



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

LUIZ OTÁVIO FAGUNDES DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA AO CONGELAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE
BACTÉRIAS DO SOLO DA GELEIRA COLLINS, ANTÁRTICA.**

Florianópolis, 2023.

LUIZ OTÁVIO FAGUNDES DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA AO CONGELAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE
BACTÉRIAS DO SOLO DA GELEIRA COLLINS, ANTÁRTICA.**

Trabalho de Conclusão de Curso submetido ao curso de Ciências Biológicas do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Licenciado(a) em Ciências Biológicas.

Orientador(a): MSc Joana Camila Lopes

Florianópolis, 2023.

Santos, Luiz Otávio Fagundes dos
AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA AO CONGELAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE
BACTÉRIAS DO SOLO DA GELEIRA COLLINS, ANTÁRTICA. / Luiz Otávio
Fagundes dos Santos ; orientadora, Joana Camila Lopes, 2023.
66 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade
Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas,
Graduação em Ciências Biológicas, Florianópolis, 2023.

Inclui referências.

1. Ciências Biológicas. 2. Microbiologia . 3. Biologia
molecular . 4. Microrganismos da Antártica . 5. Biotecnologia .
I. Lopes, Joana Camila . II. Universidade Federal de Santa
Catarina. Graduação em Ciências Biológicas. III. Título.

LUIZ OTÁVIO FAGUNDES DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA AO CONGELAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE
BACTÉRIAS DO SOLO DA GELEIRA COLLINS, ANTÁRTICA.**

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

Local: Florianópolis, 31 de outubro de 2023

Profa . Dra. Daniela Cristina de Toni
Coordenação do Curso

Banca examinadora

Mestra Joana Camila Lopes
Orientadora
MIP/CCB/UFSC

Prof. Dr. Admir José Giachini
Avaliador Titular
MIP/CCB/UFSC

Eng. Dr. Ednilson Meyer
Avaliador Titular
REMA/CTC/UFSC

Mestra Camila Tomazini Kinasz
Avaliadora Suplente
MIP/CCB/UFSC

Dedico este trabalho a minha mãe Sandra e minha companheira
Leti, vocês são minhas grandes motivações.

“Nada como procurar quando se quer achar alguma coisa. Quando se procura geralmente se encontra alguma coisa, sem dúvida, mas nem sempre é o que estávamos procurando”

- J. R. R. Tolkien

RESUMO

Os microrganismos na Antártica estão sujeitos a frequentes ciclos de congelamento e descongelamento. Existem microrganismos capazes de sobreviver a esses ciclos, conferindo resistência a essas condições. O objetivo deste estudo foi isolar, identificar molecularmente e caracterizar a resistência ao congelamento de bactérias da Antártica. Amostras de solo foram coletadas a 0, 25 e 50 metros à frente da Geleira Collins, localizada na Ilha Rei George, Península Antártica. O isolamento consistiu na suspensão dos solos e inoculação em meio R2A a 6 °C até o surgimento de colônias. A seleção dos isolados foi baseada em sua morfologia. Foram isoladas 15 bactérias. Em relação a caracterização morfológica, pelo método de coloração de Gram, 11 bactérias foram caracterizadas como Gram-positivas e 4 como Gram-negativas. Além disso, as bactérias foram classificadas quanto a pigmentação das colônias, onde 7 isolados apresentaram coloração amarela, 6 branca e 3 laranja. A análise de BOX-PCR revelou 4 filotipos distintos entre os isolados, demonstrando diversidade de bactérias isoladas. Após a BOX-PCR, foi realizada a identificação molecular dos isolados pela região RNAr 16S, com 14 isolados bacterianos, classificados nos gêneros *Arthrobacter*, *Psychrobacter*, *Leifsonia*, *Brevundimonas*, *Microterricola* e *Rhodococcus*. Foi realizada uma pré-seleção de isolados para resistência ao congelamento. Para isso, os isolados foram submetidos a 1 ciclo de congelamento de 24 horas a -6 °C e descongelamento a 25 °C por 30 minutos. A contagem de unidades formadoras de colônia foi realizada a partir da comparação de diluições seriadas até 10⁻⁶, antes e depois do congelamento, apresentando a taxa de sobrevivência de cada isolado aos ciclos. Foram selecionadas 9 bactérias com sobrevivência igual ou acima de 50% ao congelamento. Os microrganismos pré-selecionados foram submetidos a 4 ciclos de congelamento de 24 horas a -18 °C seguido pelo descongelamento a 25 °C por 30 minutos. Os resultados mostraram porcentagens de sobrevivência alta após o primeiro ciclo para os isolados *Microterricola* sp. PSC02 (89,91%), *Psychrobacter* sp. PSC25.3 (88,00%), *Leifsonia* sp. PSC503 (82,58%) e *Brevundimonas* sp. PSC50.4 (81,37%). Os demais apresentaram porcentagens de sobrevivência baixa após o primeiro ciclo para PSC50.1 (48,93%), *Leifsonia* sp. PSC01 (45,31%), *Arthrobacter* sp. PSC25.4 (44,57%), *Arthrobacter* sp. PSC50.9 (41,46%) e *Arthrobacter* sp. PSC50.5 (29,70%). O isolado *Microterricola* sp. PSC02 permaneceu com a mesma concentração de células após os 4 ciclos de congelamento. Os resultados mostraram que o terceiro ciclo é um ponto crítico para a manutenção da viabilidade celular dos microrganismos, mostrando uma baixa significativa na concentração de células bacterianas. Os resultados obtidos neste estudo demonstram que bactérias isoladas da Antártica são resistentes ao congelamento. Além disso, existe uma diversidade de gêneros resistentes e não resistentes ao congelamento, por conta de diferentes mecanismos de adaptação como pigmentos, enzimas adaptadas ao frio, fluidez da membrana plasmática e produção de substâncias crioprotetoras que incluem os exopolissacarídeos, proteínas anticongelantes (AFPs) e proteínas nucleantes de congelamento (INPs). Mais estudos precisam ser realizados para elucidar e caracterizar os mecanismos de adaptação ao frio das bactérias antárticas.

Palavras-chave: Antártica; microrganismos; gene RNAr 16S; congelamento-descongelamento.

ABSTRACT

Microorganisms in Antarctica are exposed to frequent freeze-thaw cycles. Some of them are capable of surviving these cycles, providing resistance to these conditions. The aim of this study was to isolate, molecularly identify and characterize the freeze resistance of Antarctic bacteria. Soil samples were collected 0 meters, 25 meters and 50 meters in front of Collins Glacier, located on King George Island, Antarctic Peninsula. Isolation consisted of soil suspension and inoculation in R2A medium at 6 °C until colonies appeared. The isolates selection was based on their morphology. 15 bacteria were isolated. Regarding morphological characterization, using the Gram staining method, 11 bacteria were characterized as Gram-positive and 4 as Gram-negative. Furthermore, the bacteria were classified according to the pigmentation of the colonies, where 7 isolates were yellow, 6 white and 3 orange. BOX-PCR analysis revealed 4 distinct phylotypes among the isolates, demonstrating isolated bacteria diversity. After BOX-PCR, the isolates were molecularly identified using the 16S rRNA region, with 14 bacterial isolates categorized into the genera *Arthrobacter*, *Psychrobacter*, *Leifsonia*, *Brevundimonas*, *Microterricola* and *Rhodococcus*. Pre-select of isolates on the basis of freezing resistance was conducted. In order to achieve this, the isolates underwent one cycle of freezing at -6 °C for 24 hours and thawing for 30 minutes at 25 °C. Colony-forming units were counted by comparing serial dilutions up to 10^{-6} , prior to and following freezing, demonstrating the survival rate of each isolate throughout the cycles. Nine bacteria that exhibited a 50% or higher survival rate after freezing were selected. The pre-selected microorganisms underwent four cycles of freezing at -18 °C for 24 hours and thawing for 30 minutes at 25 °C. High survival rates following the first cycle have been demonstrated by the results for *Microterricola* sp. PSC02 (89.91%), *Psychrobacter* sp. PSC25.3 (88.00%), *Leifsonia* sp. PSC503 (82.58%) and *Brevundimonas* sp. PSC50.4 (81.37%). After the first cycle, the survival rates for PSC50.1 (48.93%), *Leifsonia* sp. PSC01 (45.31%), *Arthrobacter* sp. PSC25.4 (44.57%), *Arthrobacter* sp. PSC50.9 (41.46%), and *Arthrobacter* sp. PSC50.5 (29.70%) were lower than those of the other species. After four freezing cycles, the isolated *Microterricola* sp. PSC02 cell concentration remained unchanged. The results demonstrated that the third cycle is a critical point for microorganisms, exhibiting a substantial decrease in the concentration of bacterial cells. The results obtained in this study indicate that bacteria isolated from Antarctica are resistant to freezing. Furthermore, a variety of adaptation mechanisms, such as pigments, cold-adapted enzymes, plasma membrane fluidity, and the synthesis of cryoprotective substances such as exopolysaccharides, antifreeze proteins (AFPs), and freezing nucleating proteins (INPs), have led to a diversity of resistant and non-freezing resistant genera. To clarify and better comprehend Antarctic bacteria's mechanisms for adapting to the cold, more research is required.

Keywords: Antarctica; microorganisms; 16S rRNA gene; freezing-thawing;

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Localização da Ilha Rei George, Antártica e suas áreas com cobertura e livre de cobertura de gelo mapeadas.....	17
Figura 2 – Adaptações fisiológicas comuns em bactérias psicrófilicas.....	19
Figura 3 – Pontos de coleta de solo. A: Localização da Ilha Rei George na Antártica; B: Localização da Geleira Collins; C: Localização dos pontos de coleta da Geleira Collins.....	27
Figura 4 – Isolamento e caracterização de bactérias da Geleira Collins.....	29
Figura 5 – Procedimento para identificação pelo sequenciamento do gene RNAr 16S.....	31
Figura 6 - Cultivo e padronização dos isolados para o teste de tolerância ao congelamento.....	32
Figura 7 - Teste de resistência a ciclos de congelamento.....	33
Figura 8 - Esgotamento dos isolados em meio R2A. A-PSC01; B-PSC02; C-PSC25.1; D-PSC25.2; E-PSC25.3; F-PSC25.4; G-PSC50.1; H-PSC50.2; I-PSC50.3; J-PSC50.4; K-PSC50.5; L-PSC50.6; M-PSC50.7; N-PSC50.8.....	35
Figura 9 - Coloração de Gram dos isolados. A-PSC01; B-PSC02; C-PSC25.1; D-PSC25.2; E-PSC25.3; F-PSC25.4; G-PSC50.1; H-PSC50.2; I-PSC50.3; J-PSC50.4; K-PSC50.5; L-PSC50.6; M-PSC50.7; N-PSC50.8; O-PSC50.9.....	36
Figura 10 - Dendograma dos padrões de bandas dos isolados por BOX-PCR.....	38
Figura 11 - Gêneros identificados em relação ao número de isolados.....	40
Figura 12 - Taxa de sobrevivência dos isolados após ciclo de congelamento.....	44
Figura 13 - Taxa de sobrevivência (S) dos isolados ao longo dos quatro ciclos de congelamento e descongelamento.....	46
Figura 14 - Média da concentração celular (UFC/mL) dos isolados ao longo dos quatro ciclos de congelamento e descongelamento.....	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Coordenadas dos pontos amostrados na Praia Sudeste da Galeria Collins.....	28
Tabela 2 – Condições de cultivo, identificação por coloração de Gram e coloração das colônias dos isolados.....	34
Tabela 3 – Identificação dos isolados pela região do RNAr 16S.....	39
Tabela 4 – Relação de gêneros identificados e o gradiente da geleira Collins.....	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFP - *Antifreeze proteins* (proteínas anticongelantes)

EPS - Exopolissacarídeos

INP - *Ice Nucleating Proteins* (proteínas nucleadoras de gelo)

LPS - Lipopolissacarídeos

UFC - Unidades formadoras de colônias

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Antártica	16
1.2 Microrganismos Adaptados ao Frio	18
1.3 Potencial Biotecnológico	20
2 JUSTIFICATIVA	25
3 HIPÓTESE	26
4 OBJETIVOS	26
4.1 Objetivo Geral	26
4.2 Objetivos Específicos	26
5 MATERIAL E MÉTODOS	27
5.1 Amostras Ambientais da Antártica	27
5.2 Isolamento e caracterização de bactérias	28
5.3 Seleção e identificação dos isolados por biologia molecular	29
5.4 Teste de Sobrevivência a Ciclos de Congelamento	31
5.5 Análises Estatísticas	33
6 RESULTADO E DISCUSSÃO	34
6.1 Isolamento e Identificação dos Isolados	34
6.2 Avaliação da resistência ao congelamento	43
7 CONCLUSÃO	53
REFERÊNCIAS	54

1 INTRODUÇÃO

1.1 ANTÁRTICA

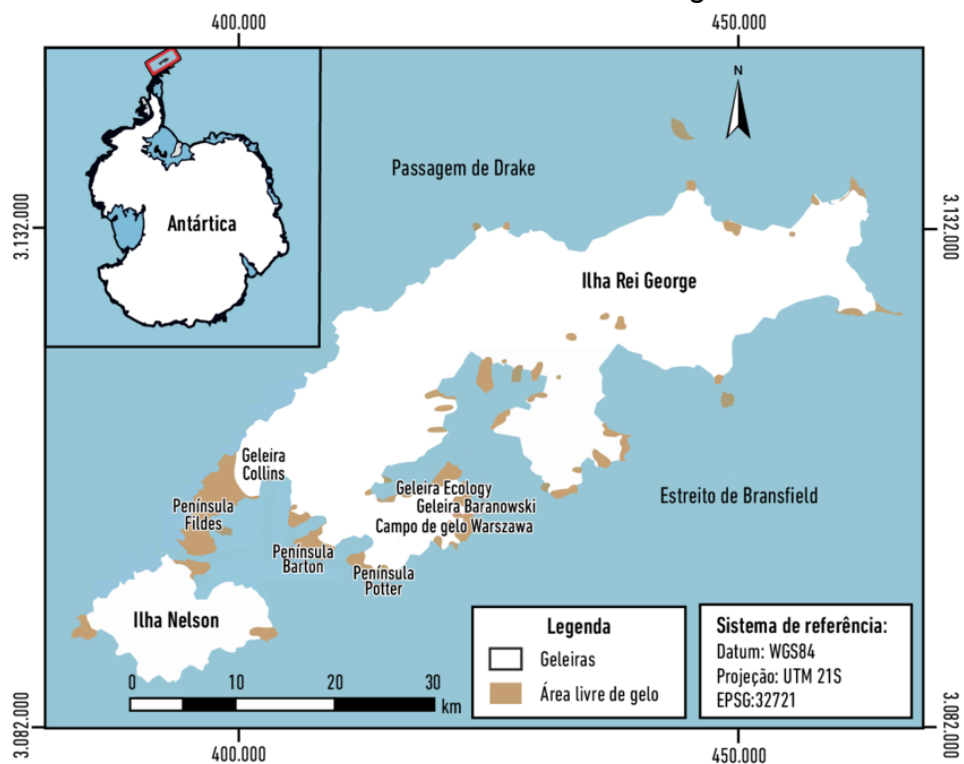
A Antártica está localizada ao sul do Círculo Polar Antártico, isolada geograficamente dos demais continentes, e é chamada de continente dos extremos (SILVA et al., 2018). Ambientes extremos são descritos como locais onde um ou mais parâmetros ambientais estão próximos dos níveis inferiores ou superiores dos limites conhecidos por sustentar a vida (DUARTE et al., 2012). Os diferentes ecossistemas terrestres da Antártica apresentam condições ambientais extremas, que refletem em ambientes pobres em nutrientes e em água no estado líquido. O isolamento geográfico e condições ambientais extremas do continente antártico resultaram na seleção/especiação de microrganismos endêmicos e altamente adaptados (NICHOLS et al., 1999). A maior parte das regiões apresenta clima extremamente seco, com precipitação média de 166 mm por ano e ventos intensos. A temperatura média anual tem variação de -10°C na costa antártica a -57°C no interior, tendo a menor temperatura registrada de $-89,2^{\circ}\text{C}$ no interior do continente nas proximidades da Estação Vostok da Rússia (KIM et al., 2019). A maioria do continente é coberta por um manto de gelo ($30 \times 10^6 \text{ km}^3$), as áreas livres da cobertura de gelo representam menos de 0,4% do território, sendo distribuídas ao longo das regiões costeiras (UGOLINI et al., 2008). O manto de gelo é dividido em três zonas distintas morfologicamente: a Antártica Oriental ($10,35 \times 10^6 \text{ km}^2$), a Antártica Ocidental ($1,97 \times 10^6 \text{ km}^2$) e a Península Antártica ($0,52 \times 10^6 \text{ km}^2$) (TURNER et al., 2009).

A Península Antártica é uma estreita região montanhosa que se estende sentido norte-sul, próximo à latitude 63°S , e apresenta temperaturas bem mais amenas em comparação às demais zonas antárticas (ROESCH et al., 2012). Apesar disso, 98% da região é caracterizada pela presença e formação de geleiras. Esse processo acontece devido à deposição da neve na superfície, já que com as baixas temperaturas e pressão atmosférica, ela se acumula e compacta durante o ano. Ao longo do tempo, esse processo de compactação natural da neve dá origem ao gelo glacial. Além disso, gases atmosféricos são capturados e dissolvidos nas geleiras, servindo de registros químicos de paleoclimas

(RUIZ-FERNÁNDEZ et al., 2019). A Península Antártica é uma das regiões mais afetadas pelas mudanças climáticas, com registros de sua temperatura média aumentando de 0,1 °C a 0,5 °C por década, dos anos 1950 até início dos anos 2010 (VAUGHAN et al, 2001; VAUGHAN et al, 2003; CARRASCO, 2013). O aumento da temperatura intensificou o processo de derretimento glacial, deixando novas regiões da costa e ilhas da península antártica livres da cobertura de gelo. Após o recuo glacial, esses ambientes estão sujeitos a uma intensa atividade geomorfológica, interferindo na dinâmica do solo na região (OLIVIA & FERNÁNDEZ, 2015; COOK et al, 2016).

Com aproximadamente 90% de sua área coberta por geleiras, a Ilha Rei George é a maior ilha do arquipélago das Shetlands do Sul, Península Antártica (OSMANOĞLU et al, 2013; PETSCH et al, 2022). Regiões de geleiras como Ecology, Baranowski e Collins, bem como regiões sem cobertura de gelo, como a península Fildes, têm sido foco de estudos relacionados às mudanças climáticas (DUARTE, 2010; CHU et al, 2017) (Figura 1).

Figura 1 - Localização da Ilha Rei George, Antártica, e suas áreas mapeadas com cobertura e livre de cobertura de gelo.



Fonte: Adaptado de PETSCH et al. (2022).

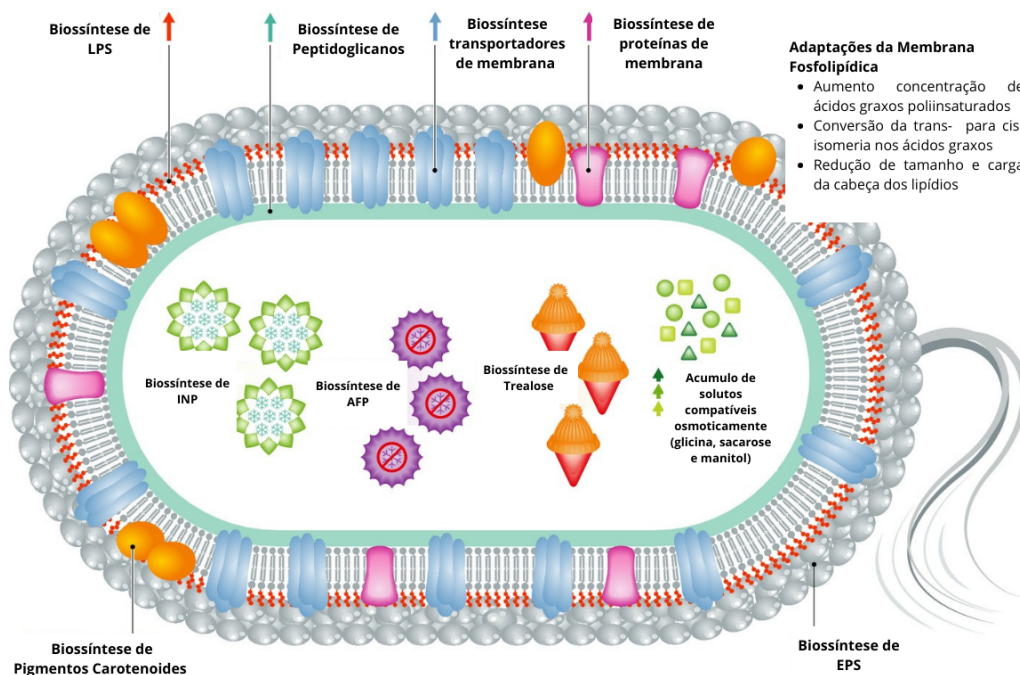
1.2 MICRORGANISMOS ADAPTADOS AO FRIO

Microrganismos extremófilos são organismos adaptados para sobreviver ou crescer de forma ideal em habitats com variáveis ambientais em faixas extremas. Eles podem ser adaptados a diferentes condições, por exemplo, pH ácido e alcalino (acidófilos e alcalófilos), alto teor de sal (halófilos), altas pressões (piezófilos), altas doses de radiação (radiotolerante) e altas e baixas temperaturas (termófilos e psicrófilos) (DUARTE et al., 2012). Aproximadamente 80% da biosfera do planeta Terra está permanentemente em condições de baixa temperatura, incluindo os oceanos, a atmosfera, regiões alpinas e polares. Dessa forma, ambientes frios podem ser considerados os ambientes extremos mais abundantes e distribuídos no mundo (DE MAAYER et al., 2014). Microrganismos adaptados ao frio podem ser divididos quanto sua faixa de temperatura de crescimento em dois grupos: psicrófilos, que crescem idealmente a menos de 15 °C (limite superior de 20 °C), e psicrotolerantes (ou psicrotróficos), que sobrevivem a temperaturas abaixo de 0 °C, mas crescem idealmente entre 20-25 °C (MORITA, 1975).

Em ambientes polares, a condição de baixas temperaturas impõem uma série de desafios físico-químicos para o funcionamento correto das células microbianas, influenciando negativamente na integridade celular, viscosidade da água, taxa de difusão de solutos, fluidez de membrana plasmática, cinética enzimática e nas interações macromoleculares (RODRIGUES & TIEDJE, 2008; PIETTE et al., 2011). Em ambientes permanentemente ou sazonalmente congelados como a Antártica, a sobrevivência dos microrganismos depende de uma série de estratégias adaptativas para manter o funcionamento vital da célula. Esses microrganismos desenvolveram mecanismos para neutralizar fatores de estresse adicionais presentes em ambientes de baixa temperatura, como excesso de radiação UV, dessecação, alta pressão osmótica, pH básico ou ácido e baixa disponibilidade de nutrientes (MORGAN-KISS et al, 2006; CHRISTNER, 2011). Existem algumas adaptações relacionadas com a manutenção da fluidez da membrana plasmática estão relacionadas ao aumento da concentração de ácidos graxos poliinsaturados em relação aos saturados, aumento da produção de pigmentos carotenóides, aumento da biossíntese de moléculas como a enzima glicosiltransferases, lipopolissacarídeos (LPS) e peptidoglicanos (SHIVAJI et al., 2010). Existem ainda a produção e concentração de outras moléculas como glicina,

sacarose e manitol, que possuem a função de prevenir a formação de cristais de gelo intracelularmente, a dessecação e o desequilíbrio osmótico (CASANUEVA et al., 2010). Outro exemplo de molécula é a trealose, que em condições de estresse sua produção é aumentada, a principal função dessa molécula crioprotetora é prevenir a agregação e desnaturação de proteínas, eliminar radicais livres e estabilizar a membrana celular (KANDROR et al., 2002). Existem ainda algumas proteínas que podem ser produzidas em condições de extremo frio e são chamadas de Proteínas anticongelantes (*Antifreeze Proteins –AFP*) e Proteínas nucleadoras de gelo (*Ice Nucleating Proteins –INP*). Estas proteínas são capazes de influenciar na dinâmica do estado físico da água. O mecanismo de ação das proteínas anticongelantes é a sua ligação aos cristais de gelo em formação controlando seu crescimento e recristalização (KIM et al, 2017; BIAŁKOWSKA et al., 2020; XING et al, 2020). Outra classe de moléculas que tem sua biossíntese estimulada em ambientes frios são os exopolissacarídeos (EPS). EPS são capazes de reter água, nutrientes e íons metálicos, facilitam a adesão superficial e celular e a formação de biofilme. Além disso, elas são capazes de reduzir o ponto de congelamento e a temperatura de nucleação do gelo (QIN et al., 2007; FENG et al., 2014) (Figura 2).

Figura 2 - Adaptações fisiológicas comuns em bactérias psicrófilas.



Fonte: Adaptado de DE MAAYER et al. (2014).

Na Antártica temos uma variação gritante de temperaturas frias, sendo a menor temperatura registrada de -89°C . Essas variações de temperatura ocasionam o congelamento e descongelamento da superfície do continente formando ciclos contínuos de diferentes temperaturas que são naturalmente impostas pelo ambiente. Os ciclos contínuos de congelamento e descongelamento podem ser prejudiciais aos microrganismos diminuindo o número de células, porém existem uma série de microrganismos que podem tolerar a ciclos de congelamento e descongelamento mantendo o número de células após o congelamento. Esse processo acontece naturalmente, mas devido às mudanças climáticas sua ocorrência está cada vez mais frequente. Além disso, áreas anteriormente cobertas por gelo, perderam essa cobertura, estando sujeitas a maiores estresses físico-químicos (VISHNIVETSKAYA et al., 2007). Ciclos de congelamento e descongelamento estão associados ao declínio das populações microbianas no solo. Há registros de perdas superiores a 50% após um único ciclo (SOULIDES & ALLISON, 1961). A diversidade de respostas dos microrganismos ao estresse dos ciclos de congelamento estão associadas aos diferentes nichos dos ambientes. Microrganismos sensíveis são danificados durante o congelamento. Aqueles adaptados a estas condições, conseguem permanecer ativos e/ou produzir biomassa em baixas temperaturas (DROTZ et al., 2010; WILSON et al., 2012; MEISNER et al., 2021).

1.3 POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO

A Antártica foi o último continente a ser explorado pelo ser humano, e por muito tempo permaneceu inexplorado devido às condições extremas do local. Em 1959, o Tratado da Antártica foi implementado tornando o continente uma reserva científica. Este tratado regulamenta as relações internacionais na Antártica, influenciando também as pesquisas no local. Apesar da localização remota e condições ambientais extremas, o número de publicações relacionadas a bioprospecção de microrganismos na Antártica vem aumentando ao longo dos anos. As condições abióticas extremas como frio, alta salinidade e exposição a radiação UV, exerceram pressões seletivas únicas nas comunidades microbianas. Microrganismos antárticos, ao longo do caminho evolutivo, desenvolveram estratégias para sobreviver a essas condições, entre elas estão a produção de enzimas tolerantes ao frio, substâncias antimicrobianas e moléculas crioprotetoras.

Essas diferentes biomoléculas possuem diversas aplicações biotecnológicas, sendo alvo de pesquisas nas últimas décadas (CORREA & ABREU, 2020).

As enzimas produzidas por organismos extremófilos vêm se destacando nos processos industriais devido a sua grande estabilidade em condições de estresse. Enzimas produzidas por microrganismos psicrófilos utilizam muito pouco, ou dispensam o calor para manutenção de sua atividade (SARMIENTO et al., 2015). Substâncias como sorbitol, trealose e glicerol são agentes crioprotetores de células bacterianas amplamente distribuídos e possuem aplicabilidades dentro das áreas da saúde, agricultura e indústria (FEENEY & YIN, 1978; STOREY & STOREY, 1986). A biossíntese de exopolissacarídeos (EPS) é uma estratégia comumente utilizada por bactérias de ambientes frios contra os estresses provocados pelo congelamento. EPS possuem alto peso molecular e apresentam uma grande diversidade química e estrutural, resultando em diferentes aplicabilidades para a indústria farmacêutica, alimentícia e cosmética (ROCA et al., 2015). Alguns estudos em regiões polares, como na Antártica, vêm se intensificando na busca de microrganismos que produzem exopolissacarídeos. Sete cepas bacterianas da Antártica foram selecionadas por produzir EPS, sendo que a cepa KOPRI 21653 foi capaz de criopreservar células de *E. coli* submetidas a ciclos de congelamento (KIM & YIN, 2007). Em outro estudo da Antártica, pesquisadores identificaram uma nova cepa produtora de EPS: *Pseudomonas mandelii*, que apresentava propriedades crioprotetoras (VASQUÉZ-PONCE et al., 2017). Bactérias associadas a esponjas na Antártica têm sido estudadas e revelaram a produção de EPS crioprotetores: *Winogradskyella* spp. CAL384 e CAL396, *Colwellia* sp. GW185 e *Shewanella* sp. CAL606 (CARUSO et al., 2018). Recentemente uma bactéria isolada de uma geleira apresentou potencial de produção de EPS com propriedades crioprotetoras e foi identificada como *Pseudomonas* sp. BGI-2 (ALI et al., 2020).

Outro tipo de substância crioprotetora são as proteínas anticongelantes (AFP), que apresentam duas propriedades físico-químicas: atividade de Inibição de Recristalização do gelo (IR) e atividade de Histerese Térmica (TH) (KNIGHT; HALLETT; DEVRIES, 1988; BARRETT, 2001). A atividade de Inibição de Recristalização do gelo (IR) tem como principal função a inibição do crescimento do gelo (KNIGHT et al., 1986; GRIFFITH; YAISH, 2004). Já a atividade de Histerese Térmica (TH) tem como principal função diminuir o ponto de congelamento (BARRETT, 2001; BRASLAVSKY & DRORI, 2013). Atualmente o grupo com a maior

diversidade de microrganismos produtores de proteínas anticongelantes são as bactérias e inclui as espécies *Pseudomonas putida* GR12-2 (SUN et al., 1995; XU et al., 1998), *Marinomonas primoryensi* (GILBERT et al., 2005), *Flavobacteraceae* (RAYMOND et al., 2008), *Flavobacterium frigoris* PS1 (DO et al., 2014), *Colwellia* sp. (HANADA et al., 2014), *Cryobacterium* sp., *Leifsonia* sp., *Polaromonas* sp., *Pseudomonas* sp. e *Subtercola* sp. (SINGH et al., 2014; SINGH et al., 2021; HANADA, et al., 2014), *Moraxella* sp. (YAMASHITA et al., 2002), *Shewanella frigidimarina* (VANCE et al., 2018), *Pseudomonas* sp., *Platibacter* sp. e *Sphingomonas* sp. (Muñoz et al., 2017), *Paenisporosarcina antarctica* CGMCC 1.6503 (Rong et al., 2020), *Nostoc* HG1 (RAYMOND et al., 2020) e *Marinomonas arctica* BSI20414 (LIAO et al., 2021). Os estudos independentes de cultivo revelaram que as proteínas anticongelantes são produzidas por bactérias que vivem em simbiose com outros organismos, como musgos e ciliados, garantindo a sobrevivência deles ao congelamento sazonal na Antártica (MANGIAGALLI et al., 2017; RAYMOND, 2016). Além do seu papel fundamental na sobrevivência dos microrganismos em regiões extremamente frias, essa família de proteínas possui potencial para fins biotecnológicos. As AFPs podem ser utilizadas para melhorar o armazenamento de alimentos congelados (GRIFFITH; EWART, 1995). Na agricultura, há registro de produção de plantas geneticamente modificadas para a produção de AFP, aumentando a tolerância da planta à exposição ao frio (HIGHTOWER et al., 1991; FAN et al., 2002). Outra estratégia é a transformação de bactérias da filosfera da planta com genes para produção e regulação de AFPs e, posteriormente, a realização da re-inoculação na planta. Essas bactérias irão impedir a formação de gelo na superfície foliar, contribuindo para a resistência a geadas (GLICK & BASHAN, 1997). Elas também podem ser aplicadas dentro da biomedicina, na criopreservação de órgãos para transplantes (AMIR et al., 2003) e na otimização da viabilidade de gametas e embriões (QADEER et al., 2016; ZANDIYEH et al., 2018).

Bactérias podem controlar o congelamento por meio de proteínas nucleantes de congelamento (INPs). Organismos nucleadores de gelo têm papéis importantes no meio ambiente. Com sua capacidade de induzir a formação de gelo em temperaturas abaixo do ponto de fusão, as bactérias podem ser aplicadas nas plantas e assim desempenhar papéis importantes na agricultura. Além disso, as bactérias podem afetar os processos de glaciação atmosférica, precipitação e clima

(PANDEY et al., 2016). O fenótipo de nucleação de gelo é fornecido por um gene estrutural nestas bactérias. O resultado dessa expressão genética é uma proteína de membrana. Esta proteína, isoladamente ou combinada com fosfolipídios de membrana, apresenta atividade de nucleação congelante (MARGARITIS & BASSI, 1991). No estudo de Kobashigawa et al. (2005) foi testada a hipótese de que proteínas nucleadoras de gelo também poderiam ter ação anticongelante. O INP96 exibiu a capacidade de moldar o cristal de gelo - morfologia hexagonal do tipo bipirâmide, mas não apresentou formato bem definido observado na presença de proteínas anticongelantes. Os resultados também revelaram que foi observada uma diminuição no ponto de congelamento na concentração de 0 a 1,8 mM, demonstrando dependência da concentração. Eickhoff et al. (2019) investigaram duas proteínas anticongelantes de ocorrência natural, uma de peixes, AFP tipo III, e uma de besouros, TmAFP. Os experimentos mostraram que, além da inibição do crescimento do gelo, ambos também podem desencadear a nucleação do gelo acima da temperatura de congelamento homogênea. A diferença predominante entre AFPs e INPs é o seu tamanho molecular, que é um bom preditor da sua temperatura de nucleação no gelo.

Kawahara, Mano e Obata (1993) estudaram um INP da *Erwinia uredovora* KUIN-3, que produz matéria extracelular de nucleação de gelo (EIM). O composto EIM purificado era estável em pH 5,0 a 10,0 e em temperaturas abaixo de 25°C, e que os componentes eram lipídio (100/0), proteína (430/0), sacarídeo (350/0) e poliamina (120/0). Kawahara et al. (1996) identificaram um INP de *Pseudomonas* sp. KUIN-5 isolado de alga marinha *Monostroma latissimum*. Os resultados mostraram que a cepa cultivada aerobicamente por 50 horas a 25°C obteve a maior atividade de congelamento de nucleação das células e a temperatura de congelamento de nucleação, T50, de -3,2 °C. Obata et al. (1999) identificaram uma nova bactéria isolada da areia da Ilha Ross, na Antártica, que produz uma INP. A cepa IN-74 foi identificada como *Pseudomonas antarctica* IN-74. Os resultados mostraram que as células da cepa IN-74 produziram núcleos de gelo apenas em temperaturas de crescimento extremamente baixas. A temperatura de nucleação de congelamento foi de 3,7°C para células em suspensão ($1,0 \times 10^7$ células/mL) incubadas a 4°C e 17,4°C.

Alguns genes foram sequenciados e identificados como responsáveis pela produção de INP: InaA de *Erwinia ananas* IN-10 (WATABE et al. 1993), inaU de *Erwinia uredovora* (MICHIGAMI et al., 1994), inaW de *Pseudomonas fluorescens*,

inaW de *Pseudomonas fluorescens* (Warren et al., 1986), inaX de *Xanthomonas campestris* (ZHAO & OSER, 1990), iceE de *Erwinia herbicola* (WARREN & COROTTO, 1989) e inaZ de *Pseudomonas syringae* (GREEN & WARREN, 1985). Bactérias nucleadoras de gelo têm potencial biotecnológico. As bactérias podem ser aplicadas no processamento de alimentos congelados, reduzindo o consumo de energia com controle de cristalização, reduzindo tempo, apresentando maior estabilidade e menores custos energéticos. Além da aplicação alimentícia, o INP pode ser aplicado na formação de neve artificial (COCHET & WIDEHEM, 2000; ZHANG, WANG & CHEN, 2010).

Proteínas de Anti-Nucleação de Gelo (ANP) são inibidores da nucleação do gelo e têm a capacidade de diminuir o ponto de super-resfriamento da água. Esta atividade é definida como antinucleação (KAWAHARA, 2017). Kawahara e colaboradores isolaram, em 1996, um microrganismo da superfície da folha de cânfora capaz de produzir uma proteína anti-nucleação congelante. O microrganismo foi identificado como *Acinetobacter calcoaceticus* KINI-1 e produziu uma proteína de 55 kDa. A atividade de antinucleação da ANP mostrou aumentar proporcionalmente à concentração proteica e a atividade antinucleação do ANP contra o núcleo de gelo das células KUIN-3 de *Erwinia uredovora* foi de 2,2°C na concentração de 12,5 µg.mL⁻¹. Em 2002, Yamashita et al. (2002) isolaram a cepa YY529 da superfície das folhas de cânfora. A cepa YY529 foi identificada como *Bacillus thuringiensis* e possuía um exopolissacarídeo com propriedades antinucleadoras de congelamento.

2 JUSTIFICATIVA

As mudanças climáticas estão influenciando cada vez mais a dinâmica do continente antártico. Com o aumento da temperatura média global o recuo das geleiras está se intensificando e as áreas sem a cobertura de gelo estão aumentando, principalmente nas regiões costeiras e de ilhas antárticas. A perda da cobertura de gelo expõe o solo a ciclos de congelamento e descongelamento muito mais agressivos aos microrganismos, resultando em perdas quantitativas e qualitativas para suas populações (LIM et al., 2019). A utilização de testes de resistência ao congelamento possibilita simular em laboratório essas condições climáticas nos permitindo entender melhor os fatores que influenciam na resistência ao estresse gerado por ciclos de congelamento e descongelamento (MEISNER et al., 2021).

Nesse contexto, pretende-se isolar e identificar pelo sequenciamento do gene RNAr 16S bactérias da Geleira Collins, e testá-las quanto à sua resistência ao congelamento. Essas informações contribuirão para a compreensão da diversidade de bactérias resistentes ao congelamento e para potenciais aplicações biotecnológicas.

3 HIPÓTESE

Bactérias da Antártica apresentam resistência a ciclos de congelamento e descongelamento.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar a resistência ao congelamento de bactérias da Geleira Collins, na Ilha Rei George, Península Antártica

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Isolar bactérias a partir de amostras de solo da Geleira Collins adaptadas ao crescimento em baixas temperaturas;

Diferenciar os isolados geneticamente por comparação do perfil de bandas de DNA repetitivo gerado pela técnica de BOX-PCR;

Identificar os isolados bacterianos por meio do sequenciamento do gene RNAr 16S;

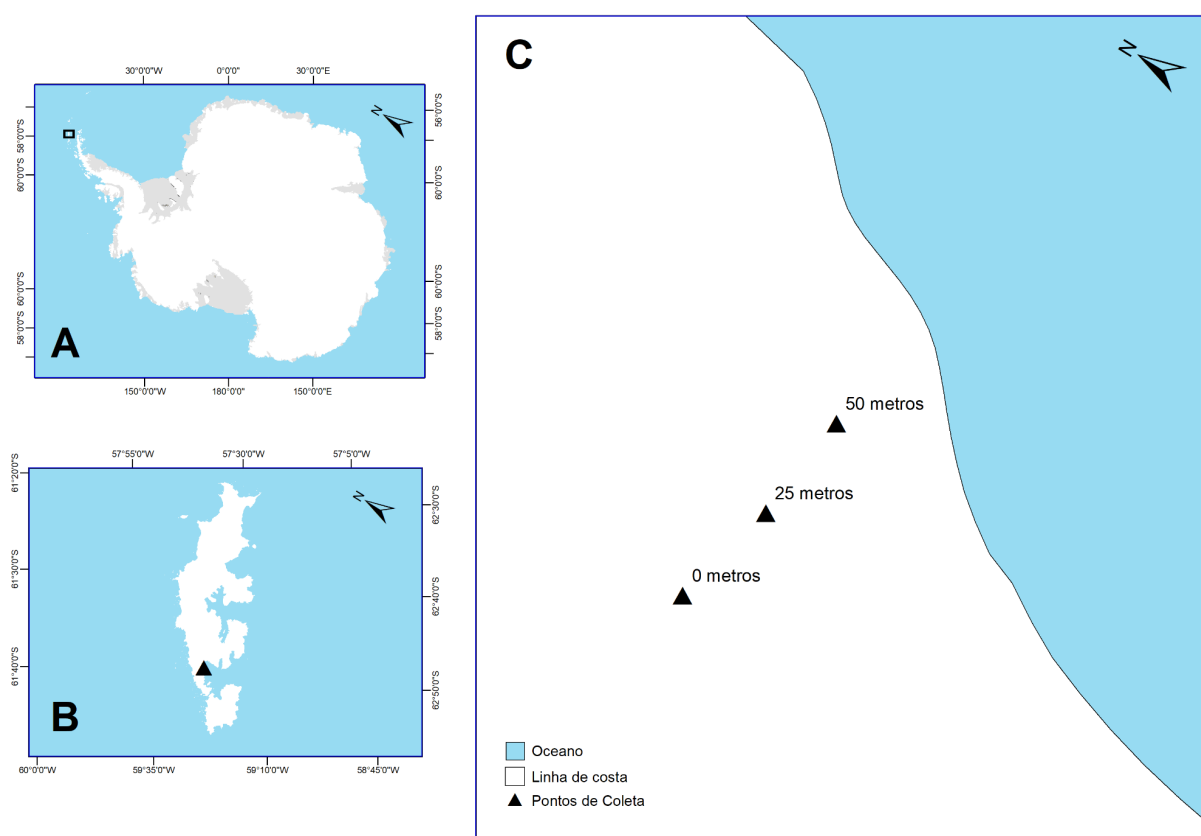
Avaliar a resistência ao congelamento dos isolados a 4 ciclos de congelamento e descongelamento.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 AMOSTRAS AMBIENTAIS DA ANTÁRTICA

Amostras de solo foram coletadas na Ilha Rei George (Península Antártica), na área da geleira Collins (Figura 3), representando o solo que foi exposto após o derretimento e recuo da frente das geleiras.

Figura 3 - Pontos de coleta de solo. A: Localização da Ilha Rei George na Antártica; B: Localização da Geleira Collins; C: Localização dos pontos de coleta da Geleira Collins.



Fonte: Thiago Fossile e Joana Camila Lopes.

Foram coletadas amostras subglaciais (base da geleira) e amostras distribuídas no solo perpendicular à frente da geleira. As amostras de solo compreenderam 3 pontos de coleta, dispostos em um gradiente em relação à frente de cada geleira (0 m, 25 m, 50 m) (Tabela 1). As amostras de solo foram coletadas em triplicatas, sendo cada uma delas composta de aproximadamente

500 g de solo, e posteriormente armazenadas sob refrigeração (-20 °C) até o laboratório. No local da amostragem foram obtidos os dados de temperatura do solo.

Tabela 1 – Coordenadas dos pontos amostrados na Praia Sudeste da Galeria Collins.

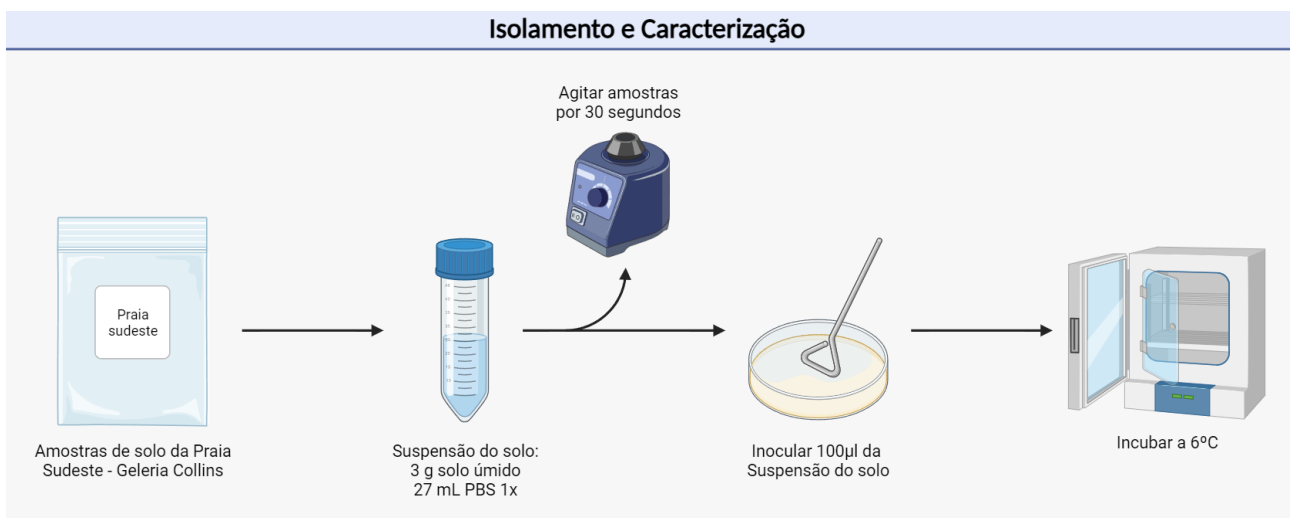
Código	Ponto de coleta	Fonte da amostra	Latitude	Longitude
PSC0	Geleira Collins - Praia Sudeste 0 m	Solo	62°17'25.00"S	58°85'60.56"W
PSC25	Geleira Collins - Praia Sudeste 25 m	Solo	62°17'25.56"S	58°85'55.83"W
PSC50	Geleira Collins - Praia Sudeste 50 m	Solo	62°17'25.00"S	58°85'50.00"W

Fonte: Autor

5.2 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS

Para as amostras de solo da Praia Sudeste - Geleira Collins, o isolamento bacteriano consistiu em diluir 3,0 g de solo úmido em um tubo Falcon de 50 mL contendo 27 mL de tampão PBS 1x (NaCl 8 g, KCl 0,2 g, Na₂HPO₄ 1,44 g, KH₂PO₄ 0,24 g para 1000 mL de água destilada). A suspensão de solo foi agitada no vórtex por 30 segundos e 100 µL foram inoculados em placas contendo os meios de cultura R2A (Agar 18 g, Extrato de levedura 0,5 g, Caseína hidrolisada 0,5 g, Glicose 0,5 g, Amido solúvel 0,5 g, K₂HPO₄ 0,3 g, Piruvato de sódio 0,3 g, Peptona 0,25 g e MgSO₄ heptahidratado 0,05 g para 1000 mL de água destilada). As placas foram incubadas a temperatura de 6 °C em condições aeróbias até o surgimento de colônias (Figura 4).

Figura 4 - Isolamento e caracterização de bactérias da Geleira Collins.



Fonte: Autor.

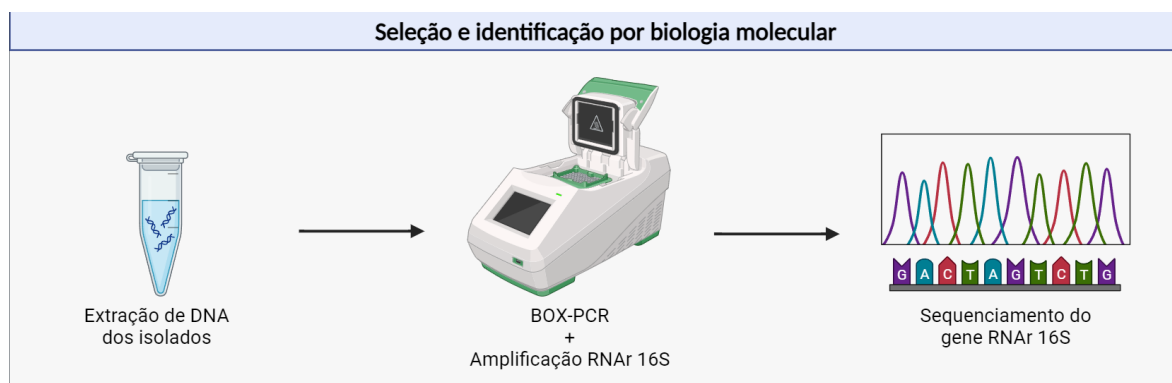
As colônias obtidas das amostras de solo foram selecionadas considerando seu pigmento, forma e tamanho. O tipo de parede celular, forma e arranjo foram determinados em microscopia óptica pelo método de coloração de Gram.

5.3 SELEÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS POR BIOLOGIA MOLECULAR

Após o isolamento dos isolados, estes foram geneticamente diferenciados por comparação do perfil de bandas de DNA repetitivo gerado pela técnica de tipagem molecular BOX-PCR (VERSALOVIC et al. 1994). Para tal, o DNA total dos isolados bacterianos foi extraído por meio do método da fervura (1 colônia diluída em 20 µL de H₂O MilliQ esterilizada, seguido de fervura a 99 °C por 3 min), seguido da metodologia descrita em Versalovic et al. (1994), que consistiu na amplificação por PCR utilizando primer para região de DNA repetitiva “BOX”. A reação da PCR para o volume final de 25 µL consistiu em 17,45 µL de Água MilliQ, 2,5 µL de Tampão 10X, 1,9 µL de MgCl₂ 50 mM, 1,25 µL de DMSO 100%, 0,595 µL de primer Box A1R a 25,2 µM, 0,2 µL de dNTPs 100 mM, 0,1 µL de Taq Polimerase 5 U. µL⁻¹ e 1 µL do DNA extraído. As condições de amplificação foram seguidas conforme Versalovic et al. (1994) onde iniciou-se com o hotstart de 94 °C por 7 min; seguido por 35 ciclos de 94 °C por 7 min, 53 °C por 1 min, 72 °C por 8 min e extensão final de 15 min a 72 °C. Os produtos das amostras amplificadas por PCR foram corados com GelRed (Invitrogen), conforme as recomendações do fabricante, verificados

utilizando eletroforese em gel de Agarose 1% em TAE 1x a 40V por 3 horas e fotografados no software ImageLab após exposição em um transluminador UV Chemidoc MP (LAMEB). Os produtos de PCR foram separados em eletroforese com gel de Agarose 1% (m/v) resultando em um perfil de bandas único para cada isolado. Foi utilizado o software PRIMER 6, para a criação de um dendograma, que teve como objetivo agrupar por similaridade o padrão de bandas dos isolados. Após a BOX PCR, os isolados foram submetidos a reação de PCR com primers degenerados, sendo eles 27F (LANE et al. 1991) e 1492R (TURNER et al. 1999), que amplificam o gene RNAr 16S bacteriano. A reação seguiu conforme descrito em Turner et al. (1999). Para volume final de 25 μL , a PCR consistiu em 19,95 μL água MilliQ, 2,5 μL de Tampão 10X, 0,75 μL de MgCl_2 50 mM, 0,25 μL de primer 27F a 20 μM , 0,25 μL de primer 1401R a 20 μM , 0,20 μL de dNTPs 100 mM, 0,10 μL de Taq Polimerase 5 U. μL^{-1} e 1 μL de DNA extraído. As condições para reação seguiram conforme Bendia et al. (2018): iniciou-se o hotstart de 95 $^{\circ}\text{C}$ por 10 min; seguido por 30 ciclos de 30s de desnaturação a 94 $^{\circ}\text{C}$, 30s de anelamento a 55 $^{\circ}\text{C}$ e 30s de extensão a 72 $^{\circ}\text{C}$ e a extensão final de 72 $^{\circ}\text{C}$ por 10 min. Também foram preparados um controle negativo (substituindo o volume do DNA por água MilliQ) e um controle positivo contendo DNA extraído de *Escherichia coli* (25 $\text{ng}/\mu\text{L}$). Os produtos da PCR foram corados utilizando GelRed e submetidos a eletroforese em gel de Agarose 1% em TAE 1X a 60V, expostos em um transiluminador UV Fotodocumentador Chemidoc MP (LAMEB) e fotografados no software ImageLab. Juntamente com os produtos da PCR, 200 ng de marcadores de peso molecular 1 kb DNA Ladder (Ludwig Biotecnologia) foram submetidos a eletroforese. Após a observação de bandas, as amostras de PCR foram purificadas conforme Green & Sambrook (2017). Em seguida, as amostras purificadas foram avaliadas por eletroforese e quantificadas via Nanovu, sendo que apenas amostras contendo um mínimo de 30 $\text{ng}/\mu\text{L}$ foram enviadas para sequenciamento. As amostras foram enviadas para MacroGen. O tipo de sequenciamento utilizado foi pelo método Sanger e o primer 27F foi utilizado para o sequenciamento dos isolados (Figura 5).

Figura 5 - Procedimento para identificação pelo sequenciamento do gene RNAr 16S.



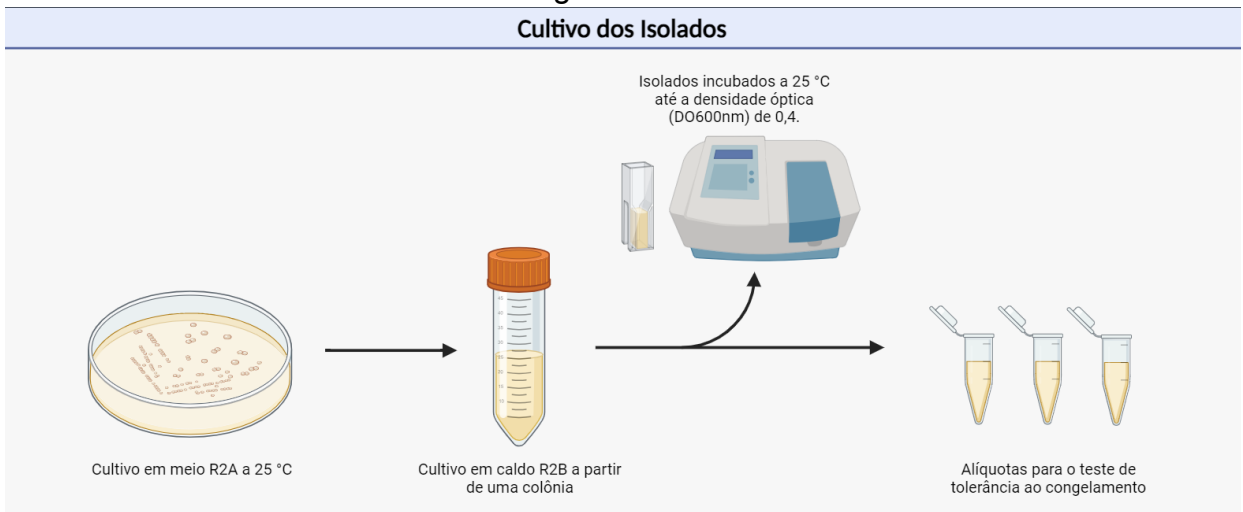
Fonte: Autor.

As seqüências de RNAr 16S foram identificadas utilizando o banco de dados BLAST do NCBI - *National Center for Biotechnology Information* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Inicialmente foi feita a análise da qualidade do sequenciamento por meio do software Chromas. Foram desconsiderados nucleotídeos com Phred score inferior a 20. As seqüências foram avaliadas quanto a presença de quimeras por meio do Chimera_slayer mothur v.1.47.0. As seqüências que não apresentaram quimeras foram depositadas no banco de dados da NCBI (Genbank).

5.4 TESTE DE SOBREVIVÊNCIA A CICLOS DE CONGELAMENTO

Os isolados bacterianos foram pré-selecionados por meio do ensaio de tolerância ao congelamento. Para tal, os isolados foram cultivados em meio R2A sólido (Merck) a 25 °C para a obtenção de colônias isoladas. A partir desta cultura, utilizando a alça de platina, 01 (uma) colônia foi coletada e inoculada em um tubo tipo Falcon de 50 mL contendo 25 mL de caldo R2B. A cultura foi incubada a 25 °C até atingir uma densidade óptica (DO600 nm) de 0,4, que representa, em média, o final da fase exponencial de crescimento. Para verificação da densidade óptica, alíquotas de 1 mL dos inóculos foram transferidos para cubeta de vidro para leitura em espectrofotômetro. Uma alíquota de 1 mL das culturas foi transferida para um tubo de microcentrifuga de 1,5 mL para o ensaio de tolerância ao congelamento (Figura 6).

Figura 6 - Cultivo e padronização dos isolados para o teste de tolerância ao congelamento.



Fonte: Autor.

O experimento consistiu em submeter as alíquotas a um ciclo de congelamento e descongelamento: inicialmente as culturas foram congeladas a -6°C por 24 horas, seguido de descongelamento a 25°C por 30 minutos. Posteriormente, a cultura foi submetida a diluições seriadas para contagem de unidades formadoras de colônias (UFC). Para isso, $10\ \mu\text{L}$ da cultura foi transferida para uma placa de 96 poços contendo $90\ \mu\text{L}$ de tampão PBS 1x (NaCl 8 g, KCl 0,2 g, Na_2HPO_4 1,44 g, KH_2PO_4 0,24 g para 1000 mL de água destilada), sendo que as diluições foram feitas até 1:1.000.000 (10^{-6}). A contagem de células viáveis foi feita antes e depois do congelamento.

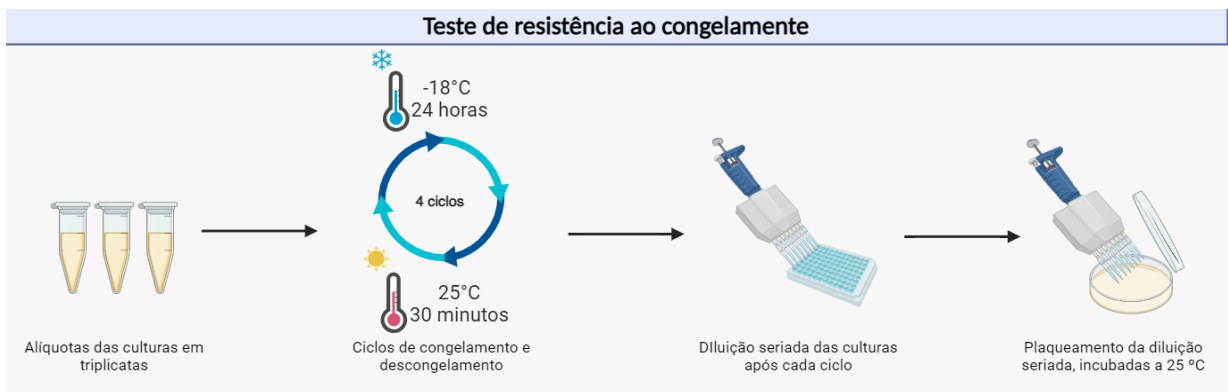
Para avaliar a taxa de sobrevivência dos isolados foi usada a equação apresentada por Kwon et al. (2018):

$$S = \frac{N_1}{N_0 \times 100}$$

sendo que: S: taxa de sobrevivência; N_1 : densidade celular viável após o descongelamento; N_0 : densidade celular inicial. Para avaliar a sobrevivência dos isolados foi utilizado como controle negativo uma cultura padrão de *Escherichia coli*, seguindo as mesmas condições do ciclo de congelamento dos isolados da Praia Sudeste. Os isolados e o controle negativo foram submetidos ao teste de tolerância ao congelamento em triplicatas.

Os isolados bacterianos com taxa de sobrevivência superior a 50% foram selecionados para o teste de resistência ao congelamento. O experimento consistiu em submeter alíquotas de 1 mL das culturas com DO600 nm 0,4 em tubos de microcentrifuga de 1,5 mL a ciclos de congelamento e descongelamento: inicialmente as culturas foram congeladas a -18°C por 24 horas, seguido de descongelamento até 25°C por 30 minutos. Os ciclos foram repetidos a cada 24h, sendo realizados um total de 4 ciclos. A cada ciclo a cultura foi submetida a diluições seriadas para contagem de unidades formadoras de colônias (UFC). A diluição seriada seguiu o mesmo padrão utilizado para o teste de tolerância ao congelamento. A taxa de sobrevivência em cada ciclos foi avaliada utilizando a equação apresentada por Kwon et al. (2018). Os isolados e o controle negativo (*Escherichia coli*) foram expostos às mesmas condições durante o teste de resistência ao congelamento, ambos em triplicatas (Figura 7).

Figura 7 - Teste de resistência a ciclos de congelamento.



Fonte: Autor.

5.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

A taxa de sobrevivência (S) de cada isolado foi determinada e comparada com o controle negativo (*E. coli*). Os dados foram avaliados quanto a normalidade e homogeneidade pelos testes Kolmogorov-Smirnov e Cochran, respectivamente. Foi utilizado o teste T para identificar as diferenças significativas na densidade populacional antes e depois dos ciclos de congelamento com nível de significância de $p < 0,05$. Todas as análises foram realizadas no software RStudio

(<http://www.rstudio.org/>). Foram considerados resistentes ao congelamento os isolados que apresentaram o mesmo número de células antes e depois do congelamento.

6 RESULTADO E DISCUSSÃO

6.1 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS

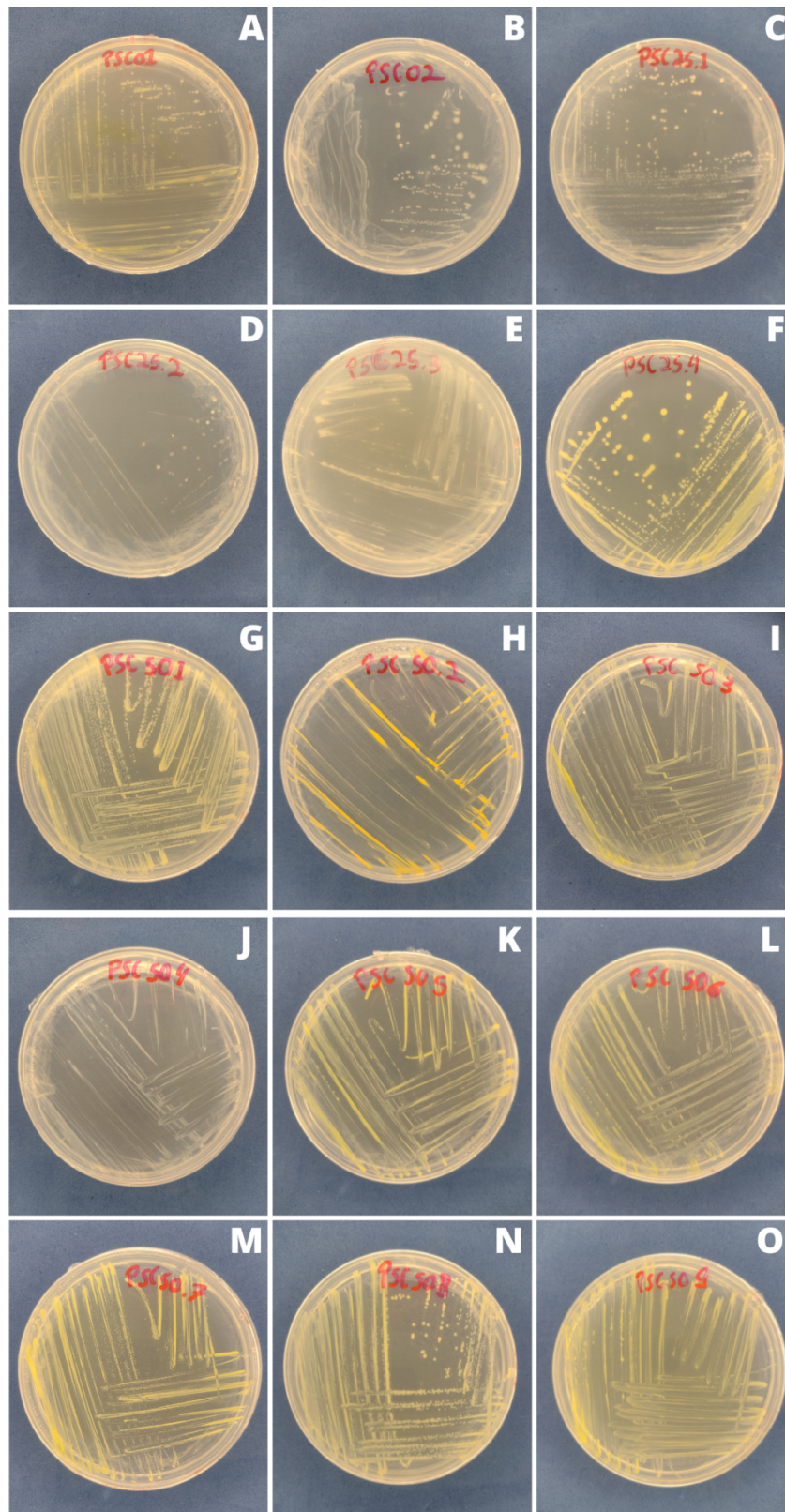
No estudo foi obtido um total de 15 isolados de amostras de solo da Geleira Collins. Todos os isolados foram cultivados no meio de cultura R2A, incubados a 6°C em condições aeróbias (Tabela 2). As colônias bacterianas apresentaram 3 tipos de coloração diferentes, em 7 isolados com coloração amarela, em 5 isolados com a coloração branca e em 3 isolados com a coloração laranja (Figura 8).

Tabela 2 – Condições de cultivo, identificação por coloração de Gram e coloração das colônias dos isolados.

Código	Temperatura de isolamento	Meio de cultura	Coloração de Gram	Coloração da colônia
PSC01	6°C	R2A	positiva	laranja
PSC02	6°C	R2A	positiva	amarela
PCS25.1	6°C	R2A	negativa	branca
PSC25.2	6°C	R2A	negativa	branca
PSC25.3	6°C	R2A	negativa	branca
PSC25.4	6°C	R2A	positiva	amarela
PSC50.1	6°C	R2A	positiva	laranja
PSC50.2	6°C	R2A	positiva	laranja
PSC50.3	6°C	R2A	positiva	branca
PSC50.4	6°C	R2A	negativo	branca
PSC50.5	6°C	R2A	positivo	amarela
PSC50.6	6°C	R2A	positiva	amarela
PSC50.7	6°C	R2A	positiva	amarela
PSC50.8	6°C	R2A	positiva	amarela
PSC50.9	6°C	R2A	positiva	amarela

Fonte: Autor.

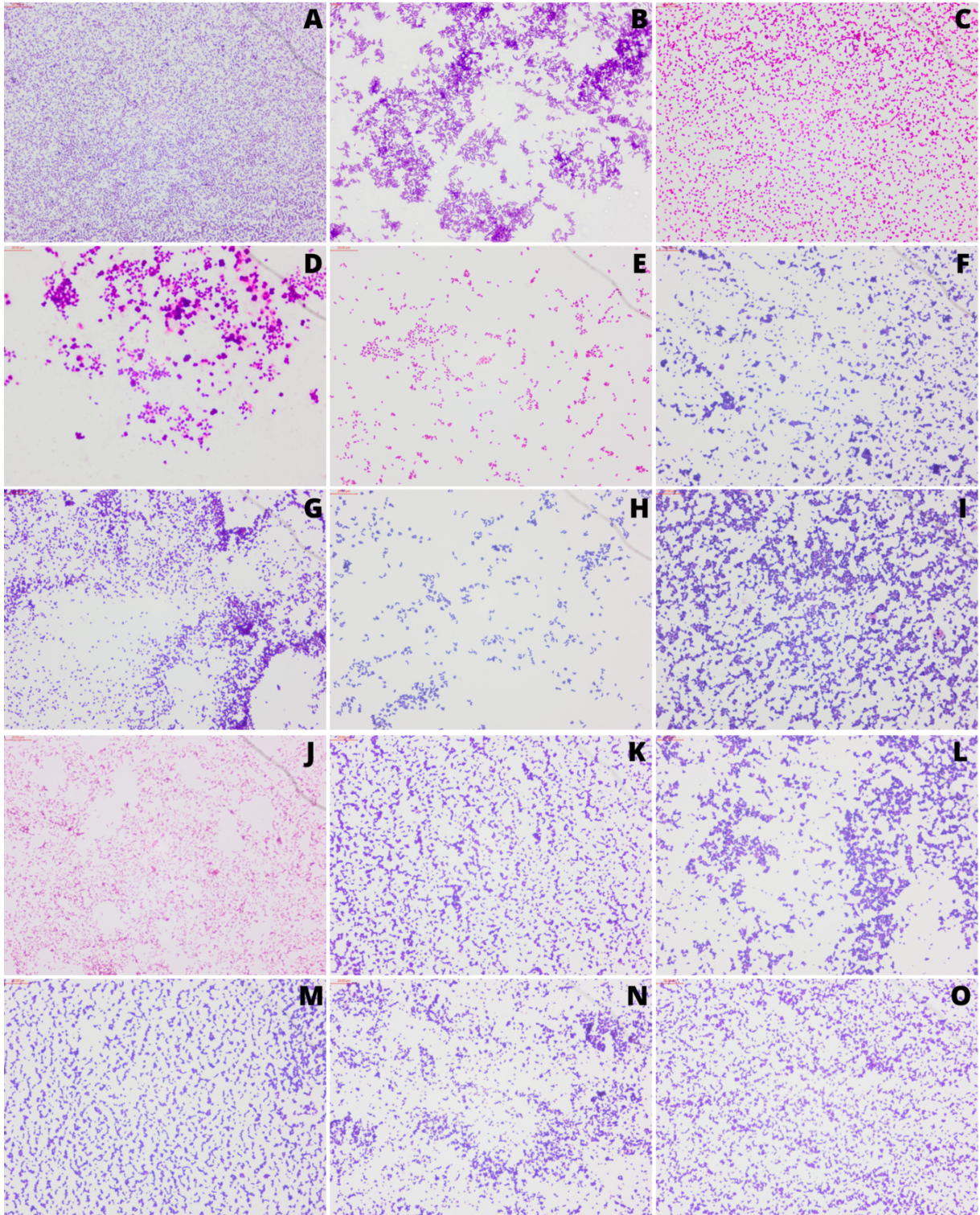
Figura 8 - Esgotamento dos isolados em meio R2A. A-PSC01; B-PSC02; C-PSC25.1; D-PSC25.2; E-PSC25.3; F-PSC25.4; G-PSC50.1; H-PSC50.2; I-PSC50.3; J-PSC50.4; K-PSC50.5; L-PSC50.6; M-PSC50.7; N-PSC50.8; O-PSC50.9.



Fonte: Autor

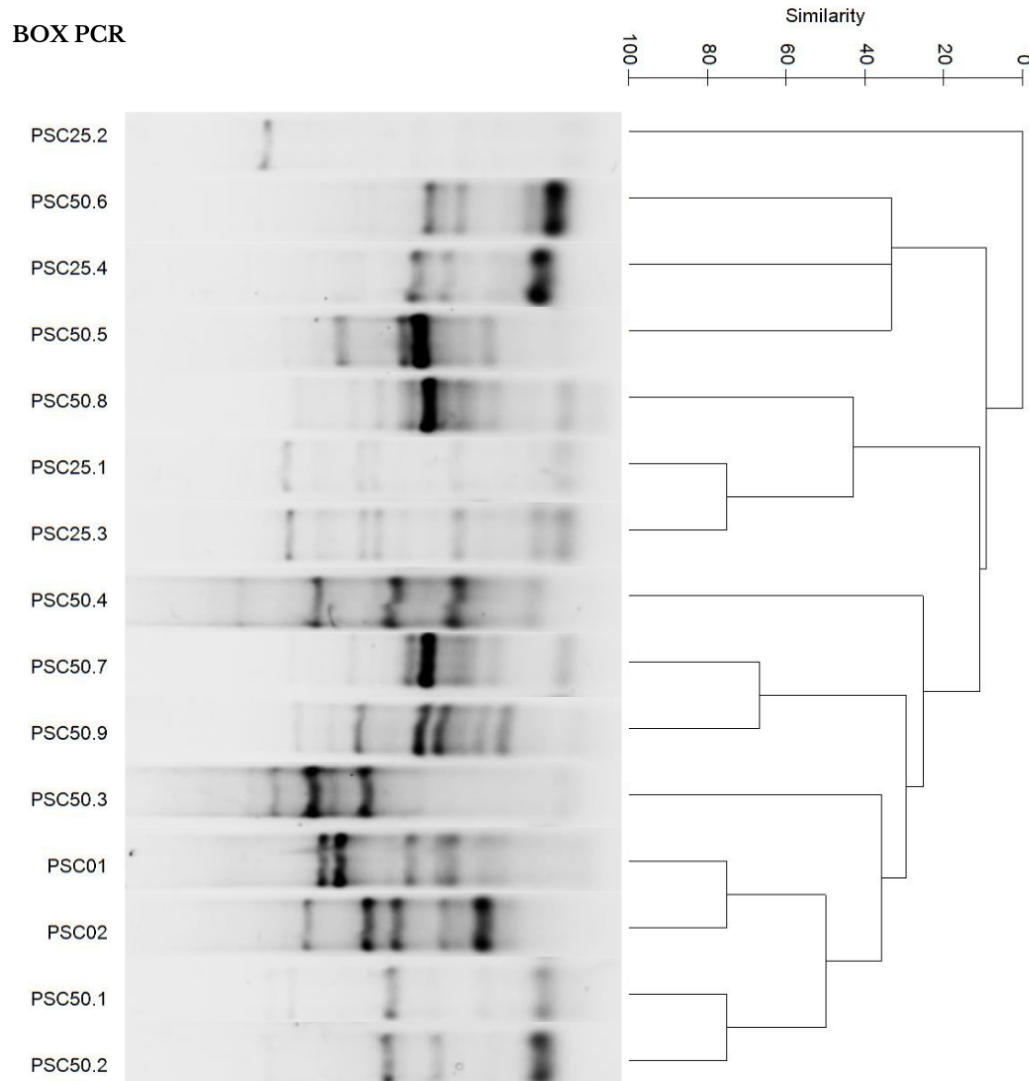
Além disso, a caracterização morfológica pelo método de coloração de Gram apresentou 11 bactérias Gram-positivas e 4 bactérias Gram-negativas (Figura 9).

Figura 9 - Coloração de Gram dos isolados. A-PSC01; B-PSC02; C-PSC25.1; D-PSC25.2; E-PSC25.3; F-PSC25.4; G-PSC50.1; H-PSC50.2; I-PSC50.3; J-PSC50.4; K-PSC50.5; L-PSC50.6; M-PSC50.7; N-PSC50.8; O-PSC50.9.



Os resultados da BOX-PCR apresentaram quatro grupos de filotipos distintos (Figura 10). Nenhum filotipo apresentou similaridade de 95% no padrão de bandas. Este resultado pode ser comparado com estudos anteriores, onde isolados apresentando similaridade inferior a 95% foram considerados diferentes entre si (CID et al., 2016). Outro estudo que pesquisou a diversidade cultivável de bactérias da estação Princesa Elisabeth na Antártica e utilizou a técnica de DGGE para diferenciar os isolados. 796 isolados foram analisados por DGGE e 251 isolados foram selecionados para identificação RNAr 16S e agrupados em 93 filotipos (PEETERS ; ERTZ; WILLEMS, 2011). Pesquisadores estudaram a diversidade cultivável de bactérias heterotróficas na Lagoa Forlidas (Montes Pensacola) e no Lago Lundström (Cordilheira Shackleton), Antártica. No total foram submetidos 785 isolados à análise de DGGE, destes 265 isolados foram considerados diferentes agrupados em 82 filotipos distintos (PEETERS et. al, 2011). Abordagens metagenômicas vem sendo realizadas com a técnica de DGGE a fim de avaliar a diversidade de bactérias em diferentes locais da Antártica (ABRAMOVICH et al., 2012; TEO & WONG, 2014; PAN et al., 2013; CHONG et al., 2009; FAN et al., 2013; NÓBREGA et al., 2023; CUI et al., 2023). Nos estudos foi mostrado que a ação antrópica diminui a diversidade de bactérias em relação a locais que não tiveram este tipo de ação.

Figura 10 – Dendrograma dos padrões de bandas dos isolados por BOX-PCR.



Fonte: Autor.

Segundo Versalovic e colaboradores (1994) o perfil de bandas gerados pelas técnicas de DNA fingerprint é específico para cada cepa bacteriana. Isolados identificados pelo sequenciamento do gene RNAr 16S como pertencentes ao mesmo gênero, apresentaram diferentes perfis de bandas. Isso pode ter relação com as particularidades de cada um dos isolados.

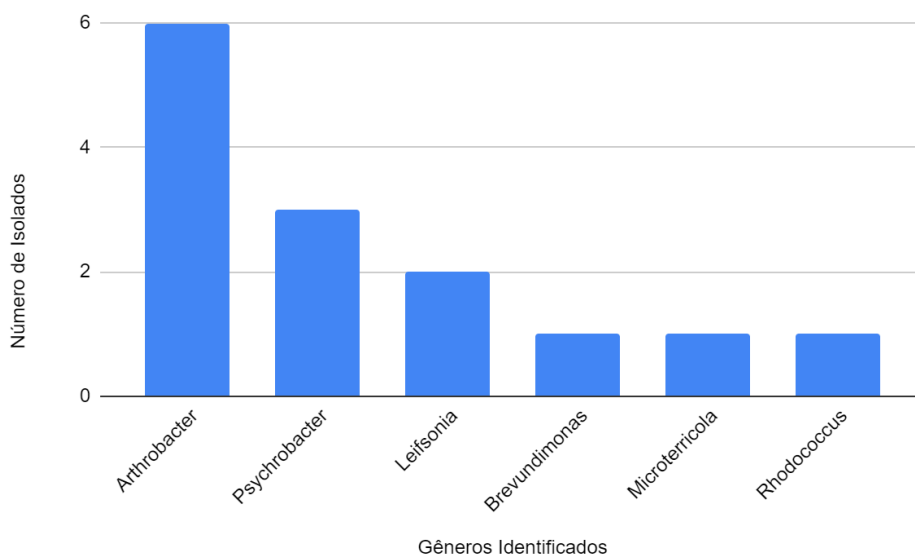
Quatorze isolados foram identificados pelo sequenciamento do gene RNAr 16S (Tabela 3). Foram identificados um total de 6 gêneros (Figura 11): *Arthrobacter*, *Psychrobacter*, *Leifsonia*, *Brevundimonas*, *Microterricola* e *Rhodococcus*, sendo *Arthrobacter* o mais abundante.

Tabela 3 – Identificação dos isolados pela região do RNAr 16S.

Código de identificação	Organismo	Cepa	Porcentagem de identificação	Latitude-longitude	Fonte de isolamento	Primer senso	Número de acesso
PSC01	<i>Leifsonia</i> sp.	PSC01	99,90%	62°17'25.00"S 58°85'60.56"W	Solo	27F	OR167762
PSC02	<i>Microterricola</i> sp.	PSC02	100,00%	62°17'25.00"S 58°85'60.56"W	Solo	27F	OR167763
PCS25.1	<i>Psychrobacter</i> sp.	PCS25.1	100,00%	62°17'25.56"S 58°85'55.83"W	Solo	27F	OR167764
PSC25.2	<i>Psychrobacter</i> sp.	PSC25.2	100,00%	62°17'25.56"S 58°85'55.83"W	Solo	27F	OR167765
PSC25.3	<i>Psychrobacter</i> sp.	PSC25.3	100,00%	62°17'25.56"S 58°85'55.83"W	Solo	27F	OR485320
PSC25.4	<i>Arthrobacter</i> sp.	PSC25.4	100,00%	62°17'25.56"S 58°85'55.83"W	Solo	27F	OR485321
PSC50.2	<i>Rhodococcus</i> sp.	PSC50.2	100,00%	62°17'25.00"S 58°85'50.00"W	Solo	27F	OR485322
PSC50.3	<i>Leifsonia</i> sp.	PSC50.3	100,00%	62°17'25.00"S 58°85'50.00"W	Solo	27F	OR485323
PSC50.4	<i>Brevundimonas</i> sp.	PSC50.4	100,00%	62°17'25.00"S 58°85'50.00"W	Solo	27F	OR485324
PSC50.5	<i>Arthrobacter</i> sp.	PSC50.5	100,00%	62°17'25.00"S 58°85'50.00"W	Solo	27F	OR485325
PSC50.6	<i>Arthrobacter</i> sp.	PSC50.6	100,00%	62°17'25.00"S 58°85'50.00"W	Solo	27F	OR485326
PSC50.7	<i>Arthrobacter</i> sp.	PSC50.7	100,00%	62°17'25.00"S 58°85'50.00"W	Solo	27F	OR485327
PSC50.8	<i>Arthrobacter</i> sp.	PSC50.8	100,00%	62°17'25.00"S 58°85'50.00"W	Solo	27F	OR485328
PSC50.9	<i>Arthrobacter</i> sp.	PSC50.9	100,00%	62°17'25.00"S 58°85'50.00"W	Solo	27F	OR485329

Fonte: Autor

Figura 11 - Gêneros identificados em relação ao número de isolados.



Fonte: Autor.

Pertencente ao filo Actinobacteria, o gênero *Arthrobacter* é comumente encontrado nos solos de todo o mundo e é considerado ubíquo no ambiente antártico, apresentando registro de isolamento a partir de diferentes fontes como solo (SAUL et al., 2005), água do mar (GUPTA et al., 2004), sedimento marinho (PINDI et al., 2010), gelo marinho (BOWMAN et al., 1997), lagos (OSÓRIO et al., 1999; REDDY et al., 2000; REDDY et al., 2002), rochas (DE LA TORRE et al., 2003) e cavernas de gelo (MARGESIN et al., 2004). Também há registros de isolamento a partir de animais como pinguins (WANG et al., 2009), peixes (OSÓRIO et al., 1999) e esponjas (SAVOCA et al., 2019). As bactérias deste gênero são Gram-positivas, aeróbias, não formadoras de esporos e não móveis. Em 2010, Pindi e colaboradores isolaram, a partir de sedimento marinho, a espécie *Arthrobacter antarcticus*, isolado móvel, aeróbia e Gram positiva. O gênero inclui bactérias mesofílicas e psicrófilas com temperatura ótima de crescimento abaixo de 30 °C. Em geral, *Arthrobacter* psicrófilas são diferenciadas pela presença de glicose como açúcar da parede celular e pela incapacidade de hidrolisar o amido (REDDY et al., 2002), além disso, suas colônias frequentemente apresentam forte pigmentação (AISLABIE et al., 2006). Este gênero foi encontrado no estudo com o maior número de isolados, sua abundância pode ser explicada por ser uma bactéria comumente encontrada no ecossistema antártico, obtendo representantes do gênero de diferentes fontes de isolamento.

Bactérias do gênero *Psychrobacter* são Gram-negativas, aeróbias, osmotolerantes, oxidase positivas, não móveis e psicrófilicas ou psicrotolerantes (CHONG et al., 2013; SILVA et al., 2018). Este gênero ocorre prevalentemente em regiões frias, em uma ampla variedade de habitats, incluindo permafrost siberiano e antártico (BAKERMANS et al., 2006; KIM et al., 2012), cordilheiras do Himalaia (SHIVAJI et al. 2011), fossas oceânicas profundas (MARUYAMA et al., 2000), solos ornitogênicos da Antártica (BOWMAN et al., 1996), krill antártico (DENNER et al., 2001) e regiões costeiras antárticas (BOWMAN et al., 1997; BOZAL et al., 2003; SHIVAJI et al., 2004; SHIVAJI et al., 2005). Apesar do gênero também ocorrer em solos tropicais e temperados, a diversidade e abundância de espécies são significativamente baixas quando comparadas ao Ártico e à Antártica (RODRIGUES et al., 2009). Os isolados identificados deste gênero foram obtidos a partir de amostras de solo da geleira Collins. Comparando com outros estudos, pode-se observar que existem diversas fontes de isolamento onde exemplares do gênero *Psychrobacter* podem ser encontrados.

Membros do gênero *Leifsonia* são Gram-positivos, não formadores de esporos, predominantemente catalase positivos e aeróbios, alguns são móveis devido à presença de flagelos peritríquios (EVTUSHENKOET et al., 2000). São mesófilicas com temperatura ideal entre 24-30 °C, apresentando faixa de crescimento 4–42 °C (EVTUSHENKOET et al., 2015). O gênero ocorre em uma variedade de habitats. Em ambientes extremos, há registros de diferentes fontes de isolamento de espécies do gênero *Leifsonia*, incluindo solo a 3500 metros de altitude da Geleira Pindari do Himalaia Indiano (REDDY et al., 2008), solo da Geleira Kafni do Himalaia (PINDI et al., 2009) e solo e oceano antárticos (REDDY et al., 2003; GANZERT et al., 2011). *Leifsonia* sp. foi encontrada neste estudo a partir de amostras de solo da geleira Collins, com temperatura de cultivo a 6 °C. *Leifsonia* é considerado um gênero raro, dessa forma, sua ocorrência quando comparada a gêneros mais dominantes, como *Arthrobacter*, é pouca representativa.

O gênero *Brevundimonas* compartilha uma estreita relação filogenética com o gênero *Pseudomonas* (SEGERS et al., 1994). O gênero *Brevundimonas* é formado por bacilos aeróbios e Gram-negativos (CHONG et al., 2013), e, por serem oligotróficos, seus isolados são comumente encontrados em amostras de habitats marinhos e de água doce (TAYEB et al., 2008). Este estudo identificou um isolado

pertencente ao gênero que foi obtido de uma amostra de solo a 50 metros da geleira Collins.

Membro do filo Actinobacteria, o gênero *Microterricola* é composto por bactérias irregulares em forma de bastonete, Gram-positivas, catalase positivas, oxidase negativas, aeróbias e mesofílicas. São móveis apresentando longos flagelos (MATSUMOTO et al., 2008). *Microterricola viridarii* foi isolado de amostras de fluxos glaciais nas proximidades da geleira Rathong do Sikkim Himalaia. É Gram-positiva, aeróbia, móvel e com pigmentação amarelo-clara. Ela apresentou metabolismo a 4 °C e o número de unidades formadoras de colônias aumentou após tratamento com radiação UV-B (HIMANCHU et al., 2016). Outra cepa de *Microterricola viridarii* foi isolada a partir do solo da Península Fildes, Ilha Rei George, próximo a estação Antártica da Grande Muralha (CHONG et al., 2020). O isolado identificado deste gênero foi obtido a partir de amostras de solo da geleira Collins, com temperatura de isolamento de 6 °C.

O gênero *Rhodococcus* pertence ao filo Actinobacteria e inclui bactérias Gram-positivas, aeróbias, não produtoras de esporos e não móveis (FINNERTY, 1992). Exemplos de *Rhodococcus* spp. foram isolados a partir de solos contaminados com óleo, nos arredores da Base Scott na Antártica (BENJ et al., 2000). Uma cepa do gênero *Rhodococcus* foi isolada do permafrost de alta altitude do Vale McMurdo Dry, Antártica. O isolado apresentou crescimento em baixas temperaturas, chegando a -5 °C (GOORDIAL et al., 2016). *Rhodococcus psychrotolerans* é Gram-positiva, aeróbia, não móvel e tem crescimento ideal entre 16 a 20 °C. Ela foi isolada de amostras da rizosfera de *Deschampsia antarctica*, gramínea coletada na Ilha Rei George, Península Antártica (SILVA et al., 2017). *Rhodococcus antarcticus* foi isolado de amostras da geleira Collins, Antártica. É aeróbia, Gram-positiva, não móvel, não formadora de esporos, com pigmentação rosa e tem crescimento ideal a 20 °C (SUN et al., 2023). O gênero *Rhodococcus* também foi encontrado neste estudo em amostras de solo da Antártica da geleira Collins. O isolado identificado do gênero foi isolado a 50 metros da geleira Collins.

O grupo mais abundante pertence ao filo Actinobacteria, seguido de Proteobacteria. Comparando os resultados deste estudo com a literatura fica evidente que o filo dominante dentro os isolados provenientes de amostras ambientais dependente de cultivo é Actinobacteria (WANG et al., 2015; KIM et al., 2019; BELOV et al., 2020; LIM et al., 2020; LOPES, 2020).

Em relação aos isolados identificados e o gradiente de coleta das amostras de solo da geleira Collins, observa-se que a maioria dos isolados foi obtida das amostras coletadas a 50 metros da geleira, com 9 isolados, seguidos das amostras coletadas a 25 metros com 4 e amostras coletadas a 0 metros com 2. Além disso, pode-se observar a ocorrência de gêneros diferentes ao longo do gradiente (Tabela 4).

Tabela 4 - Relação de gêneros identificados e o gradiente da geleira Collins.

Metros	Número de isolados	Gêneros Identificados
0 m	2	<i>Leifsonia</i> e <i>Microterricola</i> .
25 m	4	<i>Psychrobacter</i> e <i>Arthrobacter</i> .
50 m	9	<i>Arthrobacter</i> , <i>Brevundimonas</i> , <i>Leifsonia</i> e <i>Rhodococcus</i>

Fonte: Autor.

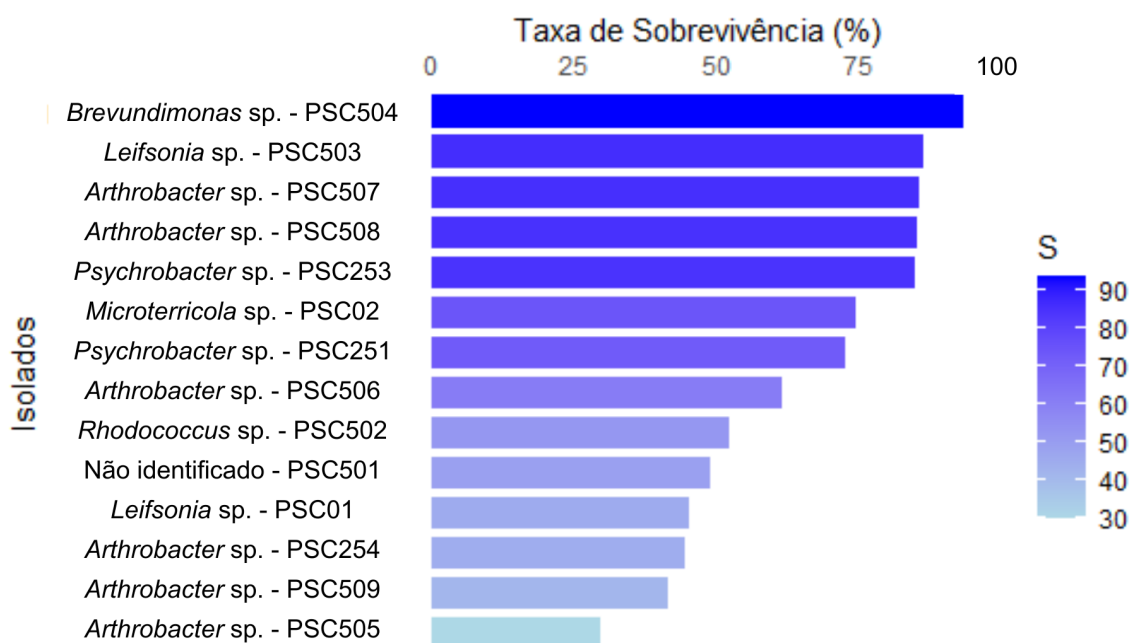
O gênero *Arthrobacter* foi o mais prevalente ao longo dos recuos, estando ausente apenas no recuo de 0 metros da geleira Collins. Este resultado é comparado com a literatura, onde o gênero *Arthrobacter* foi considerado o mais prevalente em diferentes fontes de isolamento (LOPES, 2020; ROGALA et al, 2020; KRUCON et al, 2021). Isso pode ser explicado pelo fato de que *Arthrobacter* é um gênero nutricionalmente versátil e adaptável (ZDANOWSKI et al., 2005). Além disso, o gênero desempenha um papel de população bacteriana pioneira na sucessão ecológica, possibilitando o crescimento de outros gêneros de bactérias ao longo do gradiente da geleira (ZDANOWSKI et al., 2013).

6.2 AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA AO CONGELAMENTO

Para avaliação da tolerância ao congelamento os isolados foram submetidos a um ciclo de congelamento e descongelamento de -6°C por 24 horas e 25°C por 30 minutos. Um total de 14 isolados foram testados quanto à tolerância ao congelamento. Os resultados indicaram que 9 isolados apresentaram taxa de sobrevivência (S) superior a 50%, sendo selecionados para o teste de resistência ao congelamento. O isolado *Brevundimonas* sp. PSC50.4 apresentou a maior taxa de sobrevivência, com 93,50%. Quatro isolados tiveram sobrevivência superior a 80 %,

sendo eles *Leifsonia* sp. PSC50.3 (86,20%), *Arthrobacter* sp. PSC50.7 (85,71%), *Arthrobacter* sp. PSC50.8 (85,29%) e *Psychrobacter* sp. PSC25.3 (84,78%). O restante dos isolados selecionados para o teste obtiveram taxas de sobrevivência ao congelamento de 74,59% (*Microterricola* sp. PSC02), 72,54% (*Psychrobacter* sp. PC25.1), 61,38% (*Arthrobacter* sp. PSC50.6) e 52,27% (*Rhodococcus* sp. PSC50.2). Os isolados PSC50.1 (48,93%), *Leifsonia* sp. PSC01 (45,31%), *Arthrobacter* sp. PSC25.4 (44,57%), *Arthrobacter* sp. PSC50.9 (41,46%) e *Arthrobacter* sp. PSC50.5 (29,70%) obtiveram uma porcentagem de sobrevivência menor que 50% nas contagens de UFC antes e depois do congelamento, não sendo selecionados para o teste de resistência ao congelamento (Figura 12). Dentre os isolados selecionados para o teste de resistência ao congelamento, 3 são Gram-negativos (*Psychrobacter* sp. PSC25.1, *Psychrobacter* sp. PSC25.3 e *Brevundimonas* sp. PSC50.4) e 6 Gram-positivos (*Microterricola* sp. PSC02, *Rhodococcus* sp. PSC50.2, *Leifsonia* sp. PSC50.3, *Arthrobacter* sp. PSC50.6, *Arthrobacter* sp. PSC50.7 e *Arthrobacter* sp. PSC50.8).

Figura 12 – Taxa de sobrevivência dos isolados após ciclo de congelamento.

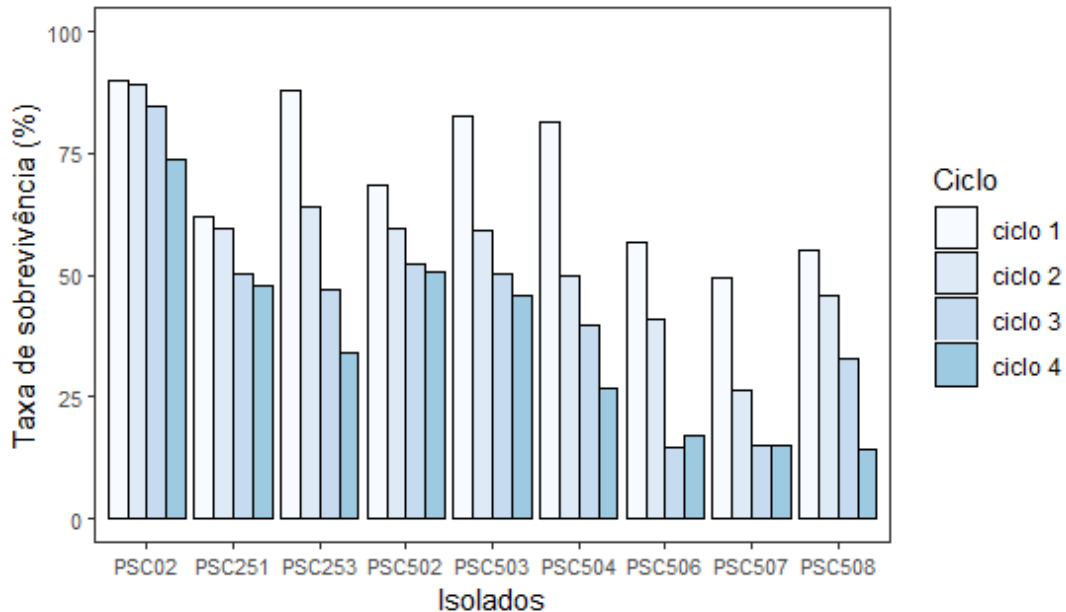


Fonte: Autor.

Analisando a resistência dos isolados a 4 ciclos de congelamento e descongelamento a -18°C e 25°C , quatro isolados apresentaram taxa de sobrevivência superior a 80% no primeiro ciclo, sendo eles *Microterricola* sp. PSC02

(89,91%), *Psychrobacter* sp. PSC25.3 (88,00%), *Leifsonia* sp. PSC503 (82,58%) e *Brevundimonas* sp. PSC50.4 (81,37%). O isolado *Microterricola* sp. PSC02 apresentou uma taxa de sobrevivência de 89,91%, 89,02%, 84,64% e 73,68% durante os quatro ciclos, sendo que 16,23% das células não sobreviveram aos 4 ciclos de congelamento. O isolado *Psychrobacter* sp. PSC251 apresentou taxa de sobrevivência de 61,95%, 59,50%, 50,40% e 47,92% durante os quatro ciclos, sendo que 14,04% das células não sobreviveram aos 4 ciclos de congelamento. O isolado *Psychrobacter* sp. PSC253 apresentou taxa de sobrevivência de 88, 63.99, 47 e 33,97% durante os quatro ciclos, sendo que 54,03% das células não sobreviveram aos 4 ciclos de congelamento. O isolado *Rhodococcus* sp. PSC502 apresentou taxa de sobrevivência de 68,30, 59,50, 52,20 e 50,73% durante os quatro ciclos, sendo que 17,57% das células não sobreviveram aos 4 ciclos de congelamento. O isolado *Leifsonia* sp. PSC50.3 apresentou taxa de sobrevivência de 82,58%, 58,97%, 50,26% e 45,64% durante os quatro ciclos, sendo que 36,94% das células não sobreviveram aos 4 ciclos de congelamento. O isolado *Arthrobacter* sp. PSC50.6 apresentou taxa de sobrevivência de 56,62%, 40,96%, 14,43% e 16,85% durante os quatro ciclos, sendo que 39,77% das células não sobreviveram aos 4 ciclos de congelamento. O isolado *Arthrobacter* sp. PSC50.7 apresentou taxa de sobrevivência de 49,30%, 26,51%, 15,15% e 15,15% durante os quatro ciclos, sendo que 34,15% das células não sobreviveram aos 4 ciclos de congelamento. O isolado *Arthrobacter* sp. PSC50.8 apresentou taxa de sobrevivência de 55,23%, 45,89%, 32,84% e 14,17% durante os quatro ciclos, sendo que 41% das células não sobreviveram aos 4 ciclos de congelamento. O isolado *Arthrobacter* sp. PSC50.7 apresentou taxa de sobrevivência inferior a 50% após o primeiro ciclo de congelamento. Apenas o isolado PSC02 apresentou taxa de sobrevivência superior a 50% após a exposição aos quatro ciclos de congelamento e descongelamento. Além disso, este isolado apresentou a menor variação da taxa de sobrevivência ao longo dos ciclos. Ele pertence ao filo Actinobacteria, que são bactérias Gram-positivas e aeróbicas. No estudo de Himanchu e colaboradores (2016), um exemplar do gênero *Microterricola* foi isolado da geleira Rathong do Sikkim Himalaia. O isolado apresentou crescimento a temperaturas de até 4 °C. Os demais isolados apresentaram resistência ao congelamento após o primeiro ciclo, porém no segundo ciclo há uma queda de sobrevivência de isolados e no terceiro ciclo há um ponto crítico (Figura 13).

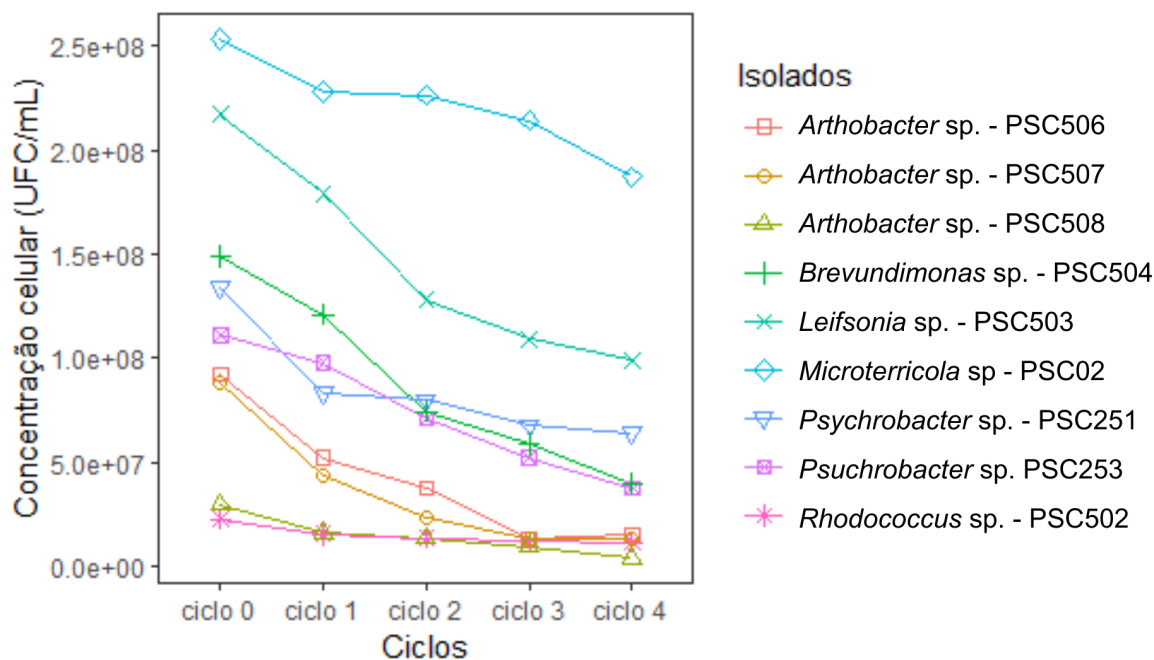
Figura 13 – Taxa de sobrevivência (S) dos isolados ao longo dos quatro ciclos de congelamento e descongelamento.



Fonte: Autor.

Em relação à concentração celular média ao longo dos ciclos de congelamento e descongelamento, observamos o decaimento de UFC/mL a cada ciclo para todos os isolados submetidos ao teste de resistência ao congelamento (Figura 14). Após os quatro ciclos, a concentração celular (UFC/mL) do isolado *Microterrícola* sp. PSC02 passou de $2,53E+08$ para $1,87E+08$ UFC/mL. A concentração celular do isolado PSC25.1 foi de $1,34E+08$ para $6,44E+07$ UFC/mL. O isolado *Psychrobacter* sp. PSC25.3 passou de $1,11E+08$ para $3,77E+07$ UFC/mL. O isolado *Rhodococcus* sp. PSC50.2 decaiu de $2,28E+07$ para $1,16E+07$ UFC/mL. O isolado *Leifsonia* sp. PSC50.3 foi de $2,17E+08$ para $9,89E+07$ UFC/mL. A concentração celular do isolado *Brevundimonas* sp. PSC50.4 passou de $1,49E+08$ para $4,00E+07$ UFC/mL. O isolado *Arthrobacter* sp. PSC50.6 passou de $9,22E+07$ para $1,55E+07$ UFC/mL. O isolado *Arthrobacter* sp. PSC50.7 teve redução de $8,78E+07$ para $1,33E+07$ UFC/mL. O isolado *Arthrobacter* sp. PSC50.8 foi de $2,98E+07$ para $4,22E+06$ UFC/mL após os quatro ciclos de congelamento e descongelamento.

Figura 14 – Média da concentração celular (UFC/mL) dos isolados ao longo dos quatro ciclos de congelamento e descongelamento.



Fonte: Autor.

O isolado mais resistente aos quatro ciclos de congelamento e descongelamento pertence ao gênero *Microterricola* (isolado PSC02). Mesmo após a exposição aos ciclos de congelamento e descongelamento a concentração celular média do isolado ficou acima de $1,00E+08$. O comportamento do gênero *Microterricola* em relação a ciclos de congelamento e descongelamento ainda não havia sido reportado na literatura. O isolado possui pigmentação amarelo-claro, assim como relatado para *Microterricola viridarii* por Himanchu e colaboradores (2016). Um dos fatores que pode ter influenciado a alta taxa de sobrevivência do isolado PSC02 aos ciclos de congelamento é a presença de pigmentação nas suas colônias. Cepas bacterianas isoladas da Antártica foram expostas a 100 ciclos de congelamento e descongelamento de 12 horas. Os resultados do teste comprovaram que os pigmentos carotenóides são capazes de aumentar a resistência ao estresse ambiental (DIESER et al., 2010).

O gênero *Brevundimonas* já tem sido isolado da Antártica, porém há registros apenas de testes caracterizando a resistência à radiação UV dos isolados (CATALÃO et al., 2023). Este é o primeiro estudo onde foi identificado um isolado do gênero *Brevundimonas* e caracterizado quanto a sua resistência ao congelamento. O isolado *Brevundimonas* sp. PSC50.4 apresentou a maior taxa de sobrevivência no

teste de tolerância ao congelamento. Quando exposto aos ciclos de congelamento e descongelamento, a taxa de sobrevivência teve um ponto crítico já no segundo ciclo. Catalão e colaboradores (2023) identificaram a presença da produção de EPS em *Brevundimonas huaxiensis*, isolada de oceano profundo. Exopolissacarídeos são biomoléculas que apresentam diversas funções, entre elas há relatos de promoverem a resistência ao congelamento em células bacterianas (LO GIUDICE et al., 2020). No estudo de Caruso et al. (2018) quatro bactérias foram isoladas de uma esponja marinha e identificadas como produtoras de EPS: *Winogradskyella* spp. CAL384 e CAL396, *Colwellia* sp. GW185 e *Shewanella* sp. CAL606. Todas as bactérias revelaram potencial na produção de EPS com propriedades crioprotetoras. A taxa de sobrevivência celular aumentou na presença de EPS e isso foi evidente apenas após os dois primeiros ciclos de congelamento e descongelamento. Liu et al. (2013) isolaram uma bactéria do gelo marinho do Ártico que foi identificada como *Pseudoalteromonas* sp. cepa SM20310. Esta bactéria produziu um exopolissacarídeo extracelular que aumentou a taxa de sobrevivência a ciclos de congelamento e descongelamento e tolerância à alta salinidade. Com um aumento da concentração de EPS de 0 para 30 mg.mL⁻¹, o número de células sobreviventes de ambas as cepas SM20310 e *E. coli* aumentou após 3, 5 ou 7 ciclos de congelamento-descongelamento. Na presença de 30 mg.mL⁻¹ de EPS, o número de células sobreviventes da cepa SM20310 após 3 ciclos de congelamento-descongelamento foi de 2,65x10⁶ UFC/mL, que foi 7 vezes maior do que o controle. O número de células sobreviventes de *E. coli* após 3 ciclos de congelamento-descongelamento foi de 1,83x10⁶ UFC/mL, que foi 18 vezes maior do que o controle. Apesar da presença do EPS ou ausência, a taxa de sobrevivência das células foi reduzida com um aumento no número de ciclos de congelamento-descongelamento. Os resultados sugerem que o EPS produzido pela bactéria pode auxiliar na adaptação ao gelo marinho que é caracterizado por baixa temperatura, alta salinidade e ciclos de congelamento e descongelamento.

Os demais gêneros identificados possuem relatos na literatura em relação ao seu comportamento quando submetidos a ciclos de congelamento e descongelamento. A partir de amostras da Antártica, isolados foram submetidos a ciclos de congelamento a -80 °C. 1 isolado do gênero *Leifsonia*, 2 do gênero *Rhodococcus*, 4 do gênero *Psychrobacter* e 9 do gênero *Arthrobacter* apresentaram resistência ao congelamento (MOREIRA et al., 2022).

O gênero *Arthrobacter* já foi caracterizado quanto a sua resistência ao congelamento. Muñoz e colaboradores (2017) isolaram a partir de amostras do continente e de ilhas da Antártica, dois isolados identificados como *Arthrobacter* sp. que apresentaram resistência a ciclos de -20 °C e 4 °C. 15 isolados do gênero *Arthrobacter* foram isolados a partir de amostras da Ilha Rei George, e apresentaram enzimas adaptadas ao frio (MOROZOVA et al., 2022). Os isolados PSC50.6 e PSC50.8 apresentaram seu ponto crítico após o segundo ciclo. Já o isolado PSC50.7 teve taxa de sobrevivência inferior a 50% após o primeiro ciclo. Neste estudo, todos os isolados identificados como *Arthrobacter* sp. apresentaram colônias com pigmentação amarela. *Arthrobacter psychrophenicus*, isolada a partir de uma caverna de gelo alpina, apresentou crescimento a 1 °C e colônias com pigmento amarelo. Dieser e colaboradores (2010), observaram que pigmentos carotenóides produzidos pelas colônias bacterianas tinham relação com o aumento da resistência ao estresse provocado por ciclos de congelamento e descongelamento. Aislabe et al. (2006) testaram 11 bactérias heterotróficas da Antártica a estressores ambientais, como o congelamento e descongelamento. Os resultados mostraram que isolados Gram positivos foram mais tolerantes aos ciclos de congelamento-descongelamento do que os isolados Gram-negativos. Foram testados 6 isolados, destes a bactéria *Arthrobacter* P1 se manteve resistente durante 10 ciclos de congelamento-descongelamento. P19 e P23 foram resistentes como menos de 30% de células permanecendo viáveis após 10 ciclos de congelamento-descongelamento. Os isolados P4 e P7 não foram resistentes ao congelamento-descongelamento com apenas 1 e 5%, respectivamente.

Pesquisadores têm buscado entender a sobrevivência dos microrganismos aos ciclos de congelamento e descongelamento na Antártica. O primeiro estudo sobre a tolerância ao congelamento da Antártica foi feito com a bactéria *Sphingomonas* sp. Ant 17. Os resultados mostraram que a bactéria Ant 17 foi tolerante a 10 ciclos de congelamento e descongelamento com 17% de sobrevivência, comparadas a 1% de *E. coli* (BARANIECKI et al., 2002). No mesmo ano, Panicker e colaboradores (2002) caracterizaram a tolerância ao congelamento da bactéria antártica *Pseudomonas* sp. 30-3. Os resultados mostraram um aumento da sobrevivência ao congelamento quando a bactéria foi exposta a 4 °C com 89% de sobrevivência, comparada a 39% por culturas cultivadas a 22 °C. Os autores concluíram que a incubação a 4 °C da bactéria aumenta a sobrevivência das células

após o congelamento. Kim & Yin (2007) investigaram bactérias da Antártica tolerantes ao congelamento com potencial para produzir EPS. Vinte e cinco cepas bacterianas foram isoladas de sedimentos obtidos da Ilha Rei George. Das vinte e cinco cepas, sete apresentaram potencial na produção de EPS com propriedades crioprotetoras. A cepa KOPRI 21653 foi identificada como *Pseudoalteromonas arctica* pela análise do gene RNAr 16S e selecionada para o teste de congelamento. A atividade crioprotetora de P-21653 foi caracterizada por um teste de viabilidade de *E. coli*. Na presença de 0,1% (p/v) de P-21653, a taxa de sobrevivência das células de *E. coli* foi de 82,6% em três repetições de ciclos de congelamento-descongelamento. Shivaji et al. (2013) testaram 6 isolados de amostra de gelo da Antártica quanto a tolerância a ciclos de congelamento e descongelamento. Em comparação com o congelamento contínuo, as seis culturas mostraram mais resistência aos ciclos de congelamento e descongelamento, mostrando uma sobrevivência de >10% após 20 ciclos de congelamento e descongelamento. Essa capacidade de resistir aos ciclos de congelamento-descongelamento é uma estratégia adaptativa para a sobrevivência em núcleos de gelo. Os dados do perfil de ácidos graxos também suportam a hipótese de que esses isolados se adaptam a um ambiente frio por possuírem ácidos graxos insaturados. Villarreal et al. (2018) analisaram a tolerância ao congelamento e a produção de proteínas anticongelantes em leveduras da Antártica. Dezoito isolados foram testados, destes, 1 isolado identificado como *Goffeauzyma gastrica* produziu uma proteína anticongelante que manteve sua atividade após ciclos de congelamento.

Além da Antártica, o Ártico também tem mostrado o potencial de microrganismos tolerantes ao congelamento. Uma nova espécie de bactéria tolerante ao frio (cepa OR1) foi identificada como: *Planococcus halocryophilus* isolada de amostras da camada ativa de permafrost do Ártico canadense. A espécie é aeróbia, Gram-positiva, móvel e cocóide. Em relação às condições de crescimento, a cepa é capaz de crescer abaixo de zero (abaixo de 10 °C a 37 °C) e com alta salinidade (0-19% NaCl), com crescimento ótimo de 25 °C e salinidade de 2% NaCl (Mykytczuk et al., 2012). Esta cepa ainda pode crescer e se dividir a -15 °C e é metabolicamente ativa a -25 °C em microcosmos de permafrost. Em relação aos mecanismos de adaptação ao frio dessa bactéria, é possível destacar a presença de ácidos graxos ramificados na membrana plasmática, flexibilidade proteica (maior

distribuição de aminoácidos) e genes de captação de osmólitos (genes Opu e Pro). A plasticidade genética de *P. halocryphilus* revela que esta espécie é altamente adaptada a ambientes extremos como o permafrost ártico, que tem temperatura de -16°C, permitindo assim o crescimento de microrganismos e sendo considerado um ecossistema microbiano (Mykytczuk et al., 2013). Singh et al. (2013) estudaram o efeito da temperatura fria em cinco leveduras isoladas de amostras de gelo glacial da geleira Svalbard. A análise da sequência dos isolados, utilizando o domínio D1/D2, identificou cinco espécies de leveduras: *Cryptococcus adeliensis* (MLB-18 JX192655), *Cryptococcus albidosimilis* (MLB-19 JX192656), *Cryptococcus saitoi* (MLB-22 JX192659), *Rhodospiridium lusitaniae* (MLB-20 JX192657) e *Rhodotorula mucilaginosa* (MLB-27 JX192664). Em relação a temperatura, todas as cepas foram capazes de crescer de 1 a 20 °C e a quantidade de enzimas (amilase, lipase, protease, catalase, urease e celulase) varia conforme a temperatura. Assim como o aumento da proporção de ácidos graxos insaturados com a diminuição da temperatura. As cepas foram testadas quanto a presença de proteínas anticongelantes, porém os filtrados intra e extracelular das culturas não apresentaram nenhuma atividade anticongelante. Os autores concluem que esses isolados são adaptados ao frio principalmente pela secreção de enzimas e não devido a proteínas anticongelantes.

E por fim, em um estudo, três amostras de solo foram coletadas no noroeste de Calgary, Alberta, Canadá, onde ocorre o processo natural de congelamento, usadas para tratar 48 ciclos de congelamento e degelo. O número de UFC/mL foi determinado a cada 3, 12, 18 ou 24 e 48 ciclos. Os resultados mostraram que a contagem de células diminuiu a cada ciclo de congelamento. Além da diminuição dos números de UFC/mL, o congelamento alterou a morfologia da colônia (menor diâmetro) e a diversidade de isolados sequenciados do gene RS 16S. Dez cepas sobreviveram ao ciclo de congelamento e foram selecionadas e identificadas a partir dos gêneros: *Buttiauxella gaviniae*, *Acinetobacter* sp., *Carnobacterium piscícola*, *Enterococcus flavescens*, *Enterococcus casseliflavus* e *Chryseobacterium* sp. As cepas selecionadas foram testadas quanto à atividade de inibição de recristalização. A cultura da cepa C14 *Chryseobacterium* sp. apresentou atividade de IR em concentrações de 0,002 a 2 mg.mL⁻¹, em comparação com o controle positivo de peixes AFP. Para confirmar a ação da proteína, foi realizado o tratamento com

proteínase K. As culturas de C14 e proteína de peixe após este tratamento não apresentaram atividade de IR (WALKER et al., 2006).

Mesmo sabendo que existe uma grande importância biotecnológica de microrganismos tolerantes ao congelamento, poucos estudos têm apresentado e caracterizado as substâncias produzidas com efeito crioprotetor. Por conta disso, é necessário que mais estudos sejam realizados para elucidar de forma mais precisa o funcionamento biológico desses microrganismos. Estudos na busca de substâncias crioprotetoras como proteínas anticongelantes, proteínas nucleantes de congelamento, exopolissacarídeos, pigmentos e enzimas adaptadas ao frio vêm se intensificando e criando estratégias para mapear a presença de substâncias crioprotetoras com o método de tolerância ao congelamento.

7 CONCLUSÕES

As amostras de solo da Geleira Collins, Antártica, possuem bactérias cultiváveis pertencentes aos gêneros *Arthrobacter*, *Psychrobacter*, *Leifsonia*, *Brevundimonas*, *Microterricola* e *Rhodococcus*.

Três isolados do gênero *Arthrobacter* (PSC50.6, PSC50.7 e PSC50.8), dois *Psychrobacter* (PSC25.1 e PSC25.3) e os isolados *Leifsonia* sp. PSC50.3, *Brevundimonas* sp. PSC50.4, *Rhodococcus* sp. PSC50.2 e *Microterricola* sp. PS02 apresentaram resistência ao congelamento.

Isolados pertencentes ao mesmo gênero (*Arthrobacter*, *Psychrobacter* e *Leifsonia*) apresentaram comportamentos diferentes aos ciclos de congelamento e descongelamento, podendo ou não ter resistência.

O teste de resistência ao congelamento indicou um isolado resistente aos quatro ciclos (PSC02) identificado a nível de gênero como *Microterricola*. Os resultados obtidos neste estudo em relação a este gênero não haviam sido descritos na literatura.

Os resultados obtidos neste estudo podem contribuir para compreensão dos efeitos dos ciclos de congelamento nas comunidades microbianas de solo da Antártica. Além disso, as bactérias da Antártica produzem moléculas crioprotetoras que podem ser aplicadas em diferentes setores da biotecnologia envolvendo a preservação de produtos no processo de congelamento.

REFERÊNCIAS

- ABRAMOVICH et al. Short Communication T-RFLP Fingerprinting Analysis of Bacterial Communities in Debris Cones. v. 248, n. November 2011, p. 244–248, 2012.
- AISLABIE, J. M.; CHHOUR, K. L.; SAUL, D. J.; MIYAUCHI, S.; AYTON, J.; PAETZOLD, R. F.; BALKS, M. R. Dominant bacteria in soils of Marble Point and Wright Valley, Victoria Land, Antarctica. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 38, n. 10, p. 3041–3056, 2006.
- AISLABIE, J. M.; BROADY, P. A.; SAUL, D. J. Culturable aerobic heterotrophic bacteria from high altitude , high latitude soil of La Gorce Mountains (86 ° 30 ' S , 147 ° W), Antarctica. v. 18, n. 3, p. 313–321, 2006.
- ALI, P.; SHAH, A. A.; HASAN, F.; HERTKORN, N.; GONSIOR, M.; SAJJAD, W.; CHEN, F. A Glacier Bacterium Produces High Yield of Cryoprotective Exopolysaccharide. *Frontiers in Microbiology*, v. 10, n. February, p. 1–16, 2020.
- AMIR, G. et al. Preservation of myocyte structure and mitochondrial integrity in subzero cryopreservation of mammalian hearts for transplantation using antifreeze proteins - An electron microscopy study. *European Journal of Cardio-thoracic Surgery*, v. 24, n. 2, p. 292–297, 2003.
- BAKERMANS, C.; PONDER, M. A.; VISHNIVETSKAYA, T.; GILICHINSKY, D.; THOMASHOW, M. F.; TIEDJE, J. M. *Psychrobacter arcticus* sp . nov ., isolated from Siberian permafrost. p. 1285–1291, 2006.
- BARANIECKI, C. A.; AISLABIE, J.; FOGHT, J. M. Characterization of *Sphingomonas* sp. Ant 17, an aromatic hydrocarbon-degrading bacterium isolated from Antarctic soil. *Microbial Ecology*, v. 43, n. 1, p. 44–54, 2002.
- BARRETT, J. Thermal hysteresis proteins. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, v. 33, n. 2, p. 105–117, 2001.
- BEJ, A. K.; AISLABIE, J.; RHODOCOCCLUS, C.; SAUL, D. Cold-tolerant alkane-degrading *Rhodococcus* species from Antarctica. p. 100–105, 2000.
- BELOV, A. A.; CHEPTSOV, V. S.; MANUCHAROVA, N. A.; EZHELEV, Z. S. Bacterial Communities of Novaya Zemlya Archipelago Ice and Permafrost. 2020.
- BENDIA, A. G. et al. Surviving in hot and cold: psychrophiles and thermophiles from deception island volcano, Antarctica. *Extremophiles* v. 22, p. 917–929, 2018.
- BIAŁKOWSKA, A.; MAJEWSKA, E.; OLCZAK, A.; TWARDA-CLAPA, A. Ice binding proteins: Diverse biological roles and applications in different types of industry. *Biomolecules*, v. 10, n. 2, 2020.

BOWMAN, J. P.; CAVANAGH, J.; AUSTIN, J. J.; SANDERSON, K. Novel Psychrobacter Species from Antarctic Ornithogenic Soils. n. 26, p. 841–848, 1996.

BOWMAN, J. P.; MCCAMMON, S. A.; BROWN, M. V.; NICHOLS, D. S.; MCMEEKIN, T. A. Diversity and association of psychrophilic bacteria in antarctic sea ice. Applied and Environmental Microbiology, v. 63, n. 8, p. 3068–3078, 1997.

BOZAL et al. JESU, M.; TUDELA, E. Characterization of several Psychrobacter strains isolated from Antarctic environments and description of Psychrobacter luti sp. nov. and Psychrobacter fozii sp. nov. Printed in Great Britain. p. 1093–1100, 2003.

BRASLAVSKY, I.; DRORI, R. LabVIEW-operated Novel Nanoliter Osmometer for Ice Binding Protein Investigations. Journal of Visualized Experiments, v. 4, n. 72, p. 1–6, 2013.

CASANUEVA, A.; TUFFIN, M.; CARY, C.; COWAN, D. A. Molecular adaptations to psychrophily: The impact of “omic” technologies. Trends in Microbiology, v. 18, n. 8, p. 374–381, 2010.

CARRASCO, J. F. Decadal Changes in the Near-Surface Air Temperature in the Western Side of the Antarctic Peninsula. Atmospheric and Climate Sciences, v. 03, n. 03, p. 275–281, 2013.

CARUSO, C.; RIZZO, C.; MANGANO, S.; POLI, A.; DONATO, D.; FINORE, I. crossm Production and Biotechnological Potential of Extracellular Polymeric Substances from Sponge-Associated Antarctic Bacteria. v. 84, n. 4, p. 1–18, 2018.

CATALÃO, M.; FERNANDES, M.; GALDON, L.; RODRIGUES, C. F.; SOBRAL, R. G.; GAUD, S. P.; TORRES, C. A. V. Exopolysaccharide Production from Marine-Derived Brevundimonas huaxiensis Obtained from Estremadura Spur Pockmarks Sediments Revealing Potential for Circular Economy. 2023.

CID, F. P.; INOSTROZA, N. G.; GRAETHER, S. P.; BRAVO, L. A.; JORQUERA, M. A. Bacterial community structures and ice recrystallization inhibition activity of bacteria isolated from the phyllosphere of the Antarctic vascular plant Deschampsia antarctica. Polar Biology, v. 40, n. 6, p. 1319–1331, 2017.

CHONG, C.; MICHAEL, C.; PETER, J. D.; TAN, G. Y. A.; WONG, R. C. S.; TAN, I. K. P. Environmental influences on bacterial diversity of soils on Signy Island, maritime Antarctic. p. 1571–1582, 2009.

CHONG, C. W.; GOH, Y. S.; CONVEY, P.; PEARCE, D.; TAN, I. K. P. Spatial pattern in Antarctica: What can we learn from Antarctic bacterial isolates? Extremophiles, v. 17, n. 5, p. 733–745, 2013.

CHRISTNER, B. C. Bioprospecting for microbial products that affect ice crystal formation and growth. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 85, n. 3, p. 481–489, 2010.

COCHET, N., & WIDEHEM, P. Ice crystallization by *Pseudomonas syringae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 54, n. 2, p. 153–161, 2000.

CONG, B.; YIN, X.; DENG, A.; SHEN, J.; TIAN, Y.; WANG, S.; YANG, H. Diversity of Cultivable Microbes From Soil of the Fildes Peninsula, Antarctica, and Their Potential Application. *Frontiers in Microbiology*, v. 11, p. 1–13, 2020.

CORREA, T.; ABREU, F. Antarctic microorganisms as sources of biotechnological products. *Physiological and Biotechnological Aspects of Extremophiles*, n. i, p. 269–284, 2020.

COOK, A. J.; HOLLAND, P. R.; MEREDITH, M. P.; MURRAY, T.; LUCKMAN, A.; VAUGHAN, D. G. Ocean forcing of glacier retreat in the western Antarctic Peninsula. *Science*, v. 353, n. 6296, p. 283–286, 2016.

CUI, S.; DU, J.; ZHU, L.; XIN, D.; XIN, Y. Analysis of Microbial Diversity in South Shetland Islands and Antarctic Peninsula Soils Based on Illumina High-Throughput Sequencing and Cultivation-Dependent Techniques. 2023.

DE LA TORRE, J. R.; GOEBEL, B. M.; FRIEDMANN, E. I.; PACE, N. R. Microbial diversity of cryptoendolithic communities from the McMurdo Dry Valleys, Antarctica. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 69, n. 7, p. 3858–3867, 2003.

DE MAAYER, P.; ANDERSON, D.; CARY, C.; COWAN, D. A. Some like it cold: Understanding the survival strategies of psychrophiles. *EMBO Reports*, v. 15, n. 5, p. 508–517, 2014.

DENNER et al. VERLAG, F.; ENNER, E. W. B. M. D.; ARK, B. A. M.; USSE, H. A. N. S. Ü. B.; URKIEWICZ, M. A. T.; UBITZ, W. E. L. *Psychrobacter proteolyticus* sp. nov., a Psychrotrophic, Halotolerant Bacterium Isolated from the Antarctic Krill *Euphausia superba* Dana, Excreting a Cold-Adapted Metalloprotease. v. 53, n. 2001, p. 44–53, 2020.

DIESER, M.; GREENWOOD, M.; FOREMAN, C. M. Carotenoid pigmentation in Antarctic heterotrophic bacteria as a strategy to withstand environmental stresses. *Arctic, Antarctic, and Alpine Research*, v. 42, n. 4, p. 396–405, 2010.

DO, H.; KIM, S. J.; KIM, H. J.; LEE, J. H. Structure-based characterization and antifreeze properties of a hyperactive ice-binding protein from the Antarctic bacterium *Flavobacterium frigoris* PS1. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, v. 70, n. 4, p. 1061–1073, 2014.

DROTZ, S.; SPARRMAN, T.; NILSSON, M. B.; SCHLEUCHER, J.; ÖQUIST, M. G. Both catabolic and anabolic heterotrophic microbial activity proceed in frozen soils. v. 107, n. 49, p. 21046–21051, 2010.

DUARTE, R. T. D. *Micro-Organismos Em Ambientes Criogênicos: Gelo Glacial, Solos Expostos Por Recuo De Geleiras, E Permafrost Polares*. p. 201, 2010.

DUARTE, R. T. D.; NÓBREGA, F.; NAKAYAMA, C. R.; PELLIZARI, V. H. Brazilian research on extremophiles in the context of astrobiology. v. 11, n. 4, p. 325–333, 2012.

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

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

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

FAN, J.; LI, L.; HAN, J.; MING, H. Diversity and structure of bacterial communities in Fildes Peninsula, King George Island. p. 1385–1399, 2013.

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

FENG, S.; POWELL, S. M.; WILSON, R.; BOWMAN, J. P. Extensive gene acquisition in the extremely psychrophilic bacterial species *Psychroflexus torquis* and the link to sea-ice ecosystem specialism. *Genome Biology and Evolution*, v. 6, n. 1, p. 133–148, 2014.

FINNERTY, W. R. The genus *Rhodococcus*. p. 193–218, 1992.

GANZERT, L.; BAJERSKI, F.; MANGELSDORF, K.; WAGNER, D. *Leifsonia psychrotolerans* sp. nov., a psychrotolerant species of the family Microbacteriaceae from Livingston Island, p. 1938–1943, 2011.

GILBERT, J. A.; DAVIES, P. L.; LAYBOURN-PARRY, J. A hyperactive, Ca²⁺-dependent antifreeze protein in an Antarctic bacterium. v. 245, p. 67–72, 2005.

GLICK, B. R.; BASHAN, Y. Genetic manipulation of plant growth-promoting bacteria to enhance biocontrol of phytopathogens. *Biotechnology Advances*, v. 15, n. 2, p. 353–378, 1997.

GOORDIAL, J.; RAYMOND-BOUCHARD, I.; ZOLOTAROV, Y.; BETHENCOURT, L. De; RONHOLM, J.; SHAPIRO, N.; WOYKE, T.; STROMVIK, M.; GREER, C. W.; BAKERMANS, C.; WHYTE, L. Cold adaptive traits revealed by comparative genomic analysis of the eurypsychrophile *Rhodococcus* sp. JG3 isolated from high elevation McMurdo Dry Valley permafrost, Antarctica. n. October 2015, p. 1–11, 2016.

GREEN, R. L., & WARREN, G. J. Physical and functional repetition in a bacterial ice nucleation gene. *Nature*, v. 317, n. 6038, p. 645–648, 1985.

GREEN M.R. & SAMBROOK J. Isolation of High-Molecular-Weight DNA Using Organic Solvents - A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, U.S.A, 2017.

GRIFFITH, M.; EWART, K. V. Antifreeze proteins and their potential use in frozen foods. *Biotechnology advances*, v. 13, n. 3, p. 375–402, 1995.

GRIFFITH, M.; YAISH, M. W. F. Antifreeze proteins in overwintering plants: A tale of two activities. *Trends in Plant Science*, v. 9, n. 8, p. 399–405, 2004.

GUPTA, P.; REDDY, G. S. N.; DELILLE, D.; SHIVAJI, S. *Arthrobacter gangotriensis* sp. nov. and *Arthrobacter kerguelensis* sp. nov. from Antarctica. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 54, n. 6, p. 2375–2378, 2004.

HANADA, Y.; NISHIMIYA, Y.; MIURA, A.; TSUDA, S.; KONDO, H. Hyperactive antifreeze protein from an Antarctic sea ice bacterium *Colwellia* sp. has a compound ice-binding site without repetitive sequences. v. 281, p. 3576–3590, 2014.

HIGHTOWER, R. et al. Expression of antifreeze proteins in transgenic plants. *Plant Molecular Biology*, v. 17, n. 5, p. 1013–1021, 1991.

HIMANCHU; SWARNKAR, M. K.; SINGH, D.; KUMAR, R. First complete genome sequence of a species in the genus *Microterricola*, an extremophilic cold active enzyme producing bacterial strain ERGS5 : 02 isolated from Sikkim Himalaya. *Journal of Biotechnology*, v. 222, p. 17–18, 2016.

KANDROR, O.; DELEON, A.; GOLDBERG, A. L. Trehalose synthesis is induced upon exposure of *Escherichia coli* to cold and is essential for viability at low temperatures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 99, n. 15, p. 9727–9732, 2002.

KAWAHARA, H., MANO, Y., & OBATA, H. Purification and characterization of extracellular ice-nucleating matter from *erwinia uredovora* kuin-3. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, v. 57, n. 9, p. 1429–1432, 1993.

KAWAHARA, H., MANO, Y., HAMADA, R., & OBATA, H. Role of Spermidine in the Ice-Nucleating Activity of the EIM from *Erwima uredovora* Kuin-3. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, v. 58, n. 12, p. 2201–2206, 1994.

KAWAHARA, H., IKUGAWA, H., & OBATA, H. Isolation and characterization of a marine ice-nucleating bacterium, *Pseudomonas* sp. KUIN-5, which produces cellulose and secretes it in the culture broth. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, v. 60, n. 9, p. 1474–1478, 1996.

KAWAHARA, H., NAGAE, I., & OBATA, H. Purification and characterization of a new anti-nucleating protein isolated from *Acinetobacter calcoaceticus* KINI-1. *Biocontrol Science*, v. 1, n. 1, p. 11–17, 1996.

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

KIM, S. J.; SHIN, C.; HONG, G.; LEE, M.; CHOI, I.; PARK, H. Genome Sequence of a Novel Member of the Genus Psychrobacter. p. 2001, 2012.

KIM, H. J.; LEE, J. H.; HUR, Y. B.; LEE, C. W.; PARK, S. H.; KOO, B. W. Marine antifreeze proteins: Structure, function, and application to cryopreservation as a potential cryoprotectant. *Marine Drugs*, v. 15, n. 2, 2017.

KIM, M.; LIM, H.; HYUN, C.; CHO, A.; NOH, H.; GYU, S.; KIM, O. Local-scale variation of soil bacterial communities in ice-free regions of maritime Antarctica. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 133, n. January, p. 165–173, 2019.

KIM, S., J. & YIN, J., H. Cryoprotective properties of exopolysaccharide (P-21653) produced by the antarctic bacterium, *Pseudoalteromonas arctica* KOPRI 21653. *Journal of Microbiology*, v. 45, n. 6, p. 510–514, 2007.

KNIGHT, C. A.; DUMAN, J. G. Inhibition of recrystallization of ice insect thermal hysteresis proteins: a possible cryoprotective role. *Cryobiology*, v. 23, n.3, p. 256-262, jun. 1986.

KNIGHT, C. A.; HALLETT, J.; DEVRIES, A. L. Solute effects on ice recrystallization: An assessment technique. *Cryobiology*, v. 25, n. 1, p. 55–60, 1988.

KOBASHIGAWA, Y.; NISHIMIYA, Y.; MIURA, K.; OHGIYA, S. A part of ice nucleation protein exhibits the ice-binding ability. v. 579, p. 1493–1497, 2005.

KRUCON, T.; DZIEWIT, L.; DREWNIAK, L. Insight Into Ecology, Metabolic Potential, and the Taxonomic Composition of Bacterial Communities in the Periodic Water Pond on King George Island (Antarctica). *Frontiers in Microbiology*, v. 12, n. October, p. 1–16, 2021.

KWON, Y. W. et al. Development of freeze-thaw tolerant *Lactobacillus rhamnosus* gg by adaptive laboratory evolution. *Frontiers in Microbiology*, v. 9, p. 1–10, 2018.

LANE, D. J. 16S/23S rRNA sequencing. In: *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. Stackebrandt, E., Goodfellow, M., eds., John Wiley and Sons, New York, NY, p. 115-175. 1991.

LIAO, L.; GAO, S.; XU, Y.; SU, S.; WEN, J.; YU, Y.; CHEN, B. Complete genome sequence of *Marinomonas arctica* BSI20414, a giant antifreeze protein-producing bacterium isolated from Arctic sea ice. *Marine Genomics*, v. 57, 2021.

LIM, P. P.; PEARCE, D. A.; CONVEY, P.; LEE, L. S.; CHAN, K. G.; TAN, G. Y. A. Effects of freeze-thaw cycles on High Arctic soil bacterial communities. *Polar Science*, v. 23, p. 100487, 2019.

LIU et al. Structure and Ecological Roles of a Novel Exopolysaccharide from the. 2012.

LO GIUDICE, A.; POLI, A.; FINORE, I.; RIZZO, C. Peculiarities of extracellular polymeric substances produced by Antarctic bacteria and their possible applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 104, n. 7, p. 2923–2934, 2020.

LOPES, J. C. Produção de proteínas anticongelantes (AFP) de microrganismos isolados da Antártica e seu uso em produtos nas áreas da saúde e indústria. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Biociências UFSC, Florianópolis-SC, 114p, 2020.

MANGIAGALLI, M.; BAR-DOLEV, M.; TEDESCO, P.; NATALELLO, A.; KALEDA, A.; BROCCA, S.; PASCALE, D. De; PUCCIARELLI, S.; MICELI, C.; BRASLAVSKY, I.; LOTTI, M. Cryo-protective effect of an ice-binding protein derived from Antarctic bacteria. v. 284, p. 163–177, 2017.

MARGARITIS, A., & BASSI, A. S. Principles and biotechnological applications of bacterial ice nucleation. *Critical Reviews in Biotechnology*, V. 11, n. 3, p. 277–295, 1991.

MARGESIN, R.; SCHUMANN, P.; SPRÖER, C.; GOUNOT, A. M. *Arthrobacter psychrophenicus* sp. nov., isolated from an alpine ice cave. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 54, n. 6, p. 2067–2072, 2004.

MARUYAMA, A.; HONDA, D.; YAMAMOTO, H. Phylogenetic analysis of psychrophilic bacteria isolated from the Japan Trench, including a description of the deep-sea species *Psychrobacter pacificensis* sp. nov. p. 835–846, 2000.

MATSUMOTO, A.; YAMADA, M.; SATOSHI, O. *Microterricola viridarii* gen. nov., sp. nov., a new member of the family Microbacteriaceae. p. 1019–1023, 2008.

MEISNER, A.; SNOEK, B. L.; NESME, J.; DENT, E.; JACQUIOD, S.; CLASSEN, A. T.; PRIEMÉ, A. Soil microbial legacies differ following drying-rewetting and freezing-thawing cycles. *ISME Journal*, v. 15, n. 4, p. 1207–1221, 2021.

MICHIGAMI, Y., ABE, K., IWABUCHI, K., OBATA, H. & ARAI, S. Cloning and Sequencing of an Ice Nucleation Active Gene of *Erwinia uredovora*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, v. 58, n. 4, p. 762–764, 1994.

MOREIRA et al. Potential for resistance to freezing by non-virulent bacteria isolated from Antarctica. v. 94, 2022.

MOROZOVA, O. V.; ANDREEVA, I. S.; YU, V.; PECHURKINA, N. I.; PUCHKOVA, L. I.; SARANINA, I. V.; EMELYANOVA, E. K.; KAMYNNINA, T. P. Antibiotic resistance and cold-adaptive enzymes of antarctic culturable bacteria from King George Island. *Polar Science*, v. 31, n. October 2021, p. 100756, 2022.

MYKYTCZUK, N. C. S.; WILHELM, R. C.; WHYTE, L. G. *Planococcus halocryophilus* sp. nov., an extreme sub-zero species from high Arctic permafrost. p. 1937–1944, 2012.

MYKYTCZUK, N. C. S. et al. Bacterial growth at -15 °C; molecular insights from the permafrost bacterium *Planococcus halocryophilus* Or1. *ISME J.* v. 7, p. 1211–1226, 2013.

NICHOLS, D.; BOWMAN, J.; SANDERSON, K.; MANCUSO, C.; NICHOLSTS, P. D. Developments with Antarctic microorganisms : culture collections, bioactivity screening , taxonomy , PUFA production and cold-adapted enzymes Nichols *?, Tom Lewis *, Tom McMeekin * tand. p. 240–246, 1999.

NÓBREGA, N. G.; AVELINO, P.; ANDRADE, M. De; COPERTINO, S.; GORMAN, D.; ZHUANG, W.; SONG, J.; ANDREOTE, F. D.; OTERO, L.; OSO, T. Bridging soil biogeochemistry and microbial communities (archaea and bacteria) in tropical seagrass meadows. n. September, p. 1–17, 2023.

OBATA, H., MURYOI, N., KAWAHARA, H., YAMADE, K., & NISHIKAWA, J. Identification of a novel ice-nucleating bacterium of antarctic origin and its ice nucleation properties. *Cryobiology*, v. 38, n. 2, p. 131–139, 1999.

OLIVA, M.; RUIZ-FERNÁNDEZ, J. Coupling patterns between para-glacial and permafrost degradation responses in Antarctica. *Earth Surface Processes and Landforms*, v. 40, n. 9, p. 1227–1238, 2015.

OSMANOĞLU, B.; BRAUN, M.; HOCK, R.; NAVARRO, F. J. Surface velocity and ice discharge of the ice cap on King George Island, Antarctica. *Annals of Glaciology*, v. 54, n. 63, p. 111–119, 2013.

OSORIO, C. R.; BARJA, J. L.; HUTSON, R. A.; COLLINS, M. D. *Arthrobacter rhombi*. n. 1 999, p. 1217–1220, 1999.

PAN, Q.; WANG, F.; ZHANG, Y.; CAI, M.; HE, J.; YANG, H. Denaturing gradient gel electrophoresis fingerprinting of soil bacteria in the vicinity of the Chinese Great Wall Station , King George Island , Antarctica. *Journal of Environmental Sciences*, v. 25, n. 8, p. 1649–1655, 2013.

PANDEY, R.; USUI, K.; LIVINGSTONE, R. A.; FISCHER, S. A.; PFAENDTNER, J.; BACKUS, E. H. G.; NAGATA, Y.; FRÖHLICH-NOWOISKY, J.; SCHMÜSER, L.; MAURI, S.; SCHEEL, J. F.; KNOPF, D. A.; PÖSCHL, U.; BONN, M.; WEIDNER, T. Ice-nucleating bacteria control the order and dynamics of interfacial water. n. April, p. 1–9, 2016.

PANICKER, G.; AISLABIE, J.; SAUL, D.; BEJ, A. K. Cold tolerance of *Pseudomonas* sp. 30-3 isolated from oil-contaminated soil, Antarctica. *Polar Biology*, v. 25, n. 1, p. 5–11, 2002.

PEETERS, K.; ERTZ, D.; WILLEMS, A. Culturable bacterial diversity at the Princess Elisabeth Station (Utsteinen , Sør Rondane Mountains , East Antarctica) harbours many new taxa. *Systematic and Applied Microbiology*, v. 34, n. 5, p. 360–367, 2011.

PEETERS, K.; RANGE, S.; WILLEMS, A. Culturable Diversity of Heterotrophic Bacteria in Forlidas Pond (Pensacola Mountains) and Lundström Lake. p. 399–413, 2011.

PIETTE, F.; D'AMICO, S.; MAZZUCHELLI, G.; DANCHIN, A.; LEPRINCE, P.; FELLER, G. Life in the cold: A proteomic study of cold-repressed proteins in the antarctic bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 77, n. 11, p. 3881–3883, 2011.

PINDI, P. K.; SHIVAJI, S. Description of *Leifsonia kafniensis* sp. nov. and *Leifsonia antarctica* sp. nov. p. 1348–1352, 2009.

PINDI, P. K.; MANORAMA, R.; BEGUM, Z.; SHIVAJI, S. *Arthrobacter antarcticus* sp. nov., isolated from an Antarctic marine sediment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 60, n. 10, p. 2263–2266, 2010.

QADEER S. et al. Efficiency of beetle (*Dendroides canadensis*) recombinant antifreeze protein for buffalo semen freezability and fertility. *Theriogenology*. V. 86, n. 7, p. 1662-1669, 2016.

QUAST, C. et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research*, v. 41, n. D1, p. 590–596, 2013.

RAYMOND, J. A.; CHRISTNER, B. C.; SCHUSTER, S. C. A bacterial ice-binding protein from the Vostok ice core. *Extremophiles*, v. 12, n. 5, p. 713–717, 2008.

RAYMOND, J. A. Dependence on epiphytic bacteria for freezing protection in an Antarctic moss, *Bryum argenteum*. *Environmental Microbiology Reports*, v. 8, n. 1, p. 14–19, 2016.

RAYMOND, J. A.; JANECH G. M.; MANGIAGALLI M.; Ice-Binding Proteins Associated with an Antarctic Cyanobacterium, *Nostoc* sp. HG1. *Evolutionary Microbiology*. V. 87, 2021

REDDY, G. S. N. et al. *Arthrobacter flavus* sp. nov., a psychrophilic bacterium isolated from a pond in McMurdo Dry Valley, Antarctica. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 50, n. 4, p. 1553–1561, 2000.

REDDY, G. S. N.; PRAKASH, J. S. S.; MATSUMOTO, G. I.; STACKEBRANDT, E.; SHIVAJI, S. *Arthrobacter roseus* sp. nov., a psychrophilic bacterium isolated from an Antarctic cyanobacterial mat sample. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 52, n. 3, p. 1017–1021, 2002.

ROCA, C.; ALVES, V. D.; FREITAS, F.; REIS, M. A. M. Exopolysaccharides enriched in rare sugars : bacterial sources , production , and applications. v. 6, n. April, p. 1–7, 2015.

RODRIGUES, D. F.; TIEDJE, J. M. Coping with our cold planet. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 74, n. 6, p. 1677–1686, 2008.

RODRIGUES, D. F.; PELLIZARI, V. H.; JESUS, E. C.; AYALA-DEL-RI, H. L.; GILICHINSKY, D.; SEPULVEDA-TORRES, L.; TIEDJE, J. M. Biogeography of two cold-adapted genera : *Psychrobacter* and *Exiguobacterium*. p. 658–665, 2009.

ROESCH, L. F. W.; FULTHORPE, R. R.; PEREIRA, A. B.; PEREIRA, C. K.; LEMOS, L. N.; BARBOSA, A. D.; SULEIMAN, A. K. A.; GERBER, A. L.; PEREIRA, M. G.; LOSS, A.; ELIAS, M. Soil bacterial community abundance and diversity in ice-free areas of Keller. *Applied Soil Ecology*, v. 61, p. 7–15, 2012.

ROGALA, M. M.; GAWOR, J.; GROMADKA, R.; KOWALCZYK, M.; GRZESIAK, J. Biodiversity and habitats of polar region polyhydroxyalkanoic acid-producing bacteria: Bioprospection by popular screening methods. *Genes*, v. 11, n. 8, p. 1–18, 2020.

RUIZ-FERNÁNDEZ, J.; OLIVA, M.; NÝVLT, D.; CANNONE, N.; GARCÍA-HERNÁNDEZ, C.; GUGLIELMIN, M.; HRBÁČEK, F.; ROMAN, M.; FERNÁNDEZ, S.; LÓPEZ-MARTÍNEZ, J.; ANTONIADES, D. Patterns of spatio-temporal paraglacial response in the Antarctic Peninsula region and associated ecological implications. *Earth-Science Reviews*, v. 192, n. October 2018, p. 379–402, 2019.

SARMIENTO et al. Cold and hot extremozymes : industrial relevance and current. v. 3, 2015.

SAUL, D. J.; AISLABIE, J. M.; BROWN, C. E.; HARRIS, L.; FOGHT, J. M. Hydrocarbon contamination changes the bacterial diversity of soil from around Scott Base, Antarctica. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 53, n. 1, p. 141–155, 2005.

SAVOCA, S.; LO GIUDICE, A.; PAPALE, M.; MANGANO, S.; CARUSO, C.; SPANÒ, N.; MICHAUD, L.; RIZZO, C. Antarctic sponges from the Terra Nova Bay (Ross Sea) host a diversified bacterial community. *Scientific Reports*, v. 9, n. 1, p. 1–15, 2019.

SCHLOSS, P. D. et al. Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 75, n. 23, p. 7537–7541, 2009.

SEGERS, P.; FALSEN, E. Classification of *Pseudomonas diminuta* Leifson and Hugh 1954 and *Pseudomonas vesicularis* Busing , Doll , and Freytag 1953 in *Brevundimonas* gen . nov . as *Brevundimonas diminuta*. n. July, p. 499–510, 1994.

SHIVAJI, S.; PRAKASH, J. S. S. How do bacteria sense and respond to low temperature? *Archives of Microbiology*, v. 192, n. 2, p. 85–95, 2010.

SHIVAJI, S. S. M. S.; HARA, B. S. K. Bacterial diversity of soil in the vicinity of Pindari glacier , Himalayan mountain ranges , India , using culturable bacteria and soil 16S rRNA gene clones. p. 1–22, 2011.

SHIVAJI, S.; BEGUM, Z.; SHIVA NAGESWARA RAO, S. S.; VISHNU VARDHAN REDDY, P. V.; MANASA, P.; SAILAJA, B.; PRATHIBA, M. S.; THAMBAN, M.;

KRISHNAN, K. P.; SINGH, S. M.; SRINIVAS, T. N. R. Antarctic ice core samples: Culturable bacterial diversity. *Research in Microbiology*, v. 164, n. 1, p. 70–82, 2013.

SILVA et al. *Rhodococcus psychrotolerans* sp. nov., isolated from rhizosphere of *Deschampsia antarctica*. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 111, n. 4, p. 629–636, 2017.

SILVA, T. R.; DUARTE, A. W. F.; PASSARINI, M. R. Z.; LUCIA, A.; CAIO, T. G. R.; FRANCO, H.; BORSOI, C.; ITAMAR, M.; MELO, S. De; RODRIGUES, R. A.; FANTINATTI, F. Bacteria from Antarctic environments : diversity and detection of antimicrobial , antiproliferative , and antiparasitic activities. n. 0123456789, 2018.

SINGH, P.; TSUJI, M.; MOHAN, S.; ROY, U.; HOSHINO, T. Cryobiology Taxonomic characterization , adaptation strategies and biotechnological potential of cryophilic yeasts from ice cores of Midre Lovénbreen glacier , Svalbard , Arctic. *Cryobiology*, v. 66, n. 2, p. 167–175, 2013.

SINGH, P.; HANADA, Y.; SINGH, S. M.; TSUDA, S. Antifreeze protein activity in Arctic cryoconite bacteria. v. 351, n. 1970, p. 14–22, 2014.

SINGH, P.; TSUDA, S.; MOHAN, S.; MONDAL, S.; ROY, U. Partial characterization of an antifreeze protein (CRY-c) from *Cryobacterium psychrotolerans* MLB-29 of Arctic glacier cryoconite. *Polar Science*, v. 28, n. June 2020, p. 100661, 2021.

SOULIDES et al. Effect of drying and freezing soils on carbon dioxide production, available mineral nutrients, aggregation, and bacterial population. v.91, p. 291-298, 1961.

STOREY, K. B.; STOREY, J. M. Freeze tolerance and intolerance as strategies of winter survival in terrestrially-hibernating amphibians. *Comparative Biochemistry and Physiology -- Part A: Physiology*, v. 83, n. 4, p. 613–617, 1986.

SUN, X.; GRIFFITH, M.; PASTERNAK, J. J.; GLICK, B. R. Low temperature growth, freezing survival, and production of antifreeze protein by the plant growth promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 41, n. 9, p. 776–784, 1995.

SUN et al. *Rhodococcus antarcticus* sp. nov., isolated from a till sample of Collins glacier front, Antarctica. 2023.

TAYEB, L. A.; LEFEVRE, M.; PASSET, V.; DIANCOURT, L.; BRISSE, S.; GRIMONT, P. A. D. Comparative phylogenies of *Burkholderia* , *Ralstonia* , *Comamonas* , *Brevundimonas* and related organisms derived from *rpoB* , *gyrB* and *rrs* gene sequences. v. 159, 2008.

TEO, J. K C.; WHONG C. M. V. L. Analyses of soil bacterial diversity of the Schirmacher Oasis , Antarctica. p. 631–640, 2014.

TURNER, S. et al. Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, v. 46, n. 4, p. 327–338, 1999.

TURNER, J.; OVERLAND, J. Contrasting climate change in the two polar regions. 2009.

UGOLINI, F. C.; BOCKHEIM, J. G. Antarctic soils and soil formation in a changing environment : A review. v. 144, p. 1–8, 2008.

VANCE, T. D. R.; GRAHAM, L. A.; DAVIES, P. L. An ice-binding and tandem beta-sandwich domain- containing protein in *Shewanella frigidimarina* is a potential new type of ice adhesin. v. 285, p. 1511–1527, 2018.

VÁSQUEZ-PONCE, F.; HIGUERA-LLANTÉN, S.; SOLEDAD, M.; RAMÍREZ-ORELLANA, R.; MARSHALL, S. H.; OLIVARES-PACHECO, J. Alginate overproduction and bio film formation by psychrotolerant *Pseudomonas mandelii* depend on temperature in Antarctic marine sediments. *Electronic Journal of Biotechnology*, v. 28, p. 27–34, 2017.

VAUGHAN, D. G.; MARSHALL, G. J.; CONNOLLEY, W. M.; PARKINSON, C.; MULVANEY, R.; HODGSON, D. A.; KING, J. C.; PUDSEY, C. J.; TURNER, J. Recent rapid regional climate warming on the Antarctic Peninsula. *Climatic Change*, v. 60, n. 3, p. 243–274, 2003.

VAUGHAN, D. G.; MARSHALL, G. J.; CONNOLLEY, W. M.; KING, J. C.; MULVANEY, R. Devil in the detail. *Science*, v. 293, n. 5536, p. 1777–1779, 2001.

VERSALOVIC et al. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods in Molecular and Cellular Biology*, v. 5, n. 1, p. 25-40, 1994.

VILLARREAL, P.; CARRASCO, M.; BARAHONA, S.; ALCAÍNO, J.; CIFUENTES, V.; BAEZA, M. Antarctic yeasts: Analysis of their freeze-thaw tolerance and production of antifreeze proteins, fatty acids and ergosterol. *BMC Microbiology*, v. 18, n. 1, p. 1–10, 2018.

VISHNIVETSKAYA, T. A. et al. Effect of low temperature and culture media on the growth and freeze-thawing tolerance of *Exiguobacterium* strains. *Cryobiology*, v. 54, n. 2, p. 234–240, 2007.

WALKER, V. K.; PALMER, G. R.; VOORDOUW, G. Freeze-Thaw Tolerance and Clues to the Winter Survival of a Soil Community. v. 72, n. 3, p. 1784–1792, 2006.

WANG, F.; GAI, Y.; CHEN, M.; XIAO, X. *Arthrobacter psychrochitiniphilus* sp. nov., a psychrotrophic bacterium isolated from Antarctica. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 59, n. 11, p. 2759–2762, 2009.

WANG, N. F.; ZHANG, T.; ZHANG, F.; WANG, E. T.; HE, J. F.; DING, H. Diversity and structure of soil bacterial communities in the Fildes Region (maritime Antarctica) as revealed by 454 pyrosequencing. v. 6, n. October, p. 1–11, 2015.

WARREN, G., COROTTO, L. & WOLBER, P. Conserved repeats in diverged ice nucleation structural genes from two species of *Pseudomonas*. *Nucleic Acids Res.* v. 14, n. 20, p. 8047–8060, 1986.

WARREN, G., & COROTTO, L. The consensus sequence of ice nucleation proteins from *Erwinia herbicola*, *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas syringae*. *Gene*, v. 85, n. 1, p. 239–242, 1989.

WATABE, S., ABE, K., HIRATA, A., EMORI, Y., WATANABE, M., & ARAI, S. Large-scale Production and Purification of an *Erwinia ananas* Ice Nucleation Protein and Evaluation of Its Ice Nucleation Activity. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, v. 57, n. 4, p. 603–606, 1993.

WILSON, S. L.; GROGAN, P.; WALKER, V. K. Prospecting for ice association: characterization of freeze – thaw selected enrichment cultures from latitudinally distant soils. v. 412, p. 402–412, 2012.

XIANG, H.; YANG, X.; KE, L.; HU, Y. The properties, biotechnologies, and applications of antifreeze proteins. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 153, p. 661–675, 2020.

XU, H.; GRIFFITH, M.; PATTEN, C. L.; GLICK, B. R. Isolation and characterization of an antifreeze protein with ice nucleation activity from the plant growth promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 44, n. 1, p. 64–73, 1998.

YAMASHITA, Y. Y.; AKAMURA, N. N.; MIYA, K. O.; ISHIKAWA, J. N.; AWAHARA, H. K.; BATA, H. O. Identification of an Antifreeze Lipoprotein from *Moraxella* sp . of Antarctic Origin. v. 66, n. 2, p. 239–247, 2002.

YAMASHITA, Y., KAWAHARA, H., & OBATA, H. Identification of a novel anti-ice-nucleating polysaccharide from *Bacillus thuringiensis* yy529. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, v. 66, n. 5, p. 948–954, 2002.

YERGEAU, E.; NEWSHAM, K. K.; PEARCE, D. A.; KOWALCHUK, G. A. Patterns of bacterial diversity across a range of Antarctic terrestrial habitats. v. 9, p. 2670–2682, 2007.

ZANDIYEH, S; EBRAHIMI, B; SABBAGHIAN, M. Application of Antifreeze Proteins for Sperm Cryopreservation. *Biomolecules*. V. 9, n. 5, p. 181, 2019.

ZDANOWSKI, M. K.; ZMUDA, M. J.; ZWOLSKA, I. Bacterial role in the decomposition of marine-derived material (penguin guano) in the terrestrial maritime Antarctic. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 37, n. 3, p. 581–595, 2005.

ZDANOWSKI, M. K.; ŻMUDA-BARANOWSKA, M. J.; BORSUK, P.; ŚWIĄTECKI, A.; GÓRNIAK, D.; WOLICKA, D.; JANKOWSKA, K. M.; GRZESIAK, J. Culturable bacteria community development in postglacial soils of Ecology Glacier, King George Island, Antarctica. *Polar Biology*, v. 36, n. 4, p. 511–527, 2013.

ZHANG, S., WANG, H., & CHEN, G. Addition of ice-nucleation active bacteria: *Pseudomonas syringae* pv. *panici* on freezing of solid model food. *LWT - Food Science and Technology*, v. 43, n. 9, p. 1414–1418, 2010.

ZHAO, J. I., & ORSER, C. S. Conserved repetition in the ice nucleation gene *inaX* from *Xanthomonas campestris* pv. *translucens*. *MGG Molecular & General Genetics*, v. 223, n. 1, p. 163–166, 1990.