



## BIOASSINATURAS MARCIANAS: USO DA ESPECTROSCOPIA MICRO-RAMAN NA ASTROBIOLOGIA

Thaís de A. Janolla<sup>1\*</sup>, Gabriel G. da Silva<sup>2</sup>, Mirian L. A. F. Pacheco<sup>3</sup> e Airton N. C. Dias<sup>1</sup>

1 - Departamento de Física, Química e Matemática (DFQM), Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). Rodovia João Leme dos Santos, SP-264 – Sorocaba, CEP 18052-780, SP

2 - Instituto de Química (IQ), Universidade de São Paulo (USP)..

3- Departamento de Biologia (DBio), Universidade Federal de São Carlos (UFSCar)- Sorocaba  
thaisjanolla@estudante.ufscar.br

### RESUMO

A Espectroscopia Raman é uma técnica aplicada em diversas áreas da ciência, dentre elas na biociências com foco na identificação e caracterização de bioassinaturas. Conceito esse que se dá quando microrganismos que em interações com substratos minerais, podem sintetizar outros compostos minerais ou de natureza orgânica. Algumas dessas bioassinaturas, como a muscilagem ou a piritita produzida ou envolvida nas atividades de bactérias estão relacionadas à preservação de tipos específicos de fósseis. A preservação de certos tipos de biominerais e matéria orgânica permite reconstituições paleoambientais também em outros mundos do Sistema Solar. Diante disso, este trabalho investigou a capacidade de formação, retenção e preservação de informações de bioassinaturas de *Acidithiobacillus ferrooxidans* em substratos argila, areia e Vivianita. Os cultivos abióticos e bióticos, utilizando o microrganismo *A. ferrooxidans* LR, foram realizados em 20 ml de meio de cultura T&K modificado sem ferro solúvel (pH = 1,8) usando o mineral Vivianita,  $Fe_2 + 2.202Fe_3 + 0.798(PO_4)_2(OH)0.798 \cdot 7.063H_2O$ , cominuida como fonte de ferro mineral (5mM). Foram preparadas 11 culturas combinando a presença ou não de areia quartzosa (10 g), Montmorilonita (4,5 g), ou a combinação de ambas (5 g e 2,25 g, respectivamente). Estas culturas foram acondicionadas em placas de Petri, a 30 °C, até a evaporação completa do meio (aproximadamente 75 dias). Em seguida, a caracterização dos minerais foi realizada via Espectroscopia micro-Raman (532 nm). Nos cultivos com argila pura, não foram detectadas bandas Raman características de Montmorilonita, Vivianita matéria orgânica ou outros minerais. Nos cultivos com a mistura de argila e areia, foram detectados apenas os sinais de quartzo, indicando que a Montmorilonita pode interferir na detecção de sinais de outros minerais. Já nos cultivos de areia pura, são evidentes as bandas de quartzo (picos em 209, 267, 359, 398, 466 e 1162  $cm^{-1}$ ) e Vivianita (201, 306, 454 e 984  $cm^{-1}$ ) tanto em sistemas abióticos quanto bióticos. No sistema biótico contendo Vivianita pura, foram identificados picos indicativos de um mineral de fosfato de  $Fe^{3+}$  em (429, 1006, e 1097  $cm^{-1}$ ). Trata-se da primeira observação da formação de um mineral fosfato de  $Fe^{3+}$  associado ao *A. ferrooxidans*. Não foi possível identificar o bioprecipitado, porém, estudos em andamento pretendem realizar uma melhor identificação e caracterização dessa fase mineral.

**Palavras-chave:** Vivianita, Montmorilonita, Bioassinaturas, Micro-raman.

## INTRODUÇÃO

A espectroscopia Raman é uma técnica vibracional que pode ser aplicada em diversas áreas, além das Ciências dos Materiais: por exemplo, Arte e Arqueologia, Geologia, Farmacologia e Biociências (Biomoléculas, Células, Bactérias, Aplicações Médicas, Plantas, Fibras) – veja, por exemplo, os *reviews* do *Journal of Raman Spectroscopy* intitulados *Recent advances in linear and nonlinear Raman Spectroscopy* e publicados anualmente desde 2007.

Diante deste amplo espectro de aplicações, pode-se citar uma abordagem relativamente nova: a Paleometria<sup>1-3</sup> – que reúne diferentes áreas, como física e química, e aplica técnicas tais como espectroscopia Raman, FT-IR, Raio-X, NanoSIMs, dentre outras, à biociências. Especificamente, a espectroscopia Raman aplicada a paleometria tornou-se uma poderosa ferramenta para o estudo de bioassinaturas<sup>4-8</sup> em ambiente terrestre ou fora dele (meteoros e outros planetas).

Neste contexto, este trabalho buscou identificar e caracterizar via espectroscopia Raman, a ação de *Acidithiobacillus ferrooxidans* na presença de diferentes sedimentos ou substratos com a oferta de Vivianita como fonte de Fe<sup>2+</sup>, na produção de biominerais. Estes biominerais funcionariam como potenciais bioassinaturas para investigação de vida em Marte.

A escolha do contexto marciano não poderia ser mais plausível. Além da recente missão MARS2020 com a presença do Rover *Perseverance*, há muito, Marte é um planeta extremamente importante para a astrobiologia. Sua geologia indica que houveram períodos em que a água era abundante e líquida e presença de rochas como sulfato<sup>9</sup>. Devido às condições de altitude e a presença visível de deltas que rios “fossilizados”, podem existir em suas crateras a presença de argilominerais e sílica, sedimentos transportados de fontes mais altas e depositados em lugares mais baixos nesse período onde existia a uma bacia hidrológica no planeta. Isso é o que torna os diferentes substratos no nosso experimento crucial. Ainda que em Marte não foi identificada diretamente a presença de Vivianita, existem localidades ricas em fosfato, e dentro desse contexto o estudo se torna viável.

Os resultados apresentados identificam a presença de sistemas bióticos e mostram que mais estudos são necessários a fim de identificar e caracterizar a interferência de outros minerais e a presença de bioprecipitados.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Com o objetivo de simular a interação dos sedimentos marcianos com bactérias extremófilas indutoras de biomineralização, foi utilizada a *Acidithiobacillus ferrooxidans*, que é um bacilo, gram-negativo, acidófilo crescendo de maneira ótima a 30°C em pH 1,8 a 2,0 e quimiolitotrófica. Esta bactéria obtém energia através da oxidação de espécies inorgânicas, por exemplo, o Fe, que, nesse experimento será disponibilizado através do mineral Vivianita, um fosfato de ferro comum em nosso planeta. Mesmo que presença não tenha sido confirmada em Marte, existem grandes chances de que ele exista no planeta. Isso porque existem áreas com grande concentração de fosfato detectada. Desta forma, se valida a necessidade identificá-la em Marte. Posteriormente, deve-se avaliar e caracterizar a formação de minerais, a partir dela, que possam ser identificados como biominerais.

As variáveis do experimento foram: i) a presença ou ausência da bactéria, caracterizando assim os sistemas bióticos e abióticos; ii) a presença ou ausência de Vivianita e; iii) a variação de sedimentos sendo eles argila (Montmorilonita) e/ou areia. A Figura 1 apresenta todo o esquema experimental pré caracterização espectroscópica.

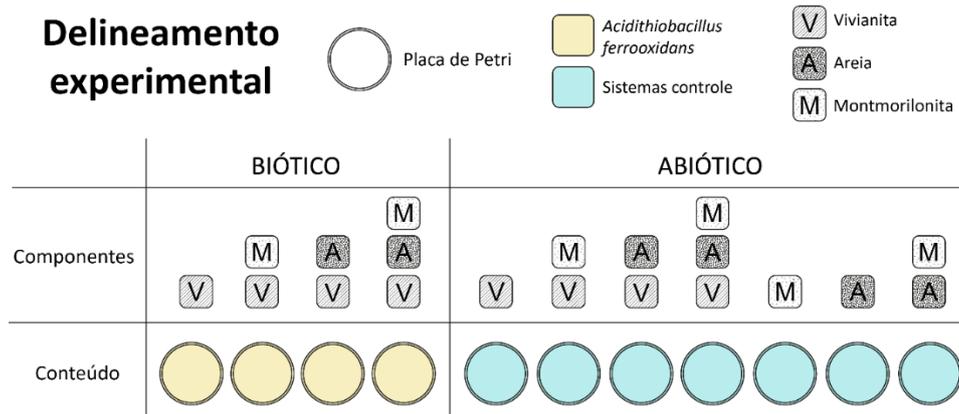


Figura 1: Esquema de identificação de variáveis do experimento.

O experimento foi monitorado quimicamente com análises de pH e disponibilidade  $Fe^{2+}$  e  $Fe^{3+}$  para que haja o desenvolvimento do microrganismo. As amostras permaneceram estáticas em placas de Petri sendo monitorado até a total evaporação do meio que foi disponibilizado em todos os recipientes.

Após a total secagem das amostras foram submetidas a análises via Espectroscopia Raman em um equipamento Renishaw modelo in-Via Reflex acoplado ao microscópio. O laser utilizado foi o de 532 nm (laser de diodo, Renishaw) - 500 mW, com rede de difração de 1200 linhas, com um Detector CCD (1040x256 pixels) resfriado termoeletricamente com uma base motorizada para suporte de amostra a qual permite o translado da amostra nas direções X, Y e Z com passo de 0,1  $\mu m$ . As análises ocorreram em modo estático e centralizado em 800  $cm^{-1}$ , com potência máxima em 5%, tempo de exposição em 1 (um) segundo e 30 acumulações.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados iniciais mostraram que: primeiramente, é possível identificar fatores que podem dificultar a identificação e caracterização das bioassinaturas. Por exemplo: análises de controle mostraram que nos conjuntos experimentais que possuíam argila, o sinal foi influenciado, resultando em apenas fluorescência. Isso é um problema relevante, pois a argila subverte os picos na região entre 900 e 2000  $cm^{-1}$ . É exatamente nesta região que grande parte dos picos em que esse fosfato de ferro é caracterizado. Este resultado mostra-se importante, pois se pode avançar metodologicamente na aplicação da Espectroscopia Raman para melhorar os resultados e ainda, avaliar o uso de técnicas complementares que sejam capazes de driblar qualquer limitação inicial.

Em segundo lugar, os resultados apresentados demonstram o potencial da técnica. Nos cultivos com argila pura, não foram detectadas bandas Raman características de Montmorilonita, Vivianita matéria orgânica ou outros minerais. Nos cultivos com a mistura de argila e areia, foram detectados apenas os sinais de quartzo, indicando que a Montmorilonita pode interferir na detecção de sinais de outros minerais. Já nos cultivos de areia pura, são evidentes as bandas de quartzo (picos em 209, 267, 359, 398, 466 e 1162  $cm^{-1}$ ) e Vivianita (201, 306, 454 e 984  $cm^{-1}$ ) tanto em sistemas abióticos quanto bióticos.

Este último resultado é o mais promissor: no sistema biótico contendo Vivianita pura, foram identificados picos indicativos de um mineral de fosfato de  $Fe^{3+}$  em 429, 1006, e 1097  $cm^{-1}$  (Figura 2). Estes resultados em que o conjunto experimental tem interação com nenhum sedimento, apresentou maior quantidade de bandas identificáveis características deste fosfato de ferro bioticamente produzido. Isso permite o levantamento de duas hipóteses igualmente relevantes: i) os sedimentos, mesmo que indiferentes ao crescimento da bactéria, não foram

indiferentes à síntese do biomineral; ii) houve o crescimento destes minerais, porém, os sedimentos impossibilitam a identificação por esta metodologia em específico.

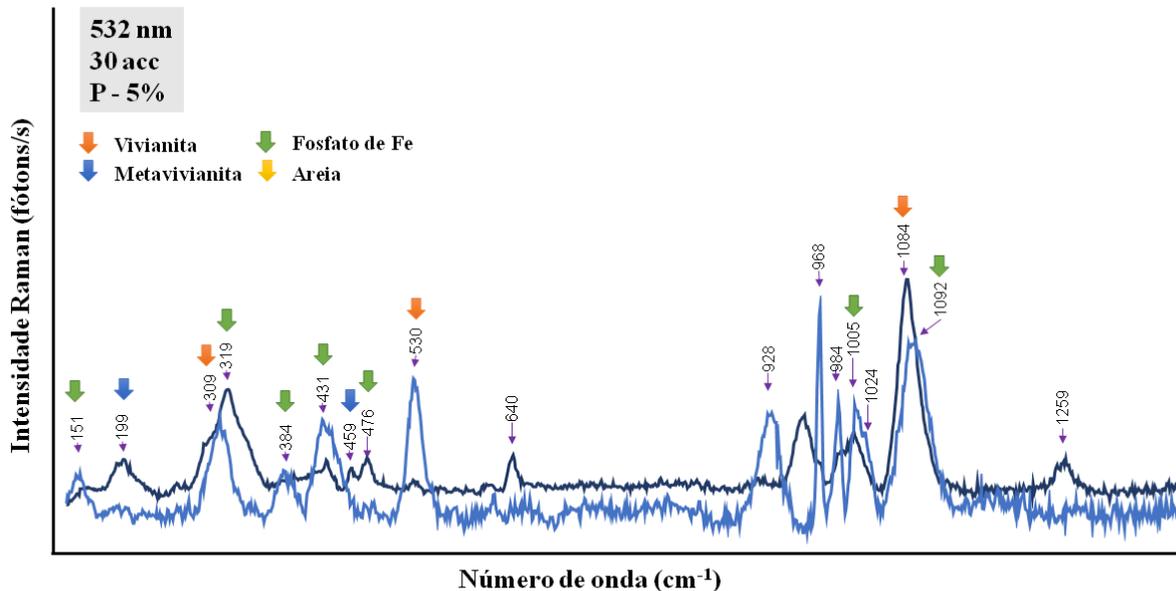


Figura 2: Espectroscopia Raman variável Biótica e Vivianita.

## CONCLUSÕES

O histórico interesse da humanidade em desvendar os mistérios do nosso e de outros planetas, pouco a pouco vai avançando. O ambiente propício para mais descobertas em nosso Sistema Solar, principalmente em Marte decorre da nova missão MARS2020. Este trabalho visa cooperar para a identificação e caracterização de minerais que origem biótica. Tais assinaturas estão inicialmente indicadas nos resultados, pois há uma primeira observação da formação de um mineral fosfato de Fe<sup>3+</sup> associado ao *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Ainda é necessário o uso de técnicas complementares e aperfeiçoamento da Espectroscopia Raman, no entanto, os resultados mostram-se promissores. Ainda é necessária a identificação do bioprecipitado, porém, estudos em andamento pretendem realizar a caracterização dessa nova fase mineral.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a CAPES pela bolsa de mestrado (projeto 88882.461700/2019-01) e a FAPESP pelo suporte financeiro.

## REFERÊNCIAS

1. SCHOPF, J. W. *et al.* Raman imagery: a new approach to assess the geochemical maturity and biogenicity of permineralized Precambrian fossils. *Astrobiology*, n. 5, v. 3, p. 333-371, 2005.
2. RIQUELME, F., RUVALCABA-SIL, J. L.; ALVARADO-ORTEGA, J. Palaeometry: Non-destructive analysis of fossil materials. *Boletín de la Sociedad Geológica Mexicana*, n. 61, v. 2, p. 177-183. 2009.
3. DELGADO, A. O. *et al.*, Paleometry: a brand new area in Brazilian science. *Materials Research*, v. 17, n. 6, p. 1434-1441, 2014.
4. MARAIS, D. J. D. *et al.*, Remote Sensing of Planetary Properties and Biosignatures on Extrasolar Terrestrial Planets. *Astrobiology*, [S.L.], v. 2, n. 2, p. 153-181, jun. 2002.

5. INIESTO, M. *et al.*, Preservation in microbial mats: mineralization by a talc-like phase of a fish embedded in a microbial sarcophagus. *Frontiers in Earth Science*, v. 3, p. 51, 2015.
6. FROST, *ey al.*, A Thermogravimetric, scanning electron microscope and vibrational spectroscopic study of the phosphate mineral santabarbarite from Santa Barbara mine, Tuscany, Italy. *J Therm Anal Calorim* 124, p. 639–644. 2016.
7. JAVAUX, E. J. Challenges in evidencing the earliest traces of life. *Nature*, [S.L.], v. 572, n. 7770, p. 451-460, 21 ago. 2019.
8. CALLEFO, F. *et al.*, Evaluating Biogenicity on the Geological Record With Synchrotron-Based Techniques. *Frontiers In Microbiology*, [S.L.], v. 10, p. 1-12, 11 out. 2019.
9. KLINGELHÖFER G. *et al.*, Jarosite and Hematite at Meridiani Planum form Opportunity's Mössbauer Spectrometer. *Science*, v.306, p. 1740-1745, 2004.