacillus</i> sp.
P25	<i>Permafrost</i>	15 °C	TSA	<i>Planococcus halocryophilus</i>
COL	Collins 0 m	25 °C	R2A 100%	<i>Deinococcus</i> sp.
P56	Sedimento marinho	15 °C	TSA	<i>Cryobacterium</i> sp.
P12	<i>Permafrost</i>	15 °C	TSA	<i>Planococcus</i> sp.
BGS200	Baranowski 200 m	15 °C	R2A 100%	<i>Arthrobacter</i> sp.
BGS4001	Baranowski 400 m	15 °C	R2A 100%	<i>Arthrobacter</i> sp.
P15	<i>Permafrost</i>	15 °C	TSA	<i>Planococcus halocryophilus</i>

**Tabela 6. Continuação.** Identificação dos isolados pela região de RNAr 16S

P65	Sedimento marinho	15 °C	TSA	<i>Cryobacterium</i> sp.
P44	Sedimento marinho	15 °C	TSA	<i>Psychrobacter</i> sp.
P64	Sedimento marinho	15 °C	TSA	<i>Cryobacterium</i> sp.
P32	Sedimento marinho	15 °C	TSA	<i>Pseudomonas palleroniana</i>
P31	Sedimento marinho	15 °C	TSA	<i>Phyllobacterium</i> sp
P37	Sedimento marinho	15 °C	TSA	<i>Planococcus halocryophilus</i>
P49	Sedimento marinho	15 °C	TSA	<i>Salinibacterium</i> sp.
P47	Sedimento marinho	15 °C	TSA	<i>Psychrobacter</i> sp.
P26	Sedimento marinho	15 °C	TSA	<i>Psychrobacter</i> sp.
P30	Sedimento marinho	15 °C	TSA	<i>Salinibacterium amurskyense</i>
P61	Sedimento marinho	15 °C	TSA	<i>Psychrobacter cryohalolentis</i>
P42	Sedimento marinho	15 °C	TSA	<i>Cryobacterium</i> sp.
P50	Sedimento marinho	15 °C	TSA	<i>Psychrobacter</i> sp.
P51	Sedimento marinho	15 °C	TSA	<i>Salinibacterium</i> sp.
P35	Sedimento marinho	15 °C	TSA	<i>Pseudomonas</i> sp.

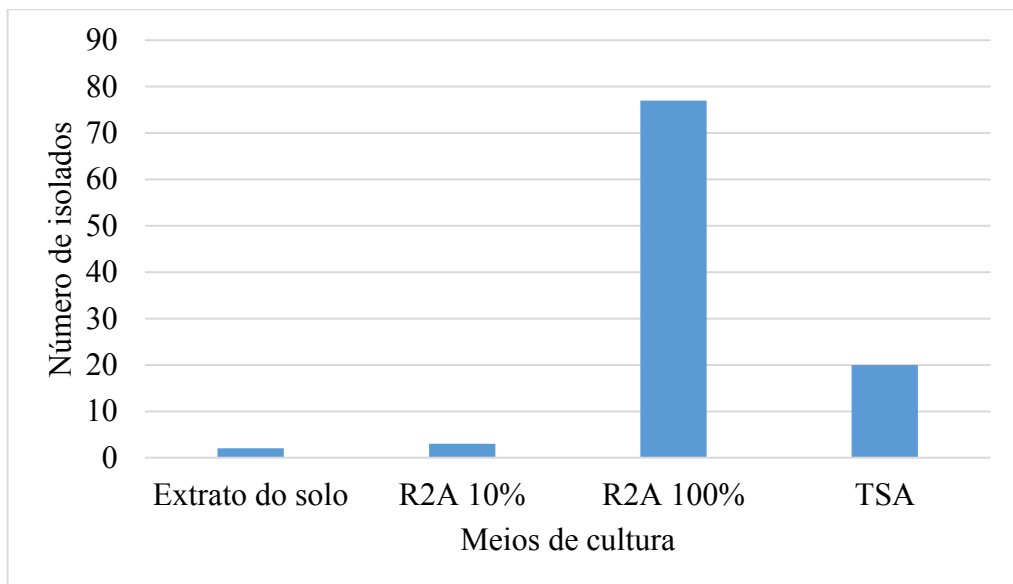
Em relação aos isolados identificados e as amostras da Antártica (Figura 18), observa-se que a maioria dos isolados foram obtidos da geleira Collins com 46, seguido das amostras da geleira Baranowski com 34, sedimento marinho com 16 e *Permafrost* e Musgo com 3 cada.

**Figura 18.** Número de isolados identificados em relação as amostras da Antártica



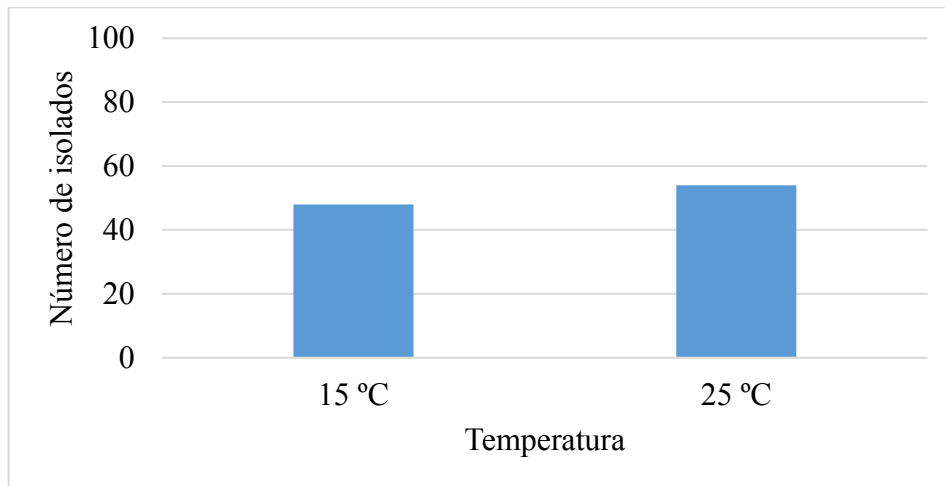
Em relação ao meio de cultura utilizado (Figura 19), foi observado que o maior número de isolados foi obtido em meio R2A 100% com 77, seguido do meio TSA com 20, R2A 10% com 3 e Extrato do solo com 2.

**Figura 19.** Meios de cultura em relação ao número de isolados identificados



Em relação ao número de isolados identificados e a temperatura (Figura 20), foi observado que a maior quantidade de isolados (54), durante a etapa de isolamento, apresentou crescimento a temperatura de 25 °C. Quarenta e oito isolados identificados apresentaram crescimento a 15 °C.

**Figura 20.** Relação de número de isolados e temperatura de incubação.

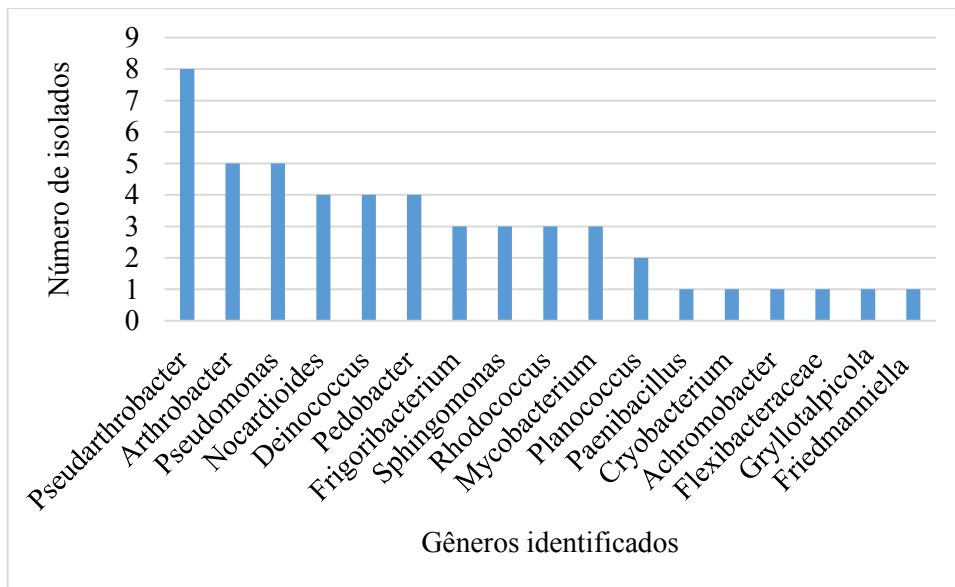


Gestel e colaboradores (2020) investigaram qual era a temperatura mínima e ótima de crescimento microbiano de amostras de água do mar e solo da Antártica. Os resultados das amostras de solo apresentaram valores de -11,3 e 27 °C para temperatura mínima e ótima, já para as amostras de água do mar apresentaram valores de -17 a 0 °C para temperatura mínima e ótima. Isso pode ser explicado devido a condições mais estáveis da temperatura das águas antárticas do que os solos, e o fato de que as temperaturas *in situ* na água são mais baixas do que nos solos. Este estudo é um exemplo de que ambientes termicamente estáveis como a água marinha antártica favorece o crescimento de comunidades bacterianas com uma curva de resposta a temperatura melhor que de comunidades bacterianas do solo que estão sob efeito de variação da temperatura do ambiente. No presente estudo encontramos a maior quantidade de isolados a 25 °C, o que pode estar relacionado a temperatura *in situ* do local de coleta das amostras de solo das Geleiras Collins e Baranowski, onde apresenta temperaturas de -1 a 2 °C no verão.

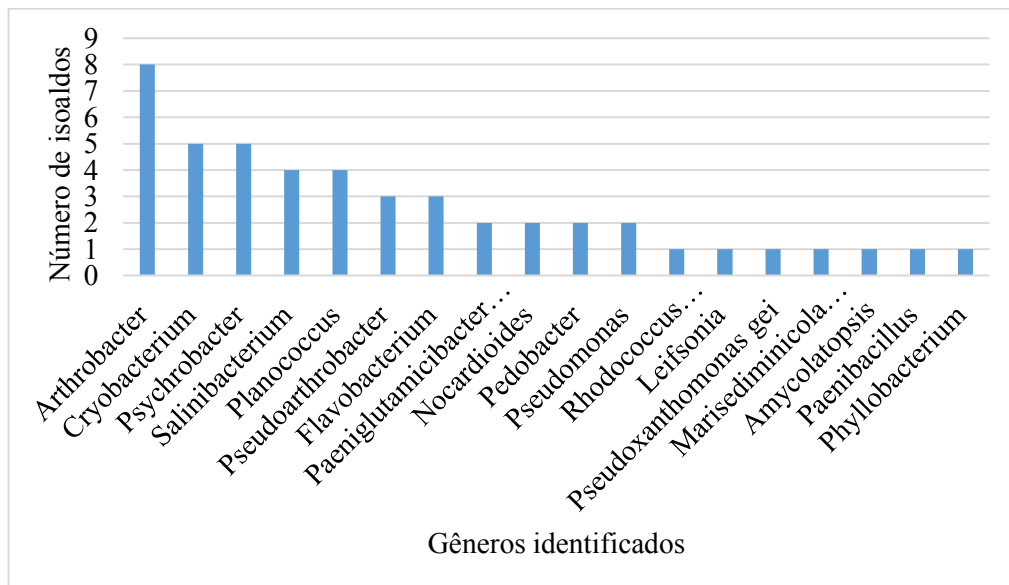
Em relação aos gêneros identificados e temperatura (**Figura 21 e 22**), pode se observar que os isolados com temperatura ótima de crescimento a 25 °C apresentaram gêneros distintos daqueles identificados com temperatura de crescimento a 15 °C. *Pseudarthrobacter* foi o gênero com a maior quantidade de isolados, seguidos de *Arthrobacter*, *Pseudomonas*, *Nocardioides*, *Deinococcus*, *Pedobacter*, *Frigoribacterium*, *Sphingomonas*, *Rhodococcus*, *Mycobacterium* e

*Planococcus*. Já em relação aos isolados cultivados a 15 °C, *Arthrobacter* foi o gênero com a maior quantidade de isolados identificados, seguidos de *Cryobacterium*, *Psychrobacter*, *Salinibacterium*, *Planococcus*, *Pseudoarthrobacter*, *Flavobacterium*, *Paeniglutamicibacter*, *Nocardioides*, *Pedobacter* e *Pseudomonas*. Estes resultados sugerem que existem gêneros que crescem em maior quantidade em temperaturas mesofílicas e psicrófilas. Por exemplo, *Pseudoarthrobacter* a 25 °C apresentou 8 isolados, enquanto o mesmo gênero a 15 °C apresentou 3 isolados. O exemplo também pode ser dado ao gênero *Planococcus*, que a 25 °C apresentou 2 isolados e a 15 °C apresentou 4.

**Figura 21.** Gêneros identificados em relação ao número de isolados a 25 °C



**Figura 22.** Gêneros identificados em relação ao número de isolados a 15 °C



A condição de crescimento a 15 ou 25 °C propicia a diversidade de bactérias de gêneros diferentes em uma mesma amostra. Por exemplo, somente a 25 °C foi identificado os gêneros *Deinococcus*, *Sphingomonas* e *Friedmanniella*. Já a 15 °C, os gêneros *Salinibacterium*, *Psychrobacter*, *Paeniglutamicibacter*, *Leifsonia*, *Pseudoxanthomonas* e *Marisediminicola* foram identificados nesta condição.

O gênero *Arthrobacter* pertence ao filo Actinobacteria e inclui bactérias mesofílicas com temperatura ótima de crescimento abaixo de 30 °C, mas algumas cepas têm sido isoladas de ambientes frios como o Ártico e Antártica sendo psicrotolerantes (PINDI et al. 2010; GANZERT et al. 2011; SILVA et al., 2018). Em 1999 uma nova espécie de bactéria foi isolada do peixe Alabote Gronelândia (*Reinhardtius hippoglossoides*): *Arthrobacter rhombi*. Esta bactéria é Gram-positiva, não forma esporos e não é móvel (OSÓRIO et al., 1999). *Arthrobacter flavus* foi a primeira bactéria isolada de uma lagoa em McMurdo Dry Valley. *A. flavus* é uma bactéria psicrófila, aeróbica, Gram-positiva, não formadora de esporos, não móvel e cresce de 5 a 30 °C (REDDY et al., 2000). *Arthrobacter roseus* foi isolada de um lago localizado em McMurdo, Antártica, é Gram-positiva, sem formação de esporos, não móvel, psicrófila e cresce de 5 a 30 °C, sendo 22 °C temperatura ótima de crescimento (REDDY et al., 2002). Em 2004 pesquisadores identificaram duas novas espécies: *Arthrobacter gangotriensis* e *Arthrobacter kerguelensis*, isoladas de amostras de solo e água do mar da Antártica. São aeróbicas, psicrotolerantes, Gram-positivas, não móveis, sem formação de esporos, com pigmentação amarela e crescem entre 4 e 30 °C (GUPTA et al., 2004). Uma nova espécie de bactéria *Arthrobacter psychrophenicus* foi isolada de uma caverna de gelo alpina. É aeróbica, Gram-positiva, não formadora de esporos, não móvel, produz pigmento amarelo e é facultativamente psicrófila (MARGESIN et al., 2004). *Arthrobacter psychrochitiniphilus* foi isolada de pinguins na Antártica (WANG et al., 2009). Em 2010 pesquisadores identificaram uma nova espécie de bactéria: *Arthrobacter antarcticus*, isolada de sedimento marinho da Antártica. É gram positiva, móvel e aeróbica (PINDI et al. 2010). Savoca e colaboradores (2019) estudaram a diversidade de bactérias cultiváveis em esponjas da Antártica. Neste estudo foi encontrado 125 isolados do gênero *Arthrobacter*. Este gênero também foi encontrado neste estudo com o maior número de isolados, o que poderia explicar sua abundância devido ao fato de que são bactérias comumente encontradas em ecossistemas antárticos. Além disso há uma variedade de fontes de isolamento que podem ser encontrados representantes deste gênero.

O gênero *Flavobacterium* é amplamente difundido na natureza sendo isolado de muitos habitats. O gênero tem sido amplamente encontrado em sistemas antárticos (MCCAMMON &



BOWMAN, 2000). A primeira espécie identificada na Antártica foi *Flavobacterium hibernum* isolada de um lago por McCammon e colaboradores em 1998. Em 2000 mais três espécies foram identificadas: *Flavobacterium gillisiae*, *Flavobacterium tegetincola* e *Flavobacterium xanthum* isoladas de amostras da Antártica (MCCAMMON & BOWMAN, 2000). *Flavobacterium frigidarium* foi identificada e descrita em 2001 de amostras de sedimento marinho da Antártica (HUMPHRY et al., 2001). *Flavobacterium gelidilacus*, *Flavobacterium degerlachei*, *Flavobacterium frigoris*, *Flavobacterium micromati*, *Flavobacterium fryxellicola* e *Flavobacterium psychrolimnae* foram isoladas de um lago da Antártica (TRAPPEN et al., 2003, TRAPPEN et al., 2004, TRAPPEN et al., 2005). *Flavobacterium frigidimaris* foi isolada de amostras da Antártica e descrita como uma nova espécie (NOGI et al., 2005). Yi e colaboradores (2005) descreveram uma espécie nova de bactéria deste gênero: *Flavobacterium antarcticum*, isolada do ambiente terrestre da Antártica na Ilha Rei George. É amarela, gram negativa, catalase e oxidase positiva e psicotolerante. A faixa de temperatura de crescimento é de -14,5, e 21,2 °C como mínima e ótima, respectivamente. *Flavobacterium weaverense* e *Flavobacterium sigetis* foram isoladas da Antártica e descritas em 2006 (YI et al., 2006). *Flavobacterium faecale* foi isolada de pinguins da Antártica (KIM et al., 2014). *Flavobacterium collinsense* foi isolada de uma geleira da Antártica (ZHANG et al., 2016). Recentemente foi descoberta uma nova espécie: *Flavobacterium ardleyense* isolada do solo na ilha de Ardley, nas ilhas Shetland do Sul, na Antártica. É gram negativa, amarela, forma de bastão, oxidase-catalase positiva e psicotolerante. Com temperatura de crescimento entre 4 a 22 °C (ideal, 10 °C), a pH 6,0 a 8,0 (ideal, pH 6,5) e com 0–1,5% NaCl (ideal, 0,5%) (ZHOU et al., 2017). *Flavobacterium phocarum*, *Flavobacterium ovatum*, *Flavobacterium chryseum*, *Flavobacterium psychroterrae* e *Flavobacterium kingsejongi* foram isoladas de amostras da Antártica e descritas em 2018 (ZHOU et al., 2018, REN et al., 2018, CHOI et al., 2018; KRÁLOVÁ et al., 2018). Em 2019 mais duas novas espécies foram identificadas: *Flavobacterium circumlabens* e *Flavobacterium cupreum* isoladas da Antártica (KRÁLOVÁ et al., 2019). Além da Antártica este gênero também pode ser encontrado no Ártico. Em 2017 foi descrita uma espécie nova: *Flavobacterium arcticum*. Três anos depois foram identificadas três novas espécies: *Flavobacterium sendaracinum*, *Flavobacterium caseinilyticum* e *Flavobacterium hiemivividum* isoladas de amostras de solo do Ártico (CHAUDHARY et al., 2020). Neste estudo foram encontrados isolados deste gênero, o que explicaria a ocorrência desse gênero em ecossistemas antárticos. Além disso a maioria dos isolados deste gênero foram isolados do solo, o que pode ser comparado com este estudo onde a maioria foi isolada de amostras de solos de recuo de geleira.

O gênero *Psychrobacter* é um grupo bacteriano aeróbico, osmotolerante, oxidase-positiva, psicrofílico ou psicotolerante tendo sua ocorrência em ambientes frios (SILVA et al., 2018). Bowman e colaboradores em 1996 identificaram novas espécies deste gênero na Antártica: *Psychrobacter urativorans* e *Psychrobacter frigidicola* isoladas de solos ornitogênicos da Antártica. *Psychrobacter giacincta* é uma bactéria psicotrofílica halotolerante isolada do gelo marinho antártico. É gram-negativa, não-móvel e seu crescimento ideal está entre 13 e 15 °C (BOWMAN et al. 1997). *Psychrobacter proteolyticus* foi isolada de um krill antártico (DENNER et al., 2001). *Psychrobacter salsus* e *Psychrobacter adeliensis* foram isoladas de amostras de gelo da Antártica. São aeróbicas, Gram-negativas, não-móveis e psicotolerantes (SHIVAJI et al., 2004). Duas espécies foram identificadas: *Psychrobacter vallis* e *Psychrobacter aquaticus*, isoladas a partir de amostras de cianobactérias coletadas de vários corpos d'água na região de McMurdo Dry Valley, na Antártica. São Gram-negativas, não móveis, cocóides, psicrofílicas e halotolerantes (SHIVAJI et al., 2005). Este gênero também pode ser encontrado no Ártico. Duas espécies de *Psychrobacter*: *Psychrobacter cryohalolentis* e *Psychrobacter arcticus* foram isoladas de amostras de *permafrost* da Sibéria (BAKERMANS et al., 2006). *Psychrobacter* também foi encontrado neste estudo somente a temperatura baixa, o que tem relação com os ambientes onde existe ocorrência desta bactéria. Os isolados identificados deste gênero foram obtidos de amostras de sedimento marinho, o que pode ser observado em outros estudos é que existem várias fontes de isolamento em que podem ser encontrados isolados do gênero *Psychrobacter*.

Os membros do gênero *Rhodococcus* são Gram-positivos, aeróbicos, não produzem esporos e tem sido encontrado em amostras de biofilme e solo da Antártica (SILVA et al., 2018). *Rhodococcus psychrotolerans* foi isolada da rizosfera da gramínea *Deschampsia antarctica* coletada na Ilha Rei George, Península Antártica. É aeróbia, Gram positiva, não móvel e tem seu crescimento ideal entre 16 a 20 °C (SILVA et al., 2017). O gênero *Rhodococcus* também tem sido encontrado neste estudo em amostras de solo da Antártica das geleiras Collins e Baranowski, mas também pode ser encontrado em outras fontes de isolamento como nos estudos mencionados. Três isolados identificados deste gênero foram isolados a 200 metros da geleira Baranowski e um isolado a 200 metros da geleira Collins, sendo que a temperatura ótima de crescimento é de 25 °C.

O gênero *Planococcus* vem sendo amplamente estudado e identificado em ambientes extremos como o Ártico e Antártica. O gênero *Planococcus* na Antártica vem sendo identificado desde 1984 (MILLER & LESCHINE, 1984). *Planococcus antarcticus* e

*Planococcus psychrophilus* foram identificadas de amostras de cianobactérias da Antártica (REDDY et al., 2002). *Planococcus maitriensis* também foi isolado de amostras de cianobactérias da Antártica (ALAM et al., 2003). *Planococcus faecalis* foi isolada de pinguins antárticos (KIM et al., 2015). *Planococcus versutus* isolada do solo da Península Antártica (SEE-TOO et al., 2017). Este gênero também tem sido encontrado no Ártico. *Planococcus halocryophilus* foi isolada do Ártico e apresenta crescimento a temperatura de -15 a -25 °C. Esta bactéria é Gram positiva, móvel, cocoíde e psicrófila (MYKYTCZUK et al., 2012; MYKYTCZUK et al., 2013). O gênero *Planococcus* também foi encontrado neste estudo em amostras de solo e *permafrost* da Antártica, sendo observado sua ocorrência em maior número em temperaturas frias.

O gênero *Cryobacterium* é um grupo bacteriano adaptado ao frio, sendo encontrado em regiões polares. Diversos estudos detectaram este gênero em amostras da Antártica e do Ártico, desde amostras de *permafrost*, buracos de crioconita, água marinha, gelo até solos (CHEN et al., 2016; BAJERSKI et al., 2011; GIUDICE et al., 2010; SINGH et al., 2014; LIU et al., 2020). *Cryobacterium psychrophilum* foi a primeira bactéria identificada e descrita do gênero *Cryobacterium* na Antártica em 1997. É Gram positiva, psicrófila e tem seu crescimento ideal entre 9 e 12 °C (SUZUKI et al., 1997). Em 2010 uma nova espécie foi identificada: *Cryobacterium arcticum*, isolada do solo da Groenlandia. É Gram positiva, possui pigmento amarelo, é aeróbica e tem seu crescimento de -6 °C a 28 °C, e a ideal a 20 °C (BAJERSKI et al., 2010). Em 2016 esta mesma espécie foi isolada de amostras de rocha na Antártica, identificada e sequenciada como *Cryobacterium arcticum* PAMC 27867 (LEE et al., 2016). *Cryobacterium psychrotolerans* isolada da geleira nº 1 da China, é Gram positiva, aeróbica, psicrotolerante e tem seu crescimento ideal entre 20-22 °C (ZHANG et al., 2007). *Cryobacterium flavum* e *Cryobacterium luteum* também foram isoladas da geleira nº 1 da China, são Gram-positivas, aeróbicas e apresenta crescimento de 0-20 °C (LIU et al., 2012). *Cryobacterium levicorallinum* foi a última bactéria descrita da geleira nº 1 da China em 2013. É Gram positiva, aeróbica, psicrófila e tem seu crescimento ideal de 8 a 14 °C (LIU et al., 2013). *Cryobacterium roopkundense* foi isolado lago glacial Roopkund na Cordilheira do Himalaia. É Gram-positiva, aeróbica, em forma de bastão, móvel, cresce otimamente entre 15 e 18,6 °C e é psicrófila (REDDY et al., 2010). Este gênero também foi encontrado neste estudo em amostras de solo da geleira Collins da Antártica, sendo identificados 2 isolados a 50 metros da geleira como da espécie *Cryobacterium psychrotolerans* que apresentam temperatura de crescimento a 25°C e outro isolado tem sua temperatura de crescimento a 15 °C a 100 metros

da geleira. O maior número de isolados identificados neste estudo deste gênero foram obtidos de amostras de sedimento marinho, tendo um total de quatro isolados, que possuem temperatura ótima de crescimento a 15 °C.

O gênero *Pedobacter* tem sido encontrado em vários ambientes e são altamente adaptadas as condições frias e com poucos nutrientes. *Pedobacter cryoconitis* foi identificada e descrita em 2003 por Margesin e colaboradores. Isolada de uma geleira alpina crioconita, é Gram negativa, aeróbica e psicrotolerante. Da e colaboradores (2015) identificaram uma nova espécie: *Pedobacter ardleyensis*, isolada do solo da Antártica. É Gram negativa, aeróbica e cresce a 18 °C. Svec e colaboradores (2017) isolaram e descreveram 4 espécies novas de *Pedobacter* da Antártica: *Pedobacter jamesrossensis*, *Pedobacter lithocola*, *Pedobacter mendelii* e *Pedobacter petrophilus*. São Gram negativas, aeróbicas e crescem entre 1 a 30 °C. *Pedobacter psychrophilus* isolada de fragmentos de rocha da Antártica (SVEC et al, 2017). Em 2019 foi identificado uma nova espécie do gênero *Pedobacter* chamada *Pedobacter changchengzhani*, isolada do solo da Antártica. É uma bactéria Gram-negativa, aeróbica, não móvel, com coloração rosa e em forma de bastonete (HE et al., 2019). *Pedobacter nototheniae* foi isolada do bacalhau preto (*Notothenia coriiceps*) da Antártica. É Gram negativa, aeróbica e cresce a 25 °C (KAMPFER et al., 2019). *Pedobacter arcticus* foi isolada de amostras de solo da tundra do Ártico. É Gram negativa, móvel, aeróbica, psicrotolerante e cresce a 18 °C (ZHOU et al., 2012). Este gênero também foi encontrado neste estudo em amostras de solo da Antártica, sendo que dos 6 isolados identificados, quatro foram obtidos da geleira Baranowski a 200, 300 e 400 metros e dois foram obtidos a 50 metros da geleira Collins. A temperatura de crescimento para 4 isolados é de 25 °C e para 2 isolados é de 15 °C.

Uma nova espécie de bactéria foi identificada como *Marisediminicola antarctica*. Esta bactéria foi isolada de amostras de areia da Estação Antártica Chinesa. Possui a forma de bastonetes, são gram-positivas e móveis. A faixa de temperatura para crescimento é de 0–26 °C, sendo que a temperatura ótima é entre 18 e 23 °C (LI et al., 2010). Esta espécie também foi encontrada neste estudo, na amostra de solo arenosa à distância de 300 metros da frente da geleira Baranowski.

O gênero *Nocardioides* possui 73 espécies e tem sido isolado de uma variedade de ambientes. *Nocardioides aquaticus* foi isolada, identificada e descrita a partir de uma amostra de água do lago hipersalino Ekho, na Antártica em 2000. É Gram negativa, aeróbica e cresce entre 16 a 26 °C (LAWSON et al., 2000). Deng e colaboradores (2015) descreveram uma nova espécie de bactéria *Nocardioides antarcticus* isolada do sedimento marinho da enseada de

Ardley, na ilha Rei George na Antártica. É uma bactéria não móvel, aeróbia, Gram positiva e ovoide. A temperatura de crescimento ideal é a 20 °C. *Nocardioides sambongensis* foi isolada e identificada de amostras de solo da ilha Dodko na Coreia. É Gram positiva, aeróbica e cresce a 30 °C (HWANG et al., 2019). *Nocardioides zhouii* foi isolada da Galeria Hailuogou na China. É Gram positiva, aeróbica e cresce a 20 °C (ZHANG et al., 2019). *Nocardioides marinus* foi isolada da água do mar e identificada como uma nova espécie. É Gram positiva, ligeiramente halofílica, aeróbica e cresce entre 10 a 40 °C (CHOI et al., 2007). Este gênero também foi encontrado neste estudo em amostras de solo da geleira Baranowski e Collins, totalizando 8 isolados, sendo que 6 desses isolados foram obtidos da geleira Collins nos recuos de 0, 50 e 100 metros e 2 isolados foram obtidos da geleira Baranowski nos recuos de 100 e 200 metros. A temperatura de isolamento foi de 25 °C para seis isolados da Collins e de 15 °C para dois da Baranowski.

O gênero *Salinibacterium* foi proposto pela primeira vez em 2003 por Han e colaboradores. Estes pesquisadores identificaram uma nova espécie de bactéria do gênero *Salinibacterium*: *Salinibacterium amurskyense*, isolada da água do mar da Baía de Amursky. É uma bactéria psicrotolerante, gram positiva, aeróbica e formadora de esporos. Tem seu crescimento ideal de 25 a 28 °C (HAN et al., 2003). Zhang e colaboradores (2008) identificaram outra espécie deste mesmo gênero: *Salinibacterium xinjiangense*, isolada de um solo congelado na China localizado em região de geleira. É uma bactéria psicrófila, Gram-positiva, aeróbica e amarela. Tem seu crescimento ideal a 18-19,6 °C. Em 2012 foi sequenciado o genoma de uma bactéria da espécie *Salinibacterium* isolada do solo da Ilha Rei George na Antártica. Este estudo representa o primeiro sequenciamento genômico para *Salinibacterium* de ambiente antártico podendo fornecer informações de sua estratégia evolutiva e adaptativa ao frio (SHIN et al., 2012). Este gênero também foi encontrado neste estudo em amostras de solo e sedimento marinho com um total de 4 isolados, sendo que destes 3 foram obtidos de sedimento marinho e 1 foi obtido a 0 metros da geleira Baranowski. Todos os isolados têm sua temperatura de crescimento ideal a 15 °C. Comparando com os estudos acima citados pode se observar que há várias fontes de isolamento de isolados deste gênero.

O gênero *Leifsonia* foi proposto pela primeira vez por Evtushenko et al. e colaboradores em 2000. A seguir apresento novas espécies do referido gênero encontradas em ambientes extremos. *Leifsonia rubra* e *Leifsonia aurea* foram identificadas como espécies novas isoladas de uma lagoa na Antártica. As duas espécies são Gram positivas, não móveis, catalase positiva, aeróbicas e crescem a 15 °C (*Leifsonia rubra*) e 22 °C (*Leifsonia aurea*) (REDDY et al., 2003).

Posteriormente, *Leifsonia pindariensis* foi isolada de amostras de solo a 3500 metros de altitude da Geleira Pindari do Himalaia Indiano e caracterizada como Gram positiva, móvel e aeróbica (REDDY et al., 2008). Pavan e colaboradores (2009) identificaram duas espécies deste gênero: *Leifsonia kafniensis* e *Leifsonia antarctica* que foram isoladas de uma amostra de solo perto da geleira Kafni, na cordilheira do Himalaia e de uma amostra de sedimentos do Oceano Antártico. Ambas espécies são pigmentadas amarelo, Gram-positivas, aeróbicas, não-móveis, em forma de coração e psicrotolerantes. Por sua vez *Leifsonia psychrotolerans* foi identificada como uma nova espécie em 2011 isolada de amostras solos cobertos de musgos da Ilha Livingstone na Antártica. Sendo *L. psychrotolerans* Gram positiva, móvel, psicrotolerante, anaeróbica facultativa e cresce a 16 °C (GANZERT et al., 2011). *Leifsonia* sp. também foi encontrado neste estudo a partir de amostras de solo da geleira Baranowski à 200 metros, e sua temperatura ideal de crescimento é de 15 °C. Esse gênero é considerado raro, por conta disso a ocorrência em ambientes antárticos torna-se pouco representativa em relação a gêneros dominantes como *Arthrobacter* e *Flavobacterium*.

Espécies do gênero *Deinococcus* são caracterizadas por serem resistentes a radiação e dessecação, compreendendo mais de 58 espécies. Novas espécies deste gênero vêm sendo isoladas de várias amostras ambientais. *Deinococcus rubellus* foi isolada de um peixe antártico. É Gram positiva, aeróbica e cresce a 20 °C (CHOI et al., 2016). *Deinococcus marmoris* foi isolada de *Usnea* sp., um líquen coletado da Ilha Rei George, Antártica (KIM et al., 2017). Srinivasan e colaboradores (2017) isolaram uma espécie nova de *Deinococcus*: *Deinococcus rubrus*, isolada da água do mar da Antártica. É Gram-negativa, vermelho-rosada, em forma de cocos, não móvel e aeróbica. Apresenta temperatura de crescimento de 4 a 30 °C. *Deinococcus psychrotolerans* foi isolada de amostras de solo da Ilha Shetlands do Sul da Antártica. É Gram negativa, estritamente aeróbica e altamente resistente a radiação (TIAN et al., 2019). *Deinococcus arcticus* foi isolada da rizosfera de *Silene acaulis* coletada na tundra do Ártico. É Gram negativa, aeróbica e cresce a 33 °C (WANG et al., 2019). *Deinococcus saudiensis* foi isolada de um deserto na Arábia Saudita. É Gram negativa, aeróbica, resistente a radiação e cresce entre 15 a 45 °C (HUSSAIN et al., 2016). *Deinococcus taklimakanensis* foi isolada de um deserto da China. É Gram negativa, resistente a radiação, aeróbica e cresce entre 28-30 °C (LIU et al., 2017). Este gênero também foi encontrado neste estudo em amostras de solo das geleiras Baranowski e Collins, totalizando 5 isolados, destes 3 isolados foram obtidos da Collins e 2 isolados da Baranowski, sendo que a temperatura ideal de crescimento é de 25 e 15 °C, respectivamente.

O gênero *Sphingomonas* pode ser encontrado em uma série de ambientes. Em 2017 pesquisadores identificaram uma nova espécie de *Sphingomonas*: *Sphingomonas antarctica*, isolada do solo de tundra da Antártica. É Gram-negativa, pigmentada amarelo, catalase positiva, oxidase-negativa, não-móvel, sem formação de esporos, em forma de bastonete e aeróbica. Sua temperatura ótima de crescimento foi de 20 °C (HUANG et al., 2017). *Sphingomonas floccifaciens* foi isolada de amostras de sedimentos subterrâneos na área de *permafrost* de Mohe, China. É Gram negativa, aeróbica e cresce a 25 °C (FAN et al., 2018). Geng e colaboradores (2019) identificaram uma nova espécie: *Sphingomonas paeninsulae* isolada de amostras de solo da Península Fildes na Antártica. É Gram negativa, oxidase e catalase positiva, aeróbica e cresce a 20 °C. Este gênero também foi encontrado neste estudo em amostras de solo da geleira Collins nos recuos de 0 e 50 metros, totalizando 3 isolados, tendo temperatura ideal de crescimento a 25 °C. Nos estudos citados acima existe uma variedade de fontes de isolamento para este gênero, sendo geralmente encontrado em solos na Antártica.

O gênero *Pseudomonas* pode ser encontrado em uma série de ambientes. Em 2003 três espécies de bactérias *Pseudomonas* foram identificadas: *Pseudomonas antarctica*, *Pseudomonas meridiana* e *Pseudomonas proteolytica*, isoladas de corpos d'água da Antártica. São aeróbicas, Gram-negativas, em forma de bastonete e móveis. Com temperatura de crescimento de 4 a 30 °C (REDDY et al., 2003). *Pseudomonas gregormendelii* foi isolada de amostras de solo da Ilha Ross na Antártica. É Gram negativa, aeróbica, psicrotrófica e cresce de 5 a 30 °C (KOSINA et al., 2016). *Pseudomonas versuta* foi isolada, identificada e descrita de amostras da Antártica. É Gram negativa, aeróbica e cresce a 28 °C (SEE-TOO et al., 2017). *Pseudomonas profundii* foi isolada e identificada de amostras de água de mar profundo (1000 metros) no Oceano Pacífico. É Gram negativa, aeróbica e cresce a 25 °C (SUN et al., 2018). Em 2020 foi identificada e descrita uma nova espécie de *Pseudomonas*: *Pseudomonas leptonychotis*, isolada de amostras de focas da Antártica (NOVÁKOVÁ et al., 2020). Este gênero também foi encontrado neste estudo em amostras de solo e de sedimento marinho, com um total de 5 isolados. Destes 1 isolado foi obtido da geleira Collins a 100 metros, 2 isolados foram obtidos da geleira Baranowski a 0 metros e 2 isolados foram obtidos de amostras de sedimento marinho. A temperatura de crescimento é de 25 °C para os isolados das geleiras e de 15 °C para os isolados de sedimento marinho.

O gênero *Frigoribacterium* foi proposto pela primeira vez em 2000 por Kampfer e colaboradores. Os membros deste gênero são gram positivos, aeróbicos e possuem menaquinona MK-9 como principal via da cadeia respiratória (KONG et al., 2016).

*Frigoribacterium faeni* foi isolada do ar e identificada como uma nova espécie (KAMPFER et al., 2000). *Frigoribacterium salinisoli* foi identificada como uma nova espécie isolada de amostras de solo salino na China. É Gram positiva, aeróbica e cresce otimamente entre 25 a 30 °C (KONG et al., 2016). Este gênero também foi encontrado neste estudo em amostras de solo da geleira Collins nos recuos de 0, 100 e 200 metros, com um total de 3 isolados. A temperatura ideal de crescimento é de 25 °C.

O gênero *Friedmanniella* tem sido encontrado na Antártica em diversas fontes de isolamento. A primeira espécie identificada na Antártica foi *Friedmanniella antarctica* isolada de um arenito e descrita em 1997. É Gram positiva, aeróbica e cresce a 22 °C (SCHUMANN et al., 1997). Posteriormente *Friedmanniella lacustris* foi isolada do lago Ehko na Antártica, caracterizada como Gram positiva, aeróbica e cresce a 26 °C (LAWSON et al., 2000). Este gênero também foi encontrado neste estudo em amostras de solo da geleira Collins no recuo de 50 metros e sua temperatura ideal de crescimento é de 25 °C.

O grupo mais abundante foi do filo Actinobacteria, seguidos de Gammaproteobacteria, Bacteroidetes, Deinococcus-Thermus, Bacilli e Alphaproteobacteria (**Tabela 7**).



**Tabela 7.** Grupos de bactérias identificados pela região do RNAr 16S encontrados na literatura e neste estudo.

<b>Estudo</b>	<b>Número de isolados</b>	<b>Filo (Classe) de bactérias</b>
Zdanowski et al. (2013)	8	Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, Proteobacteria (Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria, e Gammaproteobacteria)
Belov et al. (2020)	134	Actinobacteria, Firmicutes, Proteobacteria e Bacteroidetes
Xing et al. (2019)	109	Firmicutes, Proteobacteria
Zhang et al. (2007)	48	Actinobacteria, Firmicutes e Proteobacteria,
Este estudo	106	Actinobacteria, , Bacteroidetes, Deinococcus-Thermus, Firmicutes e Proteobacteria (Alphaproteobacteria, Gammaproteobacteria)

Os resultados deste estudo comparado com os da literatura indicam que o Filo dominante nas amostras ambientais por métodos dependentes de cultivo foi Actinobacteria. Mas também podem ser encontrados outros grupos bacterianos dependendo do tipo de amostra, do meio de cultura e da temperatura utilizada no isolamento.

Em relação aos recuos das geleiras pode-se observar a ocorrência de gêneros diferentes ao longo do gradiente (**Tabela 8 e 9**).

**Tabela 8.** Relação de gêneros identificados e o gradiente da geleira Collins

<b>Metros</b>	<b>Gêneros Identificados</b>
0	<i>Pseudomonas, Deinococcus, Nocardoides, Flavobacterium e Frigoribacterium</i>
50	<i>Arthrobacter, Sphingomonas, Friedmaniella, Mycobacterium, Pedobacter, Pseudarthrobacter e Nocardioides.</i>
100	<i>Nocardioides, Flexibacteraceae, Mycobacterium, Pseudarthrobacter, Gryllotalpicota, Frigoribacterium, Pseudomonas e Cryobacterium</i>
200	<i>Friogoribacterium, Pseudomonas, Arthrobacter, Pseudarthrobacter, Rhodococcus</i>
300	<i>Pseudarthrobacter, Arthrobacter, Flavobacterium e Pseudomonas.</i>
400	<i>Arthrobacter, Pseudathrobacter e Deinococcus</i>

**Tabela 9.** Relação de gêneros identificados e o gradiente da geleira Baranowski

<b>Metros</b>	<b>Gêneros Identificados</b>
0	<i>Arthrobacter, Pseudomonas e Deinococcus.</i>
100	<i>Arthrobacter, Paeniglutamicibacter e Planococcus.</i>
200	<i>Rhodococcus, Arthrobacter, Leifsonia, Nocardioides, Pseudoxantomonas, Allochromattium e Pedobacter.</i>
300	<i>Pseudarthrobacter, Paeniglutamicibacter, Arthrobacter, Pedobacter e Marisediminicola antartica.</i>
400	<i>Pedobacter e Arthrobacter</i>

O gênero *Pseudomonas* foi o mais prevalente ao longo dos recuos (0 a 300 metros), tendo sua ausência no recuo de 400 metros na geleira Collins. Já na geleira Baranowski, *Pseudomonas* apareceu somente na amostra de 0 metros. O gênero *Arthrobacter* apareceu em todos os recuos (0 a 400 metros) da geleira Baranowski e na geleira Collins apareceu em 4

recuos (50, 200, 300 e 400 metros). Isto pode ser explicado pelo fato de que *Arthrobacter* desempenha um papel de bactérias pioneiras na sucessão ecológica, permitindo o crescimento de outros gêneros de bactérias ao longo do gradiente (ZDANOWSKI et al., 2013). Este resultado é comparado com o estudo de Zdanowski e colaboradores (2013) onde *Arthrobacter* também esteve presente em todas as amostras de solo da geleira Ecology na Antártica. O gênero *Pseudomonas* também foi encontrado no estudo de Zdanowski e colaboradores (2013), onde eles relataram a ocorrência deste gênero em estágios finais da sucessão.

Na Antártica, as comunidades bacterianas autóctones adaptadas ao frio desempenham função de sustentar e contribuir para o funcionamento dos ecossistemas, permitindo a existência de vida em condições extremas (LO GIUDICE et al., 2019). Em um estudo da comunidade de bactérias cultiváveis em solos pós-glaciais da geleira Ecology na Ilha Rei George identificou 82 culturas puras de bactérias identificadas pela região RNAr 16S, sendo 75 dessas identificadas até nível de gênero. Entre as bactérias cultivadas a partir do transecto 1 e a borda da geleira os gêneros encontrados foram *Frigoribacterium*, *Leifsonia* e *Arthrobacter*. *Sphingomonas* e *Brevundimonas* ocorreram em grandes quantidades em todo transecto, mas seu número diminuiu com a distância da geleira. *Polaromonas* foram detectadas na geleira e ao longo de transecto 2. *Herminiimonas* foi o gênero dominante no começo do recuo da geleira. *Pseudomonas* estava presente em estágios finais da sucessão. *Flavobacterium* e *Pedobacter* estavam presentes em quantidades moderadas nos locais nos estágios inicial e médio da sucessão. *Sporosarcina* foi encontrado em ambos os transectos, mas apenas em áreas distantes da geleira (ZDANOWSKI et al., 2013). No presente estudo o gênero *Pseudomonas* também estava ao longo do gradiente da geleira Baranowski, e em estágios finais de sucessão na geleira Collins. Os gêneros *Flavobacterium* e *Pedobacter* também apareceram ao longo do gradiente das geleiras Collins e Baranowski.

No estudo de Belov e colaboradores (2020), 134 isolados de bactérias heterotróficas aeróbicas foram isoladas de amostras de *permafrost* e gelo em um arquipélago russo no oceano Ártico e identificadas por sequenciamento pela região RNAr 16S. Nas comunidades bacterianas heterotróficas aeróbicas cultiváveis das amostras analisadas, foram revelados representantes dos Filos de Actinobacteria, Firmicutes, Proteobacteria e Bacteroidetes. Desses, o Filo Actinobacteria apresentou-se como grupo dominante. Nas amostras de moraina com gelo e de gelo glacial, o Filo dominante foi Proteobacterias. No complexo bacteriano isolado da amostra de moraina a 10 ° C no meio PYG, representantes dos gêneros *Rhodococcus*, *Bacillus* e *Micrococcus* foram identificados. A comunidade cultivada no mesmo meio a 25 ° C foi

caracterizada por *Bacillus* e *Micrococcus* como gêneros dominantes. Da mesma amostra no meio CM a 10 °C, a comunidade foi dominada por *Pseudomonas oryzihabitans*; a 25 °C, *Streptomyces* e *Glutamicibacter* foram os gêneros mais abundantes. Na comunidade cultivada a partir da amostra de moráina com gelo no meio PYG a 10 °C, *Stemotrophomonas* foi o gênero mais abundante; a 25 °C, o *Arthrobacter* foi o gênero dominante no complexo bacteriano. No meio CM a 10 °C, *Leucobacter* e *Brevibacterium* constituíram 28% e 24% de todas as colônias cultivadas, respectivamente; a 25 °C, 80% de toda a comunidade isolada era representada por *Brevibacterium* e *Pseudarthrobacter*. Na comunidade isolada da amostra de gelo no meio PYG a 10 °C, *Bacillus* e *Microbacterium*; a 25 °C *Micrococcus* foi a bactéria mais abundante isolada. No meio CM a 10 °C, *Stenotrophomonas* e *Ochrobactrum*; a 25 °C, *Bacillus*, *Rhodococcus* e *Microbacterium*. Os gêneros *Arthrobacter*, *Pseudarthrobacter* e *Rhodococcus* também foram encontrados nas amostras de solo da Antártica.

Os resultados da identificação dos isolados do *permafrost* e sedimento marinho apresentaram 6 gêneros distintos. *Psychrobacter* foi o gênero mais abundante com 5 isolados, seguidos de *Cryobacterium*, *Salinibacterium* e *Planococcus* com 3 isolados, *Pseudomonas* com 2 isolados e *Phyllobacterium* com apenas 1 isolado. Em relação as camadas do *permafrost*, 3 isolados identificados foram coletados na amostra P17 que fica a 9,2 metros (7.500 anos) e 16 isolados identificados foram coletados na amostra B2 (sedimento marinho) que fica a 0 metros de profundidade. Os três isolados identificados na amostra P17 pertencem ao gênero *Planococcus*. Os 16 isolados identificados na amostra de sedimento marinho estão compreendidos nos gêneros *Psychrobacter*, *Cryobacterium*, *Salinibacterium*, *Pseudomonas* e *Phyllobacterium*.

Xing e colaboradores (2019) caracterizaram a comunidade bacteriana em ambientes frios e alcalinos no Planalto de Qinghai – Tibet de amostras de solo de deserto, terras salinas-alcalinas, áreas úmidas salinas-alcalinas e sedimento de lago. Um total de 109 cepas bacterianas foram isoladas e identificadas pela região RNAr 16S como pertencentes a 10 espécies. *Pseudomonas* representando 90,8% do total de isolados – 99. *Psychrobacter* foi identificado em 16 isolados (14,7%), dois isolados com *Acinetobacter*, *Hafnia* e *Exiguobacterium* com apenas 1 isolado. Todos os isolados conseguiram crescer a baixa temperatura (5 °C), mas o crescimento ideal para a maioria ocorreu a uma temperatura ligeiramente mais alta (10–30 °C). *Psychrobacter* e *Pseudomonas* são gêneros que também foram encontrados nas amostras de *permafrost* da Antártica neste estudo.

Zhang e colaboradores (2007) estudaram a diversidade e distribuição de bactérias psicrotolerantes alcalifílicas isoladas por métodos dependentes de cultivo de amostras de *permafrost* do Planalto de Qinghai – Tibet. Quarenta e oito isolados foram selecionados de acordo com suas características morfológicas. Após a identificação pela região RNAr 16S os 48 isolados foram agrupados em 12 grupos. Vinte e oito isolados foram identificados como dos gêneros *Nesterenkonia*, *Arthrobacter* e *Citricoccus*. Seis isolados foram identificados dos gêneros *Marinibacillus*, *Sporosarcina*, *Planomicrobium* e *Bacillus*. Dois isolados foram identificados como dos gêneros *Mycoplana* e *Paracoccus*. Os gêneros identificados no *permafrost* da Antártica diferiram dos encontrados no estudo de Zhang e colaboradores (2007) devido a serem ambientes diferentes e localizados em polos diferentes (Sul e Norte). Este é um exemplo de que a diversidade de bactérias em ambientes diferentes, apesar da mesma condição de estresse imposta (frio extremo), apresenta grupos de bactérias distintos.

No estudo de Xing e colaboradores (2019) somente os Filos Proteobacteria e Firmicutes foram detectadas usando métodos dependentes de cultivo. Em contraste, seis filios bacterianos foram detectados por métodos independentes de cultivo, sendo que Proteobacteria, Bacteroidetes e Actinobacteria foram Filos dominantes em todas as amostras. Métodos independentes de cultivo podem fornecer uma estratégia para investigar comunidades bacterianas. Em um estudo sobre ecologia microbiana em retração da geleira Hurd da Antártica foram identificadas 5070 sequências de bactérias por metagenômica, compreendidas em 31 Filos, sendo os mais abundantes as Proteobacteria e Actinobacteria, seguidas por Bacteroidetes, Chloroflexi, Acidobacteria, Deinococcus-Termo, Gemmatimonadetes e Cianobactérias. As ordens Holophagales e Acidobacteriales (Filo Acidobacteria) estavam presentes apenas nos solos. Nas comunidades edáficas, a abundância relativa de Burkholderiales (Betaproteobacteria) e Flavobacteriia (Bacterioidetes) diminuiu ao longo da cronosequência, enquanto Gemmatimonadales aumentou. Os autores ainda destacaram que as diferenças estruturais da comunidade estavam presentes desde o início da sucessão (dentro de um ano após a deglaciação). Este estudo é importante para entender a sucessão biológica e prever a resposta das comunidades microbianas às mudanças climáticas nos sistemas antárticos (GARRIDO-BENAVENT et al., 2020). As comunidades bacterianas do gelo marinho do Ártico e da Antártica são dominadas por membros heterotróficos das classes Flavobacteriia e Gammaproteobacteria, com baixa incidência de Alphaproteobacteria, Verrucomicrobia e Bacilli. As sequências de Flavobacteriia e Gamaproteobacteria geralmente dominam o gelo marinho e as sequências Alfaproteobacteria dominam a água do mar (BOETIUS et al., 2015).

Os métodos independentes de cultivo podem fornecer informações importantes de bactérias não cultiváveis e que podem vir a ser cultivadas conhecendo melhor seu metabolismo formulando condições que favoreçam seu crescimento.

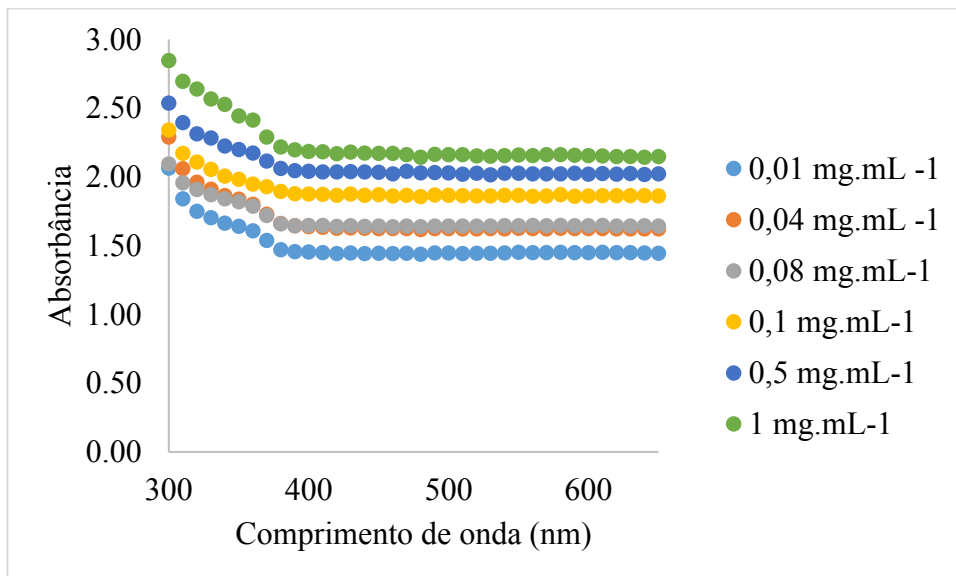
## 5.2 Seleção de bactérias produtoras de AFP

### 5.2.1 Varredura do controle positivo e negativo

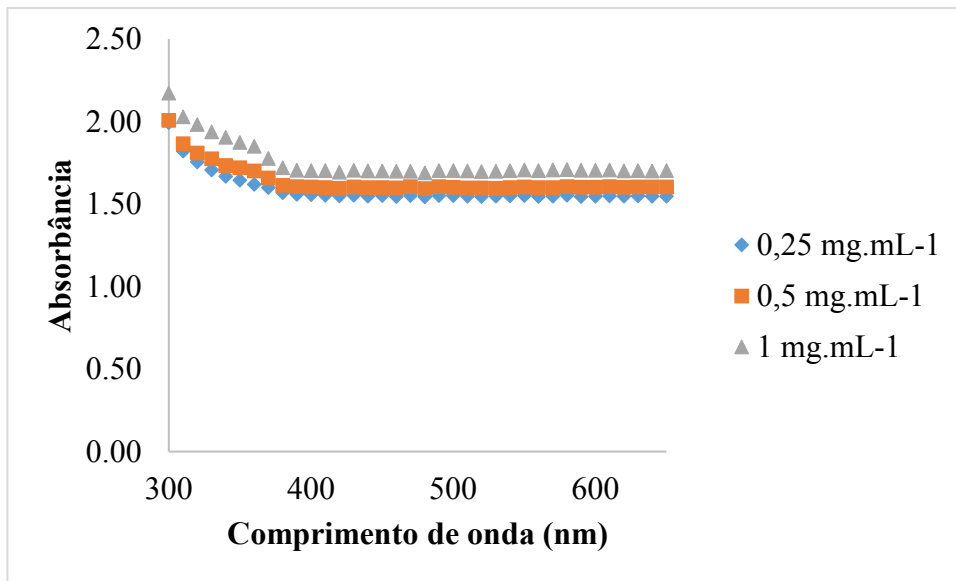
O screening de bactérias produtoras de AFP foi realizado por meio do teste de inibição de recristalização (IR) utilizando a metodologia adaptada de Gilbert e colaboradores (2004). Considerando que soluções turvas é indicativo de presença de AFP e soluções transparentes indicativo de ausência de AFP, utilizamos a metodologia desenvolvida por Cid et al. (2016), onde as proteínas anticongelantes produzem absorvâncias diferentes do controle negativo (branco/*E. coli*/BSA) na leitura do espectrofotômetro de placas.

Primeiramente foi feito uma varredura das concentrações de 0,01 a 1 mg.mL<sup>-1</sup> da proteína anticongelante de peixe tipo III (A/F Protein, Inc., USA) (**Figura 23**), da proteína albumina do soro bovino (BSA) nas concentrações de 0,25, 0,5 e 1 mg.mL<sup>-1</sup>(**Figura 24**), do branco (água + sacarose) e do extrato proteico da *E. coli* 0,5 mg.mL<sup>-1</sup> (**Figura 25**).

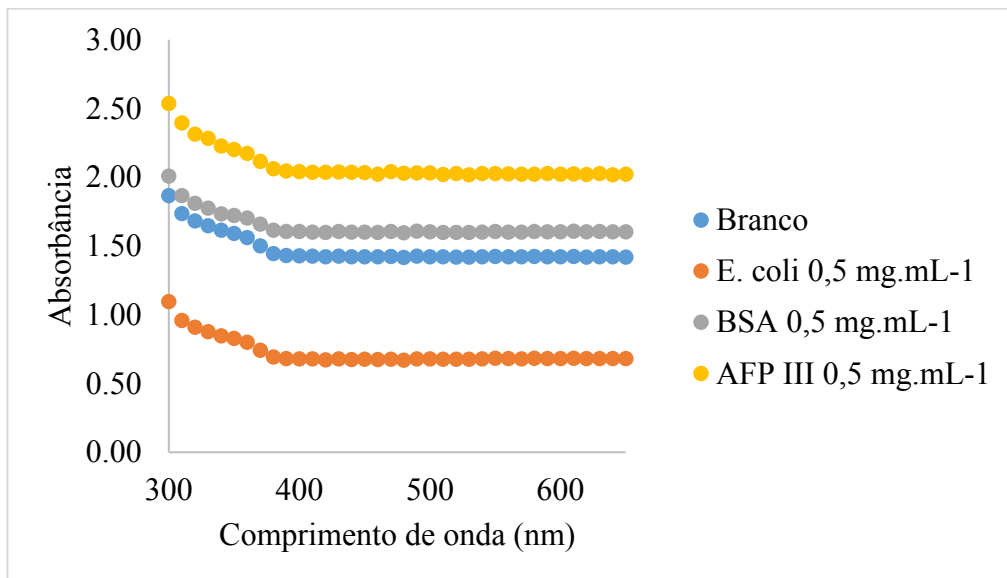
**Figura 23.** Varredura das concentrações da AFP tipo III



**Figura 24.** Varredura da proteína albumina do soro bovino (BSA)



**Figura 25.** Comparação das varreduras do controle positivo (AFP III) e dos controles negativos (Branco, BSA e *E. coli*).

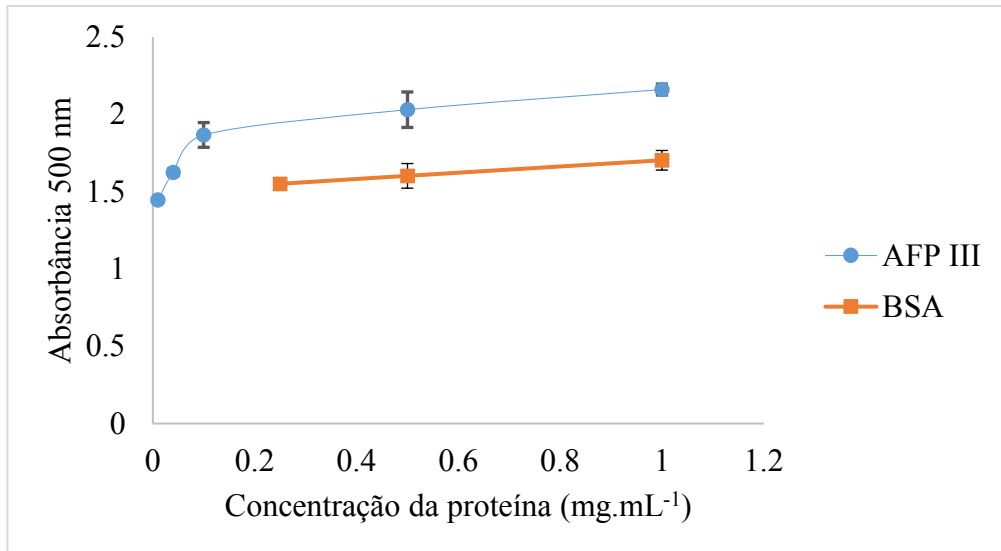


Após a realização da varredura, foi observado que o melhor comprimento de onda para a leitura do teste IR foi o de 500 nm. Este comprimento foi escolhido por conta de que entre 300 e 400 nm há uma zona de instabilidade de absorvâncias e que a partir do comprimento de 500 nm há absorvâncias com valores bem homogêneos (constante), o que há uma confiabilidade maior na leitura dos resultados do teste de inibição de recristalização (IR).

Outro ponto importante é que a proteína anticongelante produz valores de varredura de absorvância maior que os controles negativos. Além dos valores na varredura, o comprimento

de onda selecionado para as leituras das placas (500 nm) também apresenta valores de absorvância maior que a proteína albumina de soro bovino (BSA) nas mesmas concentrações utilizadas (**Figura 26**).

**Figura 26.** Leitura de diferentes concentrações de AFP III e BSA a 500 nm.



### 5.2.2 Ensaio de Inibição de Recristalização

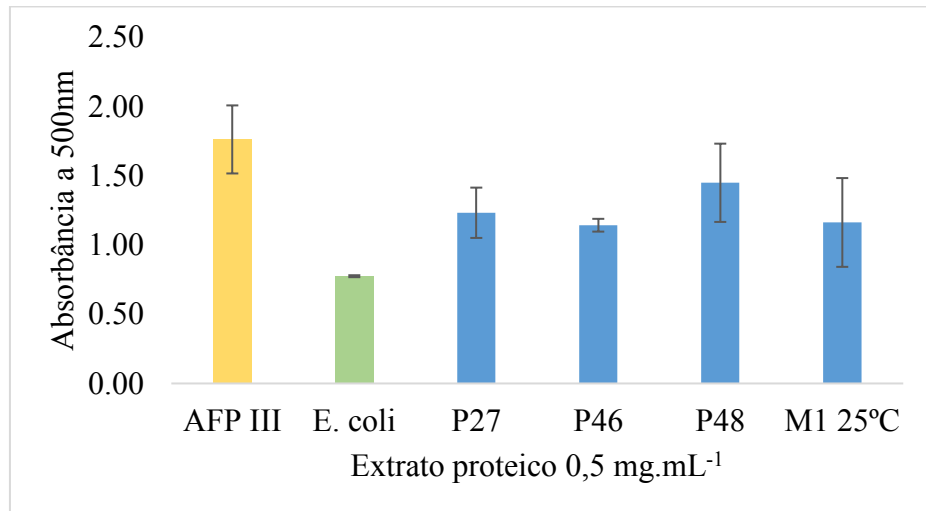
Foram testadas formas de como padronizar o teste IR. Três formas de misturar o extrato proteico foram realizadas: a) sem homogeneização; b) homogeneização com o auxílio de uma pipeta; c) homogeneização com vortex. Após os resultados de absorvância dos extratos, chegou-se a conclusão que a solução de sacarose com o extrato proteico misturada com a pipeta foi o melhor método para se ter uma leitura correta das amostras. Por exemplo, o extrato proteico de *E. coli* com o método a e c apresentaram valores de absorvância de 1, já com o método b apresentou valores de 0,6 o que foi validado e comparado com o valor de absorvância observado no trabalho de Cid e colaboradores em 2016. Além da homogeneização, as placas de 96 poços foram previamente congeladas a -20 °C por 24 horas antes do experimento, uma vez que 15 minutos no freezer -80 °C não foi suficiente para congelar a solução adicionada nas placas. As placas foram tampadas quando acondicionadas no freezer -80 °C para o gelo do freezer não interferir nos resultados do experimento. As temperaturas do freezer a -6 °C e -80 °C foram monitoradas para garantir o congelamento uniforme das soluções. Após estes procedimentos, as placas foram acondicionadas no freezer -80 °C por 15 minutos, seguido de incubação a -6 °C por 48 h. A leitura no espectrofotômetro foi realizada com as soluções congeladas nas placas.



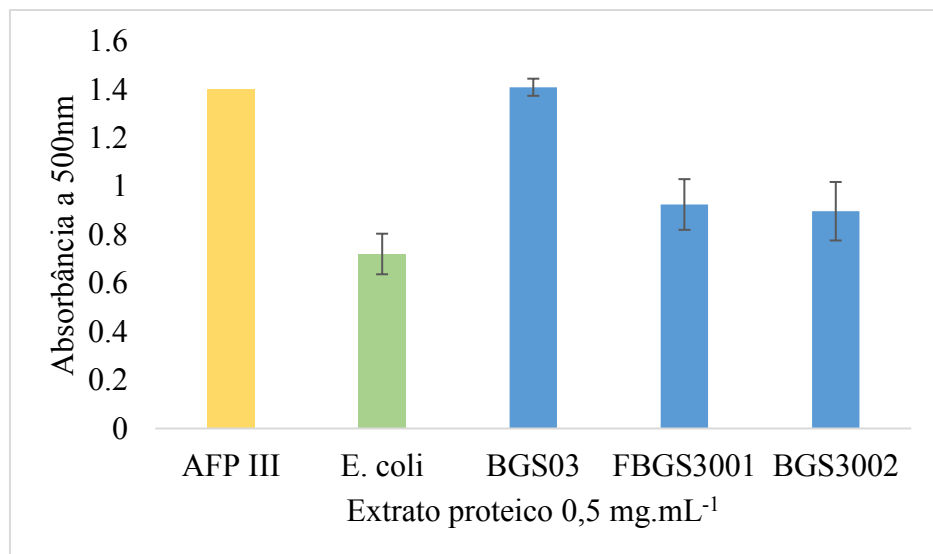
A leitura da placa foi feita imediatamente após a retirada da incubação pelo fato de que a variação da temperatura de  $-6\text{ }^{\circ}\text{C}$  e a temperatura ambiente ocasionava o descongelamento do experimento, o que podia comprometer a leitura dos resultados.

Os 165 isolados foram inicialmente cultivados a  $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ , mas somente 135 cresceram nesta condição. Dos 135 extratos proteicos bacterianos testados, 7 extratos proteicos bacterianos foram positivos para a presença de proteínas anticongelantes (**Figuras 27 e 28**). Dois isolados foram identificados ao nível de gênero: BGS3002 (*Arthrobacter*) e FBGS3001 (*Pseudarthrobacter sulfonivorans*).

**Figura 27.** Extratos proteicos bacterianos positivos para AFP no teste IR.



**Figura 28.** Extratos proteicos bacterianos positivos para AFP no teste IR.



Esses resultados podem ser comparados com o estudo de Cid et al. (2016) onde foram isolados 265 microrganismos da Antártica e somente 32 foram positivos para o teste IR ( $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ ). Em um outro estudo Gilbert et al. (2004) isolaram 866 microrganismos da Antártica e somente 187 foram positivos para o teste IR ( $1 \text{ mg.mL}^{-1}$ ). No estudo de Singh e colaboradores (2013) 14 isolados bacterianos do Ártico foram testados quanto a atividade IR, e 8 apresentaram alguma atividade anticongelante. As AFP bacterianas testadas tinham níveis diferentes de atividade de inibição da recristalização (IR), sendo que a *Pseudomonas ficuserectae* (cry-n) inibiu a recristalização do gelo a  $0,05 \text{ mg.mL}^{-1}$ . No estudo de Raymond e colaboradores (2007) 200 isolados obtidos do gelo marinho da Antártica foram submetidos a aclimação de 0 a 3 °C, 17 de 20 isolados que apresentaram crescimento rápido na condição fria foram submetidos ao teste de inibição de recristalização (IR). Destes, uma cepa (*Colwellia* sp. SLW05) mostrou atividade forte, oito mostraram atividade fraca e o restante não mostrou atividade. Parra e colaboradores (2015) isolaram 100 bactérias psicrófilas do mar da Antártica e entre elas identificaram a bactéria *Shewanella frigidimarina* NCIMB 400. Posteriormente, Vance e colaboradores (2018) caracterizaram a atividade IR e TH desta mesma bactéria, que apresentou as duas atividades de forma eficiente. Yamashita e colaboradores (2002) isolaram 130 bactérias antárticas, sendo que 21 cepas cresceram a 5 °C e entraram na fase estacionária em 64 h, enquanto outras 23 cepas entraram na mesma fase à 138 h. Após verificar a atividade anticongelante no sobrenadante concentrado ( $100 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), foram encontradas 6 cepas capazes de produzir AFP. Dentre elas, a cepa 82 (*Moxarella* sp.) apresentou a maior atividade anticongelante, com valores de atividade de histerese termal de  $0,104 \text{ } ^\circ\text{C}$ . No entanto, a forma do cristal de gelo era hexagonal, indicando um nível moderadamente baixo de atividade anticongelante. Todos os trabalhos acima relatados apresentaram porcentagens de 57,14% (SING et al., 2013), 21,59% (GILBERT et al., 2004), 12,07% (CID et al., 2016), 4,6% (YAMASHITA et al., 2002), 4,5% (RAYMOND et al., 2007), 1% (PARRA et al., 2015) em relação à isolados cultivados que foram positivos para a propriedade da atividade IR. No presente estudo 5,18% dos isolados cultivados foram positivos para a presença de proteínas no teste IR. Isto pode ser explicado pelo fato de que algumas bactérias podem ser genotipicamente positivas para AFP, mas fenotipicamente negativas devido a condições inadequadas de indução, degradação ou inativação de proteínas durante a extração. Se fosse esse o caso, explicaria a alta proporção de falsos negativos nas bactérias isoladas (GILBERT et al., 2004).

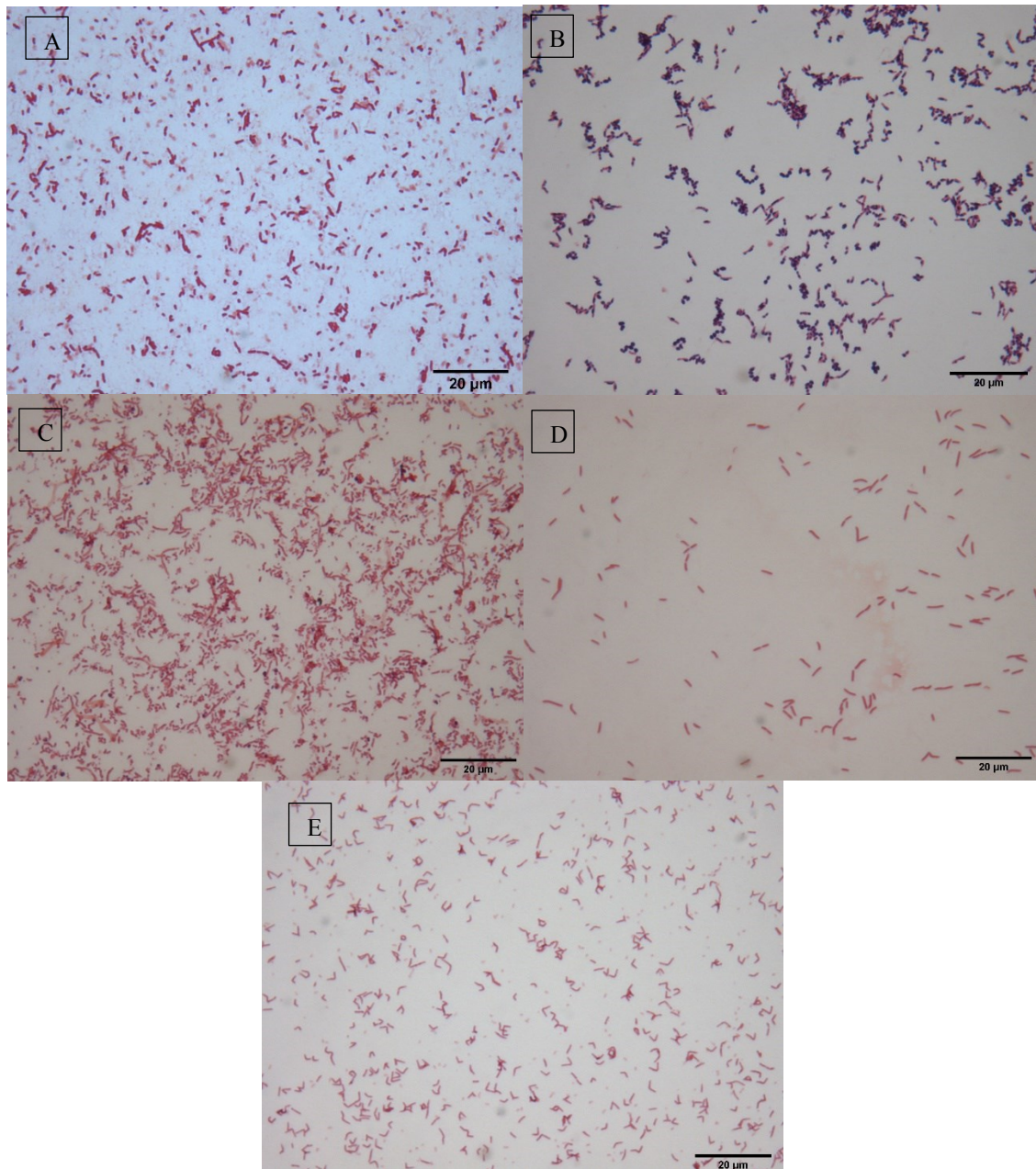
O conhecimento dos genes que codificam AFP podem fornecer uma alternativa para a investigação da presença ou não de proteínas (GILBERT et al., 2004). Um domínio de ligação

ao gelo foi recentemente descoberto, chamado DUF3494. A ocorrência repetitiva da sequência de DUF3494 no genoma de bactérias psicrófilas é altamente correlacionado com a atividade IR e tem sido passado para vários organismos por meio da transferência horizontal de genes (RAYMOND, 2014; VANCE et al., 2019; BOWMAN, 2017). As bactérias que apresentam este domínio são pertencentes ao gênero *Flavobacterium* como *Flavobacterium frigoris PSI* (RAYMOND et al. 2007) e *Flavobacterium xanthum* (KAWAHARA et al. 2007), além de outros membros do filo Bacteroidetes como o gênero *Colwellia* sp. SWL05 (HANADA et al. 2014) e *Aequorivita sublithicola* (BOWMAN, 2017). Recentemente uma abordagem metagenômica em um musgo da Antártica identificou bactérias não cultiváveis que secretavam AFP do domínio 3494 e que garantiam a sobrevivência deste musgo em condições de frio extremo (RAYMOND, 2015). Além das bactérias, o fungo *Typhula ishikariensis* (KONDO, et al. 2012) e as arqueias *Methanoregula boonei* (BRAUER et al., 2011) e *Halohasta litchfieldiae* (MOU et al., 2012) foram identificados como do domínio 3494. O domínio 3494 raramente é encontrado em organismos que não apresentam adaptação ao frio impostas pelo ecossistema onde vivem. Mais estudos precisam ser feitos para elucidar a funcionalidade do domínio 3494 e sua função celular em microrganismos (BOWMAN, 2017).

Seis isolados positivos no teste IR foram cultivados a 15 °C e um isolado foi cultivado a 25 °C. No estudo de Cid e colaboradores (2016) cinco isolados positivos no teste IR foram cultivados a 25 °C. Estes resultados indicam que microrganismos psicrotolerantes isolados a temperatura ambiente também podem produzir proteínas anticongelantes em condições de estresse. Isto pode ser explicado por genes de AFP que podem ser expressos constitutivamente em níveis intermediários, fornecendo um benefício imediato quando a proteína é necessária no metabolismo bacteriano em condições extremamente frias sob efeito de congelamento (GIESEL, 2011).

Esses mesmos isolados foram caracterizados quanto a coloração de Gram. Seis isolados foram identificados como Gram negativos (P27, P46, P48, M125 °C, FBGS3001 e BGS3002) e um isolado como Gram positivo (BGS03). Vários estudos têm mostrado que grande parte das bactérias produtoras de AFP são Gram negativas (MILLS, 1999; LIFSHITZ et al. 1986; YAMASHITA et al., 2002; GILBERT et al., 2005; KAWAHARA et al., 2007; SINGH et al., 2013; DO et al., 2014; RAYMOND et al., 2007; HANADA et al., 2014; MUNOZ et al., 2017), mas podem eventualmente ser Gram positivas (MUNOZ et al., 2017).

**Figura 29.** Coloração de gram dos isolados positivos no teste IR. A- BGS3002; B- BGS03; C- FBGS3001; D- M1 25°C e E- P27.



Uma árvore foi construída com base na sequência de nucleotídeos do gene RNAr 16S mostrando as relações filogenéticas entre as bactérias produtoras de AFP (**Figura 30**). Estão apresentados apenas os valores de bootstrap maiores que 50%. Os resultados mostraram que os isolados FBGS3001 e BGS3002 eram mais próximos dos gêneros *Arthrobacter* e *Paeniglutamicibacter*. Essas bactérias foram testadas quanto a atividade IR e apresentaram efeitos positivos em relação a inibição da recristalização do gelo. Além disso, foram isoladas de ambientes extremos como a Antártica e o Ártico (PARRA et al., 2015; SINGH et al., 2013). Os dois isolados identificados neste estudo ainda não haviam sido relatados como produtores

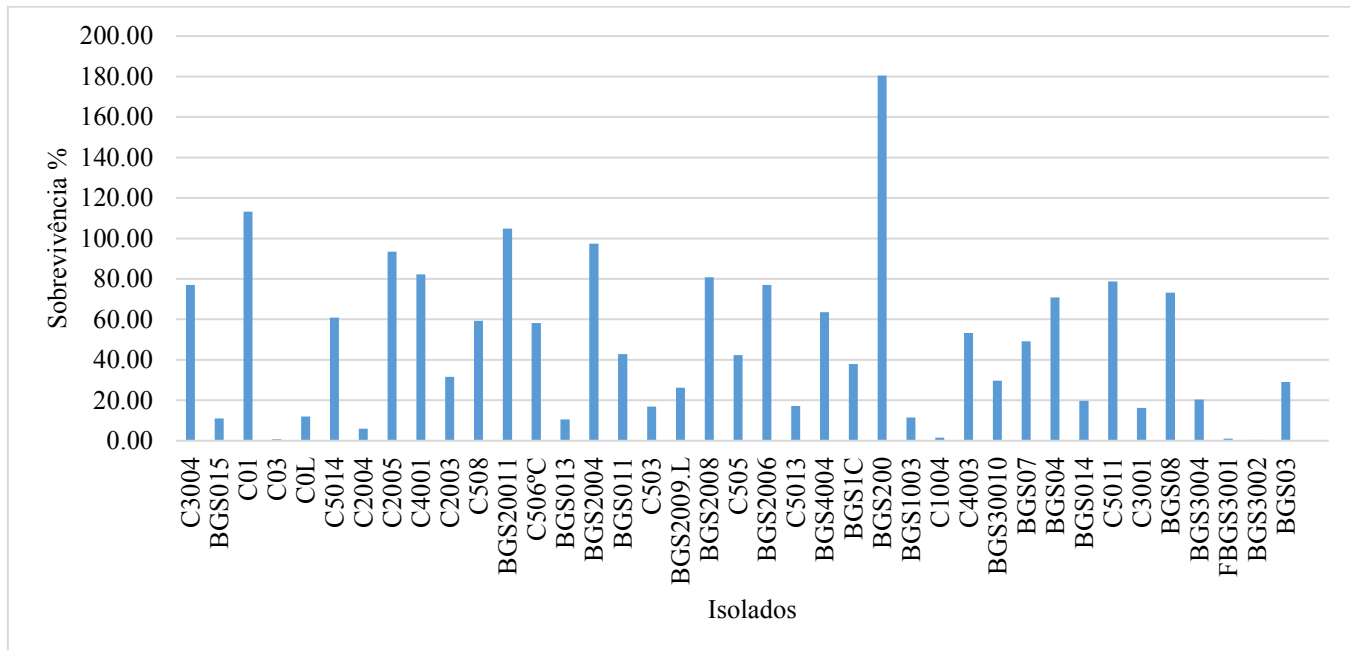
de AFP. A distância da onde foram isolados esses microrganismos, 300 metros da geleira Baranowski, e de solos permanentemente congelados, indica que esses microrganismos poderiam já estar sob estresse, em relação aos isolados mais a frente da geleira ou sob a camada ativa do *permafrost*, resultando em microrganismos mais adaptados às condições de frio extremo.



### 5.2.3 Teste de sobrevivência ao congelamento

Um total de 40 isolados foi testado quanto a sobrevivência ao congelamento. Deste conjunto de isolados, 3 foram identificados como positivos para o teste IR e 37 não foram positivos no teste IR (**Figura 31**).

**Figura 31.** Relação de isolados e sobrevivência ao congelamento.



Os resultados indicaram que 18 isolados apresentaram uma porcentagem de sobrevivência maior que 50% nas contagens de UFC antes e depois do congelamento. Entretanto, todos os isolados que sobreviveram ao congelamento não apresentaram a propriedade de Inibição de Recristalização. Isto pode ser explicado pelo fato de que bactérias podem ter a presença de AFP, mas não ser positiva para o teste IR, mas ter atividade TH (KNIGHT; WEN; LAURSEN, 1995). Além disso, as bactérias podem produzir substâncias (que não sejam AFP) que previnem o congelamento, mas que ainda não são conhecidas na literatura. No estudo de Munoz e colaboradores (2017), um total de 103 isolados foram submetidos ao teste de congelamento com objetivo de selecionar bactérias produtoras de crioprotetores, e 17 destes isolados foram capazes de sobreviver ao procedimento de congelamento. Além disso, foram registrados valores da atividade TH de 0,1 a 0,5 °C entre esses isolados. Pequenos valores de TH (0,04 a 0,09 °C) foram registrados em bactérias que não foram capazes de sobreviver após o processo de congelamento.

Onze isolados foram identificados ao nível de gênero, sendo representados por *Arthrobacter* com 3 isolados, *Rhodococcus*, *Leifsonia*, *Deinococcus*, *Pseudomonas*, *Pedobacter*, *Friedmanniella*, *Nocardioides* e *Pseudoarthrobacter* com 1 isolado cada (**Tabela 10**). Cinco isolados que apresentaram sobrevivência ao congelamento foram isolados a 200 metros da Geleira Baranowski, três isolados na borda da geleira a 0 metros e um isolado a 400 metros da geleira. Dez isolados que sobreviveram ao congelamento foram obtidos da Geleira Collins, sendo que um foi isolado na borda da geleira, cinco a 50 metros da geleira, um a 200 e 300 metros e dois a 400 metros. Estes resultados mostram que existe uma sobrevivência maior de bactérias isoladas da Geleira Collins em todo o transecto da geleira (exceto a 100 m) em relação a sobrevivência de isolados da Geleira Baranowski, onde somente a 200 metros apresentou o maior número de bactérias sobreviventes ao congelamento, mas também obteve resultados a 0 e 400 metros. O maior número de bactérias sobreviventes ao congelamento são de isolados que estão mais distantes da geleira. Isto pode ser explicado, pelo fato de que são bactérias que estão a mais tempo expostas as condições de frio extremo do ambiente.

**Tabela 10.** Identificação dos isolados e sua respectiva fonte de isolamento

<b>Isolado</b>	<b>Identificação</b>	<b>Amostra</b>
BGS200	Arthrobacter sp.	Baranowski
BGS20011	Rhodococcus sp.	Baranowski
BGS2004	Leifsonia sp.	Baranowski
BGS2008	n. i.	Baranowski
BGS2006	n. i.	Baranowski
BGS08	Pseudomonas mandelii	Baranowski
BGS04	Arthrobacter sp.	Baranowski
BGS4004	Pedobacter sp.	Baranowski
BGS07	n. i.	Baranowski
C5014	Friedmanniella sp.	Collins
C508	n. i.	Collins
C50 6 °C	Nocardioides sp.	Collins
C4003	Pseudoarthrobacter sp.	Collins
C01	n. i.	Collins
C2005	n. i.	Collins
C4001	Deinococcus claudionis	Collins
C5011	Arthrobacter scleromae	Collins
C3004	n. i.	Collins



## 6. CONCLUSÕES

As bactérias da Antártica apresentam potencial para produção de proteínas anticongelantes. As amostras da Antártica possuem microrganismos psicrófilos e mesófilos cultiváveis pertencentes aos grupos Actinobacteria, Gammaproteobacteria, Bacteroidetes, Deinococcus-Thermus, Firmicutes e Alphaproteobacteria.

A maioria das bactérias produtoras de AFP deste estudo foram à 15 °C (comparado à 25 °C) e, embora não tenha sido realizado testes para avaliar a temperatura ótima de crescimento dos isolados, esta observação sugere uma correlação entre a adaptação ao crescimento mais frio e a produção de AFP.

Com relação à produção de AFP pelos microrganismos da Antártica, conclui-se que bactérias da Antártica produzem AFP com propriedades de inibição de recristalização do gelo tão eficiente quanto à AFP III de peixes, especialmente no caso dos isolados BGS03 e P48.

Quanto à sobrevivência dos microrganismos no ambiente antártico, conclui-se que esta característica não está relacionada exclusivamente à produção de AFP, uma vez que os microrganismos que sobreviveram ao teste de congelamento não produzem AFP de acordo com o teste IR e devem utilizar outros mecanismos de sobrevivência.

Em termos de metodologia, o método de detecção da atividade IR utilizando leitura em espectrofotômetro a 500 nm sobre placas com extratos proteicos congelados é rápido, eficiente e reprodutível quando comparado com dados da literatura.

Em perspectivas futuras as AFP bacterianas descobertas neste estudo podem contribuir para o uso em aplicações biotecnológicas que envolvam produtos submetidos ao processo de congelamento.

## 7. REFERÊNCIAS

- ABRAMOV, A. et al. Geocryological conditions of Antarctica. *Earth's Cryosphere*, v. 15, n. 3, p. 3-19, 2011.
- ALAM, S. I. et al. Psychrophilic *Planococcus maitriensis* sp. nov. from Antarctica. *System. Appl. Microbiol.*, v. 26, p. 505–510, 2003.
- AMIR, G. et al. Preservation of myocyte structure and mitochondrial integrity in subzero cryopreservation of mammalian hearts for transplantation using antifreeze proteins - An electron microscopy study. *European Journal of Cardio-thoracic Surgery*, v. 24, n. 2, p. 292–297, 2003.
- ARAV, A.; RUBINSKY, B.; FLETCHER, G.; SEREN, E. Cryogenic protection of oocytes with antifreeze proteins. *Mol. Reprod. Dev.* v. 36, p. 488–493, 1993.
- BABALOLA, O.O. et al. Phylogenetic analysis of actinobacterial populations associated with Antarctic Dry Valley mineral soils, *Environm. Microbiol*, v. 11, p. 566-576, 2009.
- BAJERSKI, F. et al. *Cryobacterium arcticum* sp. nov., a psychrotolerant bacterium from an Arctic soil. *Int J Syst Evol Microbiol*, v. 61, p. 849-853, 2011.
- BAJERSKI, F. et al. *Cryobacterium arcticum* sp. nov., a psychrotolerant bacterium from an Arctic soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 61, n. 8, p. 1849–1853, 2011.
- BAKERMANS, C. et al. *Psychrobacter arcticus* sp. nov., isolated from Siberian permafrost. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 56, p. 1285–1291, 2006.
- BALAMURUGAN S. et al. Heterologous expression of *Lolium perenne* antifreeze protein confers chilling tolerance in tomato. *J Integr Agric.* V. 17, p. 1128–1136, 2018.
- BAR DOLEV, M.; BRASLAVSKY, I.; DAVIES, P. L. Ice-Binding Proteins and Their Function. *Annu. Rev. Biochem.* V. 85, p. 515–542, 2016.
- BARRETT, J. Thermal hysteresis proteins. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, v. 33, n. 2, p. 105–117, 2001.
- BAYER-GIRALDI, M. et al. Antifreeze proteins in polar sea ice diatoms: Diversity and gene expression in the genus *Fragilariopsis*. *Environmental Microbiology*, v. 12, n. 4, p. 1041–1052, 2010.
- BEALL P. T. States of water in biological systems. *Cryobiology*, v. 20, p. 324–334, 1983.
- BELOV, A. A. et al. Bacterial communities of novaya zemlya archipelago ice and permafrost. *Geosciences (Switzerland)*, v. 10, n. 2, 2020.
- BOETIUS, A. et al. Microbial ecology of the cryosphere: Sea ice and glacial habitats. *Nature Reviews Microbiology*, v. 13, n. 11, p. 677–690, 2015.
- BOWMAN, J. P. et al. Novel *Psychrobacter* Species from Antarctic Ornithogenic Soils. *International Journal Of Systematic Bacteriology*, v. 26, p. 841–848, 1996.
- BOWMAN, J. P. Genomics of Psychrophilic bacteria and Archaea. In *Psychrophiles: From Biodiversity to Biotechnology* (Margesin R, ed), pp. 345–387. Springer, New York, NY, 2017.

- BOWMAN, J. P.; NICHOLS, D. S.; MCMEEKIN, T. A. *Psychrobacter glacincola* sp. nov., a halotolerant, psychrophilic bacterium isolated from Antarctic Sea ice. *Systematic and Applied Microbiology*, v. 20, n. 2, p. 209–215, 1997.
- BRASLAVSKY, I.; DRORI, R. LabVIEW-operated Novel Nanoliter Osmometer for Ice Binding Protein Investigations. *Journal of Visualized Experiments*, v. 4, n. 72, p. 1–6, 2013.
- BRAUER S, L. et al. *Methanoregula boonei* gen. nov., sp. nov., an acidiphilic methanogen isolated from an acidic peat bog. *Int J Syst Evol Microbiol*, v. 61, p. 45–52, 2011.
- CAPICCIOTTI, C. J., DOSHI, M. & BEN R. N. Ice Recrystallization Inhibitors: From Biological Antifreezes to Small Molecules. *Recent Developments in the Study of Recrystallization*. 2013.
- CARRASCO, J. F. Decadal Changes in the Near-Surface Air Temperature in the Western Side of the Antarctic Peninsula. *Atmospheric and Climate Sciences*, v. 03, n. 03, p. 275–281, 2013.
- CAVICCHIOLI, R. Cold-adapted archaea. *Nature Reviews Microbiology*, v. 4, n. 5, p. 331–343, 2006.
- CELIK, Y. et al. Superheating of ice crystals in antifreeze protein solutions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 107, n. 12, p. 5423–5428, 2010.
- CHAKRABORTY, S., & JANA, B. Ordered hydration layer mediated ice adsorption of a globular antifreeze protein: mechanistic insight. *Physical Chemistry Chemical Physics*. V. 21, n. 35, p. 19298–19310, 2019.
- CHAO, H.; DAVIES, P. L.; CARPENTER, J. F. Effects of antifreeze proteins on red blood cell survival during cryopreservation. *Journal of Experimental Biology*, v. 199, p. 2071–2076, 1996.
- CHATTOPADHYAY, M. K. Mechanism of bacterial adaptation to low temperature. *Journal of Biosciences*, v. 31, n. 1, p. 157-65, 2006.
- CHAUDHARY, D. K. et al. *Flavobacterium sandaracinum* sp. nov., *Flavobacterium caseinilyticum* sp. nov., and *Flavobacterium hiemivividum* sp. nov., novel psychrophilic bacteria isolated from Arctic soil. *International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology*, 2020.
- CHEN, L., DEVRIES, A. L. & CHENG, C.-H. C. Convergent evolution of antifreeze glycoproteins in Antarctic notothenioid fish and Arctic cod. *Proc. Natl. Acad. Sci.* V. 94, p. 3817–3822, 1997.
- CHEN, Y. Changes of the bacterial abundance and communities in shallow ice cores from Dunde and Muztagata glaciers, Western China. *Front Microbiol*, v. 7, p. 1716, 2016.
- CHOI, D. H. et al. *Nocardioides marinus* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 57, n. 4, p. 775–779, 2007.
- CHOI, J. Y., KIM, J. H., & LEE, P. C. *Flavobacterium kingsejongi* sp. Nov., a carotenoid-producing species isolated from antarctic penguin faeces. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 68, n. 3, p. 911–916, 2018.
- CHOI, S. G. et al. *Deinococcus rubellus* sp. nov., bacteria isolated from the muscle of antarctic fish. *Journal of Microbiology*, v. 54, n. 12, p. 796–801, 2016.

- CHRISTNER, B. C. Bioprospecting for microbial products that affect ice crystal formation and growth. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 85, n. 3, p. 481–489, 2010.
- CID, F. P. et al. Bacterial community structures and ice recrystallization inhibition activity of bacteria isolated from the phyllosphere of the Antarctic vascular plant *Deschampsia antarctica*. *Polar Biology*, v. 40, n. 6, p. 1319–1331, 2017.
- DA, X. et al. *Pedobacter ardleyensis* sp. Nov., Isolated from soil in Antarctica. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 65, n. 11, p. 3841–3846, 2015.
- DAVIES, P. L. Ice-Binding Proteins: A Remarkable Diversity of Structures for Stopping and Starting Ice Growth. *Trends Biochem. Sci.* V. 39, p. 548–555, 2014.
- DE LA TORRE, J.R. et al. Microbial diversity of cryptoendolithic communities from the McMurdo Dry Valleys, Antarctica, *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 69, p. 3858–3867, 2003.
- DE LOS RIOS, A. et al. Ultrastructural and genetic characterization of endolithic cyanobacterial and genetic characteristics of endolithic cyanobacterial biofilms colonizing Antarctic granite rocks. *FEMS Microbiol. Ecol.*, v. 59, p. 386–395, 2007.
- DEMING, J. W. “Life in ice formations at very cold temperatures,” in *Physiology and Biochemistry of Extremophiles*, eds C. Gerday, and N. Glansdorff (Washington, DC: American Society of Microbiology), p. 133–144, 2007.
- DENG, S. et al. *Nocardioides antarcticus* sp. Nov, isolated from marine sediment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 65, n. 8, p. 2615–2621, 2015.
- DENNER, E. B. M. et al. *Psychrobacter proteolyticus* sp. nov., a Psychrotrophic, Halotolerant Bacterium Isolated from the Antarctic Krill *Euphausia superba* Dana, Excreting a Cold-Adapted Metalloprotease. V.53, n. 2001, p. 44–53, 2020.
- DEVRIES, A. L.; KOMATSU, S. K.; FEENEY, R. E. Chemical and Physical Properties of Freezing Point-depressing Glycoproteins from Antarctic Fishes. *J. Biol. Chem.*, v. 245, n. 11, p. 2901–2908, 1970.
- DO, H. et al. Structure-based characterization and antifreeze properties of a hyperactive ice-binding protein from the Antarctic bacterium *Flavobacterium frigoris* PS1. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, v. 70, n. 4, p. 1061–1073, 2014.
- DRORI, R. et al. Ice-binding proteins that accumulate on different ice crystal planes produce distinct thermal hysteresis dynamics. *Journal of the Royal Society Interface*, v. 11, n. 98, 2014.
- DUARTE, R. T. D. et al. Brazilian research on extremophiles in the context of astrobiology. *International Journal of Astrobiology (Print)*, p. 1–9, 2012.
- DUARTE, R. T. D. Micro-organismos em ambientes criogênicos: gelo glacial, solos expostos por recuo de geleiras e permafrost polares. 2010. 200 f. Tese de doutorado, Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia, Instituto Butantan, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2010.
- DUMAN, J. G. et al. Antifreeze proteins in Alaskan insects and spiders. *Journal of Insect Physiology*, v. 50, n. 4, p. 259–266, 2004.
- DUMAN, J. G.; OLSEN, T. M. Thermal hysteresis protein activity in bacteria, fungi, and phylogenetically diverse plants. *Cryobiology*, v. 30, n.3, p. 322–328, 1993.

EICKHOFF, L. et al. Contrasting Behavior of Antifreeze Proteins: Ice Growth Inhibitors and Ice Nucleation Promoters. *Journal of Physical Chemistry Letters*. v. 10, n. 5, p. 966–972, 2019.

EVTUSHENKO, L. I. et al. *Leifsonia poae* gen. nov., sp. nov., isolated from nematode galls on *Poa annua*, and reclassification of “*Corynebacterium aquaticum*” Leifson 1962 as *Leifsonia aquatica* (ex Leifson 1962) gen. nov., nom. rev., comb. nov. and *Clavibacter xyli* Davis et al. 1984 with two subspecies as *Leifsonia xyli* (Davis et al. 1984) gen. nov., comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 50, n. 1, p. 371–380, 2000.

FAN, Q. et al. *Sphingomonas floccifaciens* sp. nov., isolated from subterranean sediment. *International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology*, v. 69, n. 6, 2018.

FAN, Y. et al. Cloning of an antifreeze protein gene from carrot and its influence on cold tolerance in transgenic tobacco plants. *Plant Cell Reports*, v. 21, n. 4, p. 296–301, 2002.

FEENEY, R. E.; YEH, Y. Antifreeze proteins from fish bloods. *Advances in Protein Chemistry*, v. 32, n. C, p. 191–282, 1978.

FERRON, F. A.; SIMÕES, J. C.; AQUINO, F. E. Série temporal de temperatura atmosférica para a ilha Rei George, Antártica. *Geography Department, University of São Paulo*, v. 14, p. 25–32, 2001.

FOX, A.J. & COOPER, A.P.R. 1994. Measured properties of the Antarctic Ice Sheet derived from the SCAR Antarctic Digital Database, *Pol. Rec.*, 30(174), 201–206

GANZERT L. et al. *Arthrobacter livingstonensis* sp. nov. and *Arthrobacter cryotolerans* sp. nov., salttolerant and psychrotolerant species from antarctic soil. *Int J Syst Evol Microbiol*, v. 61, p. 979–984, 2011.

GANZERT, L. et al. *Leifsonia psychrotolerans* sp. nov., a psychrotolerant species of the family microbacteriaceae from Livingston Island, Antarctica. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 61, n. 8, p. 1938–1943, 2011.

GARNHAM, C. P. et al. A Ca<sup>2+</sup>-dependent bacterial antifreeze protein domain has a novel  $\beta$ -helical ice-binding fold. *Biochemical Journal*, v. 411, n. 1, p. 171–180, 2008.

GARNHAM, C. P. et al. Compound ice-binding site of an antifreeze protein revealed by mutagenesis and fluorescent tagging. *Biochemistry* v. 49, p. 9063–9071, 2010.

GARNHAM, C. P., & DAVIES, P. L. The basis for hyperactivity of antifreeze proteins. *Cryobiology*, v. 53, n. 2, p. 229–239, 2006.

GARNHAM, C. P., CAMPBELL, R. L., & DAVIES, P. L. Anchored clathrate waters bind antifreeze proteins to ice. *V*. 108, n. 18, p. 7363–7367, 2011.

GARRIDO-BENAVENT, I. et al. Differential Colonization and Succession of Microbial Communities in Rock and Soil Substrates on a Maritime Antarctic Glacier Forefield. *Frontiers in Microbiology*, v. 11, n. 126, 2020.

GENG, Y. *Sphingomonas paeninsulae* sp. nov., isolated from soil sampled at Fildes Peninsula, Antarctica. *International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology*, v. 69, n. 12, 2019.

GESTEL, N. C. et al. Comparing temperature sensitivity of bacterial growth in Antarctic marine water and soil. *Global Change Biology*, p. 1–12, 2020.

- GILBERT, J. A. et al. Demonstration of antifreeze protein activity in Antarctic lake bacteria. *Microbiology*, v. 150, n. 1, p. 171–180, 2004.
- GILBERT, J. A., DAVIES, P. L., & LAYBOURN-PARRY, J. A hyperactive, Ca<sup>2+</sup>-dependent antifreeze protein in an Antarctic bacterium. *FEMS Microbiology Letters*, v. 245, n. 1, p. 67–72, 2005.
- GIUDICE, A. L. Occurrence and characterization of psychrotolerant hydrocarbon-oxidizing bacteria from surface seawater along the Victoria Land coast (Antarctica). *Polar Biol*, v.33, p. 929-943, 2010.
- GLICK, B. R.; BASHAN, Y. Genetic manipulation of plant growth-promoting bacteria to enhance biocontrol of phytopathogens. *Biotechnology Advances*, v. 15, n. 2, p. 353–378, 1997.
- GORDON, C. et al. The simulation of SST, sea ice extents and ocean heat transports in a version of the Hadley Centre coupled model without flux adjustments, *Clim. Dyn.*, v. 16, p. 147-168, 2000.
- GRAETHER, S. P. et al.  $\beta$ -Helix structure and ice-binding properties of a hyperactive antifreeze protein from an insect. *Nature*, v. 406, n. 6793, p. 325–328, 2000.
- GRAHAM, L. A. & DAVIES, P. L. Biochemistry: Glycine-rich antifreeze proteins from snow fleas. *Science*, v. 80, p. 310, 461, 2005.
- GREEN M.R. & SAMBROOK J. Isolation of High-Molecular-Weight DNA Using Organic Solvents - A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, U.S.A, 2017.
- GRIFFITH, M. et al. Antifreeze Protein Produced Endogenously in winter rye leaves. *Plant Physiology*, v. 100, n. 2, p. 593–596, 1992.
- GRIFFITH, M.; EWART, K. V. Antifreeze proteins and their potential use in frozen foods. *Biotechnology advances*, v. 13, n. 3, p. 375–402, 1995.
- GRIFFITH, M.; YAISH, M. W. F. Antifreeze proteins in overwintering plants: A tale of two activities. *Trends in Plant Science*, v. 9, n. 8, p. 399–405, 2004.
- GUO, S. et al. Re-Evaluation of a Bacterial Antifreeze Protein as an Adhesin with Ice-Binding Activity. *PLOS ONE*, v. 7, n. 11, p. 48805, 2012.
- GUPTA, P. et al. *Arthrobacter gangotriensis* sp. nov. and *Arthrobacter kerguelensis* sp. nov. from Antarctica. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 54, n. 6, p. 2375–2378, 2004.
- GWAK, I. G. et al. Antifreeze Protein in Antarctic Marine Diatom, *Chaetoceros neogracile*. *Marine Biotechnology*, v. 12, n. 6, p. 630–639, 2010.
- HAGIWARA, T., HARTEL, R. W., & MATSUKAWA, S. Relationship between recrystallization rate of ice crystals in sugar solutions and water mobility in freeze-concentrated matrix. *Food Biophysics*, v. 1, n. 2, p. 74–82, 2006.
- HAJI-AKBARI, A. Rating antifreeze proteins: Not a breeze. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 113, n. 14, p. 3714–3716, 2016.
- HAMMOND J.B.W.; KRUGER N.J. The Bradford Method for Protein Quantitation. In: Walker J.M. (eds) *New Protein Techniques. Methods in Molecular Biology™*, vol 3. Humana Press, 1988.

- HAN, S. K. et al. *Salinibacterium amurskyense* gen. nov., sp. nov., a novel genus of the family Microbacteriaceae from the marine environment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 53, n. 6, p. 2061–2066, 2003.
- HANADA, Y. et al. Hyperactive antifreeze protein from an Antarctic sea ice bacterium *Colwellia* sp. has a compound ice-binding site without repetitive sequences. *FEBS Journal*, v. 281, n. 16, p. 3576–3590, 2014.
- HARDING, M.M.; ANDERBERG, P.I.; HAYMET, A.D.J. ‘Antifreeze’ glycoproteins from polar fish. *Eur. J. Biochem.*, v. 270, p. 1381–1392, 2003.
- HARDING, M.M.; WARD, L.G.; HAYMET, A.D.J. Type I ‘antifreeze’ proteins—Structure-activity studies and mechanisms of ice growth inhibition. *Eur. J. Biochem.* v. 264, p. 653–665, 1999.
- HASHIM, N. H. F. et al. Characterization of Afp1, an antifreeze protein from the psychrophilic yeast *Glaciozyma antarctica* PI12. *Extremophiles*, v. 17, n. 1, p. 63–73, 2012.
- HASHIM, N. H. F. et al. Molecular cloning, expression and characterisation of Afp4, an antifreeze protein from *Glaciozyma antarctica*. *Polar Biology*, n. 37, v.10, p. 1495–1505, 2014.
- HE, R. H. et al. *Pedobacter changchengzhani* sp. nov., isolated from soil of Antarctica. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, v. 112, n. 12, p. 1747–1754, 2019.
- HEW, C. L., & YANG, D. S. C. Protein interaction with Ice Structure And Ice Crystal Growth. *Eur. J. Biochem.*, v. 203, p. 33–42, 1992.
- HIGHTOWER, R. et al. Expression of antifreeze proteins in transgenic plants. *Plant Molecular Biology*, v. 17, n. 5, p. 1013–1021, 1991.
- HOBBS, P. V. *Ice Physics*. Oxford University Press, London, 1974.
- HORNECK, G., KLAUS, D. M., & MANCINELLI, R. L. Space microbiology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* v. 74, p. 121–156, 2010.
- HOSHINO, T. et al. Antifreeze proteins from snow mold fungi. *Canadian Journal of Botany*, v. 81, n. 12, p. 1175–1181, 2003.
- HUANG, Y. et al. *Sphingomonas antarctica* sp. nov., isolated from Antarctic tundra soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 67, n. 10, p. 4064–4068, 2017.
- HUDAIT, A.; ODENDAHL, N.; QIU, Y.; PAESANI, F.; MOLINERO, V. Ice-Nucleating and Antifreeze Proteins Recognize Ice through a Diversity of Anchored Clathrate and Ice-Like Motifs. *J. Am. Chem. Soc.* v. 140, p. 4905–4912, 2018.
- HUGHES, K.A. and LAWLEY, B. A novel Antarctic microbial endolithic community within gypsum crusts, *Environ. Microbiol.*, v. 5, p. 555–565, 2003.
- HUMPHRY, D. R. et al. *Flavobacterium frigidarium* sp. nov., an aerobic, psychrophilic, xylanolytic and laminarinolytic bacterium from Antarctica. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 51, n. 4, p.1235–1243, 2001.
- HUSSAIN, F. et al. *Deinococcus saudiensis* sp. Nov., isolated from desert. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 66, n. 12, p. 5106–5111, 2016.

HWANG, Y. et al. *Nocardioides sambongensis* sp. nov., isolated from Dokdo Islands soil. *International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology*, v. 70, n.1, 2019.

JANECH, M. G. et al. Ice-binding proteins from sea ice diatoms (Bacillariophyceae). *Journal of Phycology*, v. 42, n. 2, p. 410–416, 2006.

JIA, Z.; DAVIES, P. L. Antifreeze proteins: An unusual receptor-ligand interaction. *Trends in Biochemical Sciences*, v. 27, n. 2, p. 101–106, 2002.

JUNG, W. et al. Analysis of expressed sequence tags from the Antarctic psychrophilic green algae, *Pyramimonas gelidicola*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 22, n. 7, p. 902–906, 2012.

JUNG, W. et al. Isolation and Characterization of Antifreeze Proteins from the Antarctic Marine Microalga *Pyramimonas gelidicola*. *Marine Biotechnology*, v. 16, n. 5, p. 502–512, 2014.

KALEDA, A. et al. Saturn-Shaped Ice Burst Pattern and Fast Basal Binding of an Ice-Binding Protein from an Antarctic Bacterial Consortium. *Langmuir*, v. 35, n. 23, p. 7337–7346, 2018.

KÄMPFER, P. et al. Proposal of *Pedobacter nototherniae* sp. nov., isolated from the spleen of a black rock cod (*Notothernia coriiceps*, Richardson 1844) from the Chilean Antarctica. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, v. 112, n. 10, p. 1465–1475, 2019.

KAWAHARA H., TAKEMURA T. & OBATA H. Function analysis and screening of antifreeze material from fungi. *Cryobio Cryotech*, v. 52, p. 151–155, 2006.

KAWAHARA, H. *Cryoprotectants and Ice-Binding Proteins in: Psychrophiles: From Biodiversity to Biotechnology*, Springer International Publishing AG, 2017.

KAWAHARA, H. et al. A novel, intracellular antifreeze protein in an antarctic bacterium, *Flavobacterium xanthum*. *Cryo-Letters*, v. 28, n. 1, p. 39–49, 2007.

KAWAHARA, H. et al. Relationship between antifreeze protein and freezing resistance in *Pseudomonas putida* GR12-2. *Current Microbiology*, v. 43, n. 5, p. 365–370, 2001.

KIM, E. J. et al. Increased Productivity and Antifreeze Activity of Ice-binding Protein from *Flavobacterium frigidis* PS1 Produced using *Escherichia coli* as Bioreactor. *Applied Biochemistry and Microbiology*, v. 55, n. 5, p. 489–494, 2019.

KIM, H. J. et al. Marine antifreeze proteins: Structure, function, and application to cryopreservation as a potential cryoprotectant. *Mar. Drugs* v. 15, 2017.

KIM, J. et al. Genome Sequence of *Deinococcus marmoris* PAMC 26562 Isolated from Antarctic Lichen. *Genome Announc*, v. 5, n. 1, 2017.

KIM, J. H. et al. *Flavobacterium faecale* sp. nov., an agarase-producing species isolated from stools of Antarctic penguins. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 64, p. 2884–2890, 2014.

KIM, J. H. et al. *Planococcus faecalis* sp. nov., a carotenoid-producing species isolated from stools of Antarctic penguins. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 65, p. 3373–3378, 2015.

KIM, M. et al. Local-scale variation of soil bacterial communities in ice-free regions of maritime Antarctica. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 133, p. 165–173, 2019.



- KNIGHT, C. A. Adding to the antifreeze agenda. *Nature*, v. 406, n. 6793, p. 249–251, 2000.
- KNIGHT, C. A., CHENG, C. C., & DEVRIES, A. L. Adsorption of alpha-helical antifreeze peptides on specific ice crystal surface planes. *Biophysical Journal*, v. 59, n. 2, p. 409–418, 1991.
- KNIGHT, C. A.; DUMAN, J. G. Inhibition of recrystallization of ice insect thermal hysteresis proteins: a possible cryoprotective role. *Cryobiology*, v. 23, n.3, p. 256–262, jun. 1986.
- KNIGHT, C. A.; HALLETT, J.; DEVRIES, A. L. Solute effects on ice recrystallization: An assessment technique. *Cryobiology*, v. 25, n. 1, p. 55–60, 1988.
- KNIGHT, C. A.; WEN, D.; LAURSEN, R. A. Nonequilibrium antifreeze peptides and the recrystallization of ice. In *Cryobiology*, v. 32, n. 1, p. 23–34, 1995.
- KONDO H. et al. Ice-binding site of snow mold fungus antifreeze protein deviates from structural regularity and high conservation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 109, p. 9360–9365, 2012.
- KONG, L. F., QATRAN AL-KHDHAIRAWI, A. A., & TEJO, B. A. Rational design of short antifreeze peptides derived from *Rhagium inquisitor* antifreeze protein. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 23, p. 101447, 2020.
- KOSINA, M. et al. Description of *Pseudomonas gregormendelii* sp. nov., a Novel Psychrotrophic Bacterium from James Ross Island, Antarctica. *Current Microbiology*, v. 73, n. 1, p. 84–90, 2016.
- KRALOVA, S. et al. *Flavobacterium chryseum* sp. Nov. and *flavobacterium psychroterrae* sp. nov., novel environmental bacteria isolated from antarctica. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 68, n. 10, p.3132–3139, 2018.
- KRÁLOVÁ, S. et al. *Flavobacterium circumlabens* sp. nov. and *Flavobacterium cupreum* sp. nov., two psychrotrophic species isolated from Antarctic environmental samples. *Systematic and Applied Microbiology*, v. 42, n. 3, p. 291–301, 2019.
- KRELL, A. et al. A new class of ice-binding proteins discovered in a salt-stress-induced cDNA library of the psychrophilic diatom *Fragilariopsis cylindrus* (Bacillariophyceae). *European Journal of Phycology*, v. 43, n. 4, p. 423–433, 2008.
- KUBOTA, N. Effects of cooling rate, annealing time and biological antifreeze concentration on thermal hysteresis reading. *Cryobiology*, v. 63, n. 3, p 198–209, 2011.
- LANE, D. J. 16S/23S rRNA sequencing. In: *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. Stackebrandt, E., Goodfellow, M., eds., John Wiley and Sons, New York, NY, p. 115-175. 1991.
- LAWSON, P. A. et al. New LL-diaminopimelic acid-containing actinomycetes from hypersaline, heliothermal and meromictic antarctic Ekho Lake: *Nocardioides aquaticus* sp. nov. and *Friedmanniella lacustris* sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology*, v. 23, n. 2, p. 219–229, 2000.
- LE TRI, D. et al. Characterization of ice recrystallization inhibition activity in the novel freeze-responsive protein Fr10 from freeze-tolerant wood frogs, *Rana sylvatica*. *Journal of Thermal Biology*, v. 84, p. 426–430, 2019.

- LEE, J. et al. Complete genome sequence of *Cryobacterium arcticum* strain PAMC 27867, isolated from a sedimentary rock sample in northern Victoria Land, Antarctica. *Genome Announcements*, v. 4, n. 5, p. 4–5, 2016.
- LEE, J. K. et al. An extracellular ice-binding glycoprotein from an Arctic psychrophilic yeast. *Cryobiology*, v. 60, n. 2, p. 222–228, 2010.
- LI, D. D. et al. *Flavobacterium arcticum* sp. nov., isolated from Arctic seawater. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 67, n. 4, p. 1070–1074, 2017.
- LI, H. R. et al. *Marisediminicola antarctica* gen. nov., sp. nov., an actinobacterium isolated from the Antarctic. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 60, n. 11, p. 2535–2539, 2010.
- LIFSHITZ, R. et al. Nitrogen-Fixing Pseudomonads Isolated from Roots of Plants Grown in the Canadian High Arctic. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 51, n. 2, p. 251–255, 1986.
- LIN X, WISNIEWSKI M, DUMAN JG. Expression of two selfenhancing antifreeze proteins from the beetle *Dendroides canadensis* in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol Rep.* V. 29, p. 802–813, 2011.
- LIU Y. et al. Mimicry of ice structure by surface hydroxyls and water of a beta-helix AFP. V. 406, p. 1998–2000, 2000.
- LIU, Y. C., TOCILJ, A., DAVIES, P. L. & JIA, Z. Mimicry of ice structure by surface hydroxyls and water of a-helix antifreeze protein. *Nature*, v. 406, p. 322–324, 2000.
- LIU, Q. et al. *Cryobacterium flavum* sp. nov. and *Cryobacterium luteum* sp. nov., isolated from glacier ice. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 62, n. 6, p. 1296–1299, 2012.
- LIU, Q. et al. *Cryobacterium levicorallinum* sp. nov., a psychrophilic bacterium isolated from glacier ice. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 63, n. 8, p. 2819–2822, 2013.
- LIU, Q. et al. Phenotypic divergence of thermotolerance: Molecular basis and cold adaptive evolution related to intrinsic DNA flexibility of glacier-inhabiting *Cryobacterium* strains. *Environmental Microbiology*, 2020.
- LIU, Z. et al. *Deinococcus taklimakanensis* sp. nov., isolated from desert soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 67, n. 11, p. 4311–4316, 2017.
- LO GIUDICE, A. et al. Bacterial communities versus anthropogenic disturbances in the Antarctic coastal marine environment. *Environmental Sustainability*, v. 2, n. 3, p. 297–310, 2019.
- LOGSDON, J. M. & DOOLITTLE, W. F. Origin of antifreeze protein genes - a cool tale in molecular evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* v. 94, p. 3485–3487, 1997.
- LUDWIG, W. et al. ARB: A software environment for sequence data. *Nucleic Acids Research*, v. 32, n. 4, p. 1363–1371, 2004.
- MANGIAGALLI, M., et al. Cryo-protective effect of an ice-binding protein derived from Antarctic bacteria. *FEBS Journal*, v. 284, n. 1, p. 163–177, 2017.

- MARGESIN, R. et al. *Arthrobacter psychrophenicus* sp. nov., isolated from an alpine ice cave. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 54, n. 6, p. 2067–2072, 2004.
- MARGESIN, R. et al. *Pedobacter cryoconitis* sp. nov., a facultative psychrophile from alpine glacier cryoconite. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 53, n. 5, p. 1291–1296, 2003.
- MAZUR, P. Cryobiology: The freezing of biological systems. *Science*, v. 138, n.3934, p. 939–949, 1970.
- MCCAMMON, A. et al. *Flavobacterium hibernum* sp. nov., a lactose utilizing bacterium from a freshwater Antarctic. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v. 48, p.1405–1412, 1998.
- MCCAMMON, S., & BOWMAN, J. Antarctic Flavobacterium species: description of *Flavobacterium gillisiae* sp. nov., *Flavobacterium tegetincola* sp. nov., and *Flavobacterium xanthum* sp. nov., nom. rev. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 50, n. 3, p. 1055–1063, 2000.
- MCCAMMON, S., & BOWMAN, J. Antarctic Flavobacterium species: description of *Flavobacterium gillisiae* sp. nov., *Flavobacterium tegetincola* sp. nov., and *Flavobacterium xanthum* sp. nov., nom. rev. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 50, n. 3, p.1055–1063, 2000.
- MCDERMOTT, J. M et al. Geochemistry of fluids from Earth's deepest ridge-crest hot-springs: piccard hydrothermal field, Mid-Cayman Rise. *Geochim. Cosmochim. Acta* v. 228, p. 95–118, 2018.
- MEISTER, K. et al. Antifreeze Glycoproteins Bind Irreversibly to Ice. *Journal of the American Chemical Society*, v. 140, n. 30, p. 9365–9368, 2018.
- MERINO, N. et al. Living at the extremes: Extremophiles and the limits of life in a planetary context. *Frontiers in Microbiology*, v. 10, 2019.
- MILLER, K. J. & LESCHINE, S. B. A Halotolerant Planococcus from Antarctic Dry Valley Soil. *Current Microbiology*, v. 11, p. 205–209, 1984.
- MILLS, S. V. Novel biochemical compounds from antarctic microorganisms. Tese PhD, Nottingham University. 1999.
- MOK, Y. F. et al. Structural Basis for the Superior Activity of the Large Isoform of Snow Flea Antifreeze Protein. *Biochemistry*, v. 49, n. 11, p. 2593–2603, 2010.
- MOK, Y. F. et al. Structural Basis for the Superior Activity of the Large Isoform of Snow Flea Antifreeze Protein. *Biochemistry*, v. 49, p. 2593–2603, 2010.
- MOORE, E. B.; MOLINERO, V. Structural transformation in supercooled water controls the crystallization rate of ice. *Nature*, v. 479, n. 7374, p. 506–508, 2011.
- MORITA, R. Y. Psychrophilic bacteria. *Bacteriological Reviews*, v. 39, n. 2, p. 144–167, 1975.
- MOU Y,Z. et al. *Halohasta litorea* gen. nov. sp. nov., and *Halohasta litchfieldiae* sp. nov., isolated from the Daliang aquaculture farm, China and from Deep Lake, Antarctica, respectively. *Extremophiles*, v. 16, p. 895–901, 2012.

- MULDREW, K. et al. Flounder antifreeze peptides increase the efficacy of cryosurgery. *Cryobiology*, v. 42, n. 3, p. 182–189, 2001.
- MULLER, S. W. *Permafrost or Permanently Frozen Ground and Related Engineering Problems*. Ann Arbor: J.W. Edwards, 1947.
- MUÑOZ, P. A. et al. Structure and application of antifreeze proteins from Antarctic bacteria. *Microbial Cell Factories*, v. 16, n. 1, p. 1–13, 2017.
- MURYOI, N. et al. Cloning and Expression of *afpA*, a Gene Encoding an Antifreeze Protein from the Arctic Plant Growth-Promoting Rhizobacterium *Pseudomonas putida* Cloning and Expression of *afpA*, a Gene Encoding an Antifreeze Protein from the Arctic Plant Growth-Promoting R. Society, v. 186, n. 17, p. 5661–5671, 2004.
- MYKYTCZUK, N. C. S. et al. Bacterial growth at -15 °C; molecular insights from the permafrost bacterium *Planococcus halocryophilus* Or1. *ISME J.* v. 7, p. 1211–1226, 2013.
- MYKYTCZUK, N. C. S.; WILHELM, R. C.; WHYTE, L. G. *Planococcus halocryophilus* sp. nov., an extreme sub-zero species from high arctic permafrost. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* V. 62, p. 1937–1944, 2012.
- NAULLAGE, P. M.; QIU, Y., & MOLINERO, V. What Controls the Limit of Supercooling and Superheating of Pinned Ice Surfaces? *J. Phys. Chem. Lett.* V. 9, p. 1712-1720, 2018.
- NOGI, Y., SODA, K., & OIKAWA, T. *Flavobacterium frigidimaris* sp. nov., isolated from Antarctic seawater. *Systematic and Applied Microbiology*, v. 28, n. 4, p. 310–315, 2005.
- NOVÁKOVÁ, D. et al. *Pseudomonas leptonychotis* sp. nov., isolated from Weddell seals in Antarctica. *International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology*, v. 70, n. 1, 2020.
- NUTT D. R. & SMITH J. C. Function of the hydration layer around an antifreeze protein revealed by atomistic molecular dynamics simulations. *J. Am. Chem. Soc.* V. 130, p.13066–73, 2008.
- OSMANOĞLU, B. et al. Surface velocity and ice discharge of the ice cap on King George Island, Antarctica. *Annals of Glaciology*, v. 54, n. 63, p. 111–119, 2013.
- OSÓRIO, C. R. et al. *Arthrobacter rhombi* sp. nov, isolated from Greenland halibut. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v. 49, p. 1217-1220, 1999.
- OUDE VRIELINK, A. S. et al. Interaction of ice binding proteins with ice, water and ions. *Biointerphases*, v. 11, p. 18906, 2016.
- PARK, K. S. et al. Characterization of the ice-binding protein from Arctic yeast *Leucosporidium* sp. AY30. *Cryobiology*, v. 64, n.3, p. 286–296, 2012.
- PARRA, L. P. et al. Identification of lipase encoding genes from Antarctic seawater bacteria using degenerate primers: Expression of a cold-active lipase with high specific activity. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 68, p. 56–61, 2015.
- PERTAYA, N. et al. Direct visualization of spruce budworm antifreeze protein interacting with ice crystals: Basal plane affinity confers hyperactivity. *Biophysical Journal*, v. 95, n. 1, p. 333–341, 2008.

- PIETTE, F. et al. Life in the cold: A proteomic study of cold-repressed proteins in the antarctic bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 77, n. 11, p. 3881–3883, 2011.
- PINDI P. K. et al. *Arthrobacter antarcticus* sp. nov., isolated from an Antarctic marine sediment. *Int J Syst Evol Microbiol*, v. 60, p. 2263–2266, 2010.
- PINDI, P. K. et al. Description of *Leifsonia kafniensis* sp. nov. and *Leifsonia antarctica* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 59, n. 6, p. 1348–1352, 2009.
- PRISCU, J.C. et al. Perennial Antarctic lake ice: an oasis for life in a polar desert, *Science*, v. 280, p. 2095-2098, 1998.
- PROVESI, J. G. et al. Extraction of antifreeze proteins from cold acclimated leaves of *Drimys angustifolia* and their application to star fruit (*Averrhoa carambola*) freezing. *Food Chemistry*, v. 289, p. 65–73, 2019.
- PUCCIARELLI, S. et al. Identification and analysis of two sequences encoding ice-binding proteins obtained from a putative bacterial symbiont of the psychrophilic Antarctic ciliate *Euplotes focardii*. *Antarctic Science*, v. 26, n.5, p. 491–501, 2014.
- QADEER S. et al. Efficiency of beetle (*Dendroides canadensis*) recombinant antifreeze protein for buffalo semen freezability and fertility. *Theriogenology*. V. 86, n. 7, p. 1662-1669, 2016.
- QIU, Y., HUDAIT, A., & MOLINERO, V. How Size and Aggregation of Ice-Binding Proteins Control Their Ice Nucleation Efficiency. *Journal of the American Chemical Society*, v. 141, p. 7439–7452, 2019.
- QUAST, C. et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research*, v. 41, n. D1, p. 590–596, 2013.
- RAHMAN, A. T. Analysis of Ice Recrystallization Inhibition Activities among Different Antifreeze Proteins. Tese (Doutorado em Filosofia em Ciências da Vida), Universidade de Hokkaido, Sapporo, Japão, p. 100, 2019.
- RAHMAN, A. T. et al. Ice recrystallization is strongly inhibited when antifreeze proteins bind to multiple ice planes. *Scientific Reports*, v. 9, n. 1, 2019.
- RAYMOND, J. A. Dependence on epiphytic bacteria for freezing protection in an Antarctic moss, *Bryum argenteum*. *Environmental Microbiology Reports*, v. 8, n. 1, p. 14–19, 2015.
- RAYMOND, J. A.; DEVRIES, A. L. Adsorption inhibition as a mechanism of freezing resistance in polar fishes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 74, n. 6, p. 2589–2593, 1977.
- RAYMOND, J. A.; FRITSEN, C. H. Semipurification and ice recrystallization inhibition activity of ice-active substances associated with antarctic photosynthetic organisms. *Cryobiology*, v. 43, n. 1, p. 63–70, 2001.
- REDDY, G. S. N. et al. *Arthrobacter flavus* sp. nov., a psychrophilic bacterium isolated from a pond in McMurdo Dry Valley, Antarctica. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 50, n. 4, p. 1553–1561, 2000.
- REDDY, G. S. N. et al. Bacterium isolated from an Antarctic cyanobacterial mat sample. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, p. 1017–1021, 2002.

- REDDY, G. S. N. et al. *Cryobacterium roopkundense* sp. nov., a psychrophilic bacterium isolated from glacial soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 60, n. 4, p. 866–870, 2010.
- REDDY, G. S. N. et al. *Leifsonia rubra* sp. nov. and *Leifsonia aurea* sp. nov., psychrophiles from a pond in Antarctica. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 53, n. 4, p. 977–984, 2003.
- REDDY, G. S. N. et al. *Planococcus antarcticus* and *Planococcus psychrophilus* spp. nov. isolated from cyanobacterial mat samples collected from ponds in Antarctica. *Extremophiles*, v. 6, p. 253–261, 2002.
- REDDY, G. S. N. et al. Psychrophilic pseudomonads from Antarctica: *Pseudomonas antarctica* sp. nov., *Pseudomonas meridiana* sp. nov. and *Pseudomonas proteolytica* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 54, n. 3, p. 713–719, 2004.
- REDDY, G. S. N., PRABAGARAN, S. R., & SHIVAJI, S. *Leifsonia pindariensis* sp. nov., isolated from the Pindari glacier of the Indian Himalayas, and emended description of the genus *Leifsonia*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 58, n. 9, p. 2229–2344, 2008.
- REN, Q. et al. *Flavobacterium ovatum* sp. Nov., a marine bacterium isolated from an antarctic intertidal sandy beach. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 68, n. 3, p. 795–800, 2018.
- REXROAD, J. et al. Lyophilization and the Thermostability of Vaccines. *Cell Preservation Technology*, v. 1, n. 2, p. 91–104, 2002.
- RIVKINA, E. M. et al. Metabolic activity of Permafrost Bacteria below the freezing point. *Appl. Environ. Microbiol.* V. 66, p. 3230–3233, 2000.
- ROBLES, V., VALCARCE, D. G., & RIESCO, M. F. The use of antifreeze proteins in the cryopreservation of gametes and embryos. *Biomolecules*, v. 9, n. 5, p. 1–12, 2019.
- RODRIGUES, D. F.; TIEDJE, J. M. Coping with our cold planet. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 74, n. 6, p. 1677–1686, 2008.
- ROSA, L. H. et al. Endophytic fungi associated with the Antarctic grass *Deschampsia antarctica* Desv. (Poaceae). *Polar Biology*, v. 32, n. 2, p. 161–167, 2009.
- RUSSELL, N. J. Psychrophilic bacteria - Molecular adaptations of membrane lipids. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Physiology*, v. 118, n. 3, p. 489–493, 1997.
- SAVOCA, S. et al. Antarctic sponges from the Terra Nova Bay ( Ross Sea ) host a diversified bacterial community. *Nature*, p. 1–15, 2019.
- SCAMBOS, T. A. et al. Ultralow surface temperatures in East Antarctica from satellite thermal infrared mapping: the coldest places on earth. *Geophys. Res. Lett.*, v. 45, p. 6124–6133, 2018.
- SCHLOSS, P. D. et al. Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 75, n. 23, p. 7537–7541, 2009.
- SCHUMANN, P. et al. *Friedmanniella antarctica* gen. nov., sp. nov., an LL-diaminopimelic acid-containing actinomycete from antarctic sandstone. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v. 47, n. 2, p. 278–283, 1997.

- SCOTTER, A. J. et al. Solution Structures, Dynamics, and Ice Growth Inhibitory Activity of Peptide Fragments Derived from an Antarctic Yeast Protein. *PLoS One* v. 7, 2012.
- SEE-TOO , WAH-SENG et al. *Planococcus versutus* sp. nov., Isolated from Antarctic soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary*, v. 67, n. 4., p. 944-950, 2017.
- SEE-TOO, W. S. et al. *Pseudomonas versuta* sp. nov., isolated from Antarctic soil. *Systematic and Applied Microbiology*, v. 40, n. 4, p. 191–198, 2017.
- SHAH, S. H. H. et al. Solution Structures, Dynamics, and Ice Growth Inhibitory Activity of Peptide Fragments Derived from an Antarctic Yeast Protein. *PLoS ONE*, v. 7, n. 11, 2012.
- SHARP K. A. The remarkable hydration of the antifreeze protein Maxi: a computational study. *J. Chem. Phys.* V. 141, p. 22D510, 2014.
- SHIN, S. C. et al. Genome sequence of a *Salinibacterium* sp. Isolated from antarctic soil. *Journal of Bacteriology*, v. 194, n. 9, p. 2404–2404, 2012.
- SHIVAJI, S. et al. Isolated from Fast Ice from Adelie Land , Antarctica. V. 635, p. 628–635, 2004.
- SHIVAJI, S. et al. *Psychrobacter vallis* sp. nov. and *Psychrobacter aquaticus* sp. nov., from Antarctica. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 55, n. 2, p. 757–762, 2005.
- SHRAVAGE, B.V. et al. Molecular microbial diversity of a soil sample and detection of ammonia oxidizers from Cape Evan, McMurdo Dry Valley, Antarctica, *Microbiol. Res.*, v. 162, p. 15-25, 2007.
- SILVA, L. J. et al. *Rhodococcus psychrotolerans* sp. nov., isolated from rhizosphere of *Deschampsia antarctica*. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, v. 111, n. 4, p. 629–636, 2018.
- SILVA, T. R. et al. Bacteria from Antarctic environments: diversity and detection of antimicrobial, antiproliferative, and antiparasitic activities. *Polar Biology*, v. 41, n. 7, p. 1505–1519, 2018.
- SINGH, P. et al. Antifreeze protein activity in Arctic cryoconite bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, v. 351, n. 1, p. 14–22, 2014.
- SMITH, I. N. et al. Southwest Western Australian winter rainfall and its association with Indian Ocean climate variability, *International Journal of Climatology*, v. 20, p. 1913-1930, 2000.
- SNIDER, C.S. et al. Role of ice nucleation and antifreeze activities in pathogenesis and growth of snow molds. *Phytopathology*, v. 90, p. 354–361, 2000.
- SRINIVASAN, S. et al. *Deinococcus rubrus* sp. Nov., a bacterium isolated from antarctic coastal sea water. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 27, n. 3, p. 535–541, 2017.
- STOREY, K. B.; STOREY, J. M. Freeze tolerance and intolerance as strategies of winter survival in terrestrially-hibernating amphibians. *Comparative Biochemistry and Physiology -- Part A: Physiology*, v. 83, n. 4, p. 613–617, 1986.
- SUMGIN, M. I. et al. *General Permafrost Science*. Moscow: USSR Academy of Sciences (in Russian), 1940.

- SUN, J. et al. *Pseudomonas profundus* sp. nov., isolated from deep-sea water. *International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology*, v. 68, n. 5, 2018.
- SUN, X. Y. 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, 1995.
- SURIS-VALLS, R., & VOETS, I. K. Peptidic antifreeze materials: Prospects and challenges. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 20, n. 20, 2019.
- SUZUKI, K. et al. *Cryobacterium psychrophilum* gen. nov., sp. nov., nom. rev., comb. nov., an Obligately Psychrophilic Actinomycete To Accommodate “*Curtobacterium psychrophilum*” Inoue and Komagata 1976 *International Journal*, v. 26, p. 474–478, 1997.
- ŠVEC, P. et al. *Pedobacter jamesrossensis* sp. nov., *Pedobacter lithocola* sp. nov., *Pedobacter mendelii* sp. nov. and *Pedobacter petrophilus* sp. nov., isolated from the Antarctic environment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 67, n. 5, p. 1499–1507, 2017.
- SVEC, P. et al. *Pedobacter psychrophilus* sp. nov. isolated from fragmentary rock. *Int J Syst Evol Microbiol*, v. 67, p. 2538–2543, 2017.
- TAKAI, K. et al. Cell proliferation at 122 C and isotopically heavy CH<sub>4</sub> production by a hyperthermophilic methanogen under high-pressure cultivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* v. 105, p. 10949–10954, 2008.
- TAKAMICHI, M. et al. Effect of annealing time of an ice crystal on the activity of type III antifreeze protein. *FEBS Journal*, v. 274, n. 24, p. 6469–6476, 2007.
- TAMURA, K. et al. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*. v. 28, n. 10, p. 2731–2739, 2011.
- TATON, A. et al. Biogeographical distribution and ecological ranges of benthic cyanobacteria in East Antarctic lakes, *FEMS Microbiol. Ecol.*, v. 57, p. 272-289, 2006.
- TIAN, J. et al. *Deinococcus psychrotolerans* sp. nov., isolated from soil on the South Shetland Islands, Antarctica. *International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology*, v. 69, n. 12, 2019.
- TURNER, S. et al. Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, v. 46, n. 4, p. 327–338, 1999.
- UHLIG, C. et al. Heterologous expression, refolding and functional characterization of two antifreeze proteins from *Fragilariopsis cylindrus* (Bacillariophyceae). *Cryobiology*, v. 63, n. 3, p. 220–228, 2011.
- VAN EVERDINGEN, R. O. Multi-Language Glossary of Permafrost and Related Ground-ice Terms. International Permafrost Association. The Arctic Institute of North America, University of Calgary, Calgary, 268 pp, 1998.
- VAN TRAPPEN, S. et al. *Flavobacterium degerlachei* sp. nov., *Flavobacterium frigoris* sp. nov. and *Flavobacterium micromati* sp. nov., novel psychrophilic bacteria isolated from microbial mats in Antarctic lakes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 54, n. 1, p. 85–92, 2004.



- VAN TRAPPEN, S. et al. *Flavobacterium fryxellicola* sp. nov. and *Flavobacterium psychrolimnae* sp. nov., novel psychrophilic bacteria isolated from microbial mats in Antarctic lakes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 55, n. 2, p.769–772, 2005.
- VAN TRAPPEN, S., MERGAERT, J., & SWINGS, J. *Flavobacterium gelidilacus* sp. nov., isolated from microbial mats in Antarctic lakes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 53, n. 5, p. 1241–1245, 2003.
- VANCE, T. D. R. et al. Ice-binding proteins and the ‘domain of unknown function’ 3494 family. *FEBS Journal*, v. 286, n. 5, p. 855–873, 2019.
- VANCE, T. D. R.; GRAHAM, L. A.; DAVIES, P. L. An ice-binding and tandem beta-sandwich domain-containing protein in *Shewanella frigidimarina* is a potential new type of ice adhesin. *FEBS Journal*, v. 285, n. 8, 2018.
- VERSALOVIC, James et al. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods in Molecular and Cellular Biology*, v. 5, n. 1, p. 25–40, 1994.
- VISHNIVETSKAYA, T. et al. Low-temperature recovery strategies for the isolation of bacteria from ancient permafrost sediments. *Extremophiles*, v. 4, n. 3, p. 165–173, 2000.
- WANG, C. et al. Adaptation mechanisms of *Rhodococcus* sp. CNS16 under different temperature gradients: Physiological and transcriptome. *Chemosphere*, v. 238, 124571, 2020.
- WANG, F. et al. *Arthrobacter psychrochitiniphilus* sp. nov., a psychrotrophic bacterium isolated from Antarctica. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 59, p.2759–2762, 2009.
- WANG, X. *Deinococcus arcticus* sp. nov., isolated from *Silene acaulis* rhizosphere soil of the Arctic tundra. *International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology*, v. 69, n. 11, 2019.
- WU, D. W. et al. Purification and characterization of antifreeze proteins from larvae of the beetle *Dendroides canadensis*. *Journal of Comparative Physiology B*, v. 161, n. 3, p. 271–278, 1991.
- XIAO, N. et al. Comparison of functional properties of two fungal antifreeze proteins from *Antarctomyces psychrotrophicus* and *Typhula ishikariensis*. *FEBS Journal*, v. 277, n. 2, p. 394–403, 2010.
- XING, R. et al. Bacterial community in cold and alkaline environments of Hoh Xil basin in Qinghai–Tibet Plateau and isolation of potential sources of microbiota. *Annals of Microbiology*, 2019.
- XU, H. et al. Isolation and characterization of an antifreeze protein with ice nucleation activity from the plant growth promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 44, n. 1, p. 64–73, 1998.
- YAMAGISHI, A. et al. Environmental data and survival data of *Deinococcus aetherius* from the exposure facility of the Japan experimental module of the international space station obtained by the tanpopo mission. *Astrobiology*, v. 18, p. 1369–1374, 2018.
- YAMASHITA, Y. et al. Identification of an antifreeze lipoprotein from *Moraxella* sp. of Antarctic origin. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, v. 66, n. 2, p. 239–247, 2002.

- YANG, D. S. C., SAX, M., CHAKRABARTTY, A. & HEW, C. L. Crystal structure of an antifreeze polypeptide and its mechanistic implications. *Nature* v. 333, p. 232–237, 1988.
- YANG, L. et al. *Flavobacterium psychrotolerans* sp. nov., a psychrotolerant bacterium isolated from Renlongba glacier on the Tibetan Plateau. *International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology*, v. 70, n. 2, 2019.
- YEH, Y., & FEENEY, R. E. Antifreeze proteins: Structures and mechanisms of function. *Chemical Reviews*, v. 96, n. 2, 1996.
- YI, H. et al. *Flavobacterium antarcticum* sp. nov., a novel psychrotolerant bacterium isolated from the Antarctic. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 55, n. 2, p. 637–641, 2005.
- YI, H., & CHUN, J. *Flavobacterium weaverense* sp. nov. and *Flavobacterium segetis* sp. nov., novel psychrophiles isolated from the Antarctic. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 56, n. 6, p. 1239–1244, 2006.
- ZANDIYEH, S; EBRAHIMI, B; SABBAGHIAN, M. Application of Antifreeze Proteins for Sperm Cryopreservation. *Biomolecules*. V. 9, n. 5, p. 181, 2019.
- ZDANOWSKI, M. K. et al. Culturable bacteria community development in postglacial soils of Ecology Glacier, King George Island, Antarctica. *Polar Biology*, v. 36, n. 4, p. 511–527, 2013.
- ZHANG, D. C. et al. *Cryobacterium psychrotolerans* sp. nov., a novel psychrotolerant bacterium isolated from the China No. 1 glacier. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 57, n. 4, p. 866–869, 2007.
- ZHANG, D. C. et al. *Salinibacterium xinjiangense* sp. nov., a psychrophilic bacterium isolated from the China No. 1 glacier. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 58, n. 12, p. 2739–2742, 2008.
- ZHANG, G. et al. Diversity and distribution of alkaliphilic psychrotolerant bacteria in the Qinghai-Tibet Plateau permafrost region. *Extremophiles*, v. 11, n. 3, p. 415–424, 2007.
- ZHANG, Y. et al. Fabrication of Anti-Icing Surfaces by Short  $\alpha$ -Helical Peptides. *ACS Applied Materials and Interfaces*, v. 10, n. 2, p. 1957–1962, 2018.
- ZHANG, Y. et al. *Flavobacterium collinsense* sp. Nov., isolated from a till sample of an antarctic glacier. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 66, n. 1, p. 172–177, 2016.
- ZHANG, G. et al. *Nocardioides zhouii* sp. nov., isolated from the Hailuogou Glacier in China. *International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology*, v. 69, n.8, 2019.
- ZHOU, M. Y. et al. *Flavobacterium ardleyense* sp. Nov., isolated from antarctic soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 67, n. 10, p. 3996–4001, 2017.
- ZHOU, M. Y. et al. *Flavobacterium phocarum* sp. nov., isolated from soils of a seal habitat in Antarctica. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 68, n. 2, p. 536–541, 2018.