

**Universidade Federal de São João del-Rei
Departamento de Ciências Naturais
Programa de Pós-Graduação em Ecologia**

**Caracterização morfológica e por análise do perfil proteico de
leveduras isoladas de rizosfera de *Deschampsia antarctica* Desv. da
Baía do Almirantado, Ilha Rei George, Antártica**

Lislie de Souza Lima

São João del-Rei
2020

Lislie de Souza Lima

Caracterização morfológica e por análise do perfil proteico de leveduras isoladas de rizosfera de *Deschampsia antarctica* Desv. da Baía do Almirantado, Ilha Rei George, Antártica

Orientador: Prof. Dr. Juliano de Carvalho Cury

Co-orientador: Prof. Dr. Luís Roberto Batista

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia da Universidade Federal de São João del-Rei como requisito parcial à obtenção do título de mestre.

São João del-Rei
2020

Nome: Lislíe de Souza Lima

Título: Caracterização morfológica e por análise do perfil proteico de leveduras isoladas de rizosfera de *Deschampsia antarctica* Desv. da Baía do Almirantado, Ilha Rei George, Antártica

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia da Universidade Federal de São João del-Rei como requisito parcial à obtenção do título de mestre.

Aprovado em:

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Juliano de Carvalho Cury
(Orientador)
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Prof. Dr. Gabriel de Menezes Yazbeck
Universidade Federal de São João del-Rei

Profa. Dra. Fabiana Reinis Franca Passamani
Universidade Federal de Lavras

Ficha catalográfica elaborada pela Divisão de Biblioteca (DIBIB)
e Núcleo de Tecnologia da Informação (NTINF) da UFSJ,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

L732c Lima, Lislíe Souza de.
Caracterização morfológica e por análise do perfil proteico de leveduras isoladas de rizosfera de *Deschampsia antarctica* Desv. da Baía do Almirantado, Ilha Rei George, Antártica / Lislíe Souza de Lima ; orientador Juliano Carvalho Cury; coorientador Luís Roberto Batista. -- São João del-Rei, 2020.
37 p.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Ecologia) -- Universidade Federal de São João del Rei, 2020.

1. Leveduras . 2. MALDI-TOF. 3. *Pseudozyma aphidis*. 4. Antártica. . I. Cury, Juliano Carvalho, orient. II. Batista, Luís Roberto, co-orient. III. Título.

*As minhas filhas Isadora e Isabella sempre
será por vocês e para vocês.*

Dedico

Agradecimentos

Agradeço à Deus e a Nossa Senhora da Medalha Milagrosa que sempre me guiam e me protegem.

Agradeço especialmente ao meu marido Anderson pelo apoio irrestrito.

A minha filha Isadora pela compreensão e a minha filha Isabella que acompanhou de perto grande parte deste trabalho.

Agradeço aos meus pais Lindoval e Salomé, sem vocês não teria conseguido.

Aos meus irmãos (a) e cunhados (as) pelo apoio em todos os momentos.

Ao professor Juliano de Carvalho Cury pela oportunidade, orientação e pelos muitos ensinamentos.

Aos professores do programa de Pós Graduação em Ecologia da Universidade Federal de São João del-Rei pelos ensinamentos.

À Universidade Federal de Lavras, ao Departamento e ao Programa de Pós Graduação em Micologia pela oportunidade concedida para a realização deste trabalho. Em especial ao professor Luís Roberto Batista, as pesquisadoras Suzana Evangelista, Fabiana Passamani e Natasha Lira pela paciência e orientação em todos os momentos.

À CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado.

Meu muito obrigada!

Sumário

Resumo	7
Abstract	8
Introdução	9
Material e Métodos	15
Área de Estudo.....	15
Amostragem.....	16
Isolamento de leveduras de rizosfera de <i>Deschampsia antarctica</i> Desv.....	17
Caracterização morfológica de leveduras de rizosfera de <i>Deschampsia antarctica</i> Desv.....	17
Caracterização, através do MALDI-TOF, de leveduras de rizosfera de <i>Deschampsia antarctica</i> Desv.	17
Resultados e Discussão	19
Conclusão.....	28
Referências Bibliográficas	30

Resumo

As leveduras são fungos unicelulares que ocorrem em diferentes tipos de solos, incluindo os solos de ambientes extremos como o da Antártica. Os micro-organismos do solo representam a maioria da biodiversidade nos ecossistemas terrestres e são os principais responsáveis pela manutenção da qualidade e do funcionamento do solo. Um dos pontos mais importantes de atividade e diversidade nos solos é a rizosfera. A composição das comunidades microbianas e suas atividades na rizosfera têm um grande impacto no crescimento e na saúde das plantas. A comunidade microbiana na rizosfera é principalmente derivada da comunidade do solo circundante. Nosso conhecimento sobre as leveduras que vivem na região rizosférica de solos da Antártica ainda é limitado. A Antártica é a região mais conservada e isolada do planeta, possuindo condições exclusivas para o estudo de micro-organismos isolados geograficamente de outras comunidades microbianas. Até o momento, 13 ascomicetos e 57 basidiomicetos foram isolados de amostras de solo, água, gelo e neve na Antártica. O objetivo deste estudo foi caracterizar morfológicamente e por análise do perfil proteico, através da utilização de MALDI-TOF, e avaliar a diversidade de filotipos de leveduras de rizosfera de *Deschampsia antarctica* Desv. na área de Punta Hanequim, na Baía do Almirantado, Ilha Rei George, Antártica. As amostras de solo foram coletadas em quatro pontos ao longo de um transecto de 60 m. As leveduras foram isoladas pela técnica de diluição seriada seguida do plaqueamento em superfície e caracterizadas morfológicamente e por perfil proteico. Foram obtidos 117 isolados de leveduras, agrupados em 24 filotipos, sendo possível a identificação de apenas um isolado, que foi classificado como *Pseudozyma aphidis*. Isto pode sugerir uma grande diversidade de fungos leveduriformes ainda passíveis de caracterização em ambientes antárticos.

Palavras-chave: Leveduras. MALDI-TOF. *Pseudozyma aphidis*. Antártica.

Abstract

Yeasts are single-celled fungi that occur in different types of soils, including soils from extreme environments such as Antarctica. Soil microorganisms represent the majority of biodiversity in terrestrial ecosystems and are primarily responsible for maintaining soil quality and functioning. One of the most important points of activity and diversity in soils is the rhizosphere. The composition of microbial communities and their activities in the rhizosphere have a major impact on plant growth and health. The microbial community in the rhizosphere is mainly derived from the surrounding soil community. Our knowledge of the yeasts that live in the rhizospheric soil region of Antarctica is still limited. Antarctica is the most conserved and isolated region on the planet, with exclusive conditions for the study of microorganisms geographically isolated from other microbial communities. To date, 13 ascomycetes and 57 basidiomycetes have been isolated from soil, water, ice and snow samples in Antarctica. The aim of this study was to characterize morphologically and by analyzing the protein profile, using MALDI-TOF, and to evaluate the diversity of rhizosphere yeasts of *Deschampsia antarctica* Desv. in the Punta Hanequim area, in the Admiralty Bay, King George Island, Antarctica. The soil samples were collected at four points along a 60 m transect. Yeasts were isolated by the serial dilution technique followed by plating on the surface and characterized morphologically and by protein profile. 117 yeast isolates were obtained, grouped into 24 phlotypes, making it possible to identify only one isolate, which was classified as *Pseudozyma aphidis*. This may suggest a great diversity of yeast fungi that can still be characterized in Antarctic environments.

Keywords: Yeasts. MALDI-TOF. *Pseudozyma aphidis*. Antarctica.

Introdução

A combinação favorável de características químicas (e.g. acidez, salinidade e estresse osmótico) e físicas (e.g. temperatura, pressão, radiação e luminosidade) que permitam reações metabólicas, a vida poderá ser encontrada. Tais características delimitam faixas específicas onde a grande maioria das formas de vida pode existir. Os valores desses limites podem fazer com que um habitat se torne extremo e reduza o número de organismos que podem se desenvolver nele (Buzzini et al. 2018). Nosso planeta possui diversos tipos de ambientes, sendo que alguns deles podem apresentar enormes desafios para a maioria das formas de vida por serem considerados ambientes extremos. Os ambientes extremos são aqueles caracterizados por condições de pH, temperatura, pressão, salinidade, limitações nutritivas ou de radiação que são demasiadamente elevadas ou demasiadamente baixas para a grande maioria das formas de vida, para as quais podem ser tóxicas ou inibitórias (Cavicchioli & Torsten 2000).

Organismos que vivem sob condições extremas são chamados de extremófilos (Buzzini et al. 2018). Rothschild & Mancinelli (2001) definem que um dado organismo é extremófilo quando “prospera em um ambiente extremo”. A definição de extremófilos nunca é perfeitamente clara porque um organismo pode existir em condições extremas de vida (verdadeiro extremófilo) ou tolerá-las até certo ponto (extremotolerante) (Buzzini et al. 2018).

O continente Antártico é considerado um dos ambientes mais extremos da Terra por causa, dentre outros fatores, das suas baixas temperaturas, baixa umidade, alta incidência de radiação ultravioleta solar e pouca disponibilidade de nutrientes (Troncoso et al. 2017). As áreas terrestres extensas do Ártico e da Antártica estão permanentemente congeladas ou são descongeladas por apenas algumas semanas no verão (Cavicchioli & Torsten 2000). Pelo menos 2% da superfície do continente antártico corresponde a áreas livres de gelo, considerando tanto as regiões continentais como marítimas. Os solos antárticos são principalmente oligotróficos, as precipitações são escassas e os ventos são fortes e extremamente variáveis. Todos esses fatores são importantes e determinam vários microambientes extremos do solo, que diferem em temperatura, umidade, teor de carbono orgânico e níveis de N, P e demais macro e micronutrientes (Godinho et al. 2015, Connell et al. 2008).

Os ambientes de temperaturas baixas extremas têm sido colonizados com sucesso por inúmeros organismos, em especial por bactérias, leveduras, algas

unicelulares e fungos (Gerday et al. 2000). A temperatura é um dos principais fatores que influenciam o desenvolvimento microbiano, podendo afetar a faixa de crescimento e atividade metabólica dos micro-organismos, bem como as propriedades químicas e físicas do ambiente (Bialkowska et al. 2017). Os micro-organismos que conseguem se desenvolver em ambientes frios são classificados como psicrófilos quando suas temperaturas ótima e máxima de crescimento são ≤ 15 e ≤ 20 °C, respectivamente, ou como psicrotolerantes (ou psicrotróficos) se tais temperaturas forem ≥ 20 °C e ≤ 40 °C, respectivamente (Gounot 1986, Robinson 2001). Esses micro-organismos extremófilos, que adaptaram seus processos celulares para se desenvolverem em temperaturas próximas ao ponto de congelamento da água, desempenham papel essencial para a ciclagem de nutrientes e mineralização da matéria orgânica em ecossistemas com baixas temperaturas (Gerday et al. 2000, D'Amico et al. 2006).

A Antártica é a região mais conservada do planeta, onde comunidades microbianas parecem ser dominantes (Santiago et al. 2012). O Continente Antártico apresenta condições exclusivas para o estudo de micro-organismos isolados geograficamente de outras comunidades microbianas do planeta em escala de tempo e evolução. Além disso, as diferenças na pressão seletiva e na estabilidade entre os ambientes antárticos podem influenciar o grau de endemismo e adaptação dos micro-organismos presentes nesse continente. É um habitat propício para a manutenção de uma grande diversidade de espécies de micro-organismos psicrófilos e psicrotróficos, incluindo as leveduras (Yergeau & Kowalchuk 2008, Hamid 2018).

Leveduras psicrófilas e psicrotolerantes têm sido comumente encontradas em numerosos habitats frios, incluindo permafrost, neve, desertos frios, gelo glacial, água derretida, sedimentos e mar profundo, bem como alimentos congelados e refrigerados (Buzzini & Margesin 2014, Buzzini et al. 2018). Assim como outros micro-organismos que habitam ambientes extremos, as leveduras desenvolveram várias estratégias de adaptação estrutural e funcional para conseguirem superar os efeitos da baixa temperatura (Buzzini et al. 2018). Tais mecanismos de adaptação incluem altas concentrações de lipídios insaturados de membrana, proteínas anticongelantes e enzimas que são ativadas a baixas temperaturas, conhecidas como enzimas adaptadas ao frio (D'Elia et al. 2009, Vaz et al. 2011). Até o momento, o maior número de leveduras psicrófilas (13 ascomicetos e 57 basidiomicetos) foi isolado de amostras de solo, água, gelo e neve na Antártica. A maioria delas foi classificada como pertencente aos gêneros *Candida*, *Dioszegia*, *Rhodotorula*, *Mrakia*, *Mrakiella*, *Sporobolomyces*,

Glaciozyma, Malassezia, Saccharomyces, Clavispora e Cryptococcus, com base em dados fenotípicos e moleculares (Thomas-Hall & Watson 2002, Thomas-Hall et al. 2010, Guffogg et al. 2004, Buzzini et al. 2012, Connell et al. 2014).

Nos últimos anos o número de pesquisas descrevendo o isolamento de leveduras de ambientes frios está aumentando (Shivaji & Prasad 2009, Thomas-Hall et al. 2010). A maior parte desses estudos está focada no uso industrial e no potencial biotecnológico desses micro-organismos (Buzzini et al. 2012). De uma maneira geral, existe uma atenção especial e estudos sobre organismos que vivem em ambientes extremos devido ao desafio que a descoberta desses extremófilos apresenta às nossas noções atuais sobre os limites da vida e sua possível origem (Boekhout & Phaff 2003, González-Toril et al. 2003).

No estudo da ecologia de comunidades, o termo biodiversidade pode ser entendido como a variedade que existe entre os organismos e as complexidades ecológicas nas quais esses ocorrem (Botha 2006). As leveduras são organismos ubíquos na natureza (Lachance & Starmer 1998, Phaff & Starmer 1987, Botha 2006), importantes componentes de ecossistemas, contribuindo com a formação da biodiversidade (Fleet 1998). São fungos unicelulares e com alta taxa de crescimento. Podem ser encontradas em uma variedade de habitats naturais, desde solo a ambientes aquáticos, além da superfície das plantas e superfície da pele e das mucosas de animais. No estudo de Aljohani et al. (2018), onde foram analisadas as relações e a diversidade de leveduras em solos agrícolas, uma grande variedade de leveduras foi encontrada. As leveduras ocorrem em diferentes tipos de solos, e a diversidade pode ser influenciada por fatores como temperatura, umidade, composição química e localização geográfica (Vishniac 2006). Vários pesquisadores discutiram a frequência da ocorrência, diversidade e importância de leveduras associadas ao solo em todo o mundo (De Ruiter et al. 1998, Sláviková & Vadkertiová 2000 2003a 2003b, Ekelund et al. 2001, Fierer et al. 2007, Vadkertiová et al. 2017, Yurkov et al. 2011 2012a 2012b, 2016, Yurkov 2018). Inúmeras novas espécies de leveduras foram isoladas e identificadas durante os estudos acima mencionados e vários destes estudos indicaram que o ambiente do solo representa um importante nicho para a descoberta de novas espécies de leveduras (Groenewald et al. 2018).

A rizosfera pode ser definida como o volume de solo ao redor das raízes vivas das plantas que é influenciado pela atividade de tais raízes (Darrah, 1993, Hinsinger, 1998). A rizosfera difere do solo não rizosférico em uma variedade de processos

bioquímicos, químicos e físicos que ocorrem como consequência do crescimento radicular, captação de água e nutrientes, respiração e rizodeposição (Hinsinger et al. 2005). Uma grande variedade de atividades da planta torna a rizosfera um ambiente único. As alterações das propriedades bioquímicas, químicas e físicas do solo ao redor da raiz, em comparação com o solo não rizosférico, surgem de processos pelos quais as raízes são diretamente responsáveis e/ou atividades de micro-organismos que são estimulados na vizinhança das raízes em consequência da liberação de rizodepósitos pelas raízes das plantas (Curl & Truelove 1986, Bowen & Rovira, 1999, Jones et al. 2004). Através da exsudação radicular as plantas produzem uma variedade de compostos químicos que podem ser usados pelas bactérias do solo para produção de energia e biomassa (Haichar et al. 2008). Vários autores relataram que essa interação entre comunidades microbianas específicas na rizosfera e a parte do solo que é diretamente influenciada pelas raízes, produz o "efeito rizosférico" (Kielak et al. 2009, Smalla et al. 2001), caracterizado pela estimulação do crescimento e atividade, além de maior diversidade de micro-organismos, quando comparado com o solo adjacente não rizosférico, podendo ser benéfico, quando estimula o crescimento vegetal através de produção de hormônios, por exemplo, ou deletério, quando estimula o crescimento de micro-organismos patogênicos.

O ecossistema terrestre antártico exhibe simplicidade devido à sua baixa diversidade de plantas, que é composta de apenas criptogâmicos e duas espécies vasculares nativas (Fuentes-Lillo et al. 2017). A *Deschampsia antarctica* Desv. (Poaceae) é uma das duas plantas vasculares que colonizaram o continente antártico (Figura 1).



Figura 1. *Deschampsia antarctica* Desv. crescendo na Baía do Almirantado, Ilha Rei George, Antártica. Fonte: Juliano de Carvalho Cury.

Apesar dos inúmeros estudos, nosso conhecimento sobre leveduras que vivem em solos e, mais especificamente, em solo rizosférico, ainda é bastante limitado. Uma melhor compreensão dos nichos de espécies é essencial para as análises dos dados sobre a diversidade e pode, também, sugerir a descoberta de padrões de distribuição de espécies microbianas, bem como a influência da vegetação e das propriedades químicas e físicas do solo sobre as espécies existentes nesses ambientes (Moreira & Vale 2018).

Uma das maneiras de se caracterizar as leveduras é através de uma técnica de espectrometria de massa chamada MALDI-TOF (Pasternak 2012). A sigla MALDI-TOF significa *Matrix Associated Laser Desorption-Ionization – Time of Flight* e consiste num sistema no qual o material biológico (uma colônia ou um concentrado de hemocultura) é colocado em uma placa em que há uma matriz polimérica. A amostra é irradiada com um laser para vaporização e há ionização de várias moléculas, que são aspiradas por um tubo de vácuo e levadas a um detector. Dependendo da molécula, o tempo de chegada ao detector (*time of flight*) é específico. Os resultados obtidos são plotados em gráficos, onde podem-se visualizar vários picos e, para cada espécie microbiana, obtém-se um gráfico com perfil específico. Uma base de dados é utilizada

para, através de comparação, definir a classificação taxonômica do micro-organismo (Figura 2).

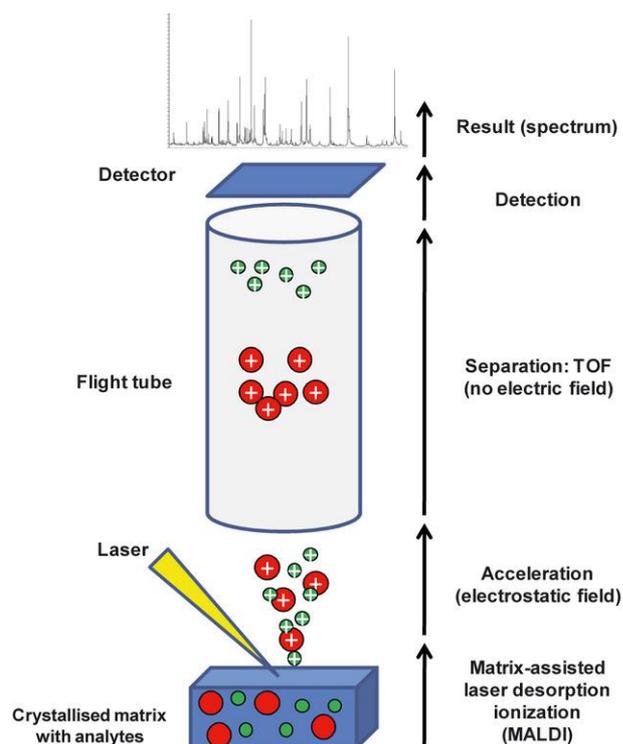


Figura 2. Esquema resumindo o funcionamento de um equipamento de espectrometria utilizado para caracterização por MALDI-TOF (Croxatto et al. 2012).

Muitos laboratórios clínicos tem empregado esta técnica para avaliação microbiológica de amostras devido à sua eficiência e ainda pelo menor custo para as análises. Mas para isso, esse sistema de identificação requer culturas puras, pois uma mistura de espécies é mais complexa para uma identificação precisa. Além disso, a atualização do banco de dados é essencial, para possibilitar a identificação a nível de espécie com altos *scores*, garantindo uma alta confiabilidade nas análises (Chakrabarti 2016).

O programa Biotyper (Bruker Daltonics, Alemanha) contém um banco de dados utilizado para identificação de micro-organismos, uma vez que contempla espectros de massa, obtidos por MALDI-TOF, oriundos de bactérias, fungos e leveduras. Os resultados das análises neste banco são liberados na forma de *scores* que variam de 0 a 3,0, valores gerados pela comparação entre a lista de sinais de um isolado desconhecido com um espectro de referência, levando em consideração informações referentes à relação massa/carga (m/z), a intensidade relativa do sinal e as frequências dos picos presentes (Bel et al. 2011).

Com o intuito de prevenir identificações incorretas, o critério para se aceitar uma identificação é rigoroso. Assim, um resultado é considerado consistente, no que concerne à espécie do micro-organismo, quando apresentar um valor de *escore* $\geq 2,0$. Quando o *escore* ficar entre 1,7 e 2,0 o gênero é confirmado e é dada a provável identificação da espécie. Quando o resultado for $\leq 1,7$ significa insucesso na identificação (Marklein *et al.* 2009).

O objetivo deste trabalho foi isolar e caracterizar, morfológicamente e pela análise do perfil protéico, leveduras da rizosfera de *Deschampsia antarctica* Desv. da Baía do Almirantado (Ilha Rei George, Antártica).

2. Material e Métodos

2.1 Área de estudo

A Baía do Almirantado situa-se na face sudeste da Ilha Rei George, a maior do arquipélago das Shetland do Sul, que, por sua vez, se localiza próximo à Península Antártica. Possui uma área de 122 km², e divide-se em três enseadas: Martel, MacKellar e Ezcurra. As amostras utilizadas no estudo foram coletadas em um transecto na localidade conhecida como Punta Hanequim, na Baía do Almirantado (Figura 3).

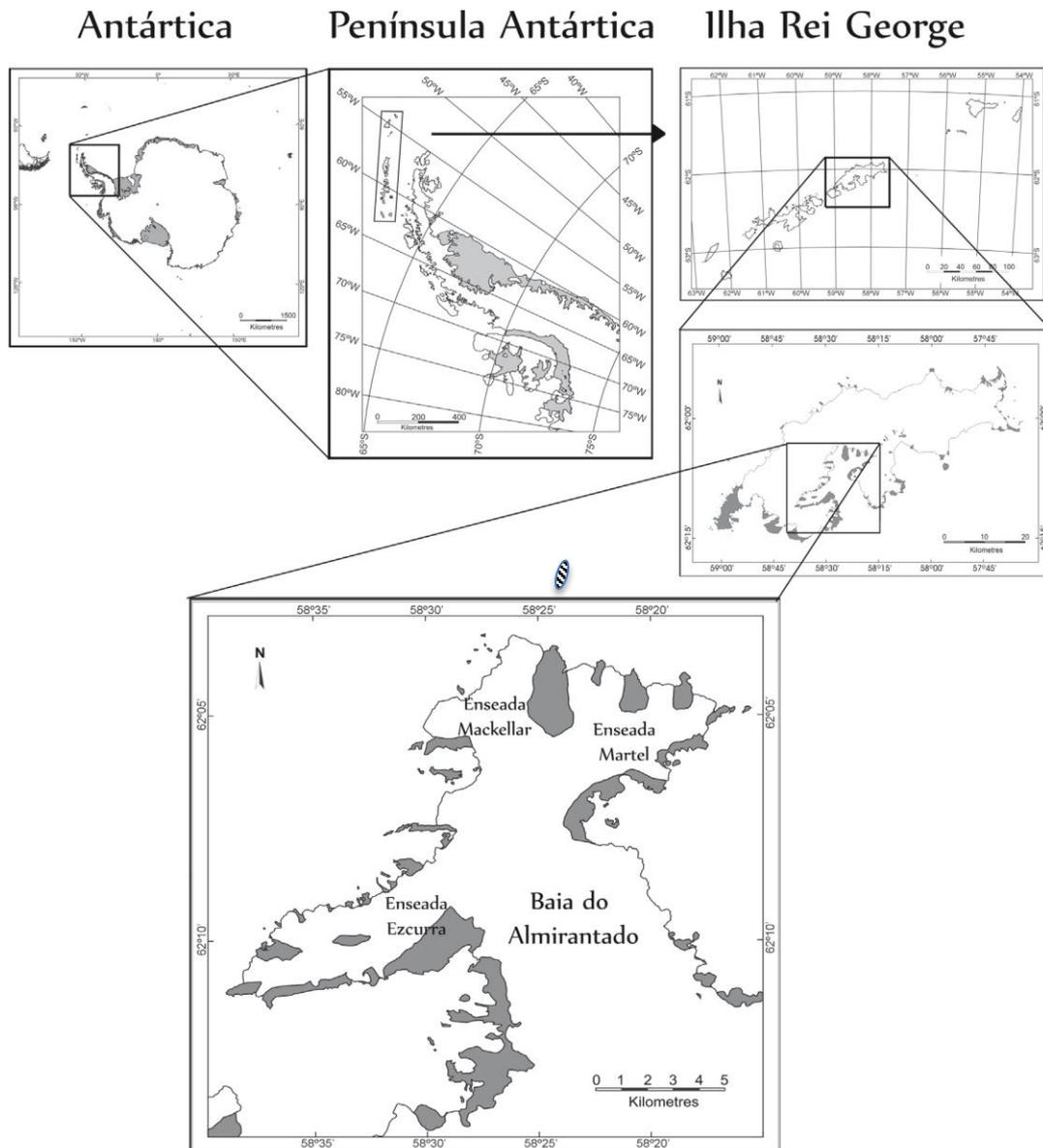


Figura 3. Continente Antártico com a localização da Península Antártica, Ilha Rei George e Baía do Almirantado. A elipse preenchida com linhas diagonais representa a região do transecto onde as amostras foram coletadas. Fonte: adaptado de Simões et al. (2004).

2.2 Amostragem

As coletas das amostras de solo rizosférico de *Deschampsia antarctica* Desv. foram realizadas em janeiro de 2017, ao longo de um transecto na localidade conhecida como Punta Hanequim (Baía do Almirantado, Ilha Rei George, Antártica). Ao longo do transecto foram coletadas quatro amostras (A1, A2, A3 e A4) em pontos com distâncias de cerca de 20 metros entre si.

As amostras foram acondicionadas em tubos de polipropileno tipo Falcon de 50 mL esterilizados. Os tubos foram transportados, sob refrigeração, até o Laboratório de Microbiologia Molecular do Departamento de Ciências Exatas e Biológicas do *Campus Sete Lagoas* da Universidade Federal de São João del-Rei, onde foram mantidos a 1 °C. Uma alíquota de cada amostra foi transportada, sob refrigeração, para o Laboratório de Micologia e Micotoxinas do departamento de Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras e mantidas a 1 °C até o momento do processo de isolamento.

2.3 Isolamento de leveduras de rizosfera de *Deschampsia antarctica* Desv.

Para o isolamento das leveduras, 5 g de cada amostra de solo foram adicionados a 45 ml de água peptonada esterilizada e agitada vigorosamente em vortex durante 10 min. A partir de uma alíquota de 0,1 mL foram feitas diluições de -1, -2 e -3. Em seguida, 100 µl de cada diluição foram inoculados nos meios de cultura ágar YM (0,3% de extrato de levedura, 0,3% de extrato de malte, 0,5% de peptona, 1,5% de ágar, 1% de glicose e 100 µg ml⁻¹ de cloranfenicol), DRBC (1% de glicose, 0,5% de peptona, 0,1% de K₂HPO₄, 0,05% de MgSO₄.7H₂O, 1,5% de ágar, 1% de rosa bengala, 2 mg de dicloran e 0,1 g de cloranfenicol), MY (2% de extrato de malte, 0,1% de peptona, 2% de glicose, 1,5% de ágar e 100 µg ml⁻¹ de cloranfenicol) e MEA (2% de extrato de malte, 0,1% de peptona, 2% de glicose, 1,5% de ágar e 100 µg ml⁻¹ de cloranfenicol). Três réplicas de cada diluição foram inoculadas em cada meio de cultura e incubadas a 15 °C durante 8 dias. Em seguida, as colônias de leveduras visíveis foram contadas e imediatamente transferidas para novas placas de Petri contendo meio de cultura YEPG (1% de extrato de levedura, 2% de peptona, 2% de glicose, 1,5% de ágar e 100 µg ml⁻¹ de cloranfenicol).

2.4 Caracterização morfológica de leveduras de rizosfera de *Deschampsia antarctica* Desv.

Inicialmente as leveduras foram agrupadas visualmente em função de suas características morfológicas (cor, forma, tamanho e elevação). Em seguida, as leveduras foram classificadas microscopicamente de acordo com sua forma (globosa, elipsoide ou apiculada) e reprodução (brotamento ou fissão).

Para a preservação, os isolados foram mantidos congelados em 500 µl de meio de cultura YEPG adicionado de 500 µl de glicerol esterilizado.

A quantidade de colônias coletadas para isolamento e caracterização microscópica de cada morfotipo foi realizada de acordo com a equação Vn (Leite 2003), onde n é o número de colônias de cada placa avaliada em cada diluição dividido pelo número de placas avaliadas.

As lâminas foram confeccionadas com o esfregaço de cada isolado encontrado, adicionando-se uma gota de azul de metileno em cima de cada esfregaço com posterior cobertura com lamínula. A observação foi realizada em microscópio de luz vertical Leica DM2000 utilizando a lente de aumento de 40 \times .

2.5 Caracterização, através do MALDI-TOF, de leveduras de rizosfera de *Deschampsia antarctica* Desv.

Os isolados de leveduras foram reativados em meio de cultura YEPG e analisados no equipamento MALDI-TOF Microflex LT Spectrometer (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha). Uma pequena quantidade de cada isolado foi colocada no fundo de um microtubo com 6 μ l de solução de extração (33,3% de etanol, 33,3% de acetonitrila e 33,3% de TFA a 10%) e agitada vigorosamente em vortex por 1 min. Em cada poço da placa MALDI flex target foram adicionados 0,6 μ l da solução homogeneizada e, após evaporação quase completa do líquido na placa, mais 0,6 μ l da matriz (0,01 mL de CHCA para 1 mL de solução orgânica) foi adicionado na placa e, em seguida, realizada a leitura no MALDI-TOF. Cada isolado foi analisado em triplicata para avaliar reprodutibilidade.

Para a calibração do equipamento foi empregada a cepa *Escherichia coli* K12, cultivada em meio Ágar Luria-Bertani (LB) (1,0g de bactotripton, 0,5 g de extrato de bactoheyeast, 1,0 g de NaCl, 15,0 g de ágar e 1 L de água destilada) incubada a 37 °C por 18 horas. Após incubação, aproximadamente 1 μ g de material celular de uma única colônia de *E. coli* K12 foi transferido, em triplicata, diretamente para a placa MALDI flex target e adicionou-se a solução matriz para a análise (Lima 2017).

Os espectros foram processados usando o programa MALDI Biotyper 3.0 (Bruker Daltonics) com as configurações padrão. O programa realiza normalização, suavização, subtração da linha de base e colheita de picos, criando uma lista dos picos mais significativos do espectro (valores de m/z e respectiva intensidade, com a relação sinal/ruído maior do que 3, limiar mínimo de 0,1% do pico mais alto e um máximo de 100 picos).

Para identificar as leveduras, cada lista de picos gerada foi comparada diretamente com a lista de picos dos espectros de referência, denominados MSP (*Main Spectra Projections*), presentes na biblioteca IVD (*In Vitro Diagnostic System*, Bruker Daltonics) integrada, por meio do algoritmo Biotyper. Nesse processamento, realiza-se a correspondência de padrões de picos, utilizando a posição, as distribuições de intensidade e a frequência de picos, atribuindo-se os scores de classificação sem qualquer intervenção do utilizador. As análises por Biotyper são classificadas utilizando os valores de $score \geq 2,0$ para identificação da espécie e $escore$ entre 1,7 e 2,0 para definição do gênero e provável espécie. Quando o resultado for $\leq 1,7$ não é possível definir a classificação do micro-organismo.

Todos os isolados analisados foram submetidos a uma análise de agrupamento baseado na comparação da listagem de picos que forma cada MSP. O dendrograma foi gerado usando uma função estatística presente no Matlab 7.1 (The MathWorks Inc.) integrado ao programa MALDI Biotyper. Os parâmetros utilizados foram a medida de Distância Euclidiana e o método do encadeamento completo (Linkage Complete). Valores mais próximos de 0 indicam baixo grau de dissimilaridade (*perfect match*) e, quanto mais próximo de 1000, maior a dissimilaridade (*no match*). Para a análise de agrupamento quando se trabalha com fungos é padronizado que valores menores que 3 são de filotipos que possivelmente pertencem à mesma espécie, porém é necessário a confirmação por técnicas moleculares (Bier et al. 2017).

3. Resultados e Discussão

Durante os procedimentos de isolamento a partir das amostras de solo rizosférico de *Deschampsia antarctica* foram observados 37 morfotipos (Tabela 1) de possíveis leveduras crescendo nas placas de Petri (Figura 4), totalizando 185 isolados.

Tabela 1. Categorização dos morfotipos de leveduras obtidos de solo rizosférico de *Deschampsia antarctica* crescendo na localidade de Punta Hanequin, Baía do Almirantado, Ilha Rei George, Arquipélago das Shetland do Sul, Antártica.

Morfotipo	Amostra de solo	Descrição	Meio de Cultura	Isolados	População
M1	A4	Pequena, circular, branca, lisa, convexa	YM	L1, L2, L6 a L13 e L15 a L21	$1,17 \times 10^5$
M2	A4	Pequena, circular, laranja, borda mais clara, convexa	YM	L3, L4 e L5	$1,5 \times 10^3$
M3	A4	Média, circular, branca, lisa, convexa	YM	L14	1×10^3
M4	A4	Pequena, rosa, lisa, convexa	YM	L22 a L23	2×10^3
M5	A4	Pequena, rosa, lisa, convexa, brilhante, halo claro	DRBC	L26, L27, L28, L37 a L40, L47 e L48	$2,79 \times 10^5$
M6	A4	Pequena, rosa, lisa, convexa, brilhante	DRBC	L29, L30, L31, L32, L41 a L46, L51, L52 e L53	$6,56 \times 10^5$
M7	A4	Média, rosa, lisa, convexa, halo branco com círculo rosa	DRBC	L33, L34, L35, L36, L49 e L50	$1,48 \times 10^5$
M8	A4	Pequena, circular, branco, liso, brilhante	MEA	L54, L55 L56, L57, L58 a L65 e L67 a L72	$9,03 \times 10^5$
M9	A4	Pequena, lisa, brilhante, creme, convexa	MEA	L66 e L74	$1,1 \times 10^3$
M10	A4	Pequena, circular, lisa, convexa, laranja	MEA	L73	1×10^3
M11	A3	Média, rosa, lisa, convexa, halo branco com círculo rosa	DRBC	L75, L76, L88 a L93, L100 a L102	$5,1 \times 10^4$
M12	A3	Pequena, rosa, lisa, convexa, borda clara	DRBC	L77 a L82	$5,2 \times 10^4$
M13	A3	Pequena, rosa, lisa, convexa, brilhante	DRBC	L83 a L87, L94 a L99, L102 a L115	9×10^4
M14	A3	Pequena, lisa, convexa, brilhante, branca	MEA	L116 a L122	$5,96 \times 10^4$
M15	A3	Irregular, grande, granulosa, borda filamentosa, rosada, convexa pregueada	MY	L123 a L126, L135	6×10^2
M16	A3	Irregular, grande, granulosa, borda filamentosa, branca, convexa, pregueada, borda transparente	MY	L127	1×10^2
M17	A3	Achatada, granulosa, irregular, grande, borda filamentosa	MY	L128	1×10^2
M18	A3	Pequena, lisa, convexa, branca, brilhante	MY	L129 a L134	$4,03 \times 10^4$
M19	A3	Pequena, transparente, borda lisa, achatada, brilhante	MY	L136, L137 e L138	1×10^4
M20	A3	Pequena, branca, lisa, convexa, brilhante	YM	L139 e L140	$1,25 \times 10^4$
M21	A3	Pequena, creme, lisa, convexa, brilhante	YM	L141 e L142	$1,5 \times 10^3$
M22	A3	Grande, irregular, branca	YM	L143	1×10^3
M23	A2	Pequena, lisa, convexa, brilhante, rosa claro	DRBC	L144, L145 e L146	$1,3 \times 10^4$
M24	A2	Pequena, lisa, convexa, brilhante, rosa pink	DRBC	L147 e L148	$4,56 \times 10^4$
M25	A2	Pequena, lisa, convexa, branca, brilhante	MEA	L149 a L152	$3,6 \times 10^3$
M26	A2	Pequena, lisa, convexa, brilhante, branca	MY	L153	1×10^3
M27	A2	Pequena, lisa, convexa, brilhante, mais branca	MY	L154 a L161	1×10^5
M28	A2	Pequena, branca, lisa, convexa, brilhante	YM	L162, L163, L164	$4,3 \times 10^4$
M29	A2	Pequena, creme, lisa, convexa, brilhante	YM	L165	1×10^3
M30	A1	Pequena, lisa, convexa, opaca, branca	DRBC	L166 e L167	3×10^2
M31	A1	Pequena, lisa, convexa, brilhante, halo branco com círculo rosa na borda	DRBC	L168 a L173	$4,13 \times 10^4$
M32	A1	Pequena, lisa, convexa, opaca, rosa	DRBC	L174	1×10^2
M33	A1	Pequena, lisa, convexa, branca	MY	L175	1×10^3
M34	A1	Pequena, lisa convexa, branca, opaca	MY	L176 a L179	$2,6 \times 10^5$
M35	A1	Pequena, lisa, convexa, branca	MEA	L180, L181 e L182	$1,3 \times 10^3$
M36	A1	Pequena, lisa convexa, brilhante, rosa	MEA	L183	1×10^2

M37

A1

Pequena, lisa, convexa, branca, brilhante

YM

L184 e L185

$4,1 \times 10^4$

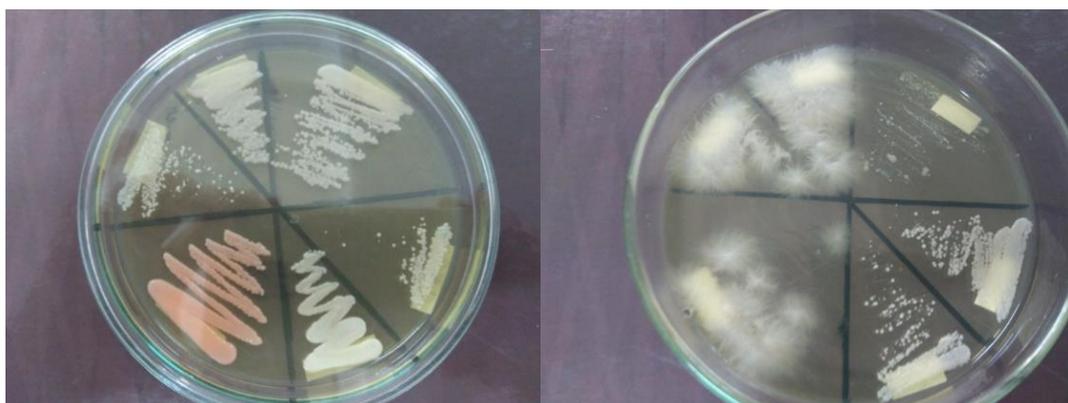


Figura 4. Leveduras isoladas de solo rizosférico de *Deschampsia antarctica* Desv. da localidade de Punta Hanequim, Baía do Almirantado, Ilha Rei George, Arquipélago das Shetland do Sul, Antártica crescendo em meio de cultura YEPG.

Após os procedimentos de observação em microscópio, dos 185 isolados iniciais, 126 apresentaram morfologia celular típica de leveduras, sendo 13 isolados em meio de cultura MY, 31 isolados em meio de cultura YM, 35 isolados em meio de cultura MEA e 46 isolados em meio de cultura DRBC (Tabela 2).

Tabela 2. Caracterização morfológica microscópica dos isolados de fungos leveduriformes obtidos após inoculação das amostras de solo rizosférico de *Deschampsia antarctica* da localidade Punta Hanequim (Baía do Almirantado, Ilha Rei George, Arquipélago das Shetland do Sul, Antártica) em diferentes meios de cultura.

Meio de cultura	Isolados	Características celulares
YM	L184	Globosa e brotamento
YM	L9, L22, L23, L141, L142, L143, L162, L163, L164	Apiculada e brotamento
YM	L1, L2, L3, L4, L5, L8, L10, L11, L12, L13, L14, L15, L16, L17, L18, L19, L20, L21, L24, L25, L162, L164	Elipsoide e brotamento
YM	L185, L163	Apiculada e brotamento
DRBC	L26, L71	Globosa e brotamento
DRBC	L33, L34, L45, L46, L104, L109, L110, L112, L113, L115, L145, L167,	Elipsoide e brotamento
DRBC	L35, L36, L41, L42, L43, L49, L50, L51, L52, L75, L76, L88, L89, L90, L91, L92, L93, L94, L97, L98, L100, L101, L102, L146, L137, L147, L148, L166, L168, L169, L170, L171, L172, L173, L174, L183	Apiculada e brotamento
MEA	L66, L71, L72, L73, L74, L117, L118, L119, L120, L150, L121, L151, L152, L180, L182	Apiculada e brotamento
MEA	L54, L55, L56, L57, L58, L59, L60, L61, L62, L63, L64, L65, L67, L68, L69, L70, L122, L149, L181, L183	Elipsóide e brotamento
MY	L179	Cilíndrica e fissão
MY	L129, L130, L153, L131, L132, L133, L176, L177, L178, L179, L135, L136	Apiculada e brotamento
MY	L130, L175	Elipsóide e brotamento

Durante o processo de reativação dos isolados em meio de cultura YEPG, nove não cresceram nas placas de Petri, não sendo possível a análise no MALDI-TOF.

O dendrograma dos perfis de massa obtidos pela análise no MALDI-TOF agrupou os 117 isolados de leveduras em 12 grupos e mais 12 ramos contendo apenas 1 isolado em cada, indicando um total de 24 filotipos referentes a possíveis 24 espécies diferentes (Figura 5). Em somente um grupo foi possível a identificação da espécie utilizando o banco de dados do MALDI-TOF.

Os dados da Tabela 3 resumem os resultados observados no dendrograma, onde verificam-se todos os isolados pertencentes a cada agrupamento, em qual meio de cultura eles foram isolados e a quantidade total de isolados que foram obtidos.

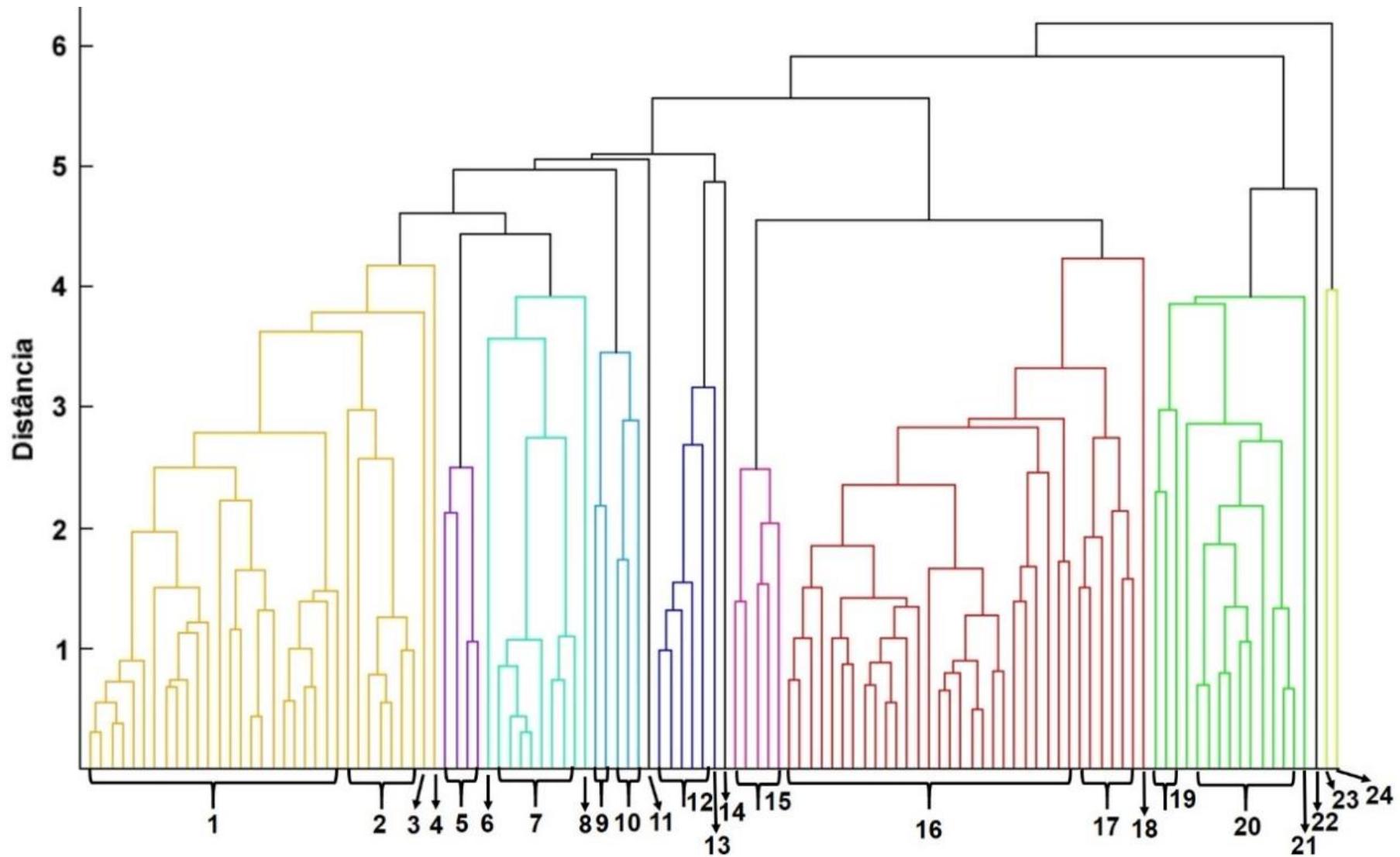


Figura 5. Dendrograma de agrupamento dos perfis, obtidos pelo MALDI-TOF, de 117 isolados de fungos leveduriformes de solo rizosférico de *Deschampsia antarctica* da localidade Punta Hanequim (Baía do Almirantado, Ilha Rei George, Arquipélago das Shetland do Sul, Antártica) crescendo em diferentes meios de cultura.

Tabela 3. Agrupamento dos perfis de leveduras, obtidos por MALDI-TOF, de solo rizosférico de *Deschampsia antarctica* crescendo na localidade de Punta Haniquin, Baía do Almirantado, Ilha Rei George, Arquipélago das Shetland do Sul, Antártica.

Grupo	Isolados	Meio de Cultura	Espécie	Número de Isolados
	L90, L91, L92, L93, L98, L100, L101, L102, L75, L76, L146 e L173	DRBC	n.d.	12
1	L59, L66, L74, L117, L120, L119, L118, L150 L129, L132, L133 L185	MEA MY YM	n.d. n.d. n.d.	8 3 1
2	L147, L148, L166, L169, L170 e L183 L72	DRBC MEA	n.d. n.d.	6 1
3	L71	DRBC	n.d.	1
4	L121 L88	MEA DRBC	n.d. n.d.	1 1
5	L73 L22 e L23	MEA YM	n.d. n.d.	1 2
6	L109 L137	DRBC DRBC	n.d. n.d.	1 1
7	L176, L177, L178 e L179 L141, L142 e L143	MY YM	n.d. n.d.	4 3
8	L184	YM	n.d.	1
9	L3 e L5	YM	n.d.	2
10	L4, L24 e L25	YM	n.d.	3
11	L135	MY	n.d.	1
12	L104, L110, L112 e L113 L175	DRBC MY	<i>Pseudozyma aphidis</i> <i>Pseudozyma aphidis</i>	4 1
13	L115	DRBC	n.d.	1
14	L136	MY	n.d.	1
15	L145 L1, L15, L17, L18 L46	DRBC YM DRBC	n.d. n.d. n.d.	1 4 1
16	L54, L55, L56, L57, L58, L59, L60, L61, L62, L63, L64, L65, L67, L68, L69 e L70 L2, L8, L10, L11, L12, L13, L16, L19, L20 e L21	MEA YM	n.d. n.d.	16 10
17	L41, L42, L43, L51 e L52 L9	DRBC YM	n.d. n.d.	5 1
18	L26	DRBC	n.d.	1
19	L122 e L149 L14	MEA YM	n.d. n.d.	2 1

Continua

Tabela 3. (continuação)

Grupo	Isolados	Meio de Cultura	Espécie	Número de Isolados
	L157, L158	DRBC	n.d.	2
20	L151, L152, L180 e L182	MEA	n.d.	4
	L130, L153	MY	n.d.	2
	L162, L163, L164	YM	n.d.	3
21	L167	DRBC	n.d.	1
22	L181	MEA	n.d.	1
23	L174	DRBC	n.d.	1
24	L183	MEA	n.d.	1

Alguns estudos identificaram e caracterizaram isolados de leveduras do solo da Antártica. Troncoso et al. (2017), por exemplo, identificaram leveduras psicrotolerantes dos grupos dos basidiomicetos e criptococos, o que está de acordo com os estudos de Buzzini et al. (2012) e Buzzini & Margesin (2014). Segundo estes estudos, são encontradas na Antártica e nos habitats terrestres e marítimos da subantártica principalmente os gêneros *Cryptococcus*, *Candida*, *Rhodotorula* e *Mrakia*. No trabalho de Martorell et al. (2017) os gêneros *Cistobasidium*, *Fellomyces*, *Guehomyces*, *Leucosporidium*, *Meyerozyma*, *Nadsonia*, *Phenoliferia*, *Dioszegia*, *Protomyces*, *Glaciozyma*, e *Pichia* também foram isolados.

Em nosso estudo, utilizando o MALDI-TOF, dos 24 filotipos encontrados, somente um pôde ser identificado, o filotipo 12 (Figura 5), classificado como espécie *Pseudozyma aphidis* (score > 2).

O gênero *Pseudozyma* (um basidiomiceto) pertence à classe dos Ustilaginomycetes, e inclui 16 espécies. As espécies de *Pseudozyma* são leveduras ambientais comuns, geralmente isoladas de folhas de plantas, flores ou solo. Foi isolada inicialmente na Antártica em 1980 a partir de sedimentos do Lago Vanda (lago permanentemente coberto por gelo) (María et al. 2005). É um basidiomiceto anamórfico leveduriforme comumente encontrado em detritos vegetais, tendo importante papel na reciclagem dos nutrientes no meio ambiente (saprotroficos) (Boro et al. 2017). Algumas espécies recentemente estiveram envolvidas em infecções invasivas, como infecção pulmonar (Parahym et al. 2013).

O banco de dados do MALDI-TOF, utilizado neste estudo, de perfis de isolados de leveduras contem espectros de referência de vários isolados clínicos (Croxatto et al. 2012) e não ambiental. Isto explica por que quase todos os filotipos avaliados no nosso estudo não puderam ser classificados taxonomicamente. O fato de haverem relatos de infecções causadas por *Pseudozyma aphidis* em humanos explica o sucesso na classificação taxonômica desta espécie.

Os filotipos que não puderam ser caracterizados taxonomicamente neste trabalho podem ser avaliados por outras abordagens como, por exemplo, a de biologia molecular baseada no gene ITS-rRNA 18S.

Nosso estudo mostra que possivelmente as espécies contidas nas amostras analisadas não são espécies patogênicas conhecidas, mas não define, no entanto, que não possuam algum potencial patogênico.

Por se tratar de um ambiente extremo, com características peculiares, as espécies estão adaptadas a condições específicas e podem não ser encontradas em outros ambientes de temperaturas mais elevadas, indicando grande diversidade de leveduras ainda passíveis de caracterização e aproveitamento biotecnológico em ambientes antárticos.

Em alguns estudos o isolamento de leveduras do solo da Antártica foi feito utilizando somente o meio de cultura YM (Troncoso et al. 2017, Fernández et al. 2017, Martorell et al. 2017). Neste estudo utilizamos 4 meios de cultura diferentes, incluindo o meio de cultura YM. Os outros três meios utilizados foram DRBC, MEA e MY, que também são meios apropriados para isolamento de fungos. Foi observado que no meio DRBC houve o crescimento do maior número de isolados (39), seguido do MEA (35) YM (31) e MY (12). Depois da análise no MALDI-TOF, pudemos observar que o meio de cultura que permitiu o isolamento da maior quantidade de diferentes filotipos foi o DRBC (15), seguido do YM (11), MEA (9) e MY (6).

Estes resultados indicam que a utilização de diferentes meios de cultura no isolamento de leveduras de um mesmo ambiente pode ser eficaz na ampliação da obtenção de diferentes espécies de leveduras. Além disso, indica também diferenças entre as espécies de leveduras em relação às suas necessidades nutricionais. A sucessão de leveduras em um determinado nicho está envolvida em uma variedade de processos ecológicos e bioquímicos devido à sua habilidade em utilizar açúcares simples como fonte de energia (Kurtzman & Fell 1998). O DRBC foi o meio de cultura que se mostrou mais eficiente no isolamento de leveduras, ele é um meio que se difere dos demais principalmente por conter o reagente rosa bengala. O ágar rosa bengala com cloranfenicol é utilizado para o isolamento seletivo e contagem de leveduras e bolores. Em 1944, Smith e Dawson utilizaram Rosa Bengala para o isolamento seletivo de fungos em amostras de solo. Um pH neutro, com a adição de um agente seletivo, apresenta um meio eficaz para o crescimento de fungos e restrição do crescimento de bactérias. No entanto, como o nosso conhecimento sobre as espécies de leveduras que vivem em solos, especialmente os da Antártica, ainda é limitado, é necessário que sejam realizados mais estudos para melhorar nossa compreensão sobre o padrão de

distribuição de tais espécies, bem como a influência de fatores ambientais sobre essas espécies.

4. Conclusão

Neste estudo conseguimos isolar 117 fungos leveduriformes da rizosfera de *Deschampsia antarctica* Desv. da Baía do Almirantado (Ilha Rei George, Antártica).

A análise do perfil proteico dos isolados de leveduras permitiu a identificação de somente 1 espécie *Pseudozyma aphidis*, não sendo possível a identificação dos demais isolados.

O meio de cultura DRBC se mostrou ser o meio de cultura mais indicado para o isolamento de um maior número e maior diversidade de isolados, provavelmente por ter na sua composição o reagente rosa bengala que fornece nitrogênio, vitaminas e possui uma alta concentração de dextrose que propicia o crescimento das leveduras.

5. Referências Bibliográficas

- Aljohani, R., Samarasinghe, H., Ashu, T. & Xu, J. 2018. Diversidade e relações entre cepas de leveduras cultiváveis em solos agrícolas em Camarões. *Sci Rep.*, **8** (1): 15687.
- Ashbolt, N. J., Amézquita, A., Backhaus, T., Borriello, P., Brandt, K. K., Collignon, P., et al. 2013. Human health risk assessment (HHRA) for environmental development and transfer of antibiotic resistance. *Environ. Health Perspect.*, **121**, 993-1001.
- Bel, A. D. et al. 2011. Acceptance criteria for identification results of gram-negative rods by mass spectrometry. *Journal of Medical Microbiology*, **60**(5), 684-686.
- Bialkowska, A.M., Szulczewska, K.M. & Krysiak, J. 2017. Genetic and biochemical characterization of yeasts isolated from Antarctic soil samples. *Polar Biol*, **40**, 1787.
- Bier, D., Tutija, J. F., Pasquatti, T. N., Oliveira, T. L., Araújo, F. R., Verbisck, N. V. 2017. Identificação por espectrometria de massa MALDI-TOF de Salmonella spp. e *Escherichia coli* isolados de carcaças bovinas. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, **37**(12), 1373-1379.
- Boro, M., Castilho, J., Souza, A. L., Marano, J. I., Marano, A.V., Pires-Zottarelli, C. L. A. 2017. Molecular identification of *Pseudozyma aphidis* (Henninger & Windisch) Boekhout: first record from a Brazilian mangrove swamp. *Hoehnea*, **44**(4), 599-606.
- Botha, A. 2006. Yeast in soil. In: Rosa CA, Péter G (eds). *The Yeast Handbook; Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts*. Springer-Verlag, 221–40.
- Boekhout, T. & Phaff, H.J. 2003. Biodiversidade da levedura. Em: Boekhout T, Robert V (eds) *Leveduras em alimentos: aspectos benéficos e prejudiciais*. Woodhead, Cambridge / CRC, 1–38.
- Bowen, G.D., Rovira, A.D. 1999. The rhizosphere and its management to improve plant growth. *Advances in Agronomy*, **66**, 1– 102.
- Buzzini, P., Turchetti, B. & Yurkov, A. 2018. Extremophilic yeasts: the toughest yeasts around? *Fermento*, **35**, 487-497.
- Buzzini, P. & Margesin, R. 2014. Cold-Adapted Yeasts: A Lesson from the Cold and a Challenge for the XXI Century. *Cold-adapted Yeasts: Biodiversity, Adaptation Strategies and Biotechnological Significance*, **3**, 22.
- Buzzini, P., Branda, E., Goretti, M. & Turchetti, B. 2012. Psychrophilic yeasts from worldwide glacial habitats: diversity, adaptation strategies and biotechnological potential. *FEMS Microbiol Ecol*, **82**, 217–241.
- Cavicchioli, R., Siddiqui, K.S, Andrews, D. & Sowers, K.R. 2002. Low temperature extremophiles and their applications. *Curr Opin Biotechnol*, **13**, 253–261.

Cavicchioli, R. & Torsten, T. 2000. Extremophiles. In: Lederberg J (ed) *Enciclopèdia de microbiologia*, **2**, 317–337.

Chakrabarti, A. 2016. The Future of Infectious Diseases Diagnostics: MALDI-TOF. *International Journal of Infectious Diseases*, **45**, 1–477.

Connell, L.B., Rodriguez, R.R., Redman, R.S. & Dalluge, J.J. 2014. Coldadapted yeasts in Antarctic deserts. In: Buzzini P, Magresin R(eds) Cold-adapted yeasts. Biodiversity, adaptation strategies and biotechnological significance. *Springer*, 75–98.

Connell, L., Redman, R., Craig, S. & Scorzetti, G. 2008. Diversity of soil yeasts isolated from South Victoria Land, Antarctica. *Microb Ecol*, **56**, 448–59.

Croxatto, A., Prod'Hom, G., Greub, G. 2012. Applications of Maldi-Tof mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology, *FEMS Microbiology Reviews*, **36(2)**, 380-407.

Curl, E.A., Truelove, B. 1986. The Rhizosphere. Heidelberg, Germany: Springer-Verlag.

D'Amico, S., Collins, T., Marx, J.C., Feller, G. & Gerday, C. 2006. Psychrophilic microorganisms: challenges for life. *EMBO Rep*, **7**, 385–389.

Darrah, P.R. 1993. The rhizosphere and plant nutrition: a quantitative approach. *Plant and Soil*, 155/156, 1– 20.

D'Elia, T., Veerapaneni, R., Theraisnathan, V. & Rogers, S. 2009. Isolation of fungi from Lake Vostok accretion ice. *Mycologia*, **101**, 751–763

De Ruiter, P.C., Neutela, A. & Mooreb, J.C. 1998. Biodiversity in soil ecosystems: therole of energy flow and community stability. *Appl Soil Ecol*, **10**, 217–228.

Ekelund, F., Ronn, R. & Christensen, S. 2001. Distribution with depth of protozoa, bacteria and fungi in soil profiles from three Danish forest sites. *Soil Biol Biochem*, **33**, 475–81

Fernández, P.M., Martorell, M.M., Blaser, M.G. et al. 2017. Phenol degradation and heavy metal tolerance of Antarctic yeasts. *Extremophiles*, **21**, 445–457.

Fierer, N., Breitbart, M. & Nulton, J. et al. 2007. Metagenomic and small-subunit rRNA analyses reveal the genetic diversity of bacteria, archaea, fungi, and viruses in soil. *Appl Environ Microbiol*, **73**, 7059–66.

Finley, R. L., Collignon, P., Larsson, D. G., McEwen, S. A., Li, X. Z., Gaze, W. H., et al. 2013. The scourge of antibiotic resistance: the important role of the environment. *Clin. Infect. Dis.*, **57**, 704-710.

Fleet, G.H. 1998. Microbiology of alcoholic beverages. In: Microbiology of fermented food, **1**, Wood, B.J. (ed). London: Blackie Academic e Professional, 217-262.

- Fuentes-Lillo, E., Cuba-Dias, M., Troncoso-Castro, J. M., Rondanelli-Reyes, M. 2017. Seeds of non-native species in King George Island soil. *Antarctic Science*, **29**(4), 324-330.
- Gerday, A.M., Bentahir, M., Chessa, J.P., Claverie, P., Collins, T., D'Amico, S., Dumont, J.G., Garsoux, G. D., Hoyoux, A., Lonhienne, T., Meuwis, M.A. & Feller, G. 2000. Enzimas Coldadapted: de fundamentos da biotecnologia. *Tibtech*, **18**, 103–107
- Godinho, V.M., Gonçalves, V.N., Santiago, I.F. & Figueredo, H.M. 2015. Diversity and bioprospection of fungal community present in oligotrophic soil of continental Antarctica. *Extremophiles*, **19**, 585–96.
- González-Toril, E., Gómez, F., Rodríguez, N., Fernández-Remolar, D., Zuluaga, J., Marín, I. & Amils, R. 2003. Geomicrobiologia do rio Tinto, um modelo de interesse para a biohidrometalurgia. *Hidrometalurgia*, **71**, 301–309.
- Gounot, A.M. 1986. Psychrophilic and psychrotrophic microorganisms. *Experientia*, **42**, 1192–1197.
- Groenewald, M., Lombard, L., de Vries, M., Giraldo, A., Smith, L.M. & Pedro W Crous, P.W. 2018. Diversidade de espécies de leveduras de solo de jardim holandês e a descrição de seis novos Ascomicetos, *FEMS Yeast Research*, **18**.
- Guffogg, S., Thomas-Hall, S., Holloway, P. & Watson, K. 2004. A novel psychrotolerant member of the hymenomycetous yeasts from Antarctica: *Cryptococcus waticus* sp. nov. *Int J Syst Evol Micr*, **54**,275–277.
- Haichar, F.Z., Marol, C., Berge, O., Rangel-Castro, J.I., Prosser, J.I., et al. 2008. Plant host habitat and root exudates shape soil bacterial community structure. *The ISME journal*, **2**, 1221–1230.
- Hamid, D. B. 2018. Isolation and screening of psychrophilic yeast from gurez valley of j&k. **3**.
- Hinsinger, P. 1998. How do plant roots acquire mineral nutrients? Chemical processes involved in the rhizosphere. *Advances in Agronomy*, **64**, 225– 265.
- Hinsinger, P., Gobran G. R., Gregory, P. J., Wenzel, W.W. 2005. Rhizosphere geometry and heterogeneity arising from root-mediated physical and chemical processes. *New Phytologist*, **168**, 293–303.
- Jamal, W. Y. 2014. Comparative evaluation of two matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) systems for the identification of clinically significant yeasts. *International Journal of Infectious Diseases*, **26**(0), 167-170.
- Jones, D.L., Hodge, A., Kuzyakov, Y. 2004. Plant and mycorrhizal regulation of rhizodeposition. *New Phytologist*, **163**, 459– 480.

- Kielak, A., Pijl, A.S., van Veen, J.A., Kowalchuk, G.A. 2009. Phylogenetic diversity of Acidobacteria in a former agricultural soil. *The ISME journal*, **3**, 378–382.
- Kurtzman, C.P. & Fell, J.W. 1998. The Yeasts – A taxonomic Study, 1074 pp. Amsterdam, NL: Elsevier, **4**, 1074pp.
- Kurtzman, C. P. & Robnett, C. J. 1998. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek*, **73**, 331-371.
- Lachance, M.A., Starmer, W.T. 1998. Ecology and Yeasts In: Kurtzman, CP.; Fell, JW. The yeasts, a Taxonomic Study, *Amsterdam: Elsevier Science*, **4**, 21-30.
- Leite, F.. 2003. Amostragem Analítica em Laboratório. T&E Analítica, **6**.
- Lima-Neto, R. et al. 2014. Application of MALDI-TOF MS for requalification of a Candida clinical isolate culture collection. *Brazilian Journal of Microbiology*, São Paulo, **45(2)**, 515-522.
- Lima, N. & Santos C. 2017. MALDI-TOF MS for identification of food spoilage filamentous fungi. *Current Opinion in Food Science*, **13**, 26–30.
- María, P.D., Carboni-Oerlemans, C., Tuin, B., Bargeman, G., Meer, A., Gemert, R. 2005. Biotechnological application of Candida antarctica lipase A: Stat of the art. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **37**, 36-46.
- Marklein, G., Josten, M., Klanke, U., Müller, E., Horré, R., Maier, T., Wenzel, T., Kostrzewa, M., Bierbaum, G., Hoerauf, A., Sahl, H.G. 2009. Matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry for fast and reliable identification of clinical yeast isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, **47(9)**, 2912-2917.
- Martínez, J.L. 2008. Antibiotics and antibiotic resistance genes in natural environments. *Science*, **321**, 365–367.
- Martorell, M. M., Ruberto, L. A. M., Fernández, P. M., Castellanos de Figueroa, L. I. & Mac Cormack, W. P. 2017. Bioprospection of cold-adapted yeasts with biotechnological potential from Antarctica. *Journal of Basic Microbiology*, **57**, 504– 516.
- Marvin, L.F.; Roberts, M.A.; Faya, L.B. 2003. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in clinical chemistry. *Clin Chim Acta*, **337**, 11-21.
- Moreira, G.A.M. & Vale, H. M.M. 2018. Occurrence of Yeast Species in Soils under Native and Modified Vegetation in an Iron Mining Area. *Rev Bras Cienc Solo*, **42**, e0170375.

- Parahym, A.M., da Silva, C.M., Domingos, I.F., Gonçalves, S.S., Rodrigues M.V.L. 2013. Infecção pulmonar devido a *Pseudozyma afidis* em um paciente com linfoma de Burkitt: primeiro relato de caso. *Diagn. Microbiol. Infectar*, **75**, 104-106
- Pasternak, J. 2012. Novas metodologias de identificação de micro-organismos: MALDI-TOF. *Einstein, São Paulo*, **10(1)**.
- Phaff, H.J. & Starmer, W.T. 1987. Yeast Associated with Plants, Insects and Soil. In: Rose and Harrison eds. *The Yeasts. Academic Press, London*, **1**, 123-180.
- Pruden, A., Larsson, D. G. J., Amézquita, A., Collignon, P., Brandt, K. K., Graham, D. W., et al. 2013. Management options for reducing the release of antibiotics and antibiotic resistance genes to the environment. *Environ. Health Perspect.* **121**, 878-885.
- Robinson, C.H. 2001. Cold adaptation in Arctic and Antarctic fungi. *New Phytol*, **51**, 341–353.
- Qian, J. et al. 2008. MALDI-TOF mass signatures for differentiation of yeast species, strain grouping and monitoring of morphogenesis markers. *Anal Bioanal Chem.*, **392(3)**, 439-449. 2008.
- Rothschild, L.J. & Mancinelli, R.L. 2001. Life in extreme environments. *Nature*, **409**, 1092 – 1101.
- Santiago, I.F., Alves, T.M.A., Rabello, A., Sales-Júnior, P.A. & Romanha, A.J. et al 2012. Leishmanicidal and antitumoral activities of endophytic fungi associated with the Antarctic angiosperms *Deschampsia antarctica* Desv. and *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. *Extremophiles*, **16**, 95–103.
- Seng, P. et al. 2009. Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Infect Dis*, **49(4)**, 543-51.
- Shivaji, S. & Prasad, G.S. 2009. Antarctic yeast: biodiversity and potential application. In: Satyanarayana T, Kunze G (eds) *Yeast biotechnology: diversity and applications. Springer*, 3–16.
- Smith, N. R. & Dawson, V.T. 1944. The bacteriostatic action of rose bengal in media used for the plate counts of soil fungi. *Soil Sci*, **58**, 467-471.
- Simr, S. & Arigony Neto, J., Bremer, U. F. 2004. O uso de mapas antogy: diver publicae mapa. *Pesq. Antart. Brasil*, **4**, 191-197.
- Sláviková, E. & Vadertiová, R. 2000. The occurrence of yeasts in the forest soils. *J Basic Microbiol*, **40**, 207–12.
- Sláviková, E. & Vadertiová, R. 2003a. The diversity of yeasts in the agricultural soil. *J Basic Microbiol*, **43**, 430–6.

Sláviková, E. & Vadertiová, R. 2003b. The occurrence of yeasts in the grass grown soils. *Czech Mycol*, **54**, 182–7.

Smalla, K., Wieland, G., Buchner, A., Zock, A., Parzy, J. *et al.* 2001. Bulk and rhizosphere soil bacterial communities studied by denaturing gradient gel electrophoresis: Plant-dependent enrichment and seasonal shifts revealed. *Applied and environmental microbiology*, **67**, 4742–4751.

Thomas-Hall, S., Turchetti, B., Buzzini, P., Branda, E., Boekhout, T., Theelen, B. & Watson, K. 2010. Cold-adapted yeasts from Antarctica and the Italian Alps—description of three novel species: *Mrakia robertii* sp. nov., *Mrakia lollopolis* sp. nov. and *Mrakiellanicombsii* sp. nov. *Extremophiles*, **14**, 47–59.

Thomas-Hall, S. & Watson, K. 2002. *Cryptococcus nyarrowii* sp. nov., abasidiomycetous yeast from Antarctica. *Int J Syst Evol Microbiol*, **52**, 1033–1038.

Thomas-Hall, S., Watson, K. & Scorzetti, G. 2002 *Cryptococcus statzelliae* sp. nov. and three novel strains of *Cryptococcus victoriae*, yeasts isolated from Antarctic soils. *Int J Syst Evol Micr*, **52**, 2303–2308.

Troncoso, E., Barahona, S., Carrasco & M. *et al.* 2017. Identification and characterization of yeasts isolated from the South Shetland Islands and the Antarctic Peninsula. *Polar Biol*, **40**, 649.

Vadkertiová, R., Dudášová, H. & Balaščíková, M. 2017. Yeasts in agricultural and managed soils. In: Buzzini P, Lachance MA, Yurkov AM (eds) *Yeasts in natural ecosystems: Diversity*. Springer, 171–144.

Vaz, A.B.M., Rosa, L.H., Vieira, M.L.A., Garcia, V., Brandão, L.R., Teixeira, L.C.R.S., Moliné, M., Libkind, D., van Broock, M. & Rosa, C.A. 2011. The diversity, extracellular enzymatic activities and photoprotective compounds of yeasts isolated in Antarctica. *Braz J Microbiol*, **42**, 937–947

Vishniac, H.S. 2006. A Multivariate Analysis of soil yeasts isolated from a latitudinal gradient. *Microb Ecol.*, **52**, 90-103.

Wright, G. D. 2010. Antibiotic resistance in the environment: a link to the clinic? *Curr. Opin. Microbiol.*, **13**, 589-594.

Yergeau, E. & Kowalchuk, G.A. 2008. Respostas de comunidades microbianas do solo antártico e funções associadas à temperatura e frequência do ciclo de congelamento e descongelamento. *Environ Microbiol.*, **10**, 2223–2235

Yurkov, A.M. 2018. Yeasts of the soil – obscure but precious. *Yeast*, **35**, 369–78.

Yurkov, A.M., Röhl, O., Pontes, A., Carvalho C., Maldonado, C., Sampaio, J.P. 2016. Local climatic conditions constrain soil yeast diversity patterns in Mediterranean forests, woodlands and scrub biome. *Fungal Ecol*, **16**, 1–11.

Yurkov, A.M., Kemler, M. & Begerow, D. 2012a. Assessment of yeast diversity in soils under different management regimes. *Fungal Ecol*, **5**, 24–35.

Yurkov, A., Wehde, T. & Kahl, T. *et al.* 2012b. Aboveground deadwood deposition supports development of soil yeasts. *Diversity*, **4**, 453–74.

Yurkov, A.M., Kemler, M. & Begerow, D. 2011. Species accumulation curves and incidence-based species richness estimators to appraise the diversity of cultivable yeasts from beech forest soils. *Fungal Ecol*, **5**, 33-35.