

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA MOLECULAR E BIOTECNOLOGIA
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
Laboratório de Microrganismos de Importância Médica e Biotecnológica

**DIVERSIDADE DE FUNGOS MARINHOS ISOLADOS DO ARQUIPÉLAGO DE
SÃO PEDRO E SÃO PAULO**

Rafaela Davis da Silva Trisch
Orientadora: Profa. Dra. Marilene Henning Vainstein

Porto Alegre, janeiro de 2024.

RAFAELA DAVIS DA SILVA TRISCH

Diversidade de Fungos Marinhos Isolados do Arquipélago de São Pedro e São Paulo

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado como requisito parcial para a
obtenção do título de Bacharel em
Biotecnologia Molecular na Universidade
Federal do Rio Grande do Sul

Orientadora: Profa. Dra. Marilene Henning
Vainstein

PORTO ALEGRE

2024

CIP - Catalogação na Publicação

Trisch, Rafaela Davis da Silva
Diversidade de Fungos Marinhos Isolados do
Arquipélago de São Pedro e São Paulo / Rafaela Davis
da Silva Trisch. -- 2024.
65 f.
Orientador: Marilene Henning Vainstein.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) --
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto
de Biociências, Curso de Biotecnologia: Biotecnologia
Molecular, Porto Alegre, BR-RS, 2024.

1. Microbiologia. 2. Leveduras. 3. Biodiversidade.
4. Biofilme. 5. Salinidade. I. Vainstein, Marilene
Henning, orient. II. Título.

RAFAELA DAVIS DA SILVA TRISCH

Diversidade de Fungos Marinhos Isolados do Arquipélago de São Pedro e São Paulo

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia Molecular na Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientadora: Profa. Dra. Marilene Henning
Vainstein

Avaliado em: Porto Alegre, 25 de janeiro de 2024

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Augusto Schrank

Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia

Msc. Maiara Monteiro Oliveira

Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Microrganismos de Importância Médica e Biotecnológica (LMIMB) do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, com apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

AGRADECIMENTOS

Toda vez que eu abro uma monografia, a primeira coisa que faço é ler os agradecimentos. Sempre achei bonito e reconfortante ver que toda jornada é de alguma forma compartilhada e que os caminhos de tanta gente se entrelaçam. Para mim, não poderia ser diferente. E é por isso que tenho tantos agradecimentos a fazer.

Agradeço à minha família por uma vida inteira de apoio, amor, atenção e carinho, principalmente aos meus pais e à minha irmã, Lívia, que são minha força e minha maior saudade nessa nova vida porto-alegrense. Ao meu pai, Moisés, a maior inspiração que eu poderia ter, por ter se empenhado tanto para realizar os seus sonhos e por fazer de tudo para que eu e a Lívia também possamos realizar os nossos. À minha mãe, que tem o coração mais lindo do mundo, minha grande amiga, que aguenta eu ligando milhares de vezes ao dia. À Lívia, que me ensina todo dia sobre o amor e sobre a felicidade. Agradeço em especial à minha vó, Ernestina, por todas as orações e a torcida constante. Feliz demais em saber que você já está escolhendo o vestido para a minha formatura, vó, porque sempre foi meu sonho que você estivesse presente nela.

À minha orientadora, Profa. Dra. Marilene, agradeço por me proporcionar a oportunidade de aprender tanto, por me receber em seu laboratório e pelo carinho e atenção dedicados ao longo desses quase dois anos.

Agradeço também aos meus amigos e primos, por tornar os dias mais fáceis, as coisas difíceis mais leves e pelas conversas intermináveis sobre tudo, mas, na maior parte do tempo, sobre nada. Amo vocês.

Agradeço aos meus colegas de laboratório, principalmente do 220, 217, 219 e 222. Sem a ajuda de vocês e os milhares de ensinamentos, essa jornada seria impossível. Agradeço em especial a Maiara, por todo auxílio, e a quem eu considero mais que uma colega, uma amiga.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul e a todo o corpo docente, por todas as oportunidades e aprendizados.

Às agências de fomento CAPES, CNPq e FAPERGS.

Não sou nada.

Nunca serei nada.

Não posso querer ser nada.

À parte isso, tenho em mim todos os sonhos do mundo.

(Fernando Pessoa)

RESUMO

O Arquipélago de São Pedro e São Paulo (ASPSP), pertencente a Pernambuco, destaca-se pela biodiversidade única devido ao isolamento, enriquecimento das águas e por ser uma rota migratória de peixes e aves. O ASPSP é um ambiente com características extremófilas, como altas temperaturas, nutrientes limitados, alta radiação ultravioleta e águas altamente salinas. Em uma expedição oceanográfica ao ASPSP, foi realizado um estudo abrangente sobre os microrganismos isolados de diferentes amostras ambientais. Foram isoladas, dentre outros microrganismos, diversas leveduras, incluindo não-convencionais e leveduras negras. O estudo visa explorar diversidade microbiológica e metabólica das leveduras no ASPSP, identificando isolados molecularmente e compreendendo suas interações com fatores externos únicos do ambiente extremo. As 12 leveduras selecionadas tiveram suas regiões Espaçadoras Transcritas Internas (ITS) sequenciadas, sendo usadas para identificação das mesmas. Foi feita a avaliação morfológica das leveduras e, além disso, fez-se um ensaio de melanização utilizando meio mínimo, suplementado com L-DOPA, para entender a capacidade das leveduras negras de metabolizar L-DOPA. A fim de verificar se as leveduras isoladas no ASPSP formam biofilme, foi realizado um experimento usando cristal violeta a 2%. Além disso, foram testadas a metabolização de 31 fontes de carbono por três das leveduras, além do crescimento de sete delas em diferentes salinidades. Das 12 leveduras selecionadas, sete foram identificadas a nível de espécie. Foram observados diversas estruturas microscópicas, como conidióforos, conídios, hifas septadas, pseudohifas e clamidosporos. Todas as leveduras negras formam biofilme, enquanto apenas uma das demais leveduras testadas não foi capaz de formar. Não houve metabolização de L-DOPA, o que revela uma estratégia metabólica distinta. Apenas uma das leveduras testadas não foi capaz de metabolizar nenhuma das fontes de carbono. Todas as sete leveduras avaliadas para crescimento em diferentes concentrações de NaCl cresceram em porcentagem de ao menos 4%. Essas descobertas enfatizam características morfológicas das leveduras negras, que permitem a adaptação a ambientes extremos e contribuem para compreensão da diversidade microbiológica do ASPSP e dos microrganismos extremófilos e suas adaptações.

Palavras-chave: Arquipélago de São Pedro e São Paulo; levedura; biofilme; habitats marinhos extremos; biodiversidade, salinidade; morfologia.

ABSTRACT

The São Pedro and São Paulo Archipelago (ASPSP), located in Pernambuco, stands out for its unique biodiversity due to isolation, water enrichment, and being a migratory route for fish and birds. ASPSP is an environment with extremophilic characteristics such as high temperatures, limited nutrients, high ultraviolet radiation, and highly saline waters. A comprehensive study on microorganisms isolated from different environmental samples was conducted during an oceanographic expedition to ASPSP. Among various microorganisms, several yeasts, including unconventional and black yeasts, were isolated. The study aims to explore the microbiological and metabolic diversity of yeasts in ASPSP, molecularly identifying isolates and understanding their interactions with unique external factors of the extreme environment. The 12 selected yeasts had their Internal Transcribed Spacer (ITS) regions sequenced for identification. Morphological evaluation of yeasts was performed, and a melanization assay using minimal medium supplemented with L-DOPA was conducted to understand the ability of black yeasts to metabolize L-DOPA. An experiment using 2% crystal violet was carried out to verify if the isolated yeasts in ASPSP form biofilms. Additionally, the metabolism of 31 carbon sources by three yeasts and the growth of seven yeasts at different salinities were tested. Seven out of the 12 selected yeasts were identified at the species level. Various microscopic structures such as conidiophores, conidia, septate hyphae, pseudohyphae, and chlamydospores were observed. All black yeasts formed biofilms, while only one of the other yeasts tested was unable to form. No L-DOPA metabolism was observed, indicating a distinct metabolic strategy. Only one of the tested yeasts was unable to metabolize any of the carbon sources. All seven yeasts evaluated for growth at different NaCl concentrations grew by at least 4%. These findings highlight the morphological characteristics of black yeasts, enabling adaptation to extreme environments and contributing to the understanding of the microbiological diversity of ASPSP and extremophilic microorganisms and their adaptations.

Keywords: São Pedro and São Paulo Archipelago; yeast; biofilm; extreme marine habitats; biodiversity; salinity; morphology.

Sumário

1.INTRODUÇÃO.....	11
1.1. Arquipélago de São Pedro e São Paulo	11
1.2. Diversidade fúngica e sua importância.....	12
1.3. Influência de fatores abióticos na sobrevivência microbiana	15
1.4. Mecanismos adaptativos a ambientes extremos.....	15
1.4.1. Formação de Biofilme e seu papel ambiental.....	15
1.4.2. Metabolização de diferentes fontes de carbono.....	16
1.4.3. Sobrevivência a temperaturas extremas e alta salinidade.....	17
2. OBJETIVOS.....	20
2.1. OBJETIVO GERAL.....	20
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
3.1. Bioprospecção e seleção das leveduras	21
3.2. Identificação Molecular das Leveduras.....	21
3.3. Microcultivo, análise da morfologia das colônias e lâminas frescas.....	22
3.4. Ensaio de Melanização em Meio Sólido.....	22
3.5. EcoPlate	23
3.6. Ensaio de Formação de Biofilme.....	23
3.7. Ensaio de Halotolerância.....	24
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
4.1. Identificação molecular das espécies das amostras de leveduras.....	25
4.2. Identificação de estruturas morfológicas das leveduras isoladas.....	33

4.3. Metabolização de levodopa.....	38
4.4. Metabolização de diferentes fontes de carbono.....	39
4.5. Formação biofilme e sobrevivência em diferentes concentrações salinas.....	42
5. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	48
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49

1. INTRODUÇÃO

1.1. Arquipélago de São Pedro e São Paulo

Em junho de 2023, a Estação Científica do Arquipélago de São Pedro e São Paulo completou 25 anos de atuação. O Arquipélago de São Pedro e São Paulo (ASPSP) é uma Área de Proteção Ambiental (APA), que integrou a APA Fernando de Noronha-Rocas-São Pedro e São Paulo entre 1986 e 2018. Em 2018, a APA do ASPSP foi criada, abrangendo boa parte da Zona Econômica Exclusiva (ZEE) brasileira, que possui um raio de cerca de 200 milhas marinhas (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2018). A menor distância entre o Arquipélago e a costa brasileira é com o Rio Grande do Norte, cerca de 1.000 km, apesar do mesmo pertencer ao Estado de Pernambuco (MESQUITA, 2017). O Arquipélago possui uma área emersa de aproximadamente 17.000 m² e é constituído por um conjunto de ilhas (Figura 1), sendo sismicamente ativo, uma vez que está sobre a falha tectônica de São Paulo (CARVALHO, 2012). Diferenciando-se da composição das demais ilhas pertencentes ao Brasil, como Fernando de Noronha, que se originam de rochas magmáticas, o ASPSP destaca-se ao ser constituído por rochas de peridotitos serpentinizados do manto abissal, uma singularidade, visto que não há outras áreas oceânicas acima do nível do mar com essa configuração rochosa (MOTOKI et al., 2009).

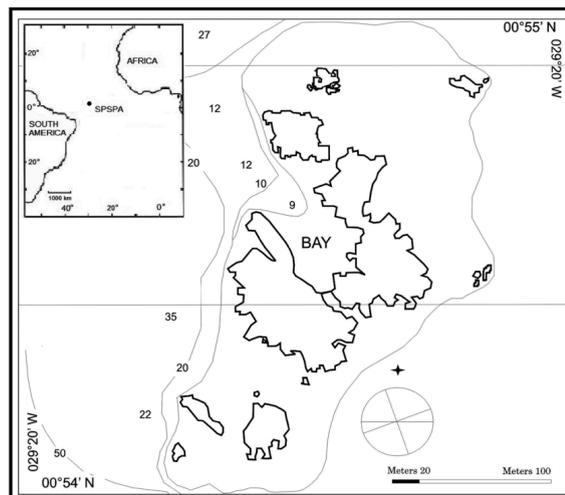


Figura 1: Ilhotas do Arquipélago de São Pedro e São Paulo. Figura obtida de Carvalho-Filho, Macena e Nunes (2016).

Ademais, o ASPSP, por conta, em parte, de sua formação rochosa, não possui vegetação de médio e grande porte e apresenta clima quente e úmido, visto que está localizada próximo à linha do Equador (MESQUITA, 2017). O Arquipélago é detentor de uma grande biodiversidade, apesar de seu isolamento geográfico (HAUEISEN; FELIPE, 2019), pois ocorre enriquecimento nutritivo das águas e é rota migratória de diversos peixes e aves (FADIGAS VIANA et al., [s.d.]). Essas características fazem com que o ASPSP seja uma área intercontinental de interesse econômico, científico e estratégico.

A partir do Programa Arquipélago de São Pedro e São Paulo, o grupo de pesquisa do Laboratório de Biologia Celular e Molecular de Fungos Filamentosos (LBCMFF) vinculado ao Centro de Biotecnologia (CBiot) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) realizou uma expedição ao ASPSP, entre os dias 14 e 29 de março de 2022. Essa expedição tinha como objetivo coletar amostras de rochas, água, guano, plantas, algas, sedimentos etc., a fim de isolar fungos leveduriformes e filamentosos presentes na região.

O projeto aprovado através da “Chamada CNPq - Nº 31/2019 - Programa Arquipélago e Ilhas Oceânicas” visa encontrar moléculas bioativas através da identificação de genes relacionados à biossíntese de metabólitos secundários (CHEN *et al.*, 2020). Para isso, duas abordagens estão sendo utilizadas: (I) isolamento de fungos, seguido da caracterização dos mesmos através de técnicas clássicas de micologia, avaliando o potencial antifúngico e antibacteriano das espécies, assim como a análise do genoma dos isolados, identificando os agrupamentos gênicos envolvidos na biossíntese de metabólitos secundários e (II) bioprospecção de genes envolvidos na biossíntese de metabólitos secundários em fungos, a partir da metagenômica *shotgun*. Assim, esse trabalho deriva do projeto maior, com o objetivo de estudar a diversidade de alguns dos fungos marinhos isolados do Arquipélago de São Pedro e São Paulo.

1.2. Diversidade fúngica e sua importância

As leveduras possuem ampla distribuição no planeta, estando presentes em grande parte dos ambientes, incluindo os marinhos. Essas leveduras presentes em

ecossistemas marinhos são encontradas na água do mar, sedimentos marinhos, algas e animais marinhos invertebrados e vertebrados (SEGAL-KISCHINEVZKY *et al.*, 2022). As leveduras são organismos eucarióticos majoritariamente unicelulares, diferenciando-se dos “bolors” ou fungos filamentosos, que podem ser multicelulares e apresentam a formação de hifas (FISCHER; GLASS, 2019). Leveduras são fungos que normalmente se reproduzem assexuadamente por brotamento ou por fissão, tendo como característica importante a não formação de corpos de frutificação. Predominantemente parte dos filos Ascomycota e Basidiomycota, a maioria das leveduras é classificada na classe Saccharomycetes ou Hemiascomycetes, que se caracterizam pela reprodução por brotamento (DUJON, 2006). Esses microrganismos, que são conhecidos como decompositores primários, integrando diversos processos naturais, como mineralização de nutrientes (SEGAL-KISCHINEVZKY *et al.*, 2022), vêm sendo utilizados há séculos em inúmeros processos industriais, incluindo os fermentativos.

De grande importância na indústria alimentícia, as leveduras participam da produção de metabólitos secundários bioativos já conhecidos, como o β -glucana, carotenóides, ácidos, como o ácido aminobutírico, oligossacarídeos, álcoois de açúcares, como xilitol e arabitol, entre outros (KUMDAM; MURTHY; GUMMADI, 2013; RAI *et al.*, 2019; ALLAHKARAMI *et al.*, 2021). Além disso, diversas leveduras possuem propriedades probióticas, como a *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis* e *Pichia fermentase* (RAI; PANDEY; SAHOO, 2019). Ademais, as leveduras podem ser utilizadas na expressão de proteínas recombinantes, sendo seu uso vantajoso em relação a bactérias, uma vez que são organismos eucariotos com maior capacidade de realizar mudanças pós-transcricionais (NTANA *et al.*, 2020). Assim, podem participar da síntese de diversas proteínas de uso comercial, de uso terapêutico e na fabricação de biocombustíveis (NANDY; SRIVASTAVA, 2018). Segundo Shruthi *et al.* (2022) e Ma *et al.* (2023), as leveduras são utilizadas na síntese de compostos antimicrobianos, atuando como antagonistas e encapsulando patógenos, como outros fungos e bactérias. Além disso, encontram-se na rizosfera, promovendo o desenvolvimento de diversas plantas (SARABIA *et al.*, 2018) e também metabolizando metais como o mercúrio e o chumbo de áreas contaminadas, através do processo de biorremediação (SHRUTHI *et al.*, 2022). O conjunto de características fisiológicas e metabólicas que

possibilitam o amplo uso dos fungos leveduriformes na indústria é também o responsável por suas capacidades de adaptação, permitindo que muitas espécies de leveduras ocupem uma variedade de ambientes, inclusive os mais extremos (SEGAL-KISCHINEVZKY et al., 2022).

As leveduras negras são fungos dematiáceos, com paredes celulares espessas e melanizadas, pertencentes ao filo Ascomycota (SEYEDMOUSAVI et al., 2014), ELSAYIS et al., 2022, NOSANCHUK et al., 2015). São caracterizadas pela presença de uma fase leveduriforme, quando em ambientes ricos em nutrientes, reproduzindo-se por brotamento. Entretanto, as leveduras negras possuem um estágio micelial, que faz parte de um mecanismo adaptativo, como resposta a condições extremas, principalmente marcadas por altas temperaturas, hipersalinidade, radiação UV e baixa disponibilidade de nutrientes (SEYEDMOUSAVI et al., 2014, CAÑETE-GIBAS; WIEDERHOLD, 2018). A ampla distribuição de espécies de leveduras negras em ambientes marinhos e extremófilos, como *Aureobasidium pullulans*, pode ser explicada por suas estruturas e adaptações (SEGAL-KISCHINEVZKY et al., 2022). Há, ainda, a formação de hifas verdadeiras, pseudohifas e hifas moniliformes (WANG; SZANISZLO, 2007) e, assim, através dessa junção de atributos, esses microrganismos são classificados como fungos dimórficos. A transição entre as fases leveduriforme e micelial é mediada por fatores de transcrição, envolvidos em vias de sinalização intracelulares e extracelulares (SEYEDMOUSAVI et al., 2014). Wang e Szaniszlo (2007) demonstraram que o gene *WdStuAp* codifica um fator de transcrição que atua na regulação, negativa e positiva, da morfologia da levedura negra *Exophiala dermatitidis* (WANG; SZANISZLO, 2007). Em outros fungos, por exemplo, como em *Metarhizium rileyi*, a transição entre o estágio hifal e leveduriforme é mediada pelo fator de transcrição *MrMsn2*, indicando que vários genes podem ser responsáveis pelo processo de transição entre as fases (SONG et al., 2018). Ademais, o desenvolvimento dessas leveduras é lento e, quando hifal, geralmente ocorre em meio sólido (CAÑETE-GIBAS; WIEDERHOLD, 2018, ELSAYIS et al., 2022). O polimorfismo da *Exophiala dermatitidis*, a título de exemplo, foi observado como resultado do tempo de cultivo, meio utilizado e tempo de incubação (CAÑETE-GIBAS; WIEDERHOLD, 2018).

1.3. Influência de fatores abióticos na sobrevivência microbiana

Fatores abióticos estão relacionados a diversos processos como a sobrevivência, adaptação e virulência de microrganismos. No entanto, condições como escassez nutricional, alta incidência de radiação ultravioleta, compreendendo diferentes comprimentos de onda, incluindo a UV-A, UV-B e UV-C, variações expressivas de temperatura, variações de pH, alta salinidade (2-20% de NaCl) e pressão atmosférica são consideradas fatores de estresse que modulam a diversidade microbiana do ambiente (SEGAL-KISCHINEVZKY *et al.*, 2022). Por exemplo, quando em ambiente de alta salinidade, ocorre a alteração da homeostase nos microrganismos, diminuindo a permeabilidade da membrana e levando ao alto gasto energético para manter o equilíbrio osmótico. Ainda, a junção desses fatores pode levar a mais danos, como em ambientes acidificados, onde há o aumento na solubilidade de metais pesados, aumentando a sua toxicidade (CHUAN *et al.*, 1996). Muitos ambientes concentram mais de uma dessas condições, onde apenas se desenvolvem microrganismos poliextremófilos e poliextremotolerantes.

O ASPSP apresenta diversas condições de estresse abiótico caracterizadas pela vegetação escassa, fontes nutricionais reduzidas, elevada exposição à radiação UV e alta salinidade. Isso é explicado pela proximidade territorial do ASPSP com a linha do Equador (CORREA, 2015) e também por conta da organização estrutural e dimensional das ilhas que o compõem e sua distância dos continentes. Desta forma, o ASPSP pode ser considerado um ambiente extremo. Assim, é possível que em sua biodiversidade existam microrganismos com características especiais de adaptação.

1.4. Mecanismos adaptativos a ambientes extremos

1.4.1. Formação de Biofilme e seu papel ambiental

A estruturação do biofilme é formada por um consórcio de microrganismos que produzem e se desenvolvem em meio a uma matriz extracelular (YIN *et al.*, 2019). A matriz extracelular é formada pela substância extracelular polimérica (EPS), sendo ela normalmente composta por proteínas, polímeros, ácidos nucleicos e lipídios (FLEMMING; WINGENDER, 2010). Essa substância tem sua composição

modulada pelos microrganismos presentes no biofilme e pelo ambiente em que está inserida, sendo que a composição da mesma é responsável por manter a matriz hidratada e outras propriedades específicas do biofilme (PARRILLI; TUTINO; MARINO, 2022). A formação de biofilme é parte de um processo complexo que envolve a adesão inicial dos microrganismos em uma superfície, que pode ser abiótica ou biótica, seguida da produção de EPS pelos microrganismos e do desenvolvimento da estrutura tridimensional do biofilme (RICCIARDELLI *et al.*, 2019). Esse tipo de forma de desenvolvimento ocorre em processos de homeostase, possibilitando interações complexas entre os organismos que o compõem, além de promover a proteção dos microrganismos localizados em ambientes considerados extremos (PARRILLI; TUTINO; MARINO, 2022). Além disso, o biofilme possui papel importante na produção e decomposição de matéria orgânica, participando da ciclagem de nutrientes.

Diversos fungos apresentam-se em forma de biofilme no ambiente. O estabelecimento do biofilme está relacionado à patogenicidade dos microrganismos, resistência a tratamentos e à resposta imune (KIRCHHOFF *et al.*, 2017, KIRCHHOFF *et al.*, 2020). Ademais, esse tipo de organização estrutural dos microrganismos está relacionado à resistência ao estresse, permitindo que microrganismos, como as leveduras, sobrevivam em diversos ambientes extremos. Desta forma, o biofilme é a forma predominante de crescimento ambiental de microrganismos, estando relacionados à distribuição e ao sucesso na sobrevivência dos microrganismos que os formam. Principalmente, quando localizados em ambientes extremos, pois acaba permitindo a resistência a variações de pH, do índice de radiação ultravioleta, da temperatura, da salinidade, da pressão atmosférica e da disponibilidade de nutrientes (YIN *et al.*, 2019). Isso porque, o ambiente em que ocorre a formação do biofilme modula diretamente a disponibilidade de macromoléculas, alterando propriedades físico-químicas, a sua composição e estrutura (RICCIARDELLI *et al.*, 2019).

1.4.2. Metabolização de diferentes fontes de carbono

Em ambientes extremos pode haver baixa disponibilidade nutricional, o que torna a capacidade de metabolização de diferentes substratos uma característica adaptativa importante. Leveduras possuem a capacidade de metabolizar diferentes

substratos, como fontes de carbono e de nitrogênio, além de aminoácidos (COSTENOBLE et al., 2011). As leveduras não-convencionais, como são chamadas as leveduras que diferem de espécies mais estudadas (ex. *Saccharomyces cerevisiae*), como algumas leveduras oleaginosas das espécies *Yarrowia lipolytica* e *Rhodotorula toruloids*, possuem a capacidade de metabolizar fontes de carbono de interesse industrial, como acetato e xilose (TIUKOVA et al., 2019). *Debaryomyces hansenii*, outra levedura oleaginoso, também já foi identificada como metabolizadora de xilose, além de ser considerada um microrganismo extremófilo, em que há a regulação positiva das rotas lipogênicas, promovendo a produção de lipídios que atuam como antioxidantes em situações de estresse (NAVARRETE et al., 2021). A ampla utilização de diferentes substratos como fonte de carbono auxilia na ampliação do nicho ecológico em que esses microrganismos podem sobreviver.

1.4.3. Sobrevivência a temperaturas extremas e alta salinidade

Em ambientes com temperaturas mais elevadas, baixas ou em regiões em que há alta variabilidade de temperatura, os microrganismos que conseguem sobreviver podem ser classificados como termofílicos ou termotolerantes (PIAZZA et al., 2020). As leveduras termofílicas, como *Kazachstania bovina* e *Pichia kudriavzevii* (TECHAPARIN; THANONKEO; KLANRIT, 2017; BUZZINI et al., 2018), apresentam crescimento ótimo em condições de temperaturas mais elevadas ou mais baixas. Já os microrganismos termotolerantes geralmente sobrevivem a essas condições estressantes, mas não apresentam um desenvolvimento ótimo. Nesses casos, alguns mecanismos adaptativos permitem com que esses microrganismos apresentem crescimento. Um desses mecanismos é o ajuste na produção de ácidos graxos saturados para ambientes com altas temperaturas e ácidos graxos insaturados para ambientes com baixas temperaturas. Nos dois casos, a síntese desses ácidos graxos está relacionada à manutenção da fluidez da membrana plasmática celular (LEACH; COWEN, 2014).

Em ambientes com alta salinidade, os microrganismos que apresentam crescimento podem ser classificados como halofílicos ou halotolerantes. Os microrganismos halofílicos apresentam crescimento ótimo em meios com NaCl, enquanto os halotolerantes crescem nesse tipo de meio, mas possuem crescimento ótimo em meios com ausência do sal (DIDARI et al., 2020). Nesse tipo de situação,

há desequilíbrio nas concentrações dos íons Na⁺ e K⁺, interferindo na homeostase dos microrganismos. Muitos são os mecanismos nos quais esses microrganismos halotolerantes utilizam para conseguirem sobreviver em ambientes hipersalinos. Dentre as leveduras, destaca-se a espécie *Debaryomyces hansenii*, que é uma das mais estudadas a respeito da tolerância a altas concentrações de NaCl (CORTE et al., 2006). A via de glicerol de alta osmolaridade (HOG) é um dos principais mecanismos de resposta a esse tipo de estresse, que atua na detecção da salinidade e na osmoadação, além de permitir, através da ativação da glicerol-3-fosfato desidrogenase 1 (GPD1) e de outras enzimas, o aumento na produção de glicerol e a diminuição do estresse oxidativo causado por condições de hipersalinidade (CHAMEKH et al., 2019). Essa via é ativada pela fosforilação da proteína quinase Hog1 (MAPK). Ademais, há o acúmulo de solutos, a fim de aumentar a osmolaridade interna dos microrganismos, além de mudanças nos transportadores de íons e na fluidez da membrana plasmática, com objetivo de modificar a permeabilidade da mesma (CHAMEKH et al., 2019).

Por sua vez, as leveduras negras sintetizam melanina, um pigmento essencial para a resposta do fungo ao estresse causado pela alta salinidade ambiental. Esse pigmento possui alto peso molecular, sendo sintetizado através da polimerização de compostos fenólicos, sendo complexada com proteínas na parede celular (ELSAYIS et al., 2022, NOSANCHUK et al., 2015). No filo Ascomycota, o 1,8-dihidroxi-naftaleno (DHN) é um dos principais precursores da biossíntese da melanina (KEJŽAR et al., 2013) (KEJŽAR et al., 2013). A presença de melanina também está relacionada à sobrevivência dos microrganismos em ambientes com temperaturas extremas e radiação UV, além de auxiliar na proteção contra lise enzimática (ELSAYIS et al., 2022, NOSANCHUK et al., 2015). Em estudos sobre o crescimento da levedura negra *Hortaea werneckii*, Kejžar et al. (2013) demonstra que a inibição da produção da melanina leva a mudança na morfologia e diminuição da taxa de crescimento desses microrganismos em ambientes hipersalinos, sendo relacionadas à perda da integridade da parede celular desse fungo (KEJŽAR et al., 2013).

A busca por microrganismos no ASPSP, oferece oportunidade significativa para o maior conhecimento técnico e científico acerca do ASPSP. O descobrimento de novas leveduras desse ambiente, que podem possuir características únicas de adaptação e sobrevivência (THAKUR et al., 2022). Além disso, a pesquisa por

leveduras e outros microrganismos em ambientes extremos lança luz sobre a biodiversidade local e contribui para a compreensão de como a vida prospera em condições adversas, bem como seu papel nos ecossistemas, podendo servir como potenciais bioindicadores ambientais (SALAMONE; ROBICHEAU; WALKER, 2016).

O pouco conhecimento sobre espécies endêmicas de regiões marinhas ainda pouco exploradas quanto ao seu potencial biotecnológico, destaca a importância da bioprospecção de bactérias e fungos desses ambientes. Ademais, fazer o levantamento da biodiversidade e seus potenciais, contribui significativamente para a preservação dessas áreas.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVOS GERAL

Estudar a biodiversidade e a resposta a condições de estresse ambiental de fungos isolados do Arquipélago de São Pedro e São Paulo.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar morfológicamente as estruturas dos fungos isolados e determinar sua possível classificação por análise de ITS das leveduras de amostras isoladas do ASPSP.
- Investigar o impacto na formação de biofilme, no crescimento das células planctônicas dos fungos quando em condições adversas, com uma variedade de concentrações salinas e fontes de carbono.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Bioprospecção e seleção das leveduras

Durante a expedição, os pesquisadores realizaram a coleta de 53 amostras em diferentes áreas do ASPSP, principalmente nas áreas localizadas na costa das ilhotas de Belmonte, São Paulo e São Pedro. Essas amostras foram semeadas em Ágar Sabouraud (SAB), Ágar Batata Dextrose (BDA), Ágar Infusão de Cérebro-Coração (BHI), Ágar-aveia-CTAB (OA), Ágar Dichloran Rose-Bengal (DRBC) acrescidas de água marinha e cloranfenicol, a fim de impedir o crescimento de bactérias, e incubadas à 28°C até o aparecimento de colônias e/ou micélios. Ao total, foram isolados 312 microrganismos, dentre eles 115 leveduras (36,9%), 87 fungos filamentosos (27,9%), 79 não-identificados (25,3%), 18 bactérias (5,8%) e 13 fungos dimórficos (4,2%). Estes microrganismos fazem parte da Coleção do Laboratório de Microrganismos de Importância Médica e Biotecnológica (LMIMB) do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e foram disponibilizadas para o presente estudo.

As leveduras selecionadas para este estudo (12) estavam armazenadas a baixas temperaturas e em diferentes meios de cultura, sendo eles SAB (25%), BDA (25%) e DRBC (50%) acrescidos de água do mar filtrada. Para a recuperação do estoque, as leveduras foram transferidas de seus meios originais para placas contendo SAB e água do mar filtradas e estéreis. O processo de filtração com fibra de vidro é realizado a fim de separar as impurezas macroscópicas da água do mar.

3.2. Identificação Molecular das Leveduras

O DNA genômico das leveduras selecionadas foi extraído utilizando o método de Sambrook & Russell (2001) com modificações. A região ITS (*internal transcribed spacer*) foi amplificada e enviada para sequenciamento na empresa ACTGene - Análises Moleculares. Para a identificação molecular, as sequências geradas foram submetidas ao BLASTn, ferramenta do *National Center for Biotechnology Information*, a fim de avaliar comparativamente as sequências obtidas com as presentes no banco de dados.

3.3. Microcultivo, análise da morfologia das colônias e lâminas frescas

As leveduras selecionadas foram submetidas ao processo de microcultivo para avaliarmos a formação de estruturas reprodutivas. Nesse ensaio, utilizamos uma lâmina de vidro, afastada do fundo da placa por algum suporte, além de duas unidades de algodão e duas lamínulas estéreis. Placas com SAB e água do mar, previamente preparadas, foram cortadas em pequenos quadrados do tamanho das lamínulas com auxílio das lamínulas. O quadrado gerado foi depositado sobre as lâminas e, com auxílio de alças descartáveis, uma pequena fração das colônias das leveduras negras foram inoculadas nas bordas do ágar e cobertas por lamínulas. Os algodões precisam ser umedecidos com água ultrapura estéril, para que não haja ressecamento do meio de cultivo. Após o preparo, as placas foram incubadas por sete dias a 28°C, sendo posteriormente analisadas em microscópio de luz *Zeiss Axiolab HB 50*, utilizando azul de algodão com lactofenol como corante. Para o preparo das lâminas frescas, no centro de uma lâmina foram pipetados 3 µL de água ultrapura e, com auxílio de uma alça estéril, uma quantidade pequena de biomassa retirada de placas contendo cada uma das leveduras é espalhada no líquido. Por fim, uma lamínula é posta em cima da lâmina, para a observação no microscópio. A morfologia das colônias foi observada após sete dias de incubação a 28°C e o diâmetro das mesmas foi medida através do *software* ImageJ.

3.4. Ensaio de Melanização em Meio Sólido

Para as leveduras negras selecionadas, o ensaio de melanização foi realizado a fim de avaliar a capacidade desse precursor em aumentar a melanização, indicando a capacidade dos fungos testados em metabolizar L-DOPA (TEIXEIRA et al., 2010). Primeiramente, as leveduras foram inoculadas em 4 mL de caldo de SAB (com água do mar) e incubadas overnight à 28°C. A cultura obtida foi colocada em microtubos de 2 mL e centrifugada por 5 min, 8.000 rpm em solução salina a 0,9%. O meio mínimo (15 mM glicose, 10 mM MgSO₄, 29,4 mM KH₂PO₄, 13 mM glicina e 3 µM tiamina), sendo que em um dos preparos foi adicionado 1 mM de L-DOPA, foi preparado em concentração de 2x para o experimento. O ágar foi preparado e adicionado posteriormente, uma vez que o meio com L-DOPA não pode ser autoclavado, somente filtrado. Duas placas de 24 poços foram preparadas, uma

com meio mínimo com L-DOPA e outra sem L-DOPA (controle negativo). Para o preparo das microplacas, o ágar aquecido deve ser misturado ao meio mínimo, em uma proporção de 1:1. Após a preparação do meio, 500 µL da mistura devem ser depositados em cada um dos poços. O meio com L-DOPA não pode ser manipulado na presença de luz, pois possui aminoácidos fotossensíveis. As microplacas de 24 poços foram preparadas no dia posterior ao pré-inóculo das leveduras em SAB, que ficaram 24h no shaker a 28°C e 180 rpm. Os pré-inóculos foram feitos em 4 mL de SAB (com água do mar) e incubados por 24h a 28°C, sob agitação de 180 rpm. Os cultivos foram centrifugados a 13.000 rpm por 5 min e as células ressuspensas em SAB. Posteriormente, foi feita uma diluição 1:100 (10µL das células em 990µL de Sabouraud). Por fim, foi pipetado 2µL no centro de cada poço da microplaca de 24 poços, em duplicata. As microplacas, com e sem L-DOPA, foram incubadas a 28°C por 7 dias. A observação dos resultados é feita visualmente, por comparação da placa com L-DOPA e o controle.

3.5. EcoPlate

Para a análise da diversidade metabólica das leveduras, utilizamos o Sistema Biolog EcoPlate™ (Biolog Inc., Hayward, CA, United States of America), que permite comparar as habilidades de diferentes microrganismos na metabolização de diferentes fontes de carbono. Esse sistema é composto por uma placa com 31 diferentes fontes de carbono em triplicatas, divididas em seis grupos: aminoácidos, aminas, carboidratos, ácidos carboxílicos, e compostos polímeros e um grupo de substratos de diferentes fontes. O ensaio foi performado como descrito em Gouka *et al.* (2022), com modificações. As placas foram incubadas a 28°C por 10 dias e as leituras da densidade celular ($OD_{590\text{ nm}}$) foram feitas em 02, 04, 07 e 10 dias de incubação.

3.6. Ensaio de Formação de Biofilme

As leveduras foram inoculadas em 30 mL de caldo de SAB (com água do mar) e incubadas *overnight* à 28°C. A cultura obtida foi colocada em *falcons* de 50 mL e centrifugada por 5 min, 8.000 rpm. A biomassa obtida foi lavada duas vezes

em solução salina a 0,9%. Após a última centrifugação, as células foram ressuspensas em SAB e tiveram a sua OD_{600nm} ajustadas para 0.1 (+/- 0.005). Posteriormente, 20 μ L do cultivo foram transferidos para 180 μ L de SAB em triplicatas, em microplaca de 96 poços. As placas foram mantidas incubadas sem agitação por 24 h (leveduras negras) e 72 h (outras leveduras) a 28°C. Após o período de incubação, uma nova leitura em OD_{600nm} foi realizada para a obtenção de uma estimativa do crescimento das leveduras. O conteúdo dos poços da microplaca foi retirado e lavado três vezes com solução salina 0,9%. Cristal violeta 2% foi adicionado em todos os poços e deixado em repouso por 15 minutos. Por fim, a microplaca foi lavada em água corrente para remoção total do cristal violeta e o corante absorvido pelo biofilme foi solubilizado por dimetilsulfóxido (DMSO) e leve agitação por 10 min. Posteriormente, a densidade de formação de biofilme foi obtida através da OD_{570nm} . O ensaio de formação de biofilme para as leveduras negras foi realizado em salinidade única de 2.5% e as demais leveduras em 2.5, 4, 8 e 12%.

3.7. Ensaio de Halotolerância

As leveduras foram pré-inoculadas em 30 mL de SAB (com água do mar) e incubados por 24h a 28°C, sob agitação de 180 rpm. Para taxa de crescimento, 1,5 mL foi transferido para microtubo e lavadas com solução salina a 0,9%, através de dois ciclos de centrifugação a 10.000 rpm por 5 minutos. Após a lavagem, a OD_{600nm} foi ajustada para 0.1 (+/- 0.005). Do volume ajustado, 20 μ L foi transferido para 180 μ L de SAB acrescido de NaCl (2.5, 4, 8 e 12%). As placas foram incubadas sem agitação a 28°C e a densidade celular foi medida por OD_{600nm} em 24, 48, 96 e 168 h após o início da incubação. Os experimentos foram realizados em triplicatas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Identificação molecular das espécies das amostras de levedura

Através do sequenciamento de ITS, nas amostras de água do mar foram identificadas as espécies *Hortaea werneckii*, *Hortaea* sp., *Exophiala dermatitidis*, *Exophiala spinifera*, *Yamadazyma barbieri* e *Yamadazyma triangularis*. Já nas amostras de origem animal, os isolados foram identificados como *Uncultured Galactomyces*, próximo a sequências de ITS de leveduras do gênero *Geotrichum* e *Debaryomyces hansenii* e *Uncultured fungus*, próximas de sequências de ITS de *Pseudozyma* sp.. As amostras de origem vegetal, por sua vez, apresentam isolados de *Uncultured fungus*, estando próximo a sequências de ITS de *Aureobasidium* sp. e *Blastobotrys mokoensis*.

Dentre as 12 leveduras selecionadas, cinco foram classificadas como leveduras negras e sete foram classificadas como outras leveduras. Essas leveduras foram isoladas de nove diferentes amostras, compreendendo amostras originadas da água do mar (caldeirão, cratera e enseada), de origem animal (guano, peixe sargentinho e peixe papagaio) e vegetal (alga amarela, alga vermelha e vegetação do farol) (Tabela 1). As sequências de ITS obtidas através do sequenciamento da região do espaçador interno transcrito, bem como o resultado da identificação através das mesmas pode ser visualizado na Tabela 2.

Tabela 1: Dados da amostra, local e identificação das leveduras selecionadas.

Isolado	Amostra	Local	Microrganismos	Identificação	Sigla
ASPSP 23	Alga vermelha	Coral	Levedura	<i>Uncultured fungus</i> (<i>Aureobasidium</i> sp.)	UncA
ASPSP 39	Peixe papagaio	-	Levedura	<i>Uncultured Galactomyces</i>	UncG
ASPSP 50	Sedimento	Enseada	Levedura negra	<i>Hortaea werneckii</i>	HorW
ASPSP 86	Sedimento	Enseada	Levedura negra	<i>Hortaea</i> sp.	HorSP
ASPSP 100	Sedimento	Enseada	Levedura	<i>Debaryomyces</i>	DebS

				<i>hansenii</i>	
ASPSP 102.3	Peixe sargentinho	-	Levedura	<i>Uncultured fungus (Pseudozyma sp.)</i>	UncP
ASPSP 201	Água	Caldeirão	Levedura	<i>Yamadazyma barbieri</i>	YamB
ASPSP 219	Água	Caldeirão	Levedura	<i>Yamadazyma triangularis</i>	YamT
ASPSP 223	Água	Cratera	Levedura negra	<i>Uncultured fungus</i>	UncF
ASPSP 231	Água	Caldeirão	Levedura negra	<i>Exophiala dermatitidis</i>	ExoD
ASPSP 243	Vegetação	Farol	Levedura	<i>Blastobotrys mokoennai</i>	BlaM
ASPSP 276	Água	Caldeirão	Levedura negra	<i>Exophiala spinifera</i>	Exo

Tabela 2: Identificação por ITS das leveduras não-convencionais.

Isolado	Amostra de origem	Sigla	ITS	Query coverage	% de identidade	Código de acesso
ASPSP 23	Alga Vermelha Coral Rosa	UncA	TATGGCKACTGCGGAGGATCATTAAAGAGTAAGGGTGCTCAGCGCC CGACCTCCAACCCTTTGTTGTTAAACTACCTTGTGCTTTGGCGG GACCGCTCGGTCTCGAGCCGCTGGGGATTCTGCCAGGCGAGCG CCCGCCAGAGTTAAACCAAACCTTTGTTATCAAACCGGTCGTCTG AGTAAAAATTTTGAATAAATCAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGT TCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAA TTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCC CTTGGTATTCCGAGGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTACACCACT CAAGCTATGCTTGGTATTGGGTGCCGTCTTAGTTGGGCGCGCCTT AAAGACCTCGGCGAGGCCTCACCGGCTTTAGGCGTAGTAGAATTTA TTCGAACGTCTGTCAAAGGAGAGGACTTCTGCCGACTGAAACCTTT TATTTTTTCTAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAAC TTAAGCATATCAAARCCSGGGAGGGAAAAA	95%	99.82%	KX515426.1
ASPSP 39	Papagaio	UncG	TATGGACTGCGGAGGATCATTAAAGAATTGATAATATTTGTGAAATTTA TACARMMACAAYAATYWTAYAATCAAMACMAAAWAATYAAAACCTT TTAACAATGGATCTCTTgGTTCTCGTATCGATGAAGAACGCAGCGAA ACGCGATATTTCTTGTGAATTGCAGAAGTGAATCATCAGTTTTTGA CGCACATTGCACTTTGGGGTATCCCCAAAGTATACTTGTGTTGAGC GTTGTTTCTCTCTTGAATTGCATTGCTTTTCTAAAWWTCGAATCA AATTCGTTTTGAAAAACAACACTATTCAACCTCAGATCAAGTAGGATTA CCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAA	98%	96.13%	HG936024.1

Isolado	Amostra de origem	Sigla	ITS	Query coverage	% de identidade	Código de acesso
ASPSP 100	Papagaio	DebS	TATGCKACTGCGGAGGATCATTACAGTATTCTTTTTGCCAGCGCTTA ATTGCGCGGCGAAAAACCTTACACACAGTGTTTTTTGTTATTACAA GAACTCTTGCTTTGGTCTGGACTAGAAATAGTTTGGGCCAGAGGTT TACTAACTAACTTCAATATTTATATTGAATTGTTATTTATTTAATTGT CAATTTGTTGATTAATTCAAAAATCTTCAAACTTTCAACAACGGA TCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAG TAATATGAATTGCAGATTTTCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACA TTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGGCATGCCTGTTTGAGCGTCATT TCTCTCTCAAACCTTCGGGTTTGGTATTGAGTGATACTCTTAGTCGA ACTAGGCGTTTGCTTGAAATGTATTGGCATGAGTGGTACTGGATAGT GCTATATGACTTTCAATGTATTAGGTTTATCCAACCTCGTTGAATAGTTT AATGGTATATTTCTCGGTATTCTAGGCTCGGCCTTACAATATAACAAA CAAGTTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCA TATCAWAAGCCCGAAGGRAAAATGAAT	97%	99.36%	EF197946.1
ASPSP 102.3	Sargentinh o	UncP	TKWTGGCKACTGCAGATGGATCATTTTCGATGAAAACCTTTTTCTTG AGGTGTGGCTCGCACCTGTCTAACTAAATCGAGCTACCACATTTTAA CACGGTTGCATCGGTTGGCTGTCAAACAGTGCGCGCGGCGATTTA TTTCGCCTCCCCGCGCATTGCGAGACGGTCGACATTTACCAAAAAC ACTGTTGATACCATAGGATTTGAACGTAGATGAACTCGACTGGTAA TGCGGTCGTCTAAAATCTAAAACAACCTTTTGGCAACGGATCTCTTG GTTCTCCCATCGATGAAGAACGCAGCGAATTGCGATAAGTAATGTG AATTGCAGAAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCTCC CGGCAGATCTAATCTGGGGAGCATGCCTGTTTGAGGGCCGCGAAT TGTTTCGAACGACAGCTTTCTTATTTAGTTGAGAAAGCTGGCGGATC GGTATTGAGGGTCTTGCCATCTTCCACGGTGGCTCCCTCGAAATGC	98%	99.48%	LC769462.1

Isolado	Amostra de origem	Sigla	ITS	Query coverage	% de identidade	Código de acesso
			ATTAGCGCATCCATTTCGATAGGCAAGACGGACGAAAGCTCGTTATTT CGCCCACGTCTTTCCCTGCCGGGTTTTGATAATATCAGGACTTCGG AGAGGAGAGGCGCAGGGTCGAGGAGCTGGACGCGACGTTTTGCT GGTTGGAGTGCTTCTGAACCCCGCCCATGCCTCCCCTTCTTCGGA AGGAGAGGAAGGGATTTAATTTCAATTCATCGGCCTCAGATTGGTA GGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAWWAAGCGGAAGGAACAC			
ASPSP 201	Caldeirão	Yam B	TAWGCKACTGCGGAGGATCATTACAGTTATTAATTCCC GCCAGCGC TTAATTGCGCGGTAGGAAATAATCCTTACACACTGTGTTTTTTGTTAT TACAGGAACCATTGCTTTGGCTTGGCCTAGAAATAGGTTGGGCCAG AGGTAAACTTAAACTTCAATTTTTAATTGAATTGTTATTTAAAAAAA TTATTGTCAATTTGTTTGATTAAATTCAAATAATCTTCAAACCTTTCA ACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAAT GCGATAAGTAATATGAATTGCAGATTTTCGTGAATCATCGAATCTTTG AACGCACATTGCGCCCTCTGGTATTCCATAGGGCATGCCTGTTTGA GCGTCATTTCTCTTTCAAACCTTTGGGTTTGGTATTGAGTGATACTC TTAGTCAGACTAGGCGTTTTGCTTCAAATGTATTGGCATGAGTGTGCT GGATAGTACGTTCTGATTATTCAATGTATTAGGTTTATCCAACCTCGTT GAACGATCAGGTGTATATTTCTGGTTACATTGGCTCGGGCCCTACAA CAACAAACAAGTTTGACCTCAAATCAGGTAAGAATACCCGCTGAAC TTAAGCATATCAWAAGCCSGGAGGRAAAAATTAA	91%	100%	NR_160336. 1
ASPSP 219	Cratera	YamT	TATGCKACTGCGGAGGATCATTACAGTATTAGTTTTTTTCCCTTACCAG CGCTTAATTGCGCGGTGGAAAATAAAAACTTACACCCCATGATTTTT CTTTTTATGGAATAATTCGTTTGGCTTGGTCGAAAGATTGGGCCAGA GATTTAAGTAAACTTCAATTTTTAATTGAATTGTTAAATTAATTATAA GTCAATTTGTTTGATTAAATTCAAAAAATTTAAACTTTCAACAGTG	97%	99.52%	MZ424839.1

Isolado	Amostra de origem	Sigla	ITS	Query coverage	% de identidade	Código de acesso
			GATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATA AGTAATATGAATTGCAGATTTTCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCA CATTGCGCTCTTTGGTATTCCAGAGAGCATGCCTGTTTGAGCGTCA TTTCTCTCTCAAACCTTGGGTTTGGTGTGAGCGATACGCTGAGG AACTGAGTGTTTGCTTGAAAAGATTGGCATGAGTGTACTAGATAG TGCTCCTTGATTTATTCAATGTATTAGGTTTATCCAACCTCGTTGAACG GAATCCTGGCGGTAAATTTCTGGTGTATTGGCTCGGCCTAATAACT TTTTATAAGTTTGACCTCAAATCAGGTAAGAATACCCGCTGAACTTAA GCATATCAAAGCCSGGAGGRAAAAAAGAA			
ASPSP 243	Planta Farol	BlaM	TAWGCKACTGCGGAGGATCATTAACGAAATATTTCTGACATTCGTG GAAAAAATCATCTTACACCTGTGAAATACRAATCTTTGCTTTGGC TTGGGTTTTTCTGAACCTGAGCCAAAAGATCAAACCTTACAATTT AACCTGAGTCTGAGAAAGAAAAGAATAAATTATTCAAACCTTTCAGC AACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGC GATACGTAATGTGAATTGCAGAATTGTGAATCATCGAATCTTTGAAC GCACATTGCGCCTTTTGGTATTCCAAAAGGCATACCTGTTTGAGAGT CATTCACTCTCAAACCTAGTTTTTGGTGTGGTCCTCATCTTTTCG CAAGAAAGTGGACTGAAATGAAATGGCAAAGCCTCGATTATTTGTC AAAAGTGTCTTAGGTTTTACCAACTACACTTGCGTAACGAATTTTCR AATTCAAGCTTGGCCTTAAACAGCCTTTTAAGTTTGACCTCAAATC AGGCAAGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGRAAGGA AAGAAA	98%	98.93%	OM904991. 1

O primeiro relato da levedura negra *Hortaea werneckii* se deu no final do século XIX no Brasil, sendo chamada de *Exophiala werneckii* até 1984, por conta das estruturas anelídicas de brotamento similares aos do gênero *Exophiala* (SHARMIN et al., 2002). Observamos que não há variedade de espécies, apenas indivíduos classificados como sendo *Hortaea werneckii* e *Hortaea* sp., segundo dados da *NCBI Taxonomy*. Leveduras desse gênero são halofílicas, podendo crescer em ambientes com concentrações de NaCl próximas a 30%, sendo usadas como organismo modelo para o estudo de halotolerância (KOGÉJ et al., 2005; ZALAR et al., 2019). Assim, a presença desse gênero em amostras provenientes da água do mar pode estar relacionado com a sua capacidade de tolerar ambientes salinos. Ademais, essas leveduras são os agentes etiológicos de micoses, como *tinea nigra* (ZALAR et al., 2019). Dentre os isolados identificados, destacam-se as leveduras negras das espécies *Exophiala dermatitidis* e *Exophiala spinifera*, fungos oportunistas associados predominantemente a infecções cutâneas, cromoblastomicose e isolados em amostras respiratórias de pacientes com fibrose cística (FC) (KIRCHHOFF et al., 2019; USUDA et al., 2021). Indivíduos desse gênero possuem ampla distribuição global, estando em ambientes naturais e antropogênicos. Além disso, algumas das espécies pertencentes ao gênero possuem aplicação biotecnológica, como a *E. pisciphila*, que pode ser utilizada na promoção do crescimento de milho (THITLA et al., 2022).

Ao observarmos as demais leveduras selecionadas, o isolado UncA, identificado como *Uncultured fungus*, apresenta proximidade filogenética ao gênero *Aureobasidium*, também classificado como levedura negra. As leveduras do gênero *Aureobasidium* são consideradas poliextremotolerantes, sendo encontradas em ambientes como desertos, parreiras, em alimentos, mel e em regiões frias, como a Antártica (PINTO et al., 2018; VARRELLA et al., 2021; WANG et al., 2022). Além disso, essas leveduras apresentam diversas características que as tornam resistentes a condições de estresse, como a presença de melanina, capacidade de formar biofilme, a habilidade de sintetizar e acumular glicerol e, também, a presença de duplicações no DNA genômico, incluindo de genes responsáveis pela regulação biológica e crescimento hifal (GOSTINČAR et al., 2019). Os fungos dimórficos do gênero *Aureobasidium* possuem grande potencial biotecnológico, sintetizando diversas enzimas, como lipases e proteases, com diferentes perfis enzimáticos e

com a capacidade de metabolizar diferentes substratos (CHI et al., 2009). A partir da produção de β -glucana, pululano (um exopolissacarídeo com diversos usos industriais), melanina e diversas outras substâncias, essas leveduras ganharam grande espaço na indústria (K.R.; V., 2017; MURAMATSU et al., 2017; WANG et al., 2022).

O isolado UncG foi identificado como *Uncultured Galactomyces* e está proximamente relacionado com *Geotrichum candidum*. O gênero *Geotrichum* é o anamorfo do gênero *Galactomyces* que, por sua vez, é o teleomorfo (HOOG; SMITH, 2011). As leveduras desses gêneros produzem uma variedade de enzimas, como lipases, proteases e enzimas oxidativas que atuam na degradação de lignocelulose, sendo utilizada na indústria de laticínios. Ademais, são consideradas dimórficas, podendo ser encontradas em diversos ambientes e colonizando a pele humana, o que pode causar infecções (LADEVÈZE et al., 2017). Outras leveduras que também podem ser encontradas em queijos e são usadas na indústria de laticínios (PRISTA et al., 2016) são da espécie *Debaryomyces hansenii*, correspondente ao isolado DebS. Além de crescer em queijos, essa espécie também se mostra capaz de apresentar crescimento em outras bebidas fermentadas e em ambientes marinhos, pertencendo à classe Saccharomycetes (PRISTA et al., 2016; LINK et al., 2022). Essas leveduras halotolerantes e diplóides possuem potencial biotecnológico, principalmente, para a indústria alimentícia e agrícola, uma vez que são leveduras antagonistas a patógenos de trigo, como *Fusarium graminearum* (WACHOWSKA et al., 2023). Junto de microrganismos da espécie *Debaryomyces hansenii* também são encontradas leveduras pertencentes à espécie *Yamadazyma triangularis*, sendo capaz de utilizar aminoácidos do queijo, como a metionina, para a produção de compostos voláteis de enxofre (ZHANG et al., 2021). Parte da família Debaryomycetaceae, leveduras desse gênero podem ser encontradas em árvores, água do mar, na atmosfera, em insetos e diversos tipos de amostras vegetais. Descrito pela primeira vez em 1989, o gênero *Yamadazyma* abriga leveduras antes classificadas como pertencentes ao gênero *Pichia*, além de novas espécie, como a *Yamadazyma barbierii*, que foi isolada pelas primeiras vezes em um sítio hidrotérmico na Dorsal Meso-Atlântica, em 2002, e na praia de Ipanema, no Rio de Janeiro, em 2011 (BURGAUD et al., 2016).

O isolado UncP, foi identificado como *Uncultured fungus*, próximo a sequências de ITS de *Pseudozyma* sp.. Leveduras desse gênero são oleaginosas, anamórficas e podem degradar diferentes substratos, como glicose e xilose (MIERKE et al., 2023), além de produzirem biossurfactantes (SAJNA et al., 2015). Uma das espécies, *Pseudozyma aphidis*, pode ser classificada como patógeno oportunista, sendo coletada em regiões com águas de diferentes salinidades, como manguezais (BORO et al., 2017). Por último, o isolado BlaM, pertence à espécie *Blastobotrys mokoennai*, caracterizada por sua termotolerância, crescendo em temperaturas de até 46°C e produção de endo-beta-xilanase (DU PREEZ; GOEDE; MYBURGH, 2009). Esse gênero compreende aproximadamente 30 espécies, que se reproduzem majoritariamente por brotamento e podem ser dimórficas (SÁ et al., 2022).

4.2. Identificação de estruturas morfológicas das leveduras isoladas

A partir da análise do microcultivo e de lâminas frescas das leveduras, foi possível observarmos diversas estruturas reprodutivas. Através da observação, identificamos o tipo de colônia e demais características morfológicas, como estrutura das margens, coloração e tamanho médio das colônias. O isolado ExoD visto na Figura 2a e 2b, pertence à espécie *Exophiala dermatitidis*, e, como descrito anteriormente em Yong et al. (2015), possui conidióforos não ramificados, retos, pouco diferenciados e caracteristicamente encontrados com *clusters* de conídios, que são esporos, em suas extremidades. Essa espécie não apresenta clamidósporos, além de ser possível identificar, através da microscopia, a presença de hifas toruloides, que são hifas com estruturas arredondadas e septo demarcado. As Figuras 2c e 2d mostram os isolados HorW e HorSP, identificados como microrganismos do gênero *Hortaea* com morfologia descrita em Zalar et al. (2019). Pode-se observar a formação de conídios com formato cilíndrico, descritos como bicelulares e septados, formados por conidiogênese anelídica, além de hifas com células longas e septadas. Observa-se pouca ramificação, além da formação de clamidósporos, por vezes relacionada a respostas ao estresse (SUN et al., 2018).

As leveduras negras observadas apresentaram, no geral, coloração escura, com colônias pretas, verde musgo escuro e marrom escuro (Figura 3). A textura

variou entre colônias cremosas e consistentes, com estruturas miceliais. Observa-se, ainda, uma variedade no tipo de elevação das colônias, uma vez que muitas tinham colônias convexas, mas isolados como o UncF cresciam em colônias irregulares e bem elevadas, distanciando-se do meio. Colônias com o micélio aéreo branco, como mostrado na Figura 3a e 3b, foram visualizadas em diversos dos isolados.

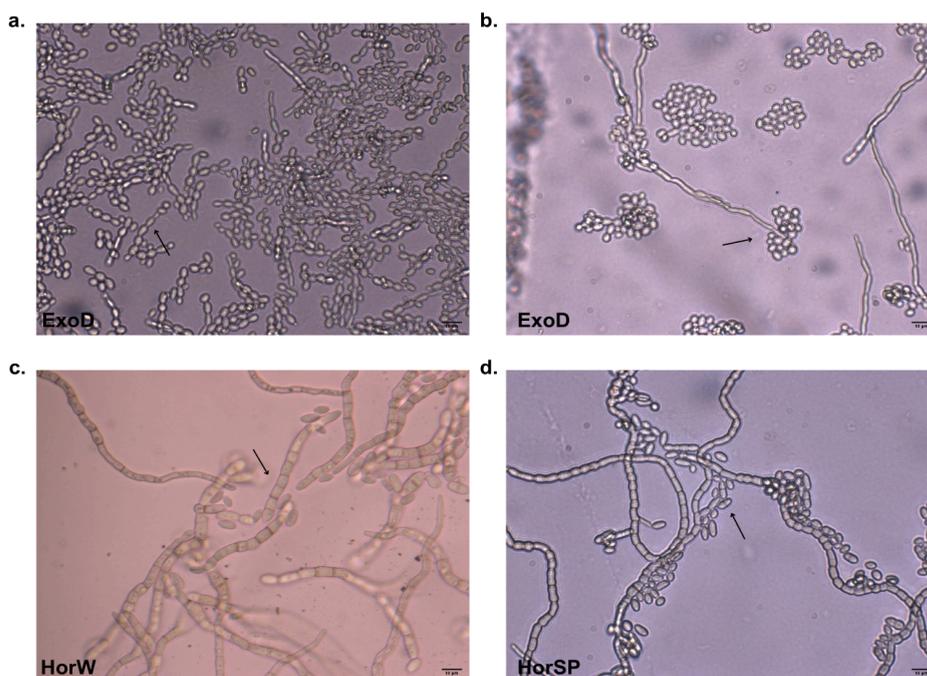


Figura 2: Estruturas microscópicas das leveduras negras. Imagens obtidas em aumento de 40x. **a.** ExoD- A seta indica a presença de hifas toruloides. **b.** ExoD- A seta indica conídios elipsoidais em *clusters* na extremidade de hifas. **c.** HorW- A seta aponta para as hifas septadas. **d.** HorSP- A seta indica os conídios bicelulares e cilíndricos com septo. Barra de escala nas figuras.

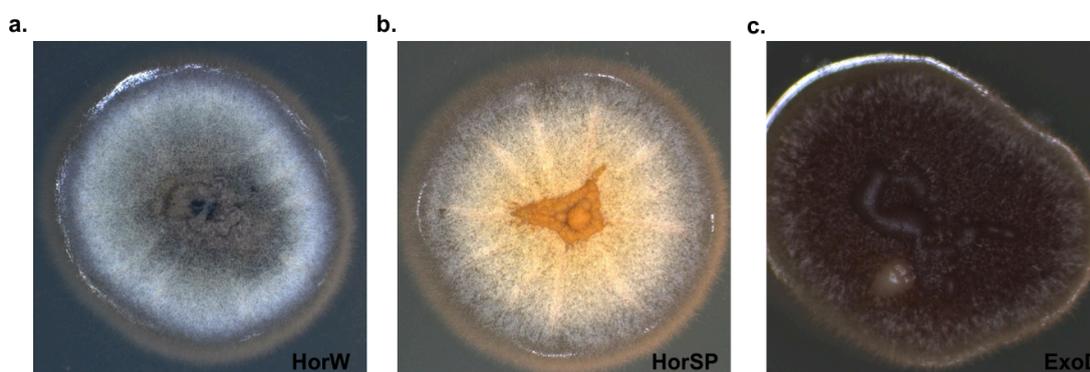


Figura 3: Morfologia das colônias das leveduras negras. Horw-Centro da colônia marrom, elevado, textura mucóide, superfície aveludada branca e margem filamentosa. **b.** HorSP- Centro da colônia amarelo mostarda, elevado e irregular, textura mucóide, superfície aveludada branca e margem filamentosa. **c.** ExoD- Colônia preta, centro elevado e irregular, textura mucóide e margem filamentosa.

Dentre as leveduras negras, o isolado UncA diferencia-se morfologicamente das demais. Assim como observado para microrganismos do gênero *Aureobasidium* em Zalar et al. (2008) e Owczarek-Kościelniak et al. (2016), esse isolado mostrou colônias rosa claro brilhosas e lisas, com margens irregulares e de aparência filamentosa (Figura 4a). O diâmetro das colônias, ao ser medido no sétimo dia após inoculação a 28°C, variou entre 17-19 mm. As colônias, após mais de uma semana de incubação, começam a melanizar nas extremidades, próximo a margem, sendo que essas, então, passam a ter um tom de amarelo queimado. Através da microscopia, foi possível observar a presença de células leveduriformes elipsoidais, com 3,6-6,0 µm de largura e 6,0-11,0 µm de comprimento, em brotamento e com “cicatrices de brotamento” (Figura 4b). Entretanto, contrário ao descrito na literatura, apresentaram apenas hifas curtas, sem aparente septação ou ramificação. Não foi possível observar conidióforos ou conidiogênese.

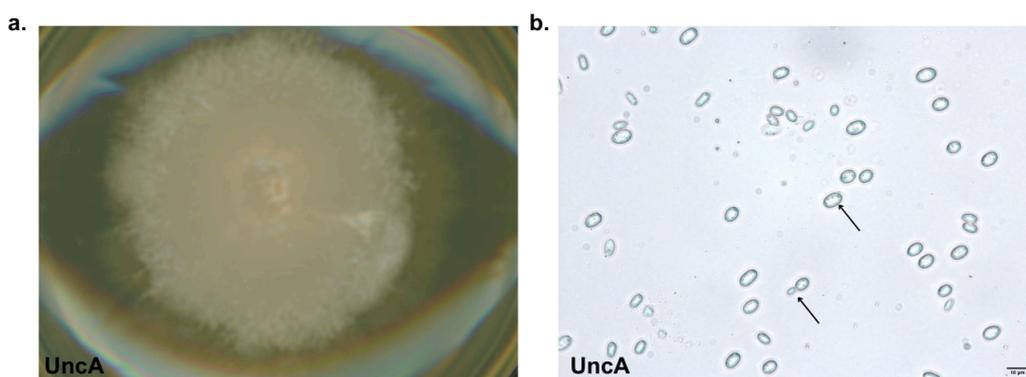


Figura 4: Morfologia de colônia e microscopia de lâmina fresca de UncA. a. Colônia rosa, textura cremosa e margem de aparência filamentosa. b. Setas indicam células elipsoidais e células em processo de brotamento. Escala de 10 µm.

A levedura UncG, que apresenta sequência próxima às sequências de ITS de leveduras do gênero *Geotrichum*, possui colônias brancas e planas, com camada inferior de textura cremosa, coberta pelo o que é descrito em Sulo et al. (2009) como uma “pulverização” (Figura 5a). As colônias, ao serem incubadas por sete dias, apresentam diâmetro de cerca de 31,7 mm. A partir da microscopia de luz de lâminas frescas de UncG, visualizou-se estruturas já bem descritas na bibliografia, como os artroconídios, que são conídios formados pela desarticulação de hifas, existindo em resposta a condições de estresse (PERKINS et al., 2020). Esses

artroconídios são unicelulares e apresentam formato cilíndrico, com comprimento de 5,7-7,8 μm e largura de 3,1-5,1 μm . Ademais, é possível observar a presença de múltiplos núcleos, podendo chegar a quatro núcleos por artroconídio (Figura 5b).

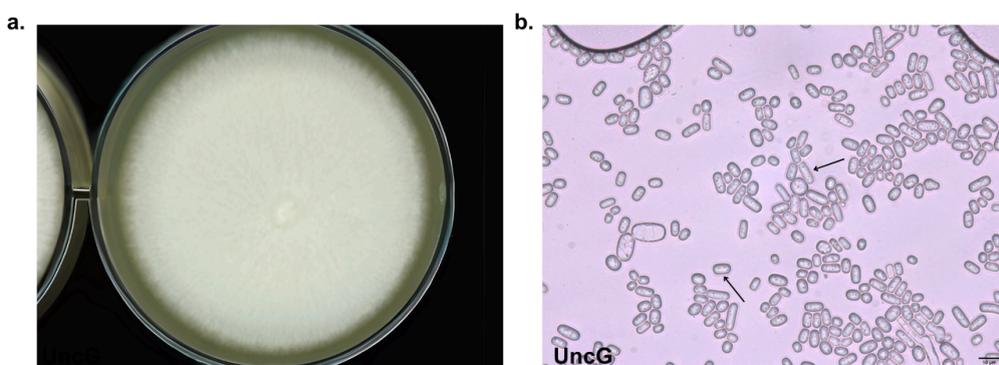


Figura 5: Morfologia de colônia e microscopia de lâmina fresca de UncG. a. Colônia branca, de aspecto pulverizado e plana. b. Setas indicam os artroconídios. Escala de 10 μm .

O diâmetro das colônias de DebS apresentou valor médio de 16,7 mm. As colônias possuem coloração creme, sendo convexas e opacas, de textura cremosa e membranosa (Figura 6a). A microscopia de luz dessa levedura mostra ascósporos, com 2,0-2,9 μm de diâmetro em ascos, com apenas um ascósporo por asco, com 7,4-13,0 μm de diâmetro (Figura 6b). Essas características correspondem ao descrito na literatura a respeito de leveduras do mesmo gênero (NGUYEN *et al.*, 2009; DLAUCHY *et al.*, 2010; LOPANDIC *et al.*, 2013)

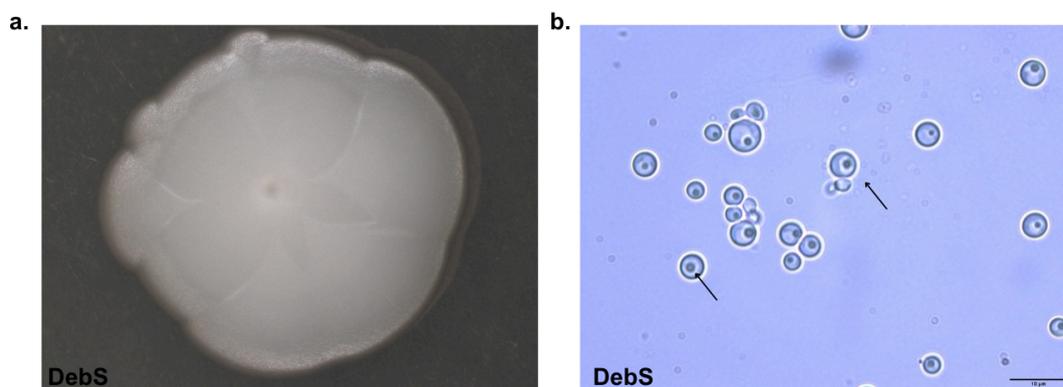


Figura 6: Morfologia de colônia e microscopia de lâmina fresca de DebS. a. Colônia creme, lisa e opaca. b. Seta mais abaixo indica o ascósporo e a seta superior indica o asco. Escala de 10 μm .

O isolado UncP apresenta colônias de aparência rugosa, que ficam alaranjadas conforme se aumenta a salinidade do meio. Com diâmetro médio de 19,9 mm, esse microrganismo, próximo filogeneticamente de sequências de *Pseudozyma* sp., apresenta a morfologia das colônias similares a já descritas anteriormente, como em *Pseudozyma aphidis*, descrito por Herb et al. (2015), e em *Pseudozyma pruni*, descrito em Liou et al. (2009) (Figura 7a). Microscopicamente, observou-se a presença de esporídios semelhantes a células leveduriformes, com formato elipsoidal, apresentando pseudohifas e brotamentos polares. As células possuem comprimento de 7,9-14,2 μm e largura de 2,1-2,9 μm (Figura 7b).

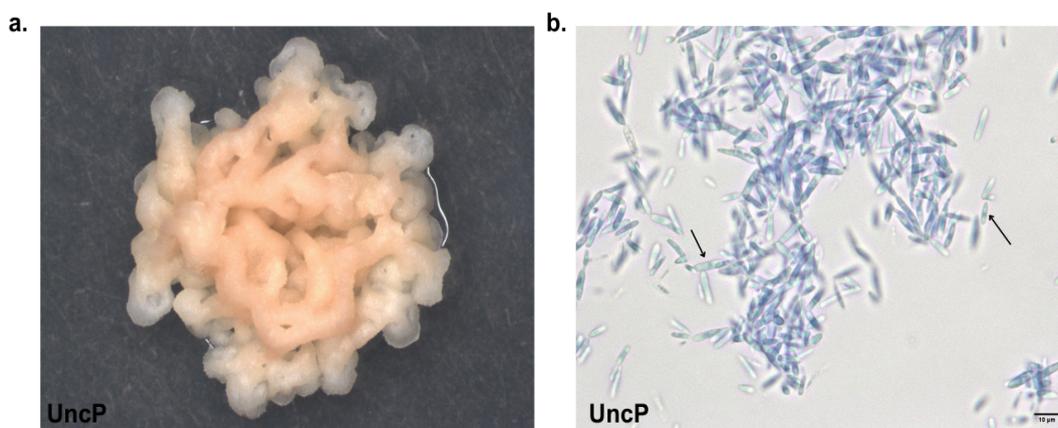


Figura 7: Morfologia de colônia e microscopia de microcultivo de UncP. a. Colônia rugosa, com coloração alaranjada e margem irregular. b. Setas indicam esporídios elipsoidais. Escala de 10 μm .

Os isolados YamB e YamT pertencem ao mesmo gênero, *Yamadazyma*, mas a espécies diferentes, *Y. barberii* e *Y. triangularis*. As colônias de YamB são brancas, brilhosas e cremosas, com textura rugosa e margens irregulares, possuindo diâmetro médio, ao sétimo dia pós inóculo, de 8,3 mm, estando de acordo com o descrito em Burgaud et al. (2016). As colônias de YamT, por sua vez, são lisas, brilhosas, com coloração creme e diâmetro médio de 6,0 mm no sétimo dia de incubação. Ao observarmos as lâminas frescas de YamB através do microscópio de luz, foi possível identificar células elipsoidais e alongadas, além da identificação de células em brotamento e com cicatrizes de brotamento, com a formação, também, de pseudohifas com brotamento lateral. As células de YamB mostraram-se com formato globóide, normalmente agrupadas ou encadeadas, com células em brotamento.

Por fim, as colônias de BlaM são brancas, com micélio aéreo de textura algodoada e margens mais opacas e lobadas, com elevação irregular e textura do centro da colônia mais rugosa (Figura 8a), como já descrito na literatura para outras leveduras do gênero *Blastobotrys* (SÁ et al., 2022). As colônias apresentam diâmetro médio, após sete dias de incubação, de 19,9 mm. Ao observar as imagens obtidas através do microcultivo de BlaM, identificaram-se uma série de estruturas típicas do gênero, como a presença de hifas verdadeiras com *cluster* de blastoconídios globulares nas extremidades, hifas moniliformes e células leveduriformes esféricas, apresentando brotamento multilateral. Há, ainda, hifas com brotamento lateral, sendo possível observar o processo de conidiogênese (Figura 8b). Ademais, observou-se a existência de pseudohifas com células alongadas (KURTZMAN et al., 2007; KUMAR et al., 2014; SÁ et al., 2022).

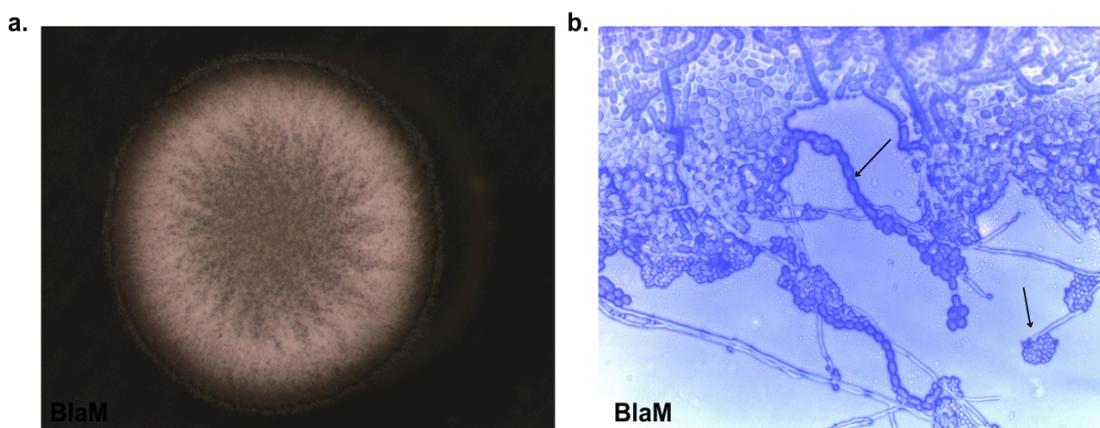


Figura 8: Morfologia de colônia e microscopia de BlaM. a. Colônias brancas, com micélio aéreo de textura algodoada e margens mais opacas. b. A seta mais abaixo indica uma hifa verdadeira com *cluster* de blastoconídios globulares nas extremidades e a seta mais acima mostra uma hifa moniliforme. Escala de 10 μ m.

4.3. Metabolização de levodopa

A fim de verificar se as leveduras negras possuíam a capacidade de metabolizar levodopa (L-DOPA), um dos precursores de melanina (KEJŽAR et al., 2013), foi feito o ensaio de melanização. Caso houvesse metabolização do precursor, esperávamos visualizar alterações na morfologia das leveduras e na coloração do meio de cultura, quando comparado às placas com ou sem o precursor. A metabolização do L-DOPA poderia indicar a capacidade da levedura em responder a fatores externos (TEIXEIRA et al., 2010). Entretanto, percebemos que

ao fazermos a análise visual das leveduras negras, não houveram alterações significativas na morfologia do microrganismo e tampouco na coloração do meio de cultura (Figura 9). Esses resultados indicam que não houve metabolização do precursor L-DOPA pelas leveduras testadas.

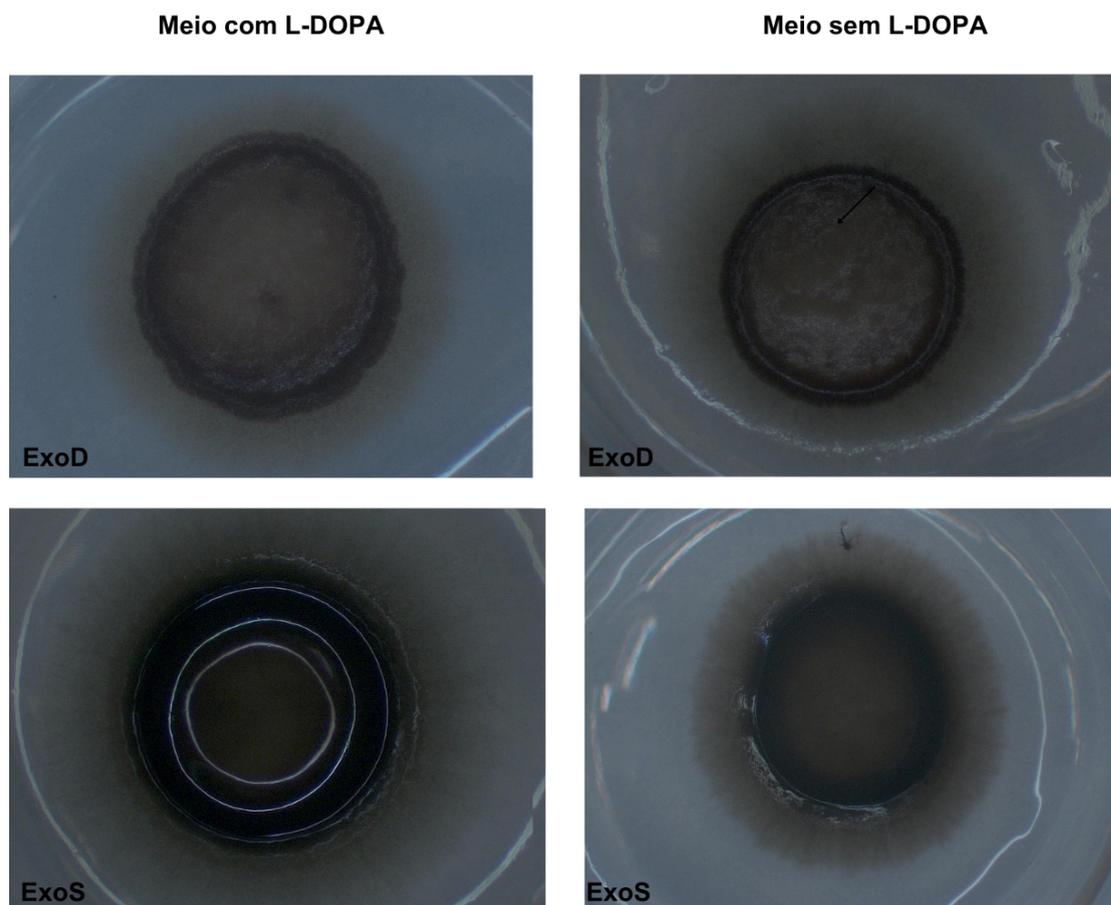


Figura 9: Placas do ensaio de melanização. Comparação entre a placa com leveduras negras crescendo em meio mínimo suplementado com L-DOPA (a esquerda) e leveduras da placa de controle, apenas com meio mínimo (a direita).

4.4. Metabolização de diferentes fontes de carbono

O Sistema Biolog EcoPlate™ da Biolog Inc. (Hayward, CA, Estados Unidos da América) foi utilizado para avaliar a capacidade de metabolização de diversas fontes de carbono pelas leveduras. Primeiramente, testamos os isolados DebS, BlaM e HorSP. Os resultados mostram que dentre os isolados, o HorSP foi o capaz de metabolizar mais fontes de carbono, seguido de BlaM. Interessantemente, o isolado DebS não foi capaz de utilizar nenhum dos substratos testados. As 31 fontes de carbono testadas se dividem em seis diferentes grupos: fontes “diversas”,

polímeros, carboidratos, ácidos carboxílicos, aminoácidos e amina/amida. Os polímeros, seguidos dos carboidratos, foram os grupos mais metabolizados pelos isolados. Nos grupos de aminoácidos, ácidos carboxílicos e de substratos de diferentes fontes, foi verificada a metabolização de ao menos um substrato. Dentre todos os grupos, o grupo das aminas foi o único que não foi metabolizado. Dos carboidratos, os substratos que foram metabolizados por duas das três leveduras testadas, HorW e DebS, foram D-Celobiose, D-Xilose e i-Eritritol, enquanto, entre os polímeros, foram piruvato de metilo, Tween 40 e Tween 80.

Na Figura 10, podemos verificar a metabolização, pelo HorSP, de 12 fontes das 31 fontes de carbono (38,7%) do EcoPlate. Entre elas: seis carboidratos, três polímeros, dois ácidos carboxílicos e um pertencente ao grupo de substratos de fontes variáveis. As leveduras do gênero *Hortaea* são halofílicas, crescendo em altas concentrações salinas (KEJŽAR *et al.*, 2013). Muitos são os mecanismos que possibilitam a tolerância desses microrganismos a ambientes hipersalinos, como, por exemplo, mecanismos de osmoadação. O glicerol é um osmólito já bem conhecido e encontrado em alta concentração intracelular em microrganismos que passam por situações de estresse, mas outros polióis podem atuar, também, na osmoadação. Exemplos destes polióis são alguns dos substratos metabolizados por HorSP, como D-manitol e i-eritritol (KOGUJ *et al.*, 2007). Parte das fontes de carbono metabolizadas por HorSP desempenham um papel crucial na síntese de poliálcoois vinculados ao crescimento das leveduras em condições de baixa atividade de água. Um exemplo notável é a D-Xilose, que, ao ser hidrogenada, resulta na síntese de xilitol (VAN ECK *et al.*, 1989). Ademais, segundo Van Eck *et al.* (1989), os polióis são capazes de eliminar espécies reativas de oxigênio, além de participarem do processo de homeostase do potencial redox dos microrganismos. Os outros substratos utilizados por HorSP participam de uma série de processos metabólicos de fungos, como definido em Zalar *et al.* (2019). Esses substratos, quando em fungos, atuam na metabolização de sacarose e amido (glicogênio e D-celobiose) na glicólise (β -metil-D-glucosídeo e D-manitol), na via da galactose (α -D-lactose), na via catabólica da pentose (D-xilose), na síntese de compostos aromáticos (ácido 4-hidroxibenzóico) e no metabolismo do piruvato (ácido D-málico).

O isolado BlaM foi capaz de utilizar 9 das 31 fontes de carbono (29,0%) testadas. Dessas, quatro são carboidratos, duas são polímeros, duas são aminoácidos e uma das fontes pertence ao grupo de fontes de carbono variadas. A espécie *Blastobotrys mokoennai* é considerada uma levedura oleaginosas (LOPANDIC et al., 2013), com potencial biotecnológico de produção de biodiesel. Leveduras oleaginosas possuem a habilidade de converter diversos substratos em lipídios e, entre eles, destaca-se a conversão de D-celobiose, D-xilose, que são metabolizadas pelo BlaM, e o amido (TANIMURA et al., 2016). A D-celobiose, além de atuar na síntese dos lipídios, participa da via de metabolismo do amido e da sacarose, enquanto outro dos substratos metabolizados, o N-acetil-D-glucosamina age na via da galactose. O Tween 80, também utilizado como substratos pelo isolado, é capaz de produzir, através de sua hidrólise, ácido oleico que, por sua vez, é convertido em triacilgliceróis, usados na biossíntese de lipídios (TANG et al., 2009). Segundo Tang et al. (2009), o Tween 80 participa da síntese não só de lipídios, mas de carotenóides e, também, do aumento de biomassa dos microrganismos. A levedura DebS não metaboliza nenhuma das 31 fontes de carbono testadas. Contrário ao descrito em Nobre, Lucas e Leão (1999), os substratos D-xilose, D-celobiose e D-manitol não foram metabolizados.

A existência de um perfil metabólico variado é considerado uma vantagem adaptativa. Isso porque possibilita o aumento do nicho ecológico em que as leveduras sobrevivem, o que permite com que ocorra o uso das fontes de carbono disponíveis no ambiente (GOUKA et al. 2022). Assim, a maior capacidade de metabolização de fontes de carbono pelo isolado HorSP pode ter relação direta com a sua habilidade de resposta a condições de estresse, uma vez que os substratos participam de diversas vias de biossíntese de compostos que são utilizados na manutenção da homeostase celular (KOGUJ et al., 2007). Ainda, o uso de substratos como β -metil-D-glucosídeo e D-manitol, que participam da glicólise, pode estar relacionada à síntese de glicerol, um importante osmólito que é acumulado em situações de estresse (BABAZADEH et al., 2017).

Perfil metabólico das leveduras isolados do ASPSP

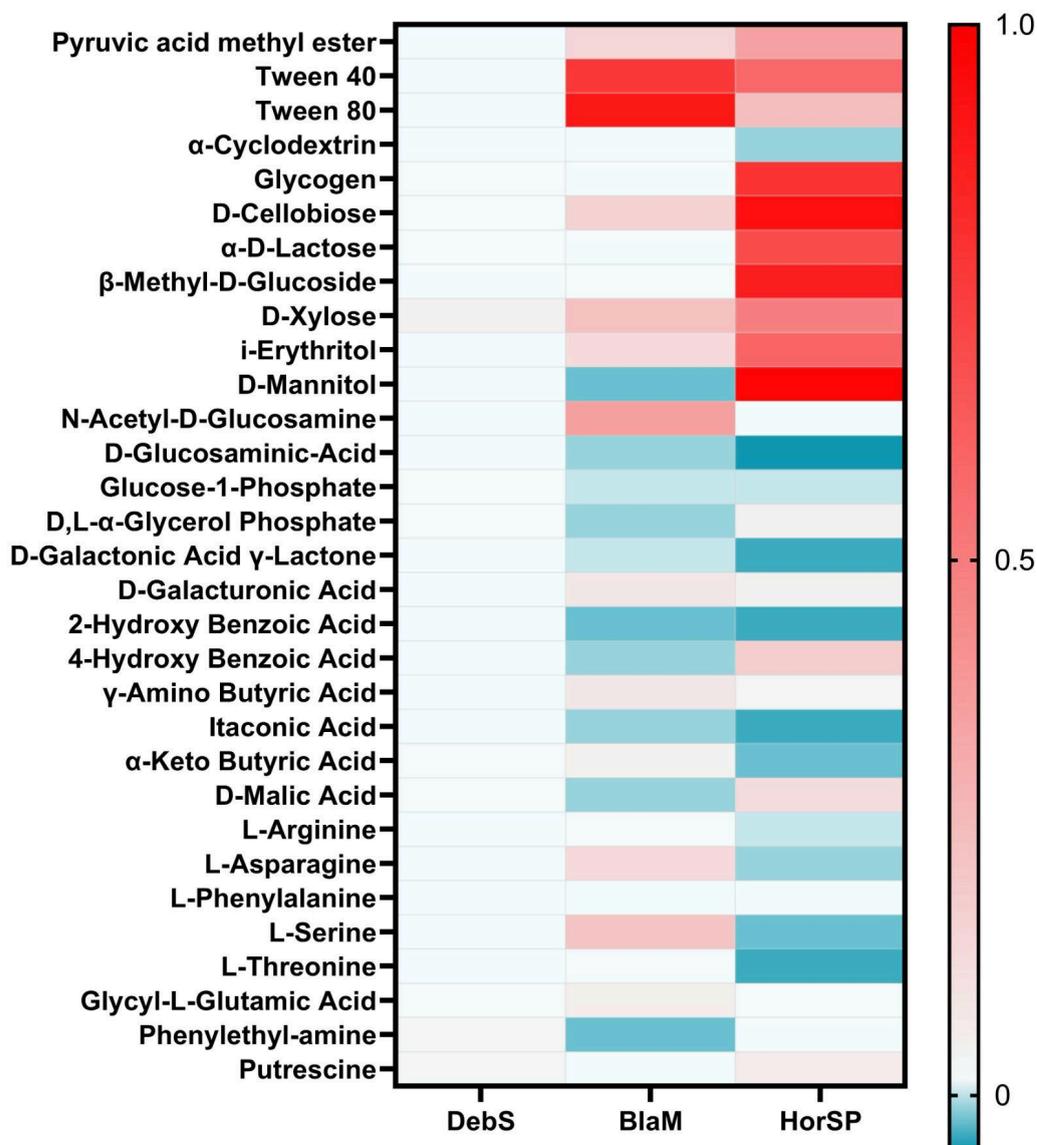


Figura 10: Perfil metabólico de três leveduras isoladas no ASPSP. Mapa de calor mostrando as fontes de carbono metabolizadas pelos isolados DebS, BlaM e HorSP. Cada linha representa uma fonte de carbono e cada coluna representa um isolado (azul: baixa abundância, vermelho: alta abundância).

4.5. Formação biofilme e sobrevivência em diferentes concentrações salinas

Para avaliar outros mecanismos de adaptação às condições de estresse presentes em ambientes extremófilos, foram feitos ensaios de formação de biofilme com as leveduras negras e as demais leveduras, além de ensaios de crescimento

em diferentes concentrações salinas. O primeiro ensaio, de formação de biofilme com as leveduras negras, apresentou que todas as cinco leveduras testadas mostraram capacidade de desenvolver biofilme (Figura 11). O biofilme já foi descrito anteriormente sendo formado por leveduras negras, normalmente associados à leveduras patogênicas (KIRCHHOFF et al., 2017). Dentre as leveduras negras testadas, a que mostrou maior formação de biofilme foi o isolado ExoD. Microrganismos da espécie *Exophiala dermatitidis* possuem capacidade de colonizar a pele e o trato respiratório de pacientes com fibrose cística, tendo alta capacidade de virulência que é, em parte, ligado ao fato dessa levedura ser dimórfica. O dimorfismo também está relacionado ao fato de que essa levedura possui capacidade de formar biofilme, que não só protegem os microrganismos das condições de estresse abiótico, mas também contra tratamentos antifúngicos e as defesas do sistema imune (KIRCHHOFF et al., 2017). Dessa forma, a formação de biofilme por esses microrganismos está relacionada a processos de infecção e possivelmente eleva a resistência desses microrganismos a tratamentos antifúngicos. Esses resultados indicam que as leveduras negras testadas possuem a formação de biofilme como um mecanismo de resposta a circunstâncias encontradas em ambientes extremos.

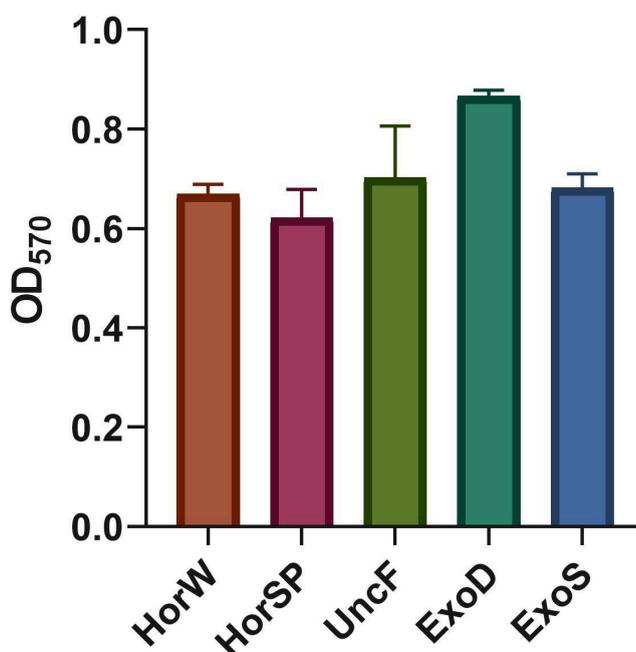


Figura 11: Formação de biofilme por leveduras negras. Ensaio feito após 24h de cultivo a 28°C em SAB e água do mar.

Dentre as demais leveduras testadas (Figura 12), apenas o isolado YamT não mostrou formação de biofilme em nenhuma das concentrações de NaCl. Todas as outras leveduras testadas apresentaram a habilidade de formação de biofilme em ao menos uma das porcentagens do sal. A análise dos resultados mostrou que o UncA só não foi capaz de formar biofilme em 12% de NaCl. Microrganismos do gênero *Aureobasidium*, filogeneticamente próximos de UncA, já foram isolados em ambientes hipersalinos, além de terem sido documentados como leveduras produtoras de biofilme (GOSTINČAR *et al.*, 2008; KLEIN *et al.*, 2018; WANG *et al.*, 2022). Assim, a combinação desses fatores, juntamente com a característica de que leveduras desse gênero são consideradas poliextremófilas, podem explicar a formação de biofilme pelo isolado em diversas concentrações de NaCl. Esse resultado vai de acordo com as características já indicadas anteriormente sobre esse microrganismos e acaba somando ao fato de que leveduras do mesmo gênero são apenas halotolerantes, o que pode estar relacionado à ausência de formação de biofilme a 12% de NaCl (KOGÉJ *et al.*, 2005). O isolado YamB mostrou formar biofilme em todas as concentrações de NaCl. Na literatura, microrganismos pertencentes a essa espécie são descritos como halotolerantes (BURGAUD *et al.*, 2016), mas, diferentemente do UncA, ocorre o desenvolvimento de biofilme em todas as salinidades. Entretanto, não há descrição na literatura sobre a sua habilidade em formar biofilme e nem indicações de como a salinidade afeta o seu crescimento. Assim como não há informações que indiquem o porquê do isolado YamT, do mesmo gênero, não mostrar capacidade na formação de biofilme. Leveduras do gênero *Geotrichum*, próximas filogeneticamente do isolado UncG, que formam biofilme em concentrações salinas de 2,5% e 4%, já foram identificadas em microbiomas de biofilme (INABA *et al.*, 2020). O isolado UncP mostrou formar biofilme apenas em 4% de salinidade. Microrganismos de sequências próximas à do isolado, do gênero *Pseudozyma*, têm a capacidade de produzir uma série de exopolissacarídeos, como polímeros de glicose, galactose e manose, que podem estar relacionados à formação de biofilme (SAJNA *et al.*, 2013). No entanto, não há referência direta na literatura que indique a capacidade de leveduras desse gênero em se estruturarem em biofilme. Ao analisarmos os resultados, notamos que o isolado DebS é capaz de formar biofilme em concentrações de 4% e 8% de salinidade. Microrganismos do gênero *Debaryomyces*, como o isolado DebS, já foram identificados como formadores de biofilme em superfícies bióticas, como em

grãos de trigo (WACHOWSKA et al., 2023). A concentração de NaCl no meio, quando associada a microrganismos halotolerantes ou halofílicos, pode atuar no aumento de formação de biofilme. Segundo Lee et al. (2014), quando em concentrações mais elevadas de NaCl, *Staphylococcus aureus* promove o aumento na formação de biofilme, estando relacionado à superexpressão de genes, como *icaA*, ligados a esse processo. Por fim, o isolado BlaM demonstrou formar biofilme quando em 8% de NaCl. Como já descrito anteriormente, esse microrganismo é dimórfico e, além disso, é halotolerante (THOMAS et al., 2019). Ambas as características podem estar relacionadas à formação de biofilme por esse microrganismo nessa condição.

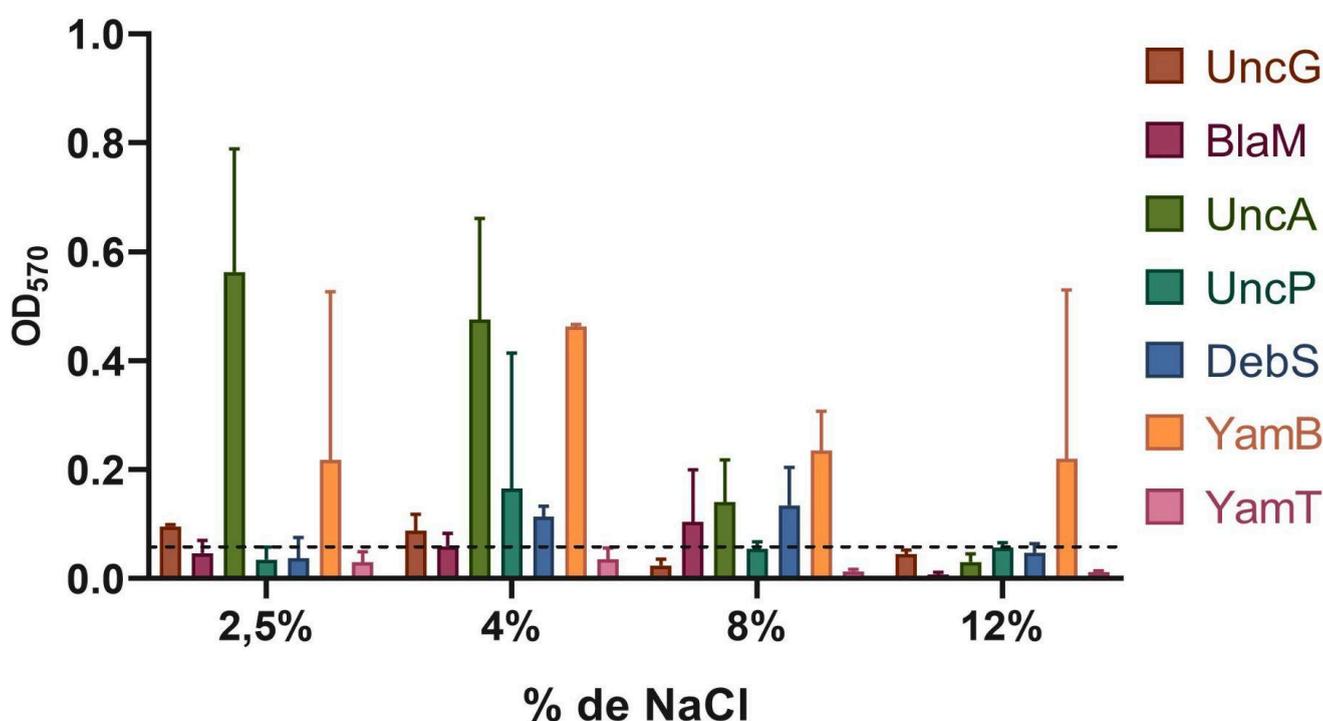


Figura 12: Formação de biofilme a 28°C sob variação de salinidade- Ensaio feito em quatro diferentes salinidades. Para evitar falsos positivos por conta de ruídos, foi estabelecido o limite de detecção de OD_{570 nm} 0,05 (GOUKA et al. 2022).

Os resultados mostram que, exceto a levedura UncG, todos os demais microrganismos crescem em todas as diferentes concentrações de NaCl (Figura 13). O isolado UncA é proveniente de alga vermelha e, como esperado, tanto por seu local de isolamento, quanto pelas características já mencionadas anteriormente, cresce em todas as salinidades (Figura 13a). Esse microrganismo, por ser halotolerante, cresce melhor em ambientes sem NaCl, e a diminuição na taxa de

crescimento vem acompanhado do acréscimo do sal (KOGUJ et al., 2005). O isolado UncG não cresceu, o que, conseqüentemente, pode estar relacionado com a não formação de biofilme quando em salinidades superiores a 4% (Figura 13b). De acordo com Guo et al. (2019), fungos do gênero *Geotrichum*, próximos ao isolado, crescem em salinidades de até 5%, o que se assemelha ao resultado obtido no experimento. Na figura 13c, observa-se que o DebS cresce de forma similar em todas as salinidades; porém, com decréscimo na taxa de crescimento conforme há o aumento na salinidade, o que era esperado, conforme informações já discutidas anteriormente a respeito da halotolerância de leveduras da mesma espécie. O isolado UncP mostrou crescimento em todas as salinidades testadas (Figura 13d). O resultado vai de encontro ao fato de que leveduras do gênero *Pseudozyma* são consideradas halotolerantes. As Figuras 13e e 13f mostram que os isolados YamB e YamT, respectivamente, crescem em todas as salinidades. Leveduras desse gênero já foram descritas como halotolerantes (BURGAUD et al., 2016). Entretanto, na Figura 13e, aparenta maior crescimento das leveduras em concentrações mais altas de sal, fato esse que difere do apresentado na literatura, uma vez que a espécie não é caracterizada como halotolerante. Os resultados mostrados na Figura 13g indicam que o isolado BlaM cresce em todas as salinidades; no entanto, há decréscimo do crescimento quando há aumento da salinidade, correspondendo a características de microrganismos halotolerantes.

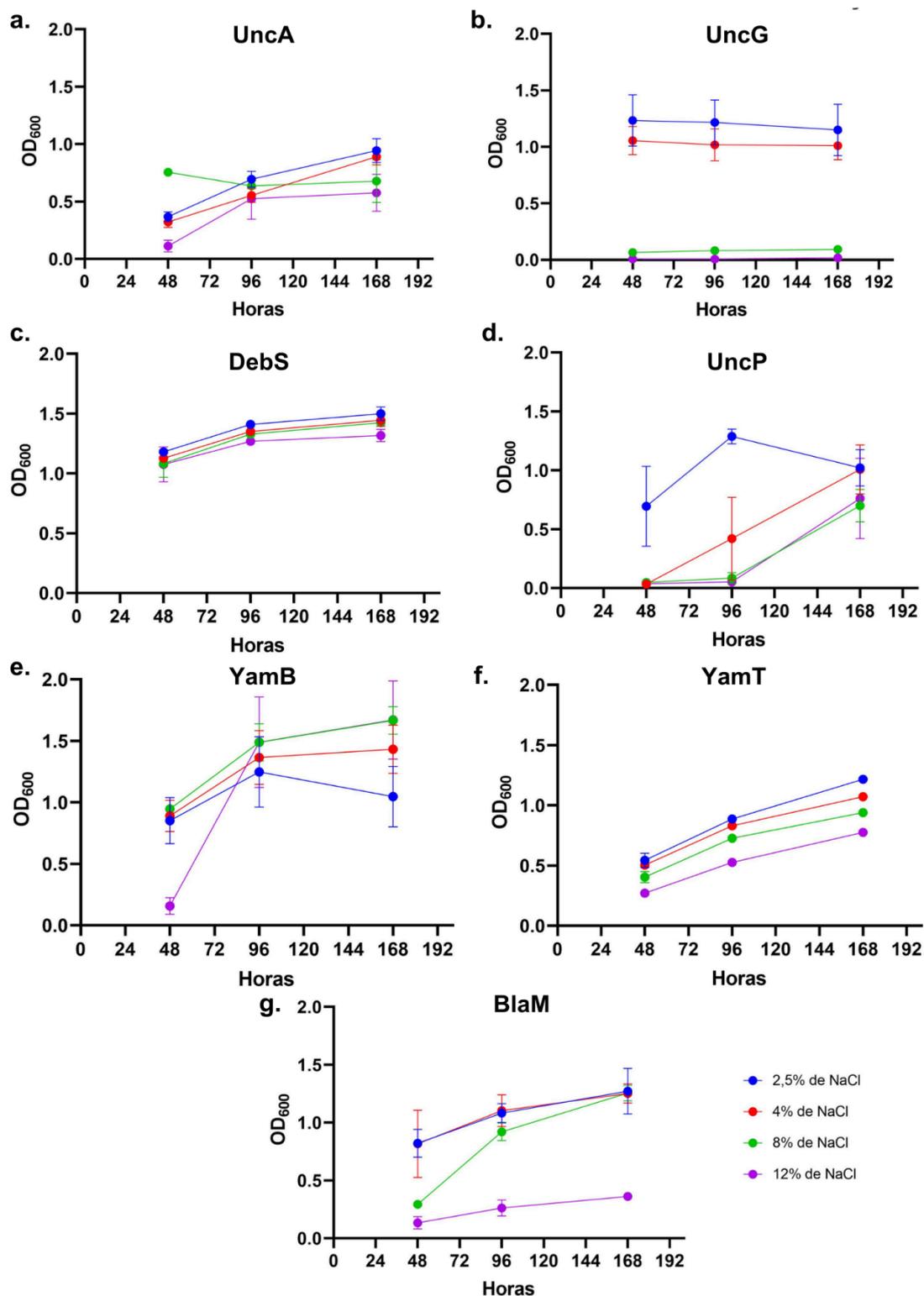


Figura 13: Crescimento dos isolados em diferentes concentrações de NaCl. Cada cor representa uma salinidade e todos os ensaios foram feitos sob as mesmas condições de temperatura. As leituras de OD foram feitas em 24, 48 e 168 horas.

5. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS

De acordo com Parrilli, Tutino e Marino (2022), ambientes extremos, caracterizados por temperaturas muito baixas ou elevadas, alta incidência de UV e concentrações elevadas de sal, podem resultar em danos estruturais e desnaturação de biomoléculas. Neste contexto, a maioria dos microrganismos tende a formar biofilme ou desenvolver características adaptativas específicas. Em ambientes salinos, a predominância de microrganismos em biofilme está conectada a uma resposta ao estresse causado pela salinidade (HÄUSLER et al., 2014). Observou-se, assim, que a maioria das leveduras utilizadas nesse estudo possuem a habilidade de sobrevivência em ambientes controlados com diferentes salinidades e capacidade de formação de biofilme. Além disso, algumas das leveduras testadas pertencem a espécies que possuem alguma forma de tolerância a fatores estressantes, como *Hortaea werneckii*. Compreende-se, portanto, que a identificação e caracterização da formação dessas estruturas são cruciais para entender a sobrevivência das espécies no ASPSP, elucidando os mecanismos empregados para aumentar a resistência dos microrganismos ao estresse ambiental.

Como perspectiva futura, o sequenciamento do genoma das leveduras será conduzido para avaliar os agrupamentos gênicos relacionados à produção de metabólitos secundários. Ferramentas de bioinformática serão empregadas para analisar e justificar a capacidade de sobrevivência dessas leveduras em ambientes extremos, relacionando suas características genéticas com diferentes rotas metabólicas e mecanismos de adaptação. Ainda como perspectiva, propõe-se continuar os testes de resposta a condições de estresse, verificando a formação de biofilme não apenas em diferentes salinidades, mas também em diferentes temperaturas. Ensaios de termotolerância e análise da área das colônias em diferentes salinidades poderão ser realizados, ampliando a compreensão das adaptações dessas leveduras a ambientes extremos. Ademais, serão conduzidos testes de metabolização das diferentes fontes de carbono pelas demais leveduras testadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLAHKARAMI, Somayeh *et al.* Isolation and identification of carotenoid-producing *Rhodotorula* sp. from Pinaceae forest ecosystems and optimization of in vitro carotenoid production. **Biotechnology Reports**, [S.L.], v. 32, p. 1-12, dez. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.btre.2021.e00687>.

BABAZADEH, Roja *et al.* The yeast osmostress response is carbon source dependent. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 7, n. 1, p. 1-11, 20 abr. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-01141-4>.

BONIFAZ, A. *et al.* *Tinea nigra* by *Hortaea werneckii*, a report of 22 cases from Mexico. **Studies In Mycology**, [S.L.], v. 61, n. [], p. 77-82, 2008. Westerdijk Fungal Biodiversity Institute. <http://dx.doi.org/10.3114/sim.2008.61.07>.

BORO, Marcela Castilho *et al.* Molecular identification of *Pseudozyma aphidis* (Henninger & Windisch) Boekhout: first record from a brazilian mangrove swamp. **Hoehnea**, [S.L.], v. 44, n. 4, p. 599-606, dez. 2017. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/2236-8906-02/2017>.

BURGAUD, Gaëtan *et al.* *Yamadazyma barbieri* f.a. sp. nov., an ascomycetous anamorphic yeast isolated from a Mid-Atlantic Ridge hydrothermal site (-2300 m) and marine coastal waters. **International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology**, [S.L.], v. 66, n. 9, p. 3600-3606, 1 set. 2016. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/ijsem.0.001239>.

BUZZINI, Pietro *et al.* Extremophilic yeasts: the toughest yeasts around?. **Yeast**, [S.L.], v. 35, n. 8, p. 487-497, 21 maio 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/yea.3314>.

CAÑETE-GIBAS, Connie F.; WIEDERHOLD, Nathan P.. The Black Yeasts: an update on species identification and diagnosis. **Current Fungal Infection Reports**, [S.L.], v.

12, n. 2, p. 59-65, 16 abr. 2018. Springer Science and Business Media LLC.
<http://dx.doi.org/10.1007/s12281-018-0314-0>.

CARVALHO-FILHO, Alfredo; MACENA, Bruno César Luz; NUNES, Diogo Martins. A new species of Anthiadinae (Teleostei: serranidae) from são pedro and são paulo archipelago, brazil, equatorial atlantic. **Zootaxa**, [S.L.], v. 4139, n. 4, p. 585-592, 22 jul. 2016. Magnolia Press. <http://dx.doi.org/10.11646/zootaxa.4139.4.10>.

CARVALHO, E. Tremor de magnitude 4,8 é registrado em arquipélago brasileiro.
Globo. Disponível em:

<<https://g1.globo.com/natureza/noticia/2012/07/tremor-de-magnitude-48-e-registrado-em-arquipelago-brasileiro-no-nordeste.html>>. Acesso em: 24 maio. 2023.

CHAMEKH, Rajaa et al. Isolation, Identification and Enzymatic Activity of Halotolerant and Halophilic Fungi from the Great Sebkhia of Oran in Northwestern of Algeria. **Mycobiology**, [S.L.], v. 47, n. 2, p. 230-241, 3 abr. 2019. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/12298093.2019.1623979>.

CHEN, Ray *et al.* Discovery of an Abundance of Biosynthetic Gene Clusters in Shark Bay Microbial Mats. **Frontiers In Microbiology**, [S.L.], v. 11, n. [], p. 1-13, 21 ago. 2020. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2020.01950>.

CHI, Zhenming *et al.* Bioproducts from *Aureobasidium pullulans*, a biotechnologically important yeast. **Applied Microbiology And Biotechnology**, [S.L.], v. 82, n. 5, p. 793-804, abr. 2009. Springer Science and Business Media LLC.
<http://dx.doi.org/10.1007/s00253-009-1882-2>.

CHUAN, M. C. *et al.* Solubility of heavy metals in a contaminated soil: effects of redox potential and ph. **Water, Air, And Soil Pollution**, [S.L.], v. 90, n. 3-4, p. 543-556, ago. 1996. Springer Science and Business Media LLC.
<http://dx.doi.org/10.1007/bf00282668>.

CORReA, Marcelo de Paula. Solar ultraviolet radiation: properties, characteristics and amounts observed in Brazil and South America. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, [S.L.], v. 90, n. 3, p. 297-313, jun. 2015. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/abd1806-4841.20154089>.

COSTENOBLE, Roeland *et al.* Comprehensive quantitative analysis of central carbon and amino-acid metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* under multiple conditions by targeted proteomics. **Molecular Systems Biology**, [S.L.], v. 7, n. 1, p. 1-13, jan. 2011. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/msb.2010.122>.

CROUS, P.W. *et al.* Fungal Planet description sheets: 785–867. **Persoonia - Molecular Phylogeny And Evolution Of Fungi**, [S.L.], v. 41, n. 1, p. 238-417, 18 dez. 2018. Naturalis Biodiversity Center. <http://dx.doi.org/10.3767/persoonia.2018.41.12>.

DEREEPER, A. *et al.* Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. **Nucleic Acids Research**, [S.L.], v. 36, n. , p. 465-469, 19 maio 2008. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkn180>.

DIDARI, Maryam *et al.* Diversity of halophilic and halotolerant bacteria in the largest seasonal hypersaline lake (Aran-Bidgol-Iran). **Journal Of Environmental Health Science And Engineering**, [S.L.], v. 18, n. 2, p. 961-971, 11 ago. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s40201-020-00519-3>.

DUJON, B. Yeasts illustrate the molecular mechanisms of eukaryotic genome evolution. **Trends In Genetics**, [S.L.], v. 22, n. 7, p. 375-387, jul. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tig.2006.05.007>.

DUPREEZ, J.; GOEDE, E. de; MYBURGH, J.. *Blastobotrys mokoena*: a thermotolerant yeast that produces extracellular endo- β -xylanase. **New Biotechnology**, [S.L.], v. 25, p. 52, set. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nbt.2009.06.265>.

ELSAYIS, Asmaa *et al.* Optimization of melanin pigment production from the halotolerant black yeast *Hortaea werneckii* AS1 isolated from solar salter in Alexandria. **Bmc Microbiology**, [S.L.], v. 22, n. 1, p. 1-16, 8 abr. 2022. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12866-022-02505-1>.

FISCHER, Monika S.; GLASS, N. Louise. Communicate and Fuse: how filamentous fungi establish and maintain an interconnected mycelial network. **Frontiers In Microbiology**, [S.L.], v. 10, n. [], p. 1-20, 29 mar. 2019. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2019.00619>.

FLEMMING, Hans-Curt; WINGENDER, Jost. The biofilm matrix. **Nature Reviews Microbiology**, [S.L.], v. 8, n. 9, p. 623-633, 2 ago. 2010. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2415>.

GOSTINČAR, C. *et al.* Expression of fatty-acid-modifying enzymes in the halotolerant black yeast *Aureobasidium pullulans* (de Bary) G. Arnaud under salt stress. **Studies In Mycology**, [S.L.], v. 61, p. 51-59, 2008. Westerdijk Fungal Biodiversity Institute. <http://dx.doi.org/10.3114/sim.2008.61.04>.

GOSTINČAR, Cene *et al.* Fifty *Aureobasidium pullulans* genomes reveal a recombining polyextremotolerant generalist. **Environmental Microbiology**, [S.L.], v. 21, n. 10, p. 3638-3652, 18 jun. 2019. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/1462-2920.14693>.

GOUKA, Linda *et al.* Genetic, Phenotypic and Metabolic Diversity of Yeasts From Wheat Flag Leaves. **Frontiers In Plant Science**, [S.L.], v. 13, n. [], p. 1-13, 7 jul. 2022. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2022.908628>.

GUO, Guang *et al.* Aerobic decolorization and detoxification of Acid Scarlet GR by a newly isolated salt-tolerant yeast strain *Galactomyces geotrichum* GG. **International Biodeterioration & Biodegradation**, [S.L.], v. 145, p. 104818, nov. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2019.104818>.

HAUEISEN, M. P.; FELIPE, Y. G. B. Unidades de Conservação Marinhas Brasileiras: APA do Arquipélago de São Pedro e São Paulo. **projeto bioicos**, 1 set. 2019.

Disponível em:

<<https://www.bioicos.org.br/post/2019/08/31/unidades-conservacao-marinhas-brasileiras-area-protecao-ambiental-arquipelago-sao-pedro-s>>. Acesso em: 24 maio. 2023.

FADIGAS VIANA, D. et al. Fisheries in the Saint Peter and Saint Paul archipelago: 13 years of monitoring. Disponível em:

<https://www.pesca.agricultura.sp.gov.br/41_2_239-248.pdf>. Acesso em: 24 maio. 2023.

HÄUSLER, Stefan *et al.* Microenvironments of reduced salinity harbour biofilms in Dead Sea underwater springs. **Environmental Microbiology Reports**, [S.L.], v. 6, n. 2, p. 152-158, 19 jan. 2014. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/1758-2229.12140>.

HOOG, G. Sybren de; SMITH, Maudy Th.. Saprochaete Coker & Shanor ex D.T.S. Wagner & Dawes (1970). **The Yeasts**, [S.L.], p. 1317-1327, 2011. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-444-52149-1.00097-5>.

INABA, Tomohiro *et al.* Clarifying prokaryotic and eukaryotic biofilm microbiomes in anaerobic membrane bioreactor by non-destructive microscopy and high-throughput sequencing. **Chemosphere**, [S.L.], v. 254, p. 126810, set. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126810>.

K.R., Sugumaran; V., Ponnusami. Review on production, downstream processing and characterization of microbial pullulan. **Carbohydrate Polymers**, [S.L.], v. 173, n. [], p. 573-591, out. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.06.022>.

KEJŽAR, Anja *et al.* Melanin is crucial for growth of the black yeast *Hortaea werneckii* in its natural hypersaline environment. **Fungal Biology**, [S.L.], v. 117, n. 5, p. 368-379, maio 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.funbio.2013.03.006>.

KIRCHHOFF, Lisa *et al.* Biofilm formation of the black yeast-like fungus *Exophiala dermatitidis* and its susceptibility to anti-infective agents. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 7, n. 1, p. 1-15, 17 fev. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/srep42886>.

KIRCHHOFF, Lisa *et al.* Phenotypical Characteristics of the Black Yeast *Exophiala dermatitidis* Are Affected by *Pseudomonas aeruginosa* in an Artificial Sputum Medium Mimicking Cystic Fibrosis–Like Conditions. **Frontiers In Microbiology**, [S.L.], v. 11, n. [], p. 1-14, 20 mar. 2020. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2020.00471>.

KLEIN, Mariana Nadjara *et al.* Biofilm production by *Aureobasidium pullulans* improves biocontrol against sour rot in citrus. **Food Microbiology**, [S.L.], v. 69, p. 1-10, fev. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2017.07.008>.

KOGEJ, Tina *et al.* The Halophilic Fungus *Hortaea werneckii* and the Halotolerant Fungus *Aureobasidium pullulans* Maintain Low Intracellular Cation Concentrations in Hypersaline Environments. **Applied And Environmental Microbiology**, [S.L.], v. 71, n. 11, p. 6600-6605, nov. 2005. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.71.11.6600-6605.2005>.

KUMAR, Anil *et al.* Invasive Mycosis Due to Species of *Blastobotrys* in Immunocompromised Patients with Reduced Susceptibility to Antifungals. **Journal Of Clinical Microbiology**, [S.L.], v. 52, n. 11, p. 4094-4099, nov. 2014. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jcm.01977-14>.

KUMDAM, Himabindu; MURTHY, Shweta Narayana; GUMMADI, Sathyanarayana N. Production of ethanol and arabitol by *Debaryomyces nepalensis*: influence of process parameters. **Amb Express**, [S.L.], v. 3, n. 1, p. 1-12, 9 maio 2013. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/2191-0855-3-23>.

KURTZMAN, Cletus P. *et al.* Blastobotrys americana sp. nov., Blastobotrys illinoisensis sp. nov., Blastobotrys malaysiensis sp. nov., Blastobotrys muscicola sp. nov., Blastobotrys peoriensis sp. nov. and Blastobotrys raffinosisfermentans sp. nov., novel anamorphic yeast species. **International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology**, [S.L.], v. 57, n. 5, p. 1154-1162, 1 maio 2007. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.64847-0>.

LADEVÈZE, Simon *et al.* The yeast Geotrichum candidum encodes functional lytic polysaccharide monoxygenases. **Biotechnology For Biofuels**, [S.L.], v. 10, n. 1, p. 1-21, 12 set. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s13068-017-0903-0>.

LEACH, Michelle D.; COWEN, Leah E.. Membrane Fluidity and Temperature Sensing Are Coupled via Circuitry Comprised of Ole1, Rsp5, and Hsf1 in Candida albicans. **Eukaryotic Cell**, [S.L.], v. 13, n. 8, p. 1077-1084, ago. 2014. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/ec.00138-14>.

LEE, Li Chuen *et al.* First record of the fungal genus Neodevriesia Quaedvl. & Crous (Ascomycota, Dothideomycetes, Neodevriesiaceae) isolated from scleractinian corals of Perhentian Islands, Malaysia. **Biodiversity Data Journal**, [S.L.], v. 10, n. [], p. 1-12, 18 maio 2022. Pensoft Publishers. <http://dx.doi.org/10.3897/bdj.10.e81533>.

LEE, Soomin *et al.* Effect of NaCl on Biofilm Formation of the Isolate from Staphylococcus aureus Outbreak Linked to Ham. **Korean Journal For Food Science Of Animal Resources**, [S.L.], v. 34, n. 2, p. 257-261, 30 abr. 2014. Korean Society for Food Science of Animal Resources. <http://dx.doi.org/10.5851/kosfa.2014.34.2.257>.

LIN, Xiaorong; HEITMAN, Joseph. Chlamydospore Formation during Hyphal Growth in Cryptococcus neoformans. **Eukaryotic Cell**, [S.L.], v. 4, n. 10, p. 1746-1754, out. 2005. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/ec.4.10.1746-1754.2005>.

LINK, Tobias *et al.* Genome Sequence of the Diploid Yeast *Debaryomyces hansenii* TMW 3.1188. **Microbiology Resource Announcements**, [S.L.], v. 11, n. 11, p. 1-3, 17 nov. 2022. American Society for Microbiology.

<http://dx.doi.org/10.1128/mra.00649-22>.

LIOU, G.-Y. *et al.* *Pseudozyma pruni* sp. nov., a novel ustilaginomycetous anamorphic fungus from flowers in Taiwan. **International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology**, [S.L.], v. 59, n. 7, p. 1813-1817, 19 jun. 2009.

Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.007765-0>.

LOPANDIC, Ksenija *et al.* Molecular characterization of the closely related *Debaryomyces* species: proposition of *d. vindobonensis* sp. nov. from a municipal wastewater treatment plant. **The Journal Of General And Applied Microbiology**, [S.L.], v. 59, n. 1, p. 49-58, 2013. Microbiology Research Foundation.

<http://dx.doi.org/10.2323/jgam.59.49>.

MA, Yue *et al.* Antimicrobial function of yeast against pathogenic and spoilage microorganisms via either antagonism or encapsulation: a review. **Food Microbiology**, [S.L.], v. 112, p. 104242, jun. 2023. Elsevier BV.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2023.104242>.

MESQUITA, J. L. Arquipélago São Pedro e São Paulo, o Brasil desconhecido.

Disponível em: <<https://marsemfim.com.br/arquipelago-sao-pedro-e-sao-paulo/>>.

Acesso em: 24 maio. 2023.

MIERKE, Friederike *et al.* Functional genome annotation and transcriptome analysis of *Pseudozyma hubeiensis* BOT-O, an oleaginous yeast that utilizes glucose and xylose at equal rates. **Fungal Genetics And Biology**, [S.L.], v. 166, p. 103783, maio 2023. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fgb.2023.103783>.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE (Brasil). **Ibama**.

<https://www.ibama.gov.br/notas/1353-icmbio-realiza-consultas-publicas-sobre-a-criac>

ao-de-unidades-de-conservacao-nos-arquipelagos-sao-pedro-e-sao-paulo-pe-e-trindade-e-martim-vaz-es. IBAMA, [S. l.], p. [s.i.], 6 fev. 2018. Disponível em: <https://www.ibama.gov.br/notas/1353-icmbio-realiza-consultas-publicas-sobre-a-criacao-de-unidades-de-conservacao-nos-arquipelagos-sao-pedro-e-sao-paulo-pe-e-trindade-e-martim-vaz-es>. Acesso em: 9 maio 2023.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE (Brasil). **Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade**. APA do Arquipélago de São Pedro e São Paulo. Brasil, 2018. Disponível em: <https://www.gov.br/icmbio/pt-br/assuntos/biodiversidade/unidade-de-conservacao/unidades-de-biomas/marinho/lista-de-ucs/area-de-protecao-ambiental-do-sao-pedro-e-sao-paulo>. Acesso em: 8 maio 2023.

MOTOKI, Akihisa *et al.* Taxa de soerguimento atual do arquipélago de São Pedro e São Paulo, Oceano Atlântico Equatorial. **Rem: Revista Escola de Minas**, [S.L.], v. 62, n. 3, p. 331-342, set. 2009. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0370-44672009000300011>.

MURAMATSU, Daisuke *et al.* Aureobasidium pullulans produced β -glucan is effective to enhance Kurosengoku soybean extract induced Thrombospondin-1 expression. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 7, n. 1, p. 1-10, 6 jun. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-03053-9>.

NANDY, Subir Kumar; SRIVASTAVA, R.K.. A review on sustainable yeast biotechnological processes and applications. **Microbiological Research**, [S.L.], v. 207, p. 83-90, mar. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2017.11.013.2>

NAVARRETE, Clara *et al.* DebaryOmics: an integrative omics study to understand the halophilic behaviour of debaryomyces hansenii. **Microbial Biotechnology**, [S.L.], v. 15, n. 4, p. 1133-1151, 5 nov. 2021. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/1751-7915.13954>.

NGUYEN, Huu-Vang *et al.* Differentiation of *Debaryomyces hansenii* and *Candida famata* by rRNA gene intergenic spacer fingerprinting and reassessment of phylogenetic relationships among *D. hansenii*, *C. famata*, *D. fabryi*, *C. flareri* (= *D. subglobosus*) and *D. prosopidis*: description of *d. vietnamensis*. nov. closely related to *d. nepalensis*. **Fems Yeast Research**, [S.L.], v. 9, n. 4, p. 641-662, jun. 2009. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1111/j.1567-1364.2009.00510.x>.

NOBRE, Alexandra; LUCAS, Cândida; LEÃO, Cecília. Transport and Utilization of Hexoses and Pentoses in the Halotolerant Yeast *Debaryomyces hansenii*. **Applied And Environmental Microbiology**, [S.L.], v. 65, n. 8, p. 3594-3598, ago. 1999. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.65.8.3594-3598.1999>.

NOSANCHUK, Joshua D. *et al.* Fungal Melanin: what do we know about structure?. **Frontiers In Microbiology**, [S.L.], v. 6, n. [], p. 1-7, 22 dez. 2015. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2015.01463>.

NTANA, Fani *et al.* *Aspergillus*: a powerful protein production platform. **Catalysts**, [S.L.], v. 10, n. 9, p. 1064-1093, 16 set. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/catal10091064>.

OWCZAREK-KOŚCIELNIAK, M.M. *et al.* *Aureobasidium pullulans* from *Juncus trifidus* L. roots. **Phytotaxa**, [S.L.], v. 266, n. 2, p. 125, 22 jun. 2016. Magnolia Press. <http://dx.doi.org/10.11646/phytotaxa.266.2.6>.

PARRILLI, Ermenegilda; TUTINO, Maria Luisa; MARINO, Gennaro. Biofilm as an adaptation strategy to extreme conditions. **Rendiconti Lincei. Scienze Fisiche e Naturali**, [S.L.], v. 33, n. 3, p. 527-536, 9 ago. 2022. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s12210-022-01083-8>.

PERKINS, Vincent *et al.* Phenotypic and Genetic Characterization of the Cheese Ripening Yeast *Geotrichum candidum*. **Frontiers In Microbiology**, [S.L.], v. 11, p. 1-16, 7 maio 2020. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2020.00737>.

PINTO, Cátia *et al.* Understand the Potential Role of *Aureobasidium pullulans*, a Resident Microorganism From Grapevine, to Prevent the Infection Caused by *Diplodia seriata*. **Frontiers In Microbiology**, [S.L.], v. 9, n. [], p. 1-15, 11 dez. 2018. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2018.03047>.

PRISTA, Catarina *et al.* The halotolerant *Debaryomyces hansenii*, the Cinderella of non-conventional yeasts. **Yeast**, [S.L.], v. 33, n. 10, p. 523-533, 25 ago. 2016. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/yea.3177>.

RAI, Amit Kumar *et al.* Biotechnological potential of yeasts in functional food industry. **Trends In Food Science & Technology**, [S.L.], v. 83, p. 129-137, jan. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2018.11.016>.

RAI, Amit Kumar; PANDEY, Ashok; SAHOO, Dinabandhu. Biotechnological potential of yeasts in functional food industry. **Trends In Food Science & Technology**, [S.L.], v. 83, p. 129-137, jan. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2018.11.016>.

RICCIARDELLI, Annarita *et al.* Environmental conditions shape the biofilm of the Antarctic bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125. **Microbiological Research**, [S.L.], v. 218, n. [], p. 66-75, jan. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2018.09.010>.

SÁ, Antônio Sérgio Ferreira de *et al.* Expanding the geographical distribution of *Blastobotrys malaysiensis* (Saccharomycetales) beyond the Asian continent – a cave fungus first reported in the Americas. **Biodiversity Data Journal**, [S.L.], v. 10, p. 1-12, 15 nov. 2022. Pensoft Publishers. <http://dx.doi.org/10.3897/bdj.10.e80226>.

SAJNA, Kuttuvan Valappil *et al.* Crude oil biodegradation aided by biosurfactants from *Pseudozyma* sp. NII 08165 or its culture broth. **Bioresource Technology**,

[S.L.], v. 191, p. 133-139, set. 2015. Elsevier BV.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2015.04.126>.

SAJNA, Kuttuvan Valappil *et al.* Studies on structural and physical characteristics of a novel exopolysaccharide from *Pseudozyma* sp. NII 08165. **International Journal Of Biological Macromolecules**, [S.L.], v. 59, p. 84-89, ago. 2013. Elsevier BV.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.04.025>.

SALAMONE, Amy L.; ROBICHEAU, Brent M.; WALKER, Allison K.. Fungal diversity of marine biofilms on artificial reefs in the north-central Gulf of Mexico. **Botanica Marina**, [S.L.], v. 59, n. 5, p. 291-305, 17 set. 2016. Walter de Gruyter GmbH.

<http://dx.doi.org/10.1515/bot-2016-0032>.

SARABIA, Marcela *et al.* Plant growth promotion traits of rhizosphere yeasts and their response to soil characteristics and crop cycle in maize agroecosystems.

Rhizosphere, [S.L.], v. 6, p. 67-73, jun. 2018. Elsevier BV.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.rhisph.2018.04.002>.

SEGAL-KISCHINEVZKY, Claudia *et al.* Yeasts Inhabiting Extreme Environments and Their Biotechnological Applications. **Microorganisms**, [S.L.], v. 10, n. 4, p. 1-26, 9 abr. 2022. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/microorganisms10040794>.

SEYEDMOUSAVI, Seyedmojtaba *et al.* Black Yeasts and Their Filamentous Relatives: principles of pathogenesis and host defense. **Clinical Microbiology Reviews**, [S.L.], v. 27, n. 3, p. 527-542, jul. 2014. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/cmr.00093-13>.

SHARMIN, Shahana *et al.* The First Isolation of *Hortaea werneckii* from a Household Guinea Pig. **Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi**, [S.L.], v. 43, n. 3, p. 175-180, 2002. The Japanese Society for Medical Mycology. <http://dx.doi.org/10.3314/jjimm.43.175>.

SHRUTHI, B. *et al.* Exploring biotechnological and functional characteristics of probiotic yeasts: a review. **Biotechnology Reports**, [S.L.], v. 34, p. 1-17, jun. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.btre.2022.e00716>.

SONG, Zhangyong *et al.* A transcription factor, MrMsn2, in the dimorphic fungus *Metarhizium rileyi* is essential for dimorphism transition, aggravated pigmentation, conidiation and microsclerotia formation. **Microbial Biotechnology**, [S.L.], v. 11, n. 6, p. 1157-1169, 29 ago. 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/1751-7915.13302>.

SUDHADHAM, M. *et al.* The neurotropic black yeast *Exophiala dermatitidis* has a possible origin in the tropical rain forest. **Studies In Mycology**, [S.L.], v. 61, p. 145-155, 2008. Westerdijk Fungal Biodiversity Institute. <http://dx.doi.org/10.3114/sim.2008.61.15>.

SULO, P. *et al.* *Geotrichum bryndzae* sp. nov., a novel asexual arthroconidial yeast species related to the genus *Galactomyces*. **International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology**, [S.L.], v. 59, n. 9, p. 2370-2374, 15 jul. 2009. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.008938-0>.

SUN, Zhan-Bin *et al.* Identification of genes related to chlamydospore formation in *Clonostachys rosea* 67-1. **Microbiologyopen**, [S.L.], v. 8, n. 1, p. 1-11, 10 abr. 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/mbo3.624>.

TANG, Yinjie J. *et al.* Central metabolism in *Mycobacterium smegmatis* during the transition from O₂-rich to O₂-poor conditions as studied by isotopomer-assisted metabolite analysis. **Biotechnology Letters**, [S.L.], v. 31, n. 8, p. 1233-1240, 9 abr. 2009. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10529-009-9991-7>.

TANIMURA, Ayumi *et al.* Lipid production through simultaneous utilization of glucose, xylose, and l-arabinose by *Pseudozyma hubeiensis*: a comparative screening study. **Amb Express**, [S.L.], v. 6, n. 1, p. 1-9, 26 ago. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s13568-016-0236-6>.

TECHAPARIN, Atiya; THANONKEO, Pornthap; KLANRIT, Preekamol.

High-temperature ethanol production using thermotolerant yeast newly isolated from Greater Mekong Subregion. *Brazilian Journal Of Microbiology*, [S.L.], v. 48, n. 3, p. 461-475, jul. 2017. Springer Science and Business Media LLC.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bjm.2017.01.006>.

TEIXEIRA, Pedro Antônio Castelo *et al.* L-DOPA accessibility in culture medium increases melanin expression and virulence of *Sporothrix schenckii* yeast cells.

Medical Mycology, [S.L.], v. 48, n. 5, p. 687-695, ago. 2010. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.3109/13693780903453287>.

TEIXEIRA, Pedro Antônio Castelo *et al.* L-DOPA accessibility in culture medium increases melanin expression and virulence of *Sporothrix schenckii* yeast cells.

Medical Mycology, [S.L.], v. 48, n. 5, p. 687-695, ago. 2010. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.3109/13693780903453287>.

THITLA, Tanapol *et al.* Species Diversity, Distribution, and Phylogeny of *Exophiala* with the Addition of Four New Species from Thailand. **Journal Of Fungi**, [S.L.], v. 8, n. 8, p. 766, 24 jul. 2022. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/jof8080766>.

THOMAS, Stéphane *et al.* *Blastobotrys adenivorans* and *B. raffinosifermentans*, two sibling yeast species which accumulate lipids at elevated temperatures and from diverse sugars. *Biotechnology For Biofuels*, [S.L.], v. 12, n. 1, p. 1-15, 20 jun. 2019. Springer Science and Business Media LLC.

<http://dx.doi.org/10.1186/s13068-019-1492-x>.

TIUKOVA, Ievgeniia A. *et al.* Proteome analysis of xylose metabolism in *Rhodotorula toruloides* during lipid production. **Biotechnology For Biofuels**, [S.L.], v. 12, n. 1, p. 1-17, 4 jun. 2019. Springer Science and Business Media LLC.

<http://dx.doi.org/10.1186/s13068-019-1478-8>.

USUDA, Daisuke *et al.* *Exophiala dermatitidis*. *World Journal Of Clinical Cases*, [S.L.], v. 9, n. 27, p. 7963-7972, 26 set. 2021. Baishideng Publishing Group Inc..

<http://dx.doi.org/10.12998/wjcc.v9.i27.7963>.

VAN ECK, J. H. *et al.* Accumulation of Polyhydroxy Alcohols by *Hansenula anomala* in Response to Water Stress. **Microbiology**, [S.L.], v. 135, n. 12, p. 3505-3513, 1 dez. 1989. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/00221287-135-12-3505>

VARRELLA, Stefano *et al.* Diversity, Ecological Role and Biotechnological Potential of Antarctic Marine Fungi. **Journal Of Fungi**, [S.L.], v. 7, n. 5, p. 391, 17 maio 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/jof7050391>.

WACHOWSKA, Urszula *et al.* A method for reducing the concentrations of *Fusarium graminearum* trichothecenes in durum wheat grain with the use of *Debaryomyces hansenii*. **International Journal Of Food Microbiology**, [S.L.], v. 397, p. 110211, jul. 2023. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2023.110211>.

WANG, Meng-Meng; SHENOY, Belle Damodara; LI, Wei; CAI, Lei. Molecular phylogeny of *Neodevriesia*, with two new species and several new combinations. **Mycologia**, [S.L.], v. 109, n. 6, p. 965-974, 2 nov. 2017. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/00275514.2017.1415075>.

WANG, Peng *et al.* *Aureobasidium* spp. and their applications in biotechnology. **Process Biochemistry**, [S.L.], v. 116, p. 72-83, maio 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2022.03.006>.

WANG, Qin; SZANISZLO, Paul J.. WdStuAp, an APSES Transcription Factor, Is a Regulator of Yeast-Hyphal Transitions in *Wangiella* (*Exophiala*) *dermatitidis*. **Eukaryotic Cell**, [S.L.], v. 6, n. 9, p. 1595-1605, set. 2007. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/ec.00037-07>.

WOO, Patrick C. Y. *et al.* Clinical Spectrum of Exophiala Infections and a Novel Exophiala Species, *Exophiala hongkongensis*. **Journal Of Clinical Microbiology**, [S.L.], v. 51, n. 1, p. 260-267, jan. 2013. American Society for Microbiology.
<http://dx.doi.org/10.1128/jcm.02336-12>.

YIN, Wen *et al.* Biofilms: the microbial protective clothing in extreme environments. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 20, n. 14, p. 1-18, 12 jul. 2019. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms20143423>.

YONG, Lee K. *et al.* Morphological and Molecular Characterization of *Exophiala polymorpha* sp. nov. Isolated from Sporotrichoid Lymphocutaneous Lesions in a Patient with Myasthenia Gravis. **Journal Of Clinical Microbiology**, [S.L.], v. 53, n. 9, p. 2816-2822, set. 2015. American Society for Microbiology.
<http://dx.doi.org/10.1128/jcm.00622-15>.

ZALAR, P. *et al.* Redefinition of *Aureobasidium pullulans* and its varieties. **Studies In Mycology**, [S.L.], v. 61, p. 21-38, 2008. Westerdijk Fungal Biodiversity Institute.
<http://dx.doi.org/10.3114/sim.2008.61.02>.

ZALAR, Polona *et al.* The extremely halotolerant black yeast *Hortaea werneckii* - a model for intraspecific hybridization in clonal fungi. **Ima Fungus**, [S.L.], v. 10, n. 1, p. 1-27, 8 jul. 2019. Springer Science and Business Media LLC.
<http://dx.doi.org/10.1186/s43008-019-0007-5>.

ZHANG, Ling *et al.* The utilisation of amino acids by *Debaryomyces hansenii* and *Yamadazyma triangularis* associated with cheese. **International Dairy Journal**, [S.L.], v. 121, p. 105135, out. 2021. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2021.105135>.