

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

AGATHA RÖEHRS MICHEL

**RESISTÊNCIA À SALINIDADE E RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA EM LEVEDURAS
NÃO-PIGMENTADAS ISOLADAS DO DESERTO DO ATACAMA: POTENCIAL
PARA ESTUDOS EM ASTROBIOLOGIA**

Florianópolis

2022

Agatha Röehrs Michel

**RESISTÊNCIA À SALINIDADE E RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA EM LEVEDURAS
NÃO-PIGMENTADAS ISOLADAS DO DESERTO DO ATACAMA: POTENCIAL
PARA ESTUDOS EM ASTROBIOLOGIA**

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.

Michel, Agatha Röehrs

Resistência à salinidade e radiação ultravioleta em
leveduras não-pigmentadas isoladas do deserto do Atacama:
potencial para estudos em astrobiologia / Agatha Röehrs
Michel ; orientador, Marianne Gabi Kreusch, 2022.

31 p.

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

Inclui referências.

1. Ciências Biológicas. 2. Leveduras extremófilas. 3.
Salinidade. 4. Radiação ultravioleta. I. Kreusch, Marianne
Gabi. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação
em Ciências Biológicas. III. Título.

Agatha Röhers Michel

Resistência à salinidade e radiação ultravioleta em leveduras não-pigmentadas isoladas do deserto do Atacama: potencial para estudos em astrobiologia

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

Florianópolis, 11 de março de 2022.



Documento assinado digitalmente
Daniela Cristina de Toni
Data: 21/03/2022 09:56:30-0300
CPF: 774.080.129-15
Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

Prof. Dr^a. Daniela Cristina de Toni
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:



Documento assinado digitalmente
MARIANNE GABI KREUSCH
Data: 18/03/2022 23:23:59-0300
CPF: 009.426.339-62
Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

MSc. Marianne Gabi Kreusch
Orientadora
Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, UFSC



Documento assinado digitalmente
Rubens Tadeu Delgado Duarte
Data: 20/03/2022 18:52:45-0300
CPF: 030.651.319-60
Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

Prof. Dr. Rubens Tadeu Delgado Duarte
Avaliador
Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, UFSC

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

Dedico este trabalho aos meus amados pais, Raquel e Lauro, e aos meus queridos irmãos, Andreza e Derik.

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer primeiramente aos meus queridos pais, Raquel e Lauro, por sempre acreditarem na minha capacidade, e por todo o amor e suporte que me deram ao longo de toda a vida. Sou muito grata pelo apoio e pela dedicação de vocês para que eu e meus irmãos sempre recebêssemos uma boa educação e para que nunca nos faltasse nada. Agradeço também aos meus irmãos, Andreza e Derik, por todo o apoio e companheirismo.

Agradeço às minhas queridas colegas e amigas Cibele e Lais, que fizeram da graduação um momento muito mais especial. Levarei a amizade de vocês por toda a minha vida.

Gostaria de agradecer imensamente à minha orientadora, Marianne Gabi Kreusch, que em janeiro de 2021 me recebeu no laboratório e desde então me ensinou tanto. Obrigada pelas conversas, pelas caronas, pela orientação e pela paciência. Sou muito grata por tudo que me ensinou e contribuiu em minha jornada.

Obrigada aos membros da banca avaliadora, Prof. Dr. Rubens Tadeu Delgado Duarte e Prof.^a Dr.^a. Ana Carolina de Carvalho, por aceitarem fazer parte deste importante momento.

Por fim, agradeço à UFSC, instituição que eu tanto sonhei em estudar, e que possibilitou este e tantos outros estudos científicos ao longo da história.

“Nada na biologia faz sentido exceto à luz da evolução”.

(DOBZHANSKY, 1973)

RESUMO

Leveduras extremófilas podem suportar condições físico-químicas extremas, em diferentes tipos de ambientes, sendo considerados modelos para estudos em astrobiologia. A presença de pigmentos costuma ser um importante mecanismo de proteção contra a radiação, porém, sabe-se que existem exceções para este mecanismo de defesa. Microrganismos que são tolerantes à radiação sem possuir pigmentação são menos estudados, o que chama a atenção para os isolados do Deserto do Atacama, coletados a partir de diferentes locais e altitudes deste ambiente com diferentes fatores ambientais extremos, em janeiro de 2012. A partir destas amostras, foram isoladas cepas de leveduras não-pigmentadas. Os referidos isolados consistem de leveduras que, mesmo não possuindo pigmento, resistem a condições extremas de radiação solar. O objetivo deste trabalho é compreender o perfil de resistência à salinidade e investigar se existe uma possível influência desta característica na resistência à radiação UVC destas leveduras extremófilas não-pigmentadas isoladas do Deserto do Atacama, ampliando assim o conhecimento acerca destes organismos que possuem potencial para futuros estudos em astrobiologia. Dois isolados da pesquisa apresentaram resistência a elevadas concentrações salinas. O estudo sugere ainda uma possível interação entre a resistência à salinidade e UVC nestes dois isolados, indicando a necessidade de novas pesquisas sobre o tema.

Palavras-chave: leveduras extremófilas; astrobiologia; salinidade; radiação ultravioleta.

ABSTRACT

Extremophilic yeasts can withstand extreme physicochemical conditions, in different types of environments, being considered models for studies in astrobiology. The presence of pigments is usually an important protection mechanism against radiation, however, it is known that there are exceptions to this defense mechanism. Microorganisms that are tolerant to radiation without having pigmentation are less studied, which draws attention to isolates from the Atacama Desert, collected from different locations and altitudes of this environment with different extreme environmental factors, in January 2012. From these samples, non-pigmented yeast strains were isolated. These isolates consist of yeasts that, even without pigment, resist to extreme conditions of solar radiation. The objective of this work is to understand the salinity resistance profile and investigate whether there is a possible influence of this characteristic on the resistance to UVC radiation of these unpigmented extremophile yeasts isolated from the Atacama Desert, thus expanding the knowledge about these organisms that have potential for future studies in astrobiology. Two isolates from this research showed resistance to high saline concentrations. The study also suggests a possible interaction between salinity resistance and UVC in these two isolates, indicating the need for further research of the subject.

Keywords: Extremophile yeasts, Astrobiology, Salinity, Ultraviolet radiation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Linha do tempo com as etapas da pesquisa.....	17
Figura 2 – Crescimento dos isolados <i>N. friedmannii</i> , <i>H. wattica</i> , ATA13A e ATA13B, após 24h e 48h de cultivo sob diferentes concentrações salinas.....	21
Figura 3 – Crescimento dos isolados <i>N. friedmannii</i> , <i>H. tattica</i> , ATA13A e ATA13B, após 48h de cultivo sob diferentes concentrações salinas.....	23
Figura 4 – Sobrevivência dos isolados expostos por 30 segundos à radiação UVC e 1% de NaCl.....	25

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Latitude, longitude e altitude dos locais de coleta de cada um dos isolados.....18

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

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

KCl Cloreto de potássio

LEMEx Laboratório de Ecologia Molecular e Extremófilos

NaCl Cloreto de sódio

UFC Unidade Formadora de Colônia

UFSC Universidade Federal de Santa Catarina

UVC Radiação Ultravioleta C

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
1.1	HIPÓTESE.....	16
1.1.1	Objetivo Geral.....	16
1.1.2	Objetivos Específicos.....	16
2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
2.1	DA OBTENÇÃO E DO CULTIVO DAS LEVEDURAS.....	17
2.2	DOS EXPERIMENTOS.....	18
2.2.1	Ensaio de Salinidade.....	18
2.2.2	Ensaio de Radiação UVC.....	19
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	20
3.1	SALINIDADE.....	20
3.2	RADIAÇÃO.....	24
4	CONCLUSÃO.....	28
5	REFERÊNCIAS.....	29

1 INTRODUÇÃO

A humanidade sempre se interessou pelo desconhecido e por desbravar o espaço e os diferentes corpos celestes existentes além do Planeta Terra. A Astrobiologia, ciência que estuda a origem, evolução, distribuição e futuro da vida no universo (Blumberg, 2003), é um campo de pesquisa recente e está em constante desenvolvimento, sendo movido por pessoas motivadas a entender a existência da vida, sua origem, como se desenvolveu e evoluiu, seja na Terra ou em outros locais do Universo, e o que podemos esperar do futuro. Como definido por Cottin et al. (2017), o campo científico da astrobiologia é interdisciplinar e não está voltado apenas para a busca de vida fora do ambiente terrestre, e requer pesquisadores das mais diversas áreas para o seu estudo em diferentes aspectos, abrangendo os campos da biologia, química, física, geologia, entre outros, buscando-se assim compreender a evolução da vida também aqui na Terra.

A possibilidade do surgimento da vida em outros lugares do Universo é afetada por fatores que também podem ser observados em nosso planeta. Temperatura, pH, salinidade, pressão, radiação, metais pesados e aridez são alguns dos fatores ambientais limitantes para a vida na Terra (Cottin et al., 2017). Tratando-se de outros planetas, ainda em nosso Sistema Solar, podemos citar o nosso vizinho Marte, um ambiente até então considerado inóspito porém um forte candidato para a presença de vida, ainda que extinta, e portanto regularmente estudados por pesquisadores da Astrobiologia. Atualmente, Marte apresenta condições ambientais extremas, como grande flutuação de temperatura, altas concentrações de CO₂ na atmosfera, e altas concentrações de sais e radiação ultravioleta (UVC) (Berry et al., 2010). Indivíduos capazes de sobreviver nesses locais precisam tolerar essas condições desafiadoras.

MacElroy (1974) utilizou o termo "extremófilo" pela primeira vez em 1974 ao descrever a tolerância de determinados microrganismos que prosperam em condições ambientais extremas. Na definição de Gupta et al. (2014), microrganismos extremófilos são aqueles que prosperam em condições tão extremas que, para a maior parte dos outros seres vivos, estas seriam prejudiciais. Gupta et al. (2014) ainda explica que, muitas vezes, tais microrganismos até mesmo necessitam e exigem ambientes com estas condições extremas para prosperarem.

A maioria dos organismos extremófilos pertencem aos Domínios Bacteria e Archaea, porém alguns eucariotos extremófilos também já foram descritos, dentre eles os fungos (Seckbach & Oren, 2007; Turk et al., 2011). Conforme define Gonçalves et al. (2015), os fungos são microrganismos altamente adaptados e diversas espécies são capazes de sobreviver em ambientes hostis, o que inclui temperaturas extremas, a dessecação prolongada e também a alta irradiação solar, sendo capazes de alterar sua fisiologia e morfologia através da produção de macro e micromoléculas, o que também os torna bons candidatos para o estudo da vida em ambientes extremos e, conseqüentemente, fora do planeta Terra.

Da mesma forma, os microrganismos halófilos também podem ser considerados promissores no estudo do potencial de encontrar vida em Marte, já que os halófilos terrestres podem ser considerados análogos aos que o ambiente de Marte pode um dia já ter apresentado (Bryanskaya et al., 2019). Halófilos são microrganismos que habitam ambientes hipersalinos, suportam essa condição extrema e podem ser classificados de acordo com sua necessidade de sal e padrão de crescimento (Irshad et al., 2014). A sobrevivência de microrganismos em condições hipersalinas requer adaptações celulares e enzimáticas especializadas para preservar o equilíbrio osmótico com o meio ambiente (Edbeib et al., 2016). Segundo Cottin et al. (2017), existem muitos ambientes no planeta Terra que costumam combinar várias características extremas, o que define os organismos que habitam esses locais como "poliextremófilos".

Alguns ambientes terrestres são análogos a ambientes extraterrestres — ou seja, apresentam similaridades quanto a suas características geológicas e/ou físico-químicas. O Deserto do Atacama é um destes, possuindo características similares ao ambiente encontrado em Marte (Navarro-Gonzalez, 2003). O local também apresenta condições extremas, com baixa disponibilidade de água, alta incidência de radiação ultravioleta UV e grande variação de temperatura diária (Pulschen et. al, 2015).

Segundo Bull et al. (2016), o que torna o Deserto do Atacama tão único é a sua incrível diversidade de nichos ecológicos, sua geologia e geoquímica, sua elevação e topografia e a intensidade da radiação. Na presente pesquisa, o objeto de estudo são leveduras não-pigmentadas isoladas do Deserto do Atacama. Sendo a pigmentação um reconhecido mecanismo de proteção celular contra a radiação UV, como demonstra Jacobs et al. (2004),

chama atenção nestes isolados o fato destes não possuírem pigmentação, o que despertou interesse pelo estudo.

A resistência desses microrganismos em viver em condições extremas os torna candidatos interessantes para estudos no campo da astrobiologia, possibilitando que sejam organismos-modelo para sobreviver em ambientes extraterrestres hostis (Pulschen et al., 2015). Diante do exposto, é possível indagar-se sobre a existência de uma potencial halofilia nas leveduras radioresistentes não-pigmentadas isoladas do Deserto do Atacama. Com esta pesquisa, busca-se compreender o perfil de salinidade dessas leveduras extremófilas e assim entender qual o perfil ótimo de salinidade, além de averiguar uma possível influência da salinidade sobre a resistência a radiação UVC nestas leveduras, objetivando-se compreender melhor sua fisiologia como microrganismos extremos e sua estratégia de sobrevivência.

A presente pesquisa justifica-se portanto por ainda não haver relatos sobre o perfil de salinidade destas leveduras, tampouco a influência que esta característica pode ter na resistência à radiação encontrada nestes microrganismos, como aborda a recente pesquisa elaborada por Cardoso (2022, em fase de elaboração) .

Sendo assim, o objetivo deste projeto é questionar-se a respeito destes parâmetros e realizar os experimentos e análises necessários para esta caracterização, possibilitando assim uma maior compreensão acerca das características desses intrigantes microrganismos e desta forma contribuir com a comunidade científica viabilizando que os resultados sejam posteriormente utilizados em futuras pesquisas no fascinante campo da astrobiologia.

1.1 HIPÓTESE

As leveduras radioresistentes não-pigmentadas isoladas do Deserto do Atacama apresentam resistência também para variações de salinidade, sendo portanto organismos com potencial para estudos em astrobiologia.

1.1.1 Objetivo Geral

Compreender o perfil de salinidade e resistência à radiação UVC em leveduras extremófilas não-pigmentadas isoladas do Deserto do Atacama.

1.1.2 Objetivos Específicos

O estudo visou responder especificamente às seguintes perguntas:

- a) Qual a salinidade ótima para o crescimento de cada uma das leveduras isoladas?
- b) Existe alguma interação entre as diferentes salinidades e a resistência à radiação UVC nas leveduras isoladas?
- c) Alguma das leveduras isoladas apresenta resistência à salinidade e radiação UVC com potencial para aplicação em estudos de astrobiologia?

2 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo, inicialmente, foi de pesquisa exploratória, com levantamento bibliográfico. Posteriormente, foi realizada a pesquisa experimental e a análise dos resultados obtidos, partindo-se dos objetivos e premissas levantadas, buscando-se assim a constatação da hipótese, como forma de estudo e ampliação de dados sobre o tema.

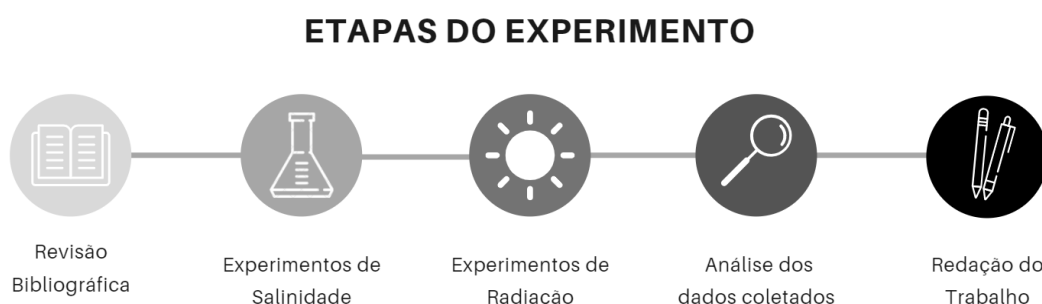


Figura 1: Linha do tempo com as etapas da pesquisa.

2.1 DA OBTENÇÃO E DO CULTIVO DAS LEVEDURAS

Os isolados de leveduras *Naganishia friedmannii* e *Holtermanniella wattica* utilizadas nesta pesquisa foram coletadas em janeiro de 2012, em pontos diversos do Deserto do Atacama, conforme a Tabela 1, por Pulschen et al. (2015), e cedidas pelo professor Fábio Rodrigues e pela pesquisadora Ana Carolina de Carvalho, do ASTROLAB (Laboratório de Astrobiologia, pertencente ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo - IQ/USP).

Atualmente, os isolados estão mantidos em *freezers* com temperatura de -20°C no Laboratório de Ecologia Molecular e Extremófilos (LEMEx) da Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC.

Para este estudo, serão realizados experimentos estruturados em laboratório, iniciando-se com a preparação de meio de cultura. O cultivo das leveduras se dará em meio 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), em temperatura de 20°C .

Isolado	Latitude (°)	Longitude (°)	Altitude
ATA13A	-22,716945	-67,923690	5047
ATA13B			
<i>N. friedmanni</i>	-22,706917	-67,996050	3981
<i>H. wattica</i>			

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

2.2 DOS EXPERIMENTOS

Durante o desenvolvimento desta pesquisa, foram realizados experimentos de crescimento sob diferentes concentrações salinas e de sobrevivência após exposição à radiação UVC, para que posteriormente fosse possível a análise dos dados obtidos. Os experimentos foram realizados nos Laboratórios do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da UFSC.

2.2.1 Ensaio de Salinidade

Para este experimento, as leveduras foram cultivadas em meio de cultura líquido YM, sob agitação constante de 150 rpm e temperatura de 20 °C até atingirem a OD595 de 0,8~1,0. Então, 30 µL foram repicados em 3 mL de meio líquido, configurando este o cultivo inicial (OD = 0) para os ensaios de salinidade. As amostras foram cultivadas, em triplicata, em meio YM líquido sob concentrações crescentes de cloreto de sódio, especificamente, 1%, 2%, 3%, 4% e 5% de NaCl, durante 48 horas. Os isolados cultivados em meio líquido YM sem acréscimo de cloreto de sódio foram considerados o controle experimental.

Após 24 e 48 horas de cultivo em temperatura de 20 °C sob agitação constante, alíquotas de 250 µL foram retiradas de cada tubo de ensaio para registro da OD595, o que

permitiu o cálculo do crescimento de cada uma das leveduras testadas em comparação aos seus respectivos controles.

2.2.2 Ensaio de Radiação UVC

Conforme o protocolo realizado por Pulschen et al. (2015), as leveduras foram cultivadas em meio líquido YM sob agitação constante e em temperatura de 20°C, até atingirem a OD₅₉₅ de 0,8~1,0. Foram então feitas diluições seriadas, de 10⁻¹ a 10⁻⁶, e então amostras de 10 µL cada foram transferidas para placas de ágar YM, em triplicatas, as quais foram expostas à radiação UVC em temperatura ambiente, por 30 segundos.

A lâmpada utilizada para obter radiação UVC foi do tipo Philips TUV-20W (253.7 nm), posicionada em uma distância de 22 centímetros das placas. Como controle, foram utilizadas placas de cultura não expostas à radiação UVC para cada um dos isolados, e culturas da levedura radioresistente *N. friedmannii* foram utilizadas como controle positivo.

Sabe-se que a condição ideal para a realização deste experimento é utilizar o equipamento radiômetro, a fim de se calcular com maior precisão as dosagens exatas de exposição dos microrganismos à radiação. Como o laboratório da universidade utilizado para esta pesquisa não contava com este dispositivo, foram utilizadas culturas da levedura radioresistente *N. friedmannii* como controle positivo do experimento, levando-se em consideração as dosagens aplicadas no estudo feito por Pulschen et al. (2015), que foi capaz de estabelecer que a *N. friedmannii* é uma levedura resistente à radiação UVC.

A forma de avaliar a resistência das leveduras nas placas de ágar foi através do método de contagem de UFC (unidades formadoras de colônia), realizado após 48h da exposição à radiação.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O presente estudo possibilitou que fossem colhidos uma série de resultados acerca das condições extremas de salinidade e radiação suportadas pelos microrganismos utilizados na pesquisa.

Já existem trabalhos pesquisando a resistência à radiação destes isolados, porém para o nosso conhecimento não existe até o momento relatos na literatura mencionando a provável resistência à salinidade, nem relacionando as duas. Este trabalho traz, portanto, informações novas ainda não pesquisadas.

3.1 SALINIDADE

O Deserto do Atacama representa um ambiente com condições únicas de biodiversidade halófila e é considerado um análogo terrestre de Marte, servindo de laboratório natural para entender como a vida evoluiu em ambientes extremos (Gajardo et. al., 2019). Osterloo et al. (2008) demonstrou que depósitos de sal foram encontrados na superfície de Marte, então microrganismos capazes de sobreviver em ambientes salinos, apresentando halotolerância, são importantes candidatos para a pesquisa astrobiológica.

John et. al. (2019) afirma que a vida em ambientes salinos requer estratégias especiais de adaptação, tanto no nível fisiológico quanto em nível molecular. Estudar a tolerância dos microrganismos à condições de salinidade traz resultados interessantes porém traz também novos questionamentos sobre os mecanismos de defesa e de reparação responsáveis pela habilidade de sobreviver a esta condição estressante.

No presente estudo, foram realizados experimentos de crescimento em salinidade com as leveduras *N. friedmannii*, *H. wattica*, e os isolados ATA13A e ATA13B. Todas as leveduras testadas cresceram quando cultivadas em meio controle (média de OD entre 1.1-1.2 após 48h). É possível notar que houve um padrão entre os resultados de 24h e 48h nos isolados analisados. Pode-se observar que a levedura isolada *N. friedmannii* apresentou a OD de 0.094, 0.038, 0.038, 0.013 e 0.036 para a salinidade de 1%, 2%, 3%, 4% e 5%, respectivamente, após 24h de tratamento, e a OD de 0.666, 0.299, 0.151, 0.052 e 0.034, após 48h, para as

salinidades de 1%, 2%, 3%, 4% e 5%, respectivamente. No tratamento controle, o crescimento apresentado por *N. friedmannii* foi de OD 0.252 em 24h e 1.125 em 48h.

Já a levedura *H. wattica* apresentou OD de 0.536, 0.094, 0.047, 0.027, 0.038, após 24h de tratamento, e OD de 1.097, 0.109, 0.066, 0.018 e 0.044, após 48h, para as salinidades de 1%, 2%, 3%, 4% e 5%, respectivamente. No tratamento controle, o crescimento apresentado por *H. wattica* foi de OD 0.718 em 24h e 1.155 em 48h.

O isolado ATA13A resistiu melhor à salinidade comparado aos isolados anteriores. Este isolado apresentou os resultados de OD de 0.78, 0.561, 0.411, 0.196 e 0.147 para as concentrações de 1%, 2%, 3%, 4% e 5%, respectivamente, após 24h de tratamento, e OD de 1.102, 0.898, 0.815, 0.755 e 0.61 para as salinidades de 1%, 2%, 3%, 4% e 5%, respectivamente, após 48h. No tratamento controle, o resultado apresentado pelo isolado ATA13A foi de OD 0.885 em 24h e 1.19 em 48h.

Por fim, o isolado ATA13B apresentou os resultados de OD de 0.713, 0.541, 0.317, 0.156 e 0.105 para as concentrações de 1%, 2%, 3%, 4% e 5%, respectivamente, após 24h de tratamento, e apresentou a OD de 1.066, 0.94, 0.862, 0.667 e 0.566 para as salinidades de 1%, 2%, 3%, 4% e 5%, respectivamente, após 48h. No tratamento controle, o resultado apresentado pelo isolado ATA13B foi de OD 0.755 em 24h e 1.126 em 48h.

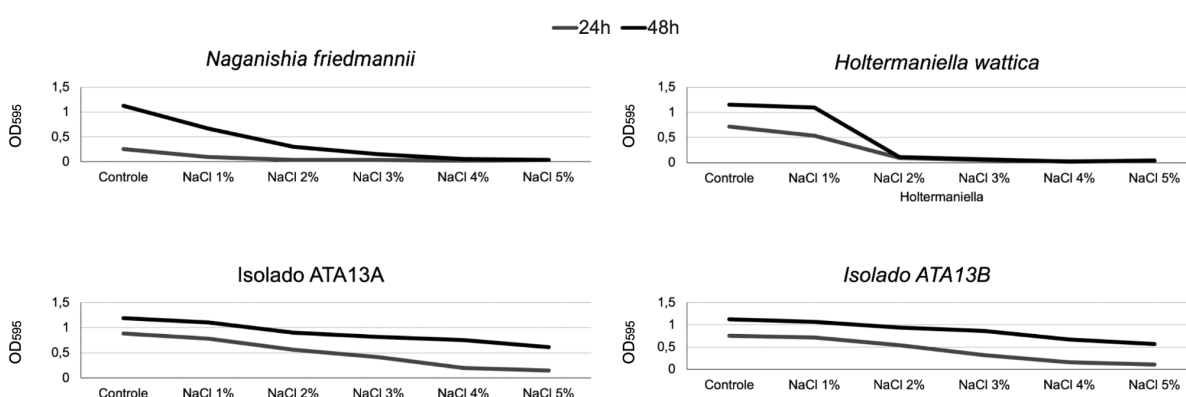


Figura 2: Crescimento dos isolados *N. friedmannii*, *H. wattica*, ATA13A e ATA13B, após 24h e 48h de cultivo sob diferentes concentrações salinas.

Podemos observar neste primeiro momento que os isolados apresentaram diferentes níveis de resistência à salinidade e isso ficou demonstrado no crescimento em 24h e 48h. O isolado de *H. wattica* apresentou OD de 1.097 em concentração de 1% de NaCl em 48h, mas ao aumentar a concentração de salinidade sua OD bruscamente diminuiu, com uma redução na taxa de sobrevivência bastante considerável, enquanto os isolados ATA13A e ATA13B apresentaram um valor mais constante durante todo o tratamento.

Em média, pode-se observar que a levedura isolada ATA13B apresentou a maior resistência a praticamente todos os tratamentos (OD 0.97, 0.80, 0.75 e 0.54, já descontando 0,08 de branco, para salinidade 2%, 3%, 4% e 5%, respectivamente), com exceção da salinidade 1%, em que apresentou a segunda maior resistência no grupo testado, com OD de 0.98, o que a configura como halotolerante (BUZZINI et. al, 2018).

O isolado ATA13A também apresentou ótimos resultados médios como halotolerante, com OD de 1.02, 0.91, 0.75, 0.72 e 0.52 para as concentrações de 1%, 2%, 3%, 4% e 5%, respectivamente, sendo esta a maior resistência do grupo testado na concentração de 1% de NaCl.

Já a *H. wattica* mostrou um bom crescimento médio na concentração de 1% de salinidade, com OD de 0.88, mas a partir disso sua resistência decaiu consideravelmente, para 0.16, 0.09, 0.07 e 0.09 em salinidade 2%, 3%, 4% e 5%, respectivamente.

A levedura *N. friedmannii* apresentou a menor resistência à salinidade em todos os tratamentos realizados, com OD de 0.07, 0.05, 0.09, 0.06 e 0.06 para as concentrações de 1%, 2%, 3%, 4% e 5% de NaCl, respectivamente.

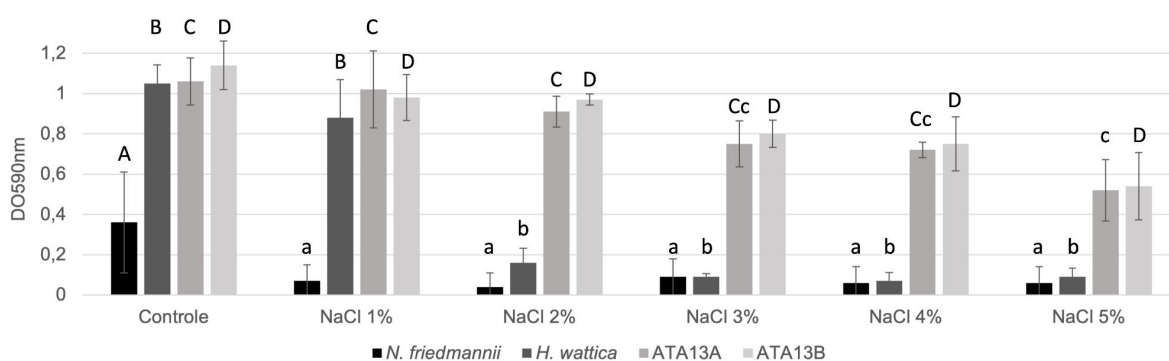


Figura 3: Crescimento dos isolados *N. friedmannii*, *H. wattica*, ATA13A e ATA13B, após 48h de cultivo sob diferentes concentrações salinas.

A partir deste experimento, nos chama a atenção o fato de que, recentemente, foi realizada a pesquisa de Cardoso (2022, em fase de elaboração), onde se sugere a possibilidade de que as leveduras isoladas pertençam a espécies filogeneticamente próximas ao gênero *Naganishia*.

É interessante observar que, mesmo tratando-se de microrganismos possivelmente próximos, o isolado ATA13A apresentou uma significativa resistência à salinidade, assim como a ATA13B, diminuindo seu crescimento de forma gradual até a concentração de 5% de NaCl, enquadrando-se como microrganismos halotolerantes (BUZZINI et. al, 2018), enquanto o isolado de *N. friedmannii* e a *H. wattica* não conseguiram prosperar em ambientes com alta concentração salina.

Os mecanismos de resistência dos isolados ATA13A e ATA13B podem estar relacionados com diversas estratégias capazes de torná-las mais resistentes. Conforme observado por Gunde-Cimerman et al. (2018), existem diferentes processos para se fornecer equilíbrio osmótico do citoplasma das células com a salinidade do meio e uma opção utilizada por muitos microrganismos halofílicos é acumular sais, principalmente cloreto de potássio (KCl), e adaptar toda a maquinaria intracelular para funcionar na presença de concentrações molares de sais. Gunde-Cimerman et al. (2018) complementa que uma opção mais difundida de estratégia para se fornecer equilíbrio osmótico é a síntese ou acúmulo de osmóticos orgânicos, os chamados solutos compatíveis, e que estes poderiam ser responsáveis por esta resistência em um ambiente salino. Solutos compatíveis são pequenas moléculas que atuam

como osmólitos e ajudam os organismos a sobreviver ao estresse osmótico extremo (Lang, 2007, apud Wani et al., 2013).

Muitos compostos orgânicos pertencentes a diferentes classes demonstraram servir como solutos compatíveis, em diferentes grupos de microrganismos, incluindo polióis, açúcares, aminoácidos, betaínas (Gunde-Cimerman et al., 2018) e se acumulam nas células equilibrando a diferença osmótica entre os arredores da célula e o citosol (Wani et al., 2013). O estudo de Kogej et al. (2007) verificou que o principal soluto compatível da levedura *Hortaea werneckii* é o glicerol. Ainda que pesquisando uma levedura pigmentada, este estudo demonstra que este osmólito pode ser uma das características que ajuda este microrganismo a tolerar uma ampla gama de concentrações de sal, o que também pode sugerir que o mecanismo utilizado pelos isolados ATA13A e ATA13B esteja relacionado a estratégias de equilíbrio osmótico. A pesquisa de Kogej traz ainda a possibilidade de que em certos microrganismos as micosporinas, ou aminoácidos tipo micosporina, também podem desempenhar um papel como solutos compatíveis complementares (Kogej et al., 2007).

3.2 RADIAÇÃO

Conforme afirma Paulino-Lima et al. (2013), o Deserto do Atacama abriga espécies altamente tolerantes aos raios UV, o que confirma este ambiente como análogo a Marte quanto a essa condição. Para o presente estudo foram realizados experimentos para medir a resistência à exposição à radiação UVC dos isolados ATA13A, ATA13B e *H. wattica*.

Neste trabalho o controle positivo foi feito com a *N. friedmannii* como referência, com base nas dosagens encontradas por Pulschen et al. (2015) em sua pesquisa, e conforme as informações trazidas pelo estudo de Cardoso (2022, em fase de elaboração), que estabeleceu o protocolo utilizado. Porém, a levedura *N. friedmannii* não foi utilizada neste experimento porque não resistiu nem mesmo ao acréscimo de 1% de salinidade no experimento anterior, portanto os resultados obtidos foram referentes aos demais isolados utilizados na pesquisa.

Quando exposta à radiação em solução controle, com 0% de sal, a levedura *H. wattica* apresentou 70% de sobrevivência, em relação ao seu controle. Após crescimento em solução com 1% de NaCl, as amostras de *H. wattica* expostas à UVC apresentaram 36% de

sobrevivência. Em solução controle o isolado ATA13A apresentou 21% de sobrevivência, e em solução com 1% de NaCl apresentou 19% de sobrevivência. Em solução controle o isolado ATA13B apresentou 24% de sobrevivência, e em solução salina apresentou 26% de sobrevivência.

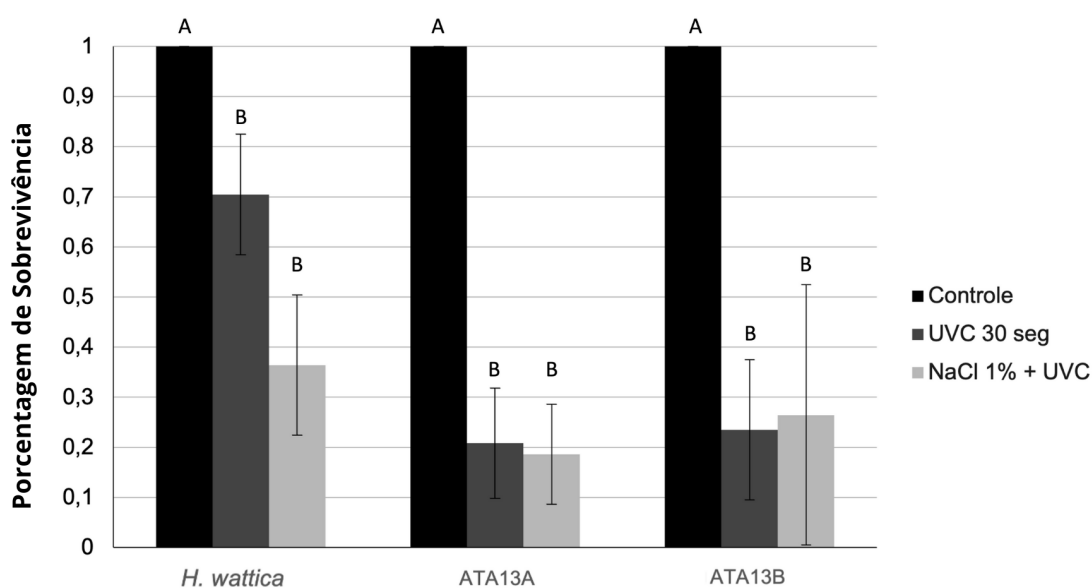


Figura 4. Sobrevivência dos isolados expostos por 30 segundos à radiação UVC e 1% de NaCl.

Percebe-se que a *H. wattica* apresenta uma redução importante ao ser exposta à radiação UVC em uma solução de 1% de NaCl, o que demonstra que, apesar de ainda existir crescimento do microrganismo, este pode estar se desenvolvendo com maior dificuldade, o que sugere que o estresse provocado pela solução salina reduziu sua capacidade de sobrevivência.

Já o isolado ATA13A manteve sua sobrevivência bastante similar entre as duas condições, e o isolado ATA13B cresceu com uma média também muito semelhante, porém levemente elevada quando exposta à radiação UVC em solução com 1% de NaCl.

O que nos causa curiosidade após analisar os resultados da presente pesquisa é o fato de que os isolados ATA13A e ATA13B utilizadas na pesquisa foram isoladas de um ambiente

com altitude maior do que a *N. friedmannii*, conforme exposto na Tabela 1, sendo os pontos de coletas a 5047 e 3981 metros de altitude, respectivamente.

A partir disso, podemos indagar então os motivos pelos quais os isolados ATA13A e ATA13B apresentam esta variação de resistência à salinidade e UVC. Poderiam elas estarem sendo selecionadas pelo ambiente em que vivem, em uma maior altitude, e com isso apresentando também resistência à salinidade? Wilks et al (2019) nos traz que a tolerância ao alto teor de sal pode estar relacionada com os mesmos mecanismos que também levam à tolerância a outras condições ambientais extremas, e que essa sobrevivência pode envolver os mesmos mecanismos de reparo do DNA.

O presente estudo mostra, pela primeira vez, uma possível relação entre a resistência à salinidade e radiação destes isolados do Deserto do Atacama. Schmidt et al (2018) esclarece que o bioma de alta altitude da região do Atacama fornece um ótimo ambiente de experimento para estudar a vida microbiana em um cenário extremo.

Sabemos que o Deserto do Atacama é considerado um ambiente poliextremo, onde a radiação solar, a salinidade e a aridez são extremamente altas e ocorrem simultaneamente (Cortés-Albayay et al., 2019). De que forma então o mecanismo de defesa destas características poderiam estar relacionados, favorecendo a reparação, e assim dando uma maior vantagem de sobrevivência aos isolados ATA13A e ATA13B, que se mostraram mais resistentes neste presente estudo? Considerando que se tratam de isolados com ausência de pigmentos fotoprotetores, o que estaria influenciando na estratégia de resistência à radiação deste microrganismo e, talvez, impactando também em sua resistência à salinidade? Inúmeros questionamentos surgem a partir dos resultados trazidos por esta pesquisa.

Podemos supor que a resistência pode estar relacionada ao tipo de solo onde o isolado foi coletado. Schmidt et al. (2018) nos mostra que os ambientes de alta altitude do Atacama divergem de outros ambientes extremos em termos de porcentagem de nitrogênio e pH. O estudo realizado por Pulschen et al. (2015) trouxe importantes dados a respeito do solo onde estes isolados foram coletados, demonstrando que o pH é de 4.25 na altitude de 5047 metros (onde foram coletados os isolados ATA13A e ATA13B) e de 5.36 na altitude de 3981 metros (local onde foram coletados os isolados de *N. friedmannii* e *H. wattica*), além de uma maior concentração de potássio e ferro no solo de maior altitude. Com essas informações

podemos indagar se o ambiente em pH mais ácido poderia ter beneficiado a sobrevivência dos isolados ATA13A e ATA13B em relação à *N. friedmannii*.

Outra possibilidade é que, pela altitude maior, o isolado ATA13A tenha sido selecionado em um ambiente mais hostil, com maior exposição à radiação UV, e por isso se tornou mais resistente a essa condição extrema. A literatura mostra entendimentos neste sentido. Por exemplo, o trabalho de Rao et al. (2016) concluiu que a exposição à radiação UV relativamente alta no Tibete contribuiu para a alta diversidade de bactérias do solo tolerantes à radiação e complementou ainda que a forte associação entre as vias de tolerância à dessecação e tolerância à radiação sugerem que o ambiente árido também pode ter selecionado a favor de táxons tolerantes à radiação. Paulino-Lima et al. (2013) já havia observado em seu estudo com bactérias que a maior parte dos sobreviventes às doses mais altas de UV de sua pesquisa estavam crescendo em um substrato com grande variedade de sais e oligoelementos, e sugeriu que estas características pudessem então ser requeridas pelos microrganismos resistentes à UV.

Libkind et al. (2009) observou que, entre as estratégias conhecidas para a minimização de danos induzidos por radiação UV, estão a síntese de antioxidantes e compostos de proteção solar UV, como carotenóides e micosporinas. Micosporinas são, como bem define Andreguetti (2010), “substâncias pertencentes a um grupo de compostos naturalmente encontrados em algas e fungos, que são utilizadas por estes organismos como mecanismo de defesa. São potentes bloqueadores químicos de radiação ultravioleta (UV)”. Uma possibilidade que pode ser sugerida é que a síntese de micosporinas seja uma das estratégias utilizadas por estas leveduras, o que carece de mais pesquisas a respeito do tema para que se demonstre experimentalmente a presença e o papel fotoprotetor deste metabólito nestes microrganismos especificamente.

O presente trabalho tinha como principal objetivo compreender o perfil de salinidade e sua potencial correlação com a resistência à radiação UVC em leveduras extremófilas não-pigmentadas isoladas do Deserto do Atacama. Os resultados analisados e considerados respondem portanto à hipótese formulada, no caso, duas das leveduras estudadas (ATA13A e ATA13B) apresentam resistência à elevadas concentrações salinas. Além disso, o trabalho demonstra uma potencial relação de halofilia e resistência à radiação UVC nas leveduras não-pigmentadas ATA13A e ATA13B isoladas do Deserto do Atacama. Com os resultados

respondeu-se também se existe salinidade ótima para o crescimento de cada uma das leveduras isoladas utilizadas no estudo. Verificou-se, ainda, que existe um certo padrão entre a resistência à radiação UVC e a salinidade ótima, e que algumas destas leveduras isoladas apresentam tolerâncias a fatores extremos interessantes para a aplicação em estudos de astrobiologia.

A presente pesquisa tratou-se de uma etapa preliminar para novos estudos e não teve a pretensão de esgotar o tema pois entende-se que, com este estudo, será possível dar embasamento para futuros pesquisadores que se interessem pela temática de extremófilos e astrobiologia, tornando possível traçar um perfil mais completo a respeito destas leveduras e assim ter uma maior exatidão nos dados e características destes isolados.

4 CONCLUSÃO

A realização dos experimentos desta pesquisa possibilitou obter diferentes respostas. Com os resultados da pesquisa foi possível entender o perfil diferenciado de resistência à radiação ultravioleta C e salinidade das leveduras não-pigmentadas isoladas do Deserto do Atacama. Assim, conclui-se que os isolados ATA13A e ATA13B apresentam maior resistência à elevadas concentrações salinas, quando comparadas às leveduras previamente identificadas *N. friedmanni* e *H. wattica*, sugerindo a presença de mecanismos adicionais de resistência à este fator extremo nos dois novos isolados. Além disso, a pesquisa sugere uma potencial interação entre a resistência à elevadas concentrações salinas e UVC nos dois isolados, indicando a necessidade de maiores estudos para compreensão dos mecanismos por trás desta resistência. A partir disso, é possível que estes resultados sejam comparados e utilizados em experimentos futuros, já que até o momento pouco se conhece sobre estes microrganismos.

A contribuição que esta pesquisa traz para a comunidade científica e acadêmica é a de demonstrar o perfil de salinidade e resistência à radiação UVC de leveduras não-pigmentadas isoladas do Deserto do Atacama e com isso abrir caminho para que novos estudos sobre o tema e sobre estes microrganismos sejam feitos, a fim de se identificar mais informações acerca da fisiologia que permite a resistência destas espécies e sua aplicação como modelos para a astrobiologia.

REFERÊNCIAS

- ANDREGUETTI, D. X. **Análogos de micosporinas: síntese e avaliação de parâmetros farmacológicos e toxicológicos.** (2010). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo. <<https://doi.org/10.11606/D.9.2011.tde-21012011-163625>>
- BERRY, B. J.; JENKINS, D. G.; SCHUERGER, A. C. **Effects of simulated Mars conditions on the survival and growth of *Escherichia coli* and *Serratia liquefaciens*.** (2010) Applied and Environmental Microbiology, p. 2377–2386. <<http://dx.doi.org/10.1128/AEM.02147-09>>.
- BLUMBERG, BS. 2003. **The Nasa astrobiology institute: early history and organization.** Astrobiology 3(3): 463-470.
- BULL, A. T., ASENJO, J. A., GOODFELLOW, M., & GÓMEZ-SILVA, B. (2016). **The Atacama Desert: technical resources and the growing importance of novel microbial diversity.** Annual Review of Microbiology. <<https://doi.org/10.1146/annurev-micro-102215-095236>>
- BUZZINI, P.; TURCHETTI, B.; YURKOV, A. (2018). **Extremophilic yeasts: the toughest yeasts around?** Yeast, 35(8), 487–497. <<https://doi.org/10.1002/yea.3314>>
- BRYANSKAYA, AV; BEREZHNOY, AA; ROZANOV, AS; SERDYUKOV, DS; MALUP, TK; PELTEK, SE. (2019) **Survival of halophiles of Altai lakes under extreme environmental conditions: implications for the search for martian life.** International Journal of Astrobiology 1–15. <<https://doi.org/10.1017/S1473550419000077>>
- CARDOSO, F. **Determinação da resistência à radiação ultravioleta C de leveduras não-pigmentadas do Deserto do Atacama.** (2022) Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia. Universidade Federal de Santa Catarina. (em fase de elaboração)
- CORTÉS-ALBAYAY, C.; SILBER, J.; IMHOFF, J. F.; ASENJO, J.A.; ANDREWS, B.; NOUIOUI, I; DORADOR, C. (2019) **The polyextreme ecosystem, Salar de Huasco at the chilean altiplano of the Atacama Desert houses diverse *streptomyces spp.* with promising pharmaceutical potentials.** Diversity, 11, 69. <<https://doi.org/10.3390/d11050069>>
- COTTIN, H., KOTLER, J.M., BARTIK, K. et al. **Astrobiology and the possibility of life on Earth and elsewhere....** Space Sci Rev 209, 1–42 (2017). <<https://doi.org/10.1007/s11214-015-0196-1>>
- DOBZHANSKY, T. (1973). **Nothing in Biology Makes Sense except in the Light of Evolution.** The American Biology Teacher, 35(3), 125–129. <<https://doi.org/10.2307/4444260>>
- EDBEIB, M. F., WAHAB, R. A., & HUYOP, F. (2016). **Halophiles: biology, adaptation, and their role in decontamination of hypersaline environments.** World Journal of

Microbiology and Biotechnology, 32(8). <<https://doi.org/10.1007/s11274-016-2081-9>>

GAJARDO, G. , REDÓN, S. **Hypersaline lagoons from Chile, the southern edge of the world.** (2019) Lagoon Environments Around the World - A Scientific Perspective. Manning, A. J. London: IntechOpen. <<https://doi.org/10.5772/intechopen.88438>>

GONÇALVES, V.; CANTRELL, C.; WEDGE, D.; FERREIRA, M.; SOARES, M. A.; JACOB, M.; OLIVEIRA, F.; GALANTE, D.; RODRIGUES, F.; ALVES, T.; ZANI, C.; SALES, P.; MURTA, S.; ROMANHA, A.; BARBOSA, E.; KROON, E.; DE OLIVEIRA, J.; GOMEZ-SILVA, B.; GALETOVIC, A.; ROSA, L. (2015). **Fungi associated with rocks of the Atacama Desert: taxonomy, distribution, diversity, ecology and bioprospection for bioactive compounds.** Environmental Microbiology. 18. <<https://doi.org/10.1111/1462-2920.13005>>

GUNDE-CIMERMAN, N.; PLEMENINAS, A.; OREN, A. **Strategies of adaptation of microorganisms of the three domains of life to high salt concentrations.** (2018) FEMS Microbiology Reviews, Volume 42, Issue 3, May, Pages 353–375, <<https://doi.org/10.1093/femsre/fuy009>>

GUPTA, G. N., SRIVASTAVA, S., KHARE, S. K., & PRAKASH, V. (2014). **Extremophiles: an overview of microorganism from extreme environment.** International Journal of Agriculture, Environment and Biotechnology. 371-380. <https://doi.org/10.5958/2230-732x.2014.00258.7>

IRSHAD, A.; Ahmad, I.; KIM, S. **Culturable diversity of halophilic bacteria in foreshore soils.** (2014) Brazilian Journal of Microbiology v. 45, n. 2, pp. 563-572. <<https://doi.org/10.1590/S1517-83822014005000050>>

JACOBS, J. L., CARROLL, T. L., & SUNDIN, G. W. **The role of pigmentation, ultraviolet radiation tolerance, and leaf colonization strategies in the epiphytic survival of phyllosphere bacteria.** (2004) Microbial Ecology, 49(1), 104–113. <<https://doi.org/10.1007/s00248-003-1061-4>>

JOHN, J.; SIVA, V.; RICHA, K.; ARYA, A.; KUMAR, A. **Life in high salt concentrations with changing environmental conditions: insights from genomic and phenotypic analysis of *salinivibrio* sp.** (2019) Microorganisms, 7, 577. <<https://doi.org/10.3390/microorganisms7110577>>

KOGEJ, T.; STEIN, M.; VOLKMANN, M.; GORBUSHINA, A. A.; GALINSKI, E. A. e GUNDE-CIMERMAN, N. **Osmotic adaptation of the halophilic fungus *Hortaea werneckii*: role of osmolytes and melanization.** (2007) Microbiology, 153(12), 4261–4273. <<https://doi.org/10.1099/mic.0.2007/010751-0>>

LIBKIND, D.; MOLINÉ, M.; SAMPAIO, J. P.; VAN BROOCK, M. **Yeasts from high-altitude lakes: influence of UV radiation.** (2009) FEMS Microbiology Ecology, Volume 69, 3 de Agosto, páginas 353–362, <<https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2009.00728.x>>

MACELROY, R. D. **Some comments on the evolution of extremophiles.** (1974).

Biosystems, 6(1), 74–75. <[https://doi.org/10.1016/0303-2647\(74\)90026-4](https://doi.org/10.1016/0303-2647(74)90026-4)>

NAVARRO-GONZALEZ, R. (2003). **Mars-Like Soils in the Atacama Desert, Chile, and the Dry Limit of Microbial Life.** *Science*, 302(5647), 1018–1021. <<https://doi.org/10.1126/science.1089143>>.

OSTERLOO, M. M.; HAMILTON, V. E.; BANDFIELD, J. L.; GLOTCH, T. D.; BALDRIDGE, A. M.; CHRISTENSEN, P. R.; et al. **Chloride-bearing materials in the southern highlands of Mars.** (2008) *Science*. Vol 319, pag. 1651-1654 <<https://doi.org/10.1126/science.1150690>>

PAULINO-LIMA, I. G.; AZUA-BUSTOS, A.; VICUÑA, R.; GONZÁLEZ-SILVA, C.; SALAS, L.; TEIXEIRA, L.; ROSADO, A.; LEITAO, A. A.; LAGE, C. **Isolation of UVC-tolerant bacteria from the hyperarid Atacama Desert, Chile.** (2013) *Microb Ecol.* Feb;65(2):325-35. <<https://doi.org/10.1007/s00248-012-0121-z>>

PULSCHEN, A.; RODRIGUES, F.; RUBENS, T.D.; ARAUJO, G.; SANTIAGO, I.; PAULINO-LIMA, I.; ROSA, C, KATO, M.; PELLIZARI, V.; GALANTE, D. **UV-resistant yeasts isolated from a high-altitude volcanic area on the Atacama Desert as eukaryotic models for astrobiology.** (2015). *MicrobiologyOpen*; 4(4): 574– 588. <<https://doi.org/10.1002/mbo3.262>>

RAO, S.; CHAN, O. W.; LACAP-BUGLER, D.C.; POINTING, S. B. . **Radiation-tolerant bacteria isolated from high altitude soil in Tibet.** (2016) *Indian journal of microbiology*, 56(4), 508–512. <<https://doi.org/10.1007/s12088-016-0604-6>>

SECKBACH, J; OREN, A. 2007. **Algae and cyanobacteria in extreme environments.** Springer 3-25.

SCHMIDT, S.K., GENDRON, E.M.S., VINCENT, K. et al. **Life at extreme elevations on Atacama volcanoes: the closest thing to Mars on Earth?** (2018) *Antonie van Leeuwenhoek* 111, 1389–1401. <<https://doi.org/10.1007/s10482-018-1066-0>>

TURK, M.; PLEMENITAS, A; GUNDE-CIMERMAN, N. 2011. **Extremophilic yeasts: plasma-membrane fluidity as determinant of stress tolerance.** *Fungal Biol* 115:950-958.

WANI, S. H.; SINGH, N. B.; HARIBHUSHAN, A. e MIR, J. I. **Compatible solute engineering in plants for abiotic stress tolerance - role of glycine betaine.** (2013) *Current genomics*, 14(3), 157–165. <<https://doi.org/10.2174/1389202911314030001>>

WILKS, JM; CHEN, F.; BC, Clark; SCHNEEGURT, MA. **Bacterial growth in saturated and eutectic solutions of magnesium sulphate and potassium chlorate with relevance to Mars and the ocean worlds.** (2019). *International Journal of Astrobiology* 1–8. <<https://doi.org/10.1017/S1473550418000502>>