

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CURSO DE LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA, IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA

Fernando Cardoso de Oliveira

**Determinação da resistência à radiação ultravioleta C de leveduras não-pigmentadas do
Deserto do Atacama**

Florianópolis

2022

Fernando Cardoso de Oliveira

**Determinação de resistência a radiação UV de leveduras não-pigmentadas do Deserto do
Atacama**

Trabalho de Conclusão de Curso submetido ao
Curso de Ciências Biológicas da Universidade
Federal de Santa Catarina como requisito
parcial para a obtenção do Grau de Licenciada
em Ciências Biológicas.

Orientadora: MSc. Marianne Gabi Kreusch

Florianópolis

2022

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

Cardoso de Oliveira, Fernando

Determinação da resistência à radiação ultravioleta C de leveduras não-pigmentadas do Deserto do Atacama / Fernando Cardoso de Oliveira; orientador, Marianne Gabi Kreusch, 2022.

34 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Santa Catarina, Graduação em Ciências Biológicas, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Ciências Biológicas. 2. Microrganismos extremófilos.
3. Leveduras não pigmentadas. 4. Radiação UV-C. 5. Deserto do Atacama. I. Gabi Kreusch, Marianne. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Ciências Biológicas.
- III. Título.

Fernando Cardoso de Oliveira

**Determinação de resistência a radiação UV de leveduras não-pigmentadas do Deserto do
Atacama**

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do Título de Licenciado em Ciências Biológicas e aprovado em sua forma final pelo Curso de Ciências Biológicas.

Florianópolis, 10 de março de 2022.

Prof.^a Dr.^a Daniela Cristina De Toni
Coordenadora do Curso

Banca Examinadora:

MSc. Marianne Gabi Kreusch
Orientadora - UFSC

Prof. Dr. Rubens Tadeu Delgado Duarte
Avaliador - UFSC

Prof.^a Dr.^a. Ana Carolina de Carvalho
Avaliadora - Instituto de Química, USP

Dedico este trabalho ao meu filho e companheira, Artur e Jéssica.

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer primeiramente a minha companheira Jéssica Mendonça de Paula e ao meu filho Artur Cardoso de Paula por compreenderem as várias horas que estive ausente por causa do desenvolvimento deste trabalho. Também quero agradecer aos meus sogros Cezar David de Paula e Rogéria Almeida M. de Paula por darem suporte nas horas que mais precisei, e o mais importante por cuidarem com tanto amor e carinho do meu filho Artur, me permitindo dedicar-me com mais tranquilidade a academia, sabendo que ele está sob o cuidado de pessoas maravilhosas.

Também quero agradecer a amigos e colegas de trabalho da Casa de Acolhimento Darcy Vitória de Brito, em especial Daiana Garcia e Roberta Cristina Santos que acompanharam minha formação e que de alguma forma me ajudaram ao longo dos últimos anos.

Quero registrar minha gratidão a Marianne Gabi Kreusch, por sua dedicação, atenção, paciência e por tanto conhecimento transmitido durante construção desse projeto. Seus conhecimentos fizeram grande diferença no resultado final deste trabalho e também na minha formação.

Sou grato a todo corpo docente da UFSC que sempre transmitiram seu saber com muito profissionalismo, e todos colegas de curso pela oportunidade do convívio e pela cooperação mútua durante estes anos.

RESUMO

O planeta terra possui vários ambientes considerados hostis aos seres humanos, contudo, outras formas de vida sobrevivem nesses locais. Organismos denominados extremotolerantes e extremófilos estão presente em todos ambientes da terra, inclusive no Deserto do Atacama que é um ambiente hiperárido com alta incidência de radiação ultravioleta (UV). Microrganismos que vivem em ambientes com intensa radiação solar como o Deserto do Atacama, devem possuir mecanismos para lidar com os danos causados pelos raios UV. Esses organismos normalmente produzem e armazenam pigmentos fotoprotetores capazes de absorver a radiação UV. O presente trabalho teve como objetivo verificar a potencial resistência a radiação UV-C em leveduras não pigmentadas isoladas do Deserto do Atacama. As amostras de leveduras foram expostas a radiação UV-C por 30 e 60 segundos, e sua resistência foi quantificada a partir da contagem de unidades formadoras de colônia (UFCs). Mesmo não possuindo pigmentos fotoprotetores aparentes, os isolados estudados nesse trabalho apresentaram crescimento após serem submetidos a exposição à radiação UV-C. O presente trabalho nos leva a conclusão de que as leveduras estudadas apresentam resistência a radiação UV-C similar ou muito próxima a de *Naganishia friedmannii*, levedura anteriormente estudada que possui comprovada resistência a este tipo de radiação.

Palavras-chave: leveduras extremófilas; Deserto do Atacama; radiação ultravioleta.

ABSTRACT

The planet Earth possesses numerous environments considered hostile to human life; however, other life forms can survive in these environments. The so-called extremotolerant and extremophilic organisms can be found throughout all Earth environments, including the Atacama Desert, a hyper-arid desert with an extreme incidence of ultraviolet (UV) radiation. Microorganisms surviving such environments possess mechanisms to overcome the damage caused by UV radiation. These organisms usually produce and accumulate photoprotective pigments capable of absorbing UV radiation. The present work aimed to investigate the potential resistance to UV-C in non-pigmented yeast isolated from the Atacama Desert. Yeast samples were exposed to 30 and 60 seconds of UV-C, and their resistance was measured through colony forming units (CFU) count. Even though not possessing any visible pigmentation, the isolated yeasts presented growth after exposure to UV-C. The present work demonstrated a UV-C resistance similar to that presented by *Naganishia friedmannii*, a previously studied yeast with proven radiation resistance.

Keywords: extremophile yeasts; Atacama Desert; ultraviolet radiation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ilustração da técnica de diluição seriada para contagem das unidades formadoras de colônia	20
Figura 2 – Dados utilizados para a normalização da dosagem de radiação UV-C.....	21
Figura 3 – Curva de crescimento da levedura <i>Naganishia friedmannii</i> após exposição à radiação UV-C durante 30 e 60 segundos.....	21
Figura 4 - Curvas de resistência a radiação UV-C dos isolados durante 30 e 60 segundos	23

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Latitude, longitude e altitude dos locais de coleta de cada um dos isolados.... 19

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

UV - Ultravioleta

UFC - Unidade Formadora de Colônia

LEMEx - Laboratório de Ecologia Molecular e Extremófilos

UFSC - Universidade Federal de Santa Catarina

ASTROLAB - Laboratório de Astrobiologia do Instituto de Química da Universidade de São Paulo

SUMÁRIO

1	Introdução	14
2	Objetivo	18
2.1	Objetivos Geral	18
2.2	Objetivos Específicos	18
3	Material e Métodos	19
3.1	Coleta e Isolamento	19
3.2	Exposição à Radiação UV-C	20
4	RESULTADOS	21
4.1	Normalização da dosagem de radiação	21
4.2	Resistência à radiação	22
5	Discussão	24
6	Conclusão.....	28
7	Referências	29

1.INTRODUÇÃO

O planeta terra possui diversos climas e biomas, nichos de muitas espécies. No entanto, existem locais com condições ambientais que os tornam inabitáveis para a maioria dos seres vivos. Estes locais são denominados ambientes extremos e dentre eles encontram-se regiões polares, vulcões, desertos, sedimentos oceânicos profundos, fontes hidrotermais, lagos hipersalinos, corpos de água ácida e alcalina, dentre outros (Duarte *et al.*, 2012). Os ambientes extremos apresentam fatores físicos (temperatura, pressão, radiação, luz) e químicos (pH, salinidade, estresse osmótico) que dificultam a presença de vida (Buzzini; Turchetti; Yurkov, 2018).

A ideia dos ambientes extremos como intransponíveis à vida é considerada uma visão antropocêntrica, pois, ainda que extremos, estes ambientes abrigam inúmeros organismos que toleram e até mesmo prosperam sob condições hostis aos seres humanos. Os organismos encontrados em ambientes extremos são denominados extremófilos, e por muito tempo o termo remeteu apenas a microorganismos unicelulares procarióticos, devido ao fato de existirem muitos extremófilos dentro domínio Bactéria, além de que a maioria das arqueias também serem extremófilas. Entretanto, atualmente sabe-se que existem extremófilos dentro dos três domínios, desde microorganismos unicelulares até eucariotos e multicelulares (Horikoshi, 2011). Extremófilos podem ser divididos em extremotolerantes, organismos que apenas toleram o ambiente extremo por determinado tempo ou estágios de vida, ou extremófilos verdadeiros, pois necessitam das condições extremas para que realizem suas atividades fisiológicas em condições ótimas. Vale destacar ainda a existência de organismos que toleram mais de um extremo, os quais são denominados poliextremófilos (Rothschild; Mancinelli, 2001).

O Deserto do Atacama é considerado um ambiente extremo por se tratar de um deserto hiperárido com alta incidência de radiação ultravioleta (UV), escassas fontes de carbono orgânico, grandes variações diárias de temperatura e baixa disponibilidade de água (Navarro-Gonzalez, 2003). Com território entre 17 ° S e 27 ° S de latitude no norte do Chile, o Deserto do Atacama é o deserto mais seco e mais antigo da Terra, tendo experimentado aridez extrema nos últimos 150 milhões de anos e hiperaridez nos últimos 15 milhões de anos (Hartley *et al.*, 2005; Houston & Hartley, 2003). No núcleo hiperárido deste deserto, a precipitação média anual é inferior a 5mm por ano – com longos períodos sem chuva – o que acarreta em uma

disponibilidade de água muito abaixo do limite necessário para apoiar a vida fototrófica do solo e, conseqüentemente, todas as demais formas de vida (Warren-Rhodes *et al.*, 2006).

Devido às características extremas do Deserto do Atacama, poucos são os organismos que prosperam nesse território, porém alguns microrganismos extremófilos conseguem obter relativo sucesso – mesmo com todas as condições adversas. Uma grande variação de temperatura já foi registrada, de 46,5°C a -8°C, entre maio de 2008 e maio de 2009 neste deserto (Ríos & Valea, 2010), mas isso não impede o crescimento de microrganismos resistentes à extremos de temperatura, que se fazem presentes até mesmo a 6000 metros de altitude, em vulcões onde a oscilação térmica pode ser ainda maior – com uma amplitude de até 70 ° C (Lynch *et al.*, 2012).

A radiação UV é outro fator físico limitante que torna esse território um ambiente extremo a ser superado pelos microrganismos extremófilos, pois induz efeitos deletérios em todos os organismos existentes na terra, de procariotos até seres humanos. A radiação UV faz parte do espectro da luz solar e compreende ondas eletromagnéticas divididas em três comprimentos: UV-A (320-400 nm), que possui o maior comprimento de onda, contudo, não induz tanto danos quanto UV-B (280-320 nm), que mesmo tendo boa parte absorvida pelo ozônio estratosférico, causa muitos danos ao DNA dos organismos terrestres. UV-C (100-280 nm) é o menor comprimento de onda e por ser mais eficaz na inativação de microrganismos e mais eficiente na geração de fotoprodutos de DNA que UV-B (Mitchell *et al.* 1991), normalmente é utilizada para esterilizar superfícies, contudo a radiação UV-C não chega até superfície terrestre, pois é absorvida em sua totalidade pela camada de ozônio

O Deserto do Atacama possui intensa radiação UV ao longo de todo o ano, propiciada pela ausência de nuvens devido a suas características geográficas (Paulino-Lima *et al.*, 2012). Dose *et al.* (2001) confirmou a severidade da radiação do Atacama ao testar microrganismos sobre o solo expostos à radiação solar. Esporos de *Bacillus subtilis*, conídios secos de *Aspergillus niger* sobreviveram poucas horas, e até mesmo células de *Deinococcus radiodurans* – bactéria extremamente resistente aos mais variados fatores – não resistiu ao experimento.

Para que um microrganismo prospere em um ambiente extremo como o Deserto do Atacama, ele deve possuir mecanismos de proteção frente à radiação UV, que pode causar danos ao maquinário celular. Entre os danos mais prejudiciais resultantes da exposição à radiação UV, estão a redução no crescimento e sobrevivência e destruição de proteínas e ácidos

nucleicos devido a modificações em sua estrutura. Há também formação de radicais livres, desaminação hidrolítica, elevada produção de espécies reativas de oxigênio, dímeros de ciclobutano-pirimidina e 6-4 fotoprodutos e seus isômeros etc. (Sinha & Häder, 2002).

Dentre os mecanismos de proteção apresentados pelos microrganismos resistentes à radiação UV, podemos citar a produção e armazenamento de pigmentos, como carotenóides e melanina, capazes de absorver a radiação UV em diferentes comprimentos de onda, inclusive no UV-C (Wynn-Williams & Edwards 2002). Além disso, os carotenóides protegem a célula contra danos oxidativos, eliminando radicais livres gerados pela exposição à radiação UV (Moore *et al.*, 1989; Schroeder & Johnson 1993). Porém, os pigmentos não são a única forma de evitar os danos causados por radiação UV, e em determinadas situações até se mostram ineficientes, como demonstrado por Pulschen *et al.*, (2015) quando evidenciou que *D. radiodurans*, mesmo possuindo carotenóides, apresentou menor sobrevivência que *Saccharomyces cerevisiae* quando exposta à radiação ambiental.

Ademais, existem microrganismos que, ainda que desprovidos de pigmentos, também se fazem presentes em ambientes com intensa radiação UV, dentro os quais as leveduras, organismos eucariontes de grande versatilidade fisiológica. Espécies de leveduras não-pigmentadas já foram relatadas no Deserto do Atacama (Pulschen *et al.*, 2015) e demais ambientes, como lagos cristalinos de montanha – que possuem alta radiação UV não somente devido à sua alta elevação, mas também devido a transparência e superficialidade da água (Libkind *et al.*, 2009).

Em um trabalho pioneiro envolvendo eucariontes extremófilos, Pulschen *et al.* (2015) isolou leveduras presentes no solo do vulcão Sairecabur, localizado no Deserto do Atacama. Seu objetivo era submetê-las a condições extremas simuladas em laboratório, tais como radiação UV ambiental, UV-B e UV-C, altas concentrações de sal e temperatura. Em seu trabalho ele também caracterizou pigmentos fotoprotetores presentes em algumas leveduras e analisou se estes auxiliavam na resistência ao UV. Os pesquisadores responsáveis pelo projeto registraram, ainda, dois isolados não-pigmentados, os quais foram identificados como *N. friedmannii* (inicialmente identificado como *Cryptococcus friedmannii*) e *Holtermanniella wattica* (inicialmente identificado como *Holtermanniella watticus*). Ainda que nenhum pigmento tenha sido identificado através da técnica de espectrometria RAMAN, ambos os isolados apresentaram significativa resistência à radiação UV-B e, principalmente, a radiação

UV-C. Desde então, novas leveduras (pigmentadas e não-pigmentadas) foram isoladas do mesmo material de coleta, porém até o momento nenhum estudo foi realizado com esses isolados.

Libkind *et al.* (2009) evidenciou que determinadas espécies de leveduras não-pigmentadas isoladas de lagos cristalinos possuem micosporinas, um metabólito secundário que atua como filtro de radiação UV, reduzindo seus danos. Existem também mecanismos moleculares de reparo de DNA, dentre eles fotorreativação, reparo por excisão e reparo recombinacional (Sinha & Häder, 2002). Schiave *et al.* (2009) não observaram diferenças significativas na resistência de leveduras pigmentadas e não-pigmentadas frente a radiação UV, sugerindo que mecanismos complementares de resistência à radiação UV devem estar presentes nestes organismos.

Além dos mecanismos complementares ainda desconhecidos, somente a força seletiva do ambiente não poderia explicar tamanha resistência, já que a radiação UV-C é completamente absorvida/refletida e não atinge a superfície terrestre. Ao estudar o tema, Mattimore & Battista (1996) descobriram que *D. radiodurans* sensíveis à radiação UV-C também eram suscetíveis a danos causados por dessecação. Neste mesmo trabalho os autores evidenciam que a superfície terrestre não possui taxas tão altas de radiação UV-C quanto às suportadas por *D. radiodurans*, de forma que tal resistência não possa ser explicada puramente como uma consequência de força seletiva, e sim como uma consequência indireta da resistência à dessecação. A prolongada exposição à dessecação também causa danos ao DNA, portanto, para sobreviver a esta condição é necessário que haja uma alta capacidade de reparo, e, de acordo com os autores, essa alta capacidade de reparo é a mesma que torna o *D. radiodurans* resistente à altas taxas de radiação UV-C, contudo, vale destacar que o tema é controverso, e novos estudos com demais organismos resistentes à radiação UV-C são necessários para confirmar essa hipótese.

Desta forma, o presente projeto tem como objetivo testar a resistência a radiação UV-C, que mesmo não chegando até superfície terrestre, pois se os isolados se mostrarem resistentes, poderão ser utilizados experimento de astrobiologia. Também comparar a resistência a radiação em leveduras não-pigmentadas isoladas do Deserto do Atacama, em busca de potenciais modelos para o estudo de mecanismos complementares de resistência à radiação UV. Este trabalho baseia-se na hipótese de que as leveduras não-pigmentadas isoladas

do Deserto do Atacama apresentarão resistência a radiação UV-C uma vez que se encontram adaptadas à sobrevivência em um ambiente com intensa irradiação solar.

2.OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Determinar se leveduras extremófilas não-pigmentadas isoladas do Deserto do Atacama apresentam resistência à radiação UV-C.

2.2 Objetivos Específicos

- Determinar se as leveduras são resistentes a radiação UV-C.
- Comparar a resistência a radiação UV-C das leveduras com a resistência observada na levedura *N. friedmannii*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Coleta e Isolamento

As leveduras foram isoladas de diversos pontos e altitudes ao longo do Deserto do Atacama (tabela 1), incluindo o Vulcão Sairecabur, em janeiro de 2012, e foram cedidas pelo professor Fábio Rodrigues e pela pesquisadora discente Ana Carolina de Carvalho, do Laboratório de Astrobiologia (ASTROLAB, Instituto de Química, Universidade de São Paulo - IQ/USP). Os isolados foram mantidos no Laboratório de Ecologia Molecular e Extremófilos (LEMEx) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) em freezers -20 °C. Os cultivos de rotina das leveduras foram realizados em meio líquido YM (Peptona 5 g.L⁻¹, Extrato de Levedura 3 g.L⁻¹, Extrato de Malte 3 g.L⁻¹, Glicose 10 g.L⁻¹, água destilada 1 L), sob temperatura de 20 °C e agitação constante.

Tabela 1. Latitude, longitude e altitude dos locais de coleta de cada um dos isolados.

Isolado	Latitude (°)	Longitude (°)	Altitude
ATA13B	-22,716945	-67,923690	5047
ATA16AD	-22,706917	-67,996050	3981
ATA16B			
ATA16BAB			
ATA16BC			
ATA16DC			
ATA35B	-25,028878	-70,458352	282
ATA37BB1	-26,295352	-70,659348	83

3.2 Exposição à radiação UV-C

Os ensaios com radiação foram realizados de acordo com protocolo anteriormente realizado por Pulschen *et al.* (2015). As leveduras foram cultivadas em meio líquido YM sob agitação constante e temperatura de 20°C até atingirem a OD595 ~ 1.0-1.1. Diluições seriadas foram realizadas (10^{-1} a 10^{-6}) e posteriormente alíquotas de 10 μ l foram transferidas para placas de ágar YM, em triplicatas, que foram expostas por 30 e 60 segundos a radiação UV-C sob temperatura ambiente. A radiação foi obtida por lâmpada Philips (Philips, Eindhoven, Holanda) TUV-20W (253.7 nm) a uma distância de 22 centímetros das placas. A resistência das leveduras foi avaliada através do método de contagem de UFC (unidades formadoras de colônia), 48h após a exposição à radiação. Para cada um dos isolados, placas de cultura não expostas à radiação UV-C foram utilizadas como controle. Culturas da levedura radorresistente *N. friedmannii* foram utilizadas como controle positivo, e após exposição à radiação UV-C, utilizamos a contagem de viáveis para quantificar a resistência dos isolados

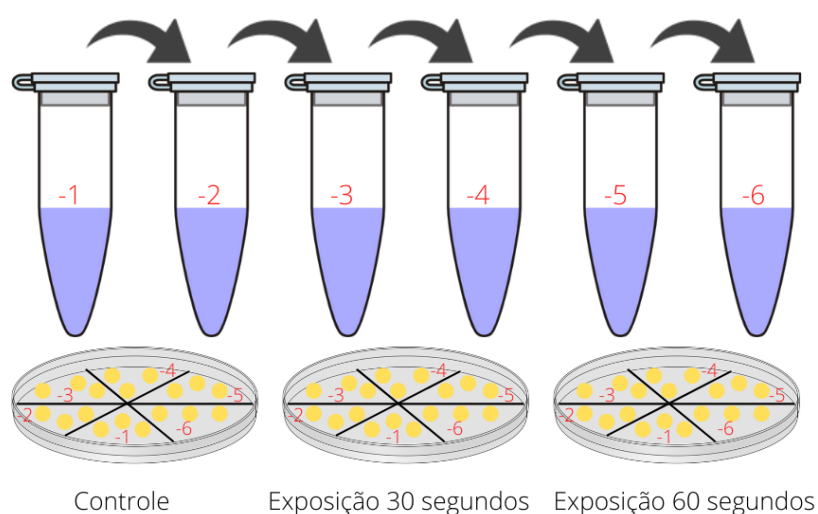


Figura 1: Ilustração da técnica de diluição seriada para contagem das unidades formadoras de colônia.

4.RESULTADOS

4.1 Normalização da Dosagem de Radiação

Em condições ideais, o equipamento radiômetro é utilizado para o cálculo das dosagens exatas de radiação as quais os microrganismos são expostos. Devido a ausência de tal equipamento em nosso laboratório, culturas da levedura radorresistente *N. friedmannii* foram utilizadas como controle positivo do experimento. Elas também foram utilizadas para normalizar a dosagem de radiação a qual os isolados foram expostos, uma vez que *N. friedmannii* possui resistência à radiação UV-C já estabelecida conforme o experimento realizado por Pulschen *et al.*, (2015) (figura 2). As culturas de *N. friedmannii*, anteriormente denominadas *C. friedmannii*, foram expostas a radiação UV-C durante 30 e 60 segundos, e sua resistência foi calculada a partir da contagem de UFCs, de acordo com as condições anteriormente citadas.

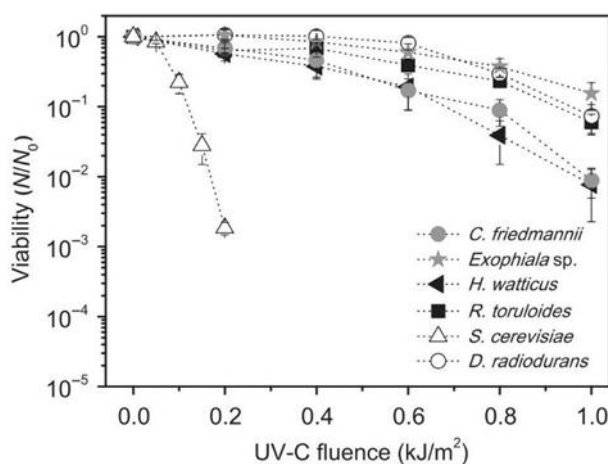


Figura 2: Dados utilizados para a normalização da dosagem de radiação UV-C utilizados no presente trabalho. Curvas de crescimento apresentadas por Pulschen *et al* (2015) para as leveduras *N. friedmannii*, *Holtermanniella wattica*, *Exophiala sp.* e *Rhodosporidium toruloides*.

A figura 3 evidencia a resistência à radiação UV-C apresentada pela levedura *N. friedmannii*. Comparando-se os dados apresentados por Pulschen *et al.* (2015) com os dados

encontrados no presente trabalho, verifica-se um crescimento similar ao crescimento observado após sua exposição às dosagens de 0.6 e 1.2 kJ/m² (30 e 60 segundos de exposição, respectivamente), sendo estas, portanto, as dosagens aproximadas utilizadas para os demais experimentos apresentados no presente trabalho (Figura 3).

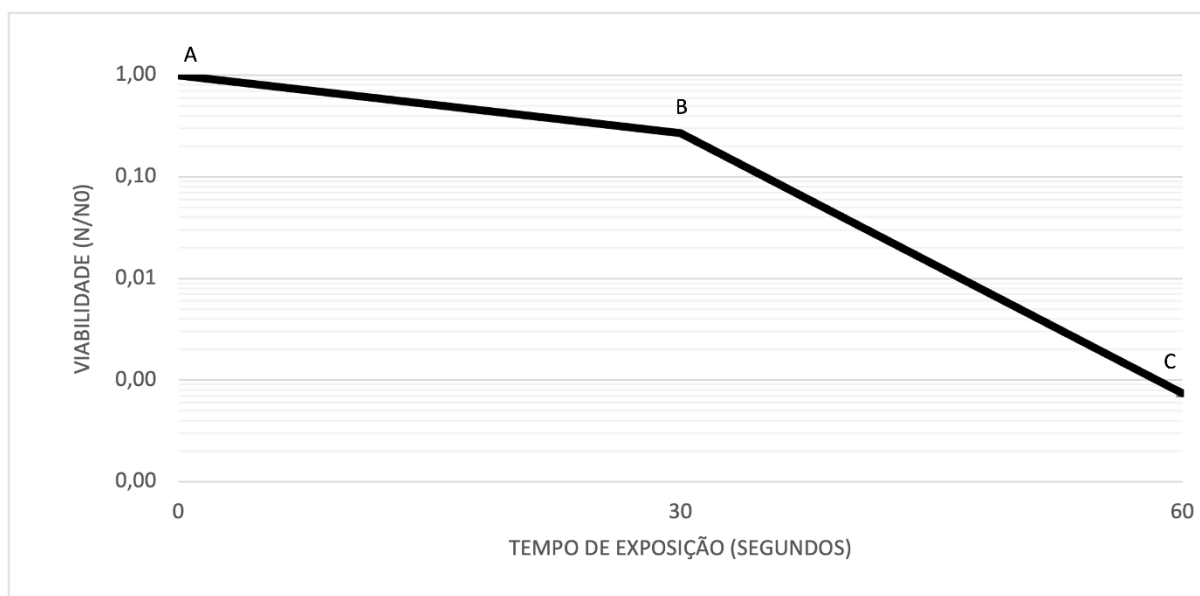


Figura 3: Curva de crescimento obtida no presente trabalho após exposição da *levedura N. friedmannii* por 30 e 60 segundos à radiação UV-C.

4.2 Resistência à radiação

Os isolados estudados no presente trabalho apresentaram, em sua maioria, resistência a radiação UV-C semelhantes ou muito próximas à resistência observada em *N. friedmannii*, apesar não ser estatisticamente significativo (P=0,001). Em relação à exposição à radiação durante 30 segundos (equivalente a 0.6 kJ/m²), apenas três isolados, de um total de oito, apresentaram redução de mais de um log de viabilidade. São eles: ATA16AD, ATA16DC e ATA16BAB, esta última tendo sua sobrevivência reduzida em dois logs de viabilidade (99,1%). Todos os demais isolados, ATA16B, ATA16BC, ATA35B, ATA37BB1 e ATA13B, apresentaram resistência similar à observada em *N. friedmannii*, que apresentou pequena redução de viabilidade (86,9%) após exposição após 30 segundos de exposição.

Após exposição de 60 segundos (equivalente a 1.2 kJ/m^2), houve diferença na resistência dos isolados, apesar não ser estatisticamente significativo ($P=0.001$). Pôde-se observar uma considerável queda na sobrevivência dos isolados, de forma similar ao observado em *N. friedmannii*, que chegaram a apresentar redução de até três logs de viabilidade. O isolado ATA16B, por exemplo, apresentou redução de três logs de viabilidade, quase 100%. Por outro lado, os isolados identificadas como ATA16AD, ATA16BAB, ATA16BC, ATA35B e ATA37BB1 apresentaram redução de dois logs de viabilidade. Chama-se atenção, aqui, para o fato de que as leveduras ATA16AD e ATA16BAB, que apresentaram uma menor resistência após exposição de 30 segundos, apresentaram maior resistência quando expostas durante 60 segundos, indicando uma maior resistência para períodos mais longos de exposição nestes dois isolados. Duas leveduras, ATA16DC e, especialmente ATA13B, apresentaram elevada resistência mesmo após a exposição de 60 segundos, com ambas perdendo apenas um log de viabilidade, 98,8% e 96,9%, respectivamente. A levedura identificada como ATA13B apresentou, portanto, a maior resistência dentre todos os isolados incluídos no presente trabalho, bem como quando comparada à levedura de radiorresistência já estabelecida, *N. friedmannii*.

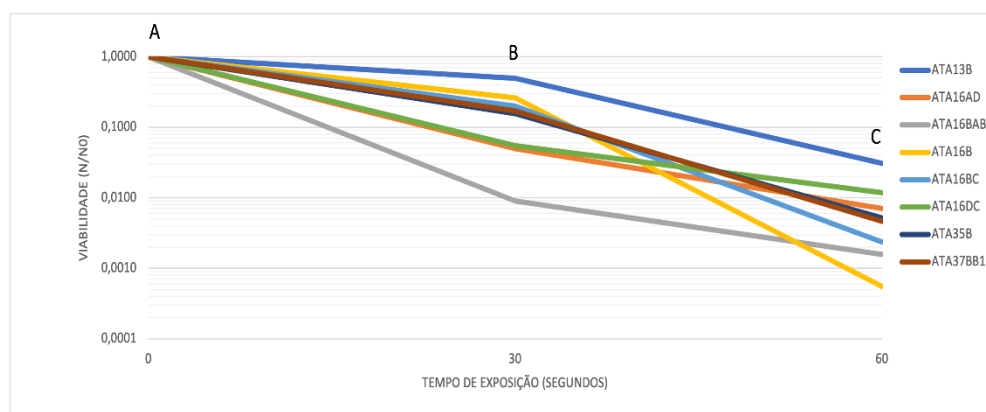


Figura 4: Curvas de resistência a radiação UV-C dos isolados após 30 e 60 segundos.

5. DISCUSSÃO

As leveduras utilizadas no presente trabalho foram isoladas de quatro regiões distintas do Deserto do Atacama, apresentando altitudes distintas, que variam de 83 metros de altitude até 5043 metros acima do nível do mar. Estes dados, juntamente aos resultados obtidos nos experimentos aqui apresentados, evidenciam a resistência similar ou superior à radiação UV-C nos isolados estudados em relação a levedura radiorresistente *N. friedmannii*. Esta observação indica a possibilidade de que ao menos alguns dos isolados estudados pertençam ao mesmo gênero ou a grupos filogeneticamente próximos a *N. friedmannii*. Diferentes trabalhos já evidenciaram a presença dominante de representantes do gênero *Naganishia* em outros estratovulcões próximos do Deserto do Atacama. Em um trabalho de caracterização bioquímica e molecular de comunidades procarióticas e eucarióticas associadas e não associadas a fumarolas presentes no vulcão Socompa, Costello *et al.*, (2009) evidenciou que o solo seco não associado as fumarolas é predominantemente dominado por fungos (97% do total microrganismos isolados), sendo o gênero *Cryptococcus sp* identificado em mais de 60% da amostra coletada da tefra não associada a fumarola. O gênero *Cryptococcus sp* encontra-se filogeneticamente próximo ao gênero *Naganishia*, sendo algumas espécies anteriormente denominadas *Cryptococcus* reclassificadas como pertencentes ao gênero *Naganishia* (dentre elas, a espécie utilizada no presente trabalho, *N. friedmannii*).

Lynch *et al.*, (2012) com o objetivo de determinar se os solos presentes em altitudes de 6.000 metros acima do nível do mar, tais como o vulcão Socompa e vulcão Llullaillaco, eram tão pobres em nutrientes e microrganismos, quanto o próprio Deserto do Atacama, constatou a presença expressiva do gênero *Naganishia*. Além de constatarem a condição oligotrófica destes solos, com níveis de carbono semelhantes a solos praticamente sem vida microbiana e níveis de nitrogênio abaixo dos limites de detecção, as amostras de Llullaillaco evidenciaram a predominância de uma unidade taxonômica operacional (OTU) com 97% de identidade com *N. friedmannii*, evidenciando a presença dominante de leveduras do gênero *Naganishia*.

Em outro trabalho com o objetivo de averiguar a diversidade microbiológica presente nos solos dos vulcões Socompa e Llullaillaco associados ou não a fumarolas e também a nieves

penitentes (formações de gelo em altitudes), Solon *et al.* (2018) constatou que leveduras relacionadas a *N. friedmannii* são organismos heterotróficos dominantes em grandes áreas de solos secos nesses mesmos vulcões. Assim como Solon *et al.*, (2018), Pulschen *et al.*, (2015), em seu trabalho envolvendo leveduras isoladas do vulcão Sairecabur, observou a presença de *N. friedmannii* nos quatro pontos de coletas a 5047, 4823 e 3981 metros de altitude, mesmo com diferenças nas características do solo de alguns pontos de coleta. Por exemplo, a amostra coletada a 4823 metros de altitude apresentou solo ácido e rico em enxofre. Portanto, fica evidente a presença dominante de *Naganishia* em outros pontos próximos e com características semelhantes ao dos isolados que acredito serem do mesmo gênero.

Schmidt *et al.*, (2017) afirma em seu trabalho que o fato de haver uma presença massiva de *Naganishia* em estratovulcões presentes no Atacama se deve a sua capacidade de suportar altos níveis radiação ultravioleta, baixos valores de pH e capacidade de crescer durante ciclos de congelamento e descongelamento, além de apresentarem características halotolerantes e psicrotolerantes. O fato de *Naganishia* ser tão predominante nesses vulcões de alta altitude com escassez de água e nutrientes, evidencia que sua caracterização como organismos oportunitróficos flexíveis, aproveitando-se de raros momentos de disponibilidade de água através do derretimento de neve e disponibilidade de nutrientes através de entradas eólicas. Devido a essas características e a predominância de *Naganishia* evidenciadas pelos trabalhos aqui citados, evidencia-se a possibilidade de que os isolados estudados no presente trabalho pertençam ao mesmo gênero ou a grupos filogenéticos similares a *N. friedmannii*.

A abundância desse grupo nos estratovulcões se deve ao fato que esses locais, segundo Schmidt *et al.*, (2017), são o reservatório dessas leveduras, e que a presença desse gênero em outros locais se deve à dispersão aérea. A alta capacidade de sobrevivência a condições extremas dos membros do gênero *Naganishia* permite sua dispersão na alta troposfera ou até ainda mais alto, na atmosfera. Já a presença de espécies do gênero ou similares em comunidades microbianas dos vales secos da Antártica é fruto de dispersão contínua de poeira de partículas do sul dos Andes via ondas de Rossby, fruto da confluência de jatos polares e subtropicais que se unem e se separam em intervalos periódicos e que pode levar à dispersão aérea de micróbios em ambas as direções entre os Andes e a Antártica.

Em relação aos mecanismos de fotoproteção, na ausência aparente de pigmentos fotoprotetores tudo indica que os isolados possuam outros mecanismos que auxiliem na resistência a radiação UV-C do experimento e também a forte radiação presente no Deserto do Atacama. Existe a grande possibilidade que os isolados possuam outras moléculas fotoprotetoras, como a micosporina (Libkind *et al.*, 2009). As micosporinas foram descobertas pela primeira vez em micélios esporulantes de fungos (Leach, 1965; Trione *et al.*, 1966). Elas são compostos solúveis em água e apresentam máximos de absorção entre 310 a 320 nm (Pérez *et al.*, 2006) e em alguns trabalhos ela é apontada com metabólito secundário que atuam como filtro UV além de desempenhar papel importante como antioxidantes e osmoprotetores (Volkman *et al.*, 2003), que é algo muito importante, pois além da radiação existem outros fatores físicos extremos presentes no Deserto do Atacama, dentre esses, alta salinidade é um fator a ser superado.

Se confirmada a presença deste composto nos isolados, aumentará ainda mais a possibilidade destes isolados pertencerem ao gênero *Naganishia* ou serem muito próximos filogeneticamente. Libkind *et al.*, (2004) em seu trabalho com leveduras de oito gêneros, dentre eles, o gênero *Cryptococcus*, envolvendo produção de compostos fotoprotetores após exposição à radiação UV, constatou que somente alguns gêneros eram capazes de sintetizar micosporinas após a exposição ao UV e sugeriu tendência taxonômica e estudos futuros com grupo mais amplo de espécies de leveduras para verificar tal hipótese. Em um estudo posterior, Libkind *et al.*, (2005), também testando a produção de compostos fotoprotetores após a exposição à radiação UV, constatou que somente alguns grupos, dentre eles membros da família Tremellaceae (família a qual o gênero *Naganishia* pertence), eram capazes de sintetizar micosporinas, sugerindo que o processo de micosporinogênese é específico de determinados grupos taxonômicos.

Os isolados aqui estudados, assim como *N. Friedmannii*, podem possivelmente conter mecanismos de fotorreativação (Pulschen *et al.*, 2015) que auxiliam no combate aos danos ao DNA causados pela radiação UV-C do nosso experimento. A radiação UV-C, assim como UV-B produzem CPDs e 6,4 PPs que podem ser reparados através das enzimas fotoliasas induzidas por radiação fotossinteticamente ativa (PAR, 400-700nm), tornando os isolados resistentes à radiação UV-C e conseqüentemente a intensa radiação presente no Deserto do Atacama (Zenoff

et al. 2006). Além da fotorreativação, é possível que os isolados também possuam enzimas antioxidantes assim como micosporinas, que auxiliam de forma eficiente a eliminação de ROS, o que torna ainda mais importante na prevenção do mal funcionamento celular decorrente da exposição ao UV (Hoerter *et al.* 2005).

Todos esses mecanismos e recursos citados anteriormente de fato podem ser responsáveis pela resistência apresentada pelos os isolados aqui estudados. Contudo, demais mecanismos complementares também podem estar correlacionados com a elevada resistência a radiação observada nos isolados do Deserto do Atacama (Pulschen *et al.* 2015). Em um trabalho de comparação entre resistência crônica e aguda a radiação ionizante, Shuryak *et al.*, (2017) constatou que as leveduras mais resistentes eram aquelas que apresentavam maior concentração celular e agiam cooperativamente secretando compostos antioxidantes, portanto, estudos futuros devem ser realizados a fim de compreender os mecanismos de resistência à radiação, assim como os diferentes níveis de resistência, observados nos isolados analisados no presente trabalho.

6. CONCLUSÃO

As leveduras analisadas nesse trabalho apresentarem a resistência a radiação UV-C similar ou muito próxima a *N. friedmannii*, que foi utilizada como referência por já possuir sua resistência bem definida. Dentre todas as leveduras, o isolado identificado como ATA13B apresentou maior resistência, inclusive, maior que a anteriormente observada em *N. friedmannii*. Sua resistência talvez se deva ao seu local de isolamento a 5043 metros de altitude, diferente dos demais isolados. Segundo Blumthaler *et al.*, (1997) há um aumento na dose de radiação UV devido ao efeito altitude (AE), que é o aumento da dose de radiação conforme o aumento da altitude. Isso se deve as massas ópticas de ar menores e também devido a maior proximidade com a radiação que sofre menos dispersão e absorção. Contudo, somente uma maior exposição à radiação UV não explica a maior resistência a radiação UV-C do isolado ATA13B, pois tal radiação não chega até superfície terrestre, evidenciando que devem existir outros fatores físicos ou químicos presentes no local de isolamento do isolado que o torna indiretamente resistente a radiação UV-C.

Vale destacar que as leveduras foram isoladas posteriormente ao isolamento da levedura *N. friedmannii*, muito provavelmente por serem encontradas em menor quantidade, talvez em virtude de uma menor resistência a outras condições físicas extremas presentes no Deserto do Atacama, tais como salinidade, temperatura, dessecação e baixa concentração de nutrientes - meio oligotrófico (Pulshen *et al.*, 2015; Schmidt *et al.*, 2017; Solon *et al.*, 2018; Lynch *et al.*, 2012). A fim de confirmar-se a real abundância dos isolados em relação a *N. friedmannii*, são necessários novos estudos ecológicos, além também de estudos para determinar sua resistência a demais fatores ambientais extremos (salinidade, temperatura, dessecação, etc.) presentes no Deserto do Atacama. Além disso, novos estudos devem avaliar a possibilidade de uma relação direta ou indireta entre a resistência a radiação UV-C e demais fatores ambientais.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BLUMTHALER, M.; AMBACH, W.; ELLINGER, R.. **Increase in solar UV radiation with altitude**. Journal Of Photochemistry And Photobiology B: Biology, [S.L.], v. 39, n. 2, p. 130-134, jun. 1997. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1011-1344\(96\)00018-8](http://dx.doi.org/10.1016/s1011-1344(96)00018-8).

BUZZINI, Pietro; TURCHETTI, Benedetta; YURKOV, Andrey. **Extremophilic yeasts: the toughest yeasts around?**. Yeast, [s.l.], v. 35, n. 8, p. 487-497, 21 maio 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/yea.3314>.

COSTELLO, Elizabeth K.; HALLOY, Stephan R. P.; REED, Sasha C.; SOWELL, Preston; SCHMIDT, Steven K.. **Fumarole-Supported Islands of Biodiversity within a Hyperarid, High-Elevation Landscape on Socompa Volcano, Puna de Atacama, Andes**. Applied And Environmental Microbiology, [S.L.], v. 75, n. 3, p. 735-747, fev. 2009. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.01469-08>.

De Los Ríos A, Valea S, Ascaso C, Davila A, Kastovsky J, McKay CP, Gómez-Silva B, Wierzchos J. **Comparative analysis of the microbial communities inhabiting halite evaporites of the Atacama Desert**. Int Microbiol. 2010 Jun;13(2):79-89. doi: 10.2436/20.1501.01.113.

DOSE, Klaus; BIEGER-DOSE, Angelika; ERNST, Birgit; FEISTER, Uwe; GÓMEZ-SILVA, Benito; KLEIN, Anke; RISI, Sergio; STRIDDE, Christine. **Survival of Microorganisms under the Extreme Conditions of the Atacama Desert**. Origins Of Life And Evolution Of The Biosphere, [s.l.], v. 31, n. 3, p. 287-303, 2001. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1023/a:1010788829265>.

DUARTE, Rubens T. D.; NÓBREGA, Felipe; NAKAYAMA, Cristina R.; PELLIZARI, Vivian H.. **Brazilian research on extremophiles in the context of astrobiology**. International Journal Of Astrobiology, [s.l.], v. 11, n. 4, p. 325-333, 11 jul. 2012. Cambridge University Press (CUP). <http://dx.doi.org/10.1017/s1473550412000249>.

HARTLEY, Adrian J.; CHONG, Guillermo; HOUSTON, John; MATHER, Anne E. **150 million years of climatic stability: evidence from the Atacama Desert, northern Chile.** Journal of The Geological Society, [s.l.], v. 162, n. 3, p. 421-424, maio 2005. Geological Society of London. <http://dx.doi.org/10.1144/0016-764904-071>.

Hoerter JD, Arnold AA, Kuczynska DA, Shibuya A, Ward CS, Sauer MG, Gizachew A, Hotchkiss TM, Fleming TJ, Johnson S. **Effects of sublethal UV-A irradiation on activity levels of oxidative defense enzymes and protein oxidation in Escherichia coli.** J Photochem Photobiol B. 2005 Dec 1; 81(3):171-80. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2005.07.005.

Horikoshi K., Bull A. (2011) **Prologue: Definition, Categories, Distribution, Origin and Evolution, Pioneering Studies, and Emerging Fields of Extremophiles.** In: Horikoshi K. (eds) Extremophiles Handbook. Springer, Tokyo. https://doi.org/10.1007/978-4-431-53898-1_1

HOUSTON, John; HARTLEY, Adrian J. **The central Andean west-slope rainshadow and its potential contribution to the origin of hyper-aridity in the Atacama Desert.** International Journal of Climatology, [s.l.], v. 23, n. 12, p. 1453-1464, 2003. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/joc.938>.

LEACH, Charles M.. **ULTRAVIOLET-ABSORBING SUBSTANCES ASSOCIATED WITH LIGHT-INDUCED SPORULATION IN FUNGI.** Canadian Journal Of Botany, [S.L.], v. 43, n. 2, p. 185-200, 1 fev. 1965. Canadian Science Publishing. <http://dx.doi.org/10.1139/b65-024>

LIBKIND, Diego; MOLINÁ, Martín; SAMPAIO, José Paulo; VAN BROECK, Maria. **Yeasts from high-altitude lakes: influence of uv radiation.** Fems Microbiology Ecology, [s.l.], v. 69, n. 3, p. 353-362, set. 2009. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6941.2009.00728.x>.

Libkind, D., Pérez, P., Sommarug, R. et al. **Constitutive and UV-inducible synthesis of photoprotective compounds (carotenoids and mycosporines) by freshwater yeasts.** Photochem Photobiol Sci 3, 281–286 (2004). <https://doi.org/10.1039/b310608j>

Libkind D, Sommaruga R, Zagarese H, van Broock M. **Mycosporines in carotenogenic yeasts.** Syst Appl Microbiol. 2005 Oct;28(8):749-54. doi: 10.1016/j.syapm.2005.05.005. PMID: 16261865.

LYNCH, R. C.; KING, A. J.; FARÍAS, Mariá E.; SOWELL, P.; VITRY, Christian; SCHMIDT, S. K. **The potential for microbial life in the highest-elevation (>6000 m.a.s.l.) mineral soils of the Atacama region.** Journal of Geophysical Research: Biogeosciences, [S.L.], v. 117, n. 2, p. 01-10, jun. 2012. American Geophysical Union (AGU). <http://dx.doi.org/10.1029/2012jg001961>.

MATTIMORE, V; BATTISTA, J R. **Radioresistance of Deinococcus radiodurans: functions necessary to survive ionizing radiation are also necessary to survive prolonged desiccation.** Journal Of Bacteriology, [S.L.], v. 178, n. 3, p. 633-637, 1996. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jb.178.3.633-637.1996>.

Mitchell DL, Jen J, Cleaver JE. **Relative induction of cyclobutane dimers and cytosine photohydrates in DNA irradiated in vitro and in vivo with ultraviolet-C and ultraviolet-B light.** Photochem Photobiol. 1991 Nov;54(5):741-6. doi: 10.1111/j.1751-1097.1991.tb02084.x. PMID: 1665910.

MOORE, Margo M.; BREEDVELD, Michael W.; AUTOR, Anne P. **The role of carotenoids in preventing oxidative damage in the pigmented yeast, Rhodotorula mucilaginosa.** Archives Of Biochemistry And Biophysics, [S.L.], v. 270, n. 2, p. 419-431, maio 1989. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0003-9861\(89\)90524-9](http://dx.doi.org/10.1016/0003-9861(89)90524-9).

NAVARRO-GONZALEZ, R.. **Mars-Like Soils in the Atacama Desert, Chile, and the Dry Limit of Microbial Life.** Science, [s.l.], v. 302, n. 5647, p. 1018-1021, 7 nov. 2003. American

Association for the Advancement of Science (AAAS).
<http://dx.doi.org/10.1126/science.1089143>.

PAULINO-LIMA, Ivan Gláucio; AZUA-BUSTOS, Armando; VICUÑA, Rafael; GONZÁLEZ-SILVA, Carlos; SALAS, Loreto; TEIXEIRA, Lia; ROSADO, Alexandre; LEITAO, Alvaro Augusto da Costa; LAGE, Claudia. **Isolation of UV-C-Tolerant Bacteria from the Hyperarid Atacama Desert, Chile**. *Microbial Ecology*, [s.l.], v. 65, n. 2, p. 325-335, 23 set. 2012. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00248-012-0121-z>.

Pérez, P., Libkind, D., Diéguez, M.d.C. et al. **Mycosporines from freshwater yeasts: a trophic cul-de-sac?** *Photochem Photobiol Sci* 5, 25–30 (2006).
<https://doi.org/10.1039/b509764a>

PULSCHEN, André A.; RODRIGUES, Fabio; DUARTE, Rubens T. D.; ARAUJO, Gabriel G.; SANTIAGO, Iara F.; PAULINO-LIMA, Ivan G.; ROSA, Carlos A.; KATO, Massuo J.; PELLIZARI, Vivian H.; GALANTE, Douglas. **UV-resistant yeasts isolated from a high-altitude volcanic area on the Atacama Desert as eukaryotic models for astrobiology**. *Microbiologyopen*, [s.l.], v. 4, n. 4, p. 574-588, 4 jul. 2015. Wiley.
<http://dx.doi.org/10.1002/mbo3.262>.

ROTHSCHILD, Lynn J.; MANCINELLI, Rocco L.. **Life in extreme environments**. *Nature*, [S.L.], v. 409, n. 6823, p. 1092-1101, fev. 2001. Springer Science and Business Media LLC.
<http://dx.doi.org/10.1038/35059215>.

SCHIAVE, Letícia A.; PEDROSO, Reginaldo S.; CANDIDO, Regina C.; ROBERTS, Donald W.; BRAGA, Gilberto U. L. **Variability in UV-B Tolerances of Melanized and Nonmelanized Cells of *Cryptococcus neoformans* and *C. laurentii***. *Photochemistry And Photobiology*, [s.l.], v. 85, n. 1, p. 205-213, jan. 2009. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1751-1097.2008.00418.x>.

SCHROEDER, W. A.; JOHNSON, E. A. **Antioxidant role of carotenoids in *Phaffia rhodozyma***. Journal Of General Microbiology, [s.l.], v. 139, n. 5, p. 907-912, 1 maio 1993. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/00221287-139-5-907>.

SELBMANN, Laura; ISOLA, Daniela; ZUCCONI, Laura; ONOFRI, Silvano. **Resistance to UV-B induced DNA damage in extreme-tolerant cryptoendolithic Antarctic fungi: detection by pcr assays**. Fungal Biology, [S.L.], v. 115, n. 10, p. 937-944, out. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.funbio.2011.02.016>.

SHURYAK, Igor; MATROSOVA, Vera Y.; GAIDAMAKOVA, Elena K.; TKAVC, Rok; GRICHENKO, Olga; KLIMENKOVA, Polina; VOLPE, Robert P.; DALY, Michael J. **Microbial cells can cooperate to resist high-level chronic ionizing radiation**. Plos One, [S.L.], v. 12, n. 12, p. 1-24, 20 dez. 2017. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0189261>.

SINHA, Rajeshwar P.; HÄDER, Donat-p.. **UV-induced DNA damage and repair: a review**. Photochemical & Photobiological Sciences, [s.l.], v. 1, n. 4, p. 225-236, 13 mar. 2002. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/b201230h>.

Solon, AJ, Vimercati, L., Darcy, JL et ai. **Comunidades Microbianas de Fumarolas de Alta Elevação, Penitentes e “Solos” Secos de Tephra da Zona Vulcânica de Puna de Atacama**. Microb Eco 76, 340-351 (2018). <https://doi.org/10.1007/s00248-017-1129-1>

Steven K Schmidt, Lara Vimercati, John Lcy, Pablo Arán, Eli MS Gendron, Adam Jon, Dorota Porazinska & Cristina Dorador (2017) **Naganishia in high places: working or dormant cells of the atmosphere?** Mycology, 8:3, 153-163, DOI: 10.1080/21501203.2017.1344154
Trione EJ, Leach CM, Mutch JT. **Sporogenic substances isolated from fungi**. Nature. 1966 Oct 8;212(5058):163-4. doi: 10.1038/212163a0.

VISHNIAC, H. S.. **Cryptococcus friedmannii, a New Species of Yeast from the Antarctic**. Mycologia, [s.l.], v. 77, n. 1, p. 149, jan. 1985. JSTOR. <http://dx.doi.org/10.2307/3793260>.

Volkman M, Whitehead K, Rütters H, Rullkötter J, Gorbushina AA. **Mycosporine-glutamicol-glucoside: a natural UV-absorbing secondary metabolite of rock-inhabiting microcolonial fungi.** Rapid Commun Mass Spectrom. 2003;17(9):897-902. <https://doi.org/10.1002/rcm.997>

WARREN-RHODES, Kimberley A.; RHODES, Kevin L.; POINTING, Stephen B.; EWING, Stephanie A.; LACAP, Donnabella C.; GÓMEZ-SILVA, Benito; AMUNDSON, Ronald; FRIEDMANN, E. Imre; MCKAY, Christopher P.. **Hypolithic Cyanobacteria, Dry Limit of Photosynthesis, and Microbial Ecology in the Hyperarid Atacama Desert.** Microbial Ecology, [s.l.], v. 52, n. 3, p. 389-398, 25 jul. 2006. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00248-006-9055-7>.

WYNN-WILLIAMS, David D.; EDWARDS, Howell G. M.. **Environmental UV Radiation: biological strategies for protection and avoidance.** Astrobiology, [s.l.], p. 245-260, 2002. Springer Berlin Heidelberg. http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-59381-9_17.

Fernández Zenoff V, Siñeriz F, Farías ME. **Diverse responses to UV-B radiation and repair mechanisms of bacteria isolated from high-altitude aquatic environments.** Appl Environ Microbiol. 2006 Dec;72(12):7857-63. doi: 10.1128/AEM.01333-06.