

## **ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE MICRORGANISMOS COLETADOS EM AMBIENTE COM ALTA CONCENTRAÇÃO DE URÂNIO COMO MODELO PARA ASTROBIOLOGIA**

Bárbara Luane Poletto<sup>1</sup>; Gabriel Gonçalves Silva<sup>2</sup>; Eiji Almeida Yamassaki<sup>3</sup>; Fabio Rodrigues<sup>4</sup>; Cláudia Moreno Rosa<sup>5</sup>

1. Estudante do curso de Biologia; e-mail: barbarapoletto27@gmail.com
2. Doutorando em Química; e-mail: g\_goncalves\_silva@hotmail.com
3. Mestrando em Química; e-mail: eiji.de.almeida@gmail.com
4. Professor da Universidade de São Paulo; e-mail: farod@iq.usp.br;
5. Professora da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: claumr99@yahoo.com

Área de Conhecimento: **Saúde e Biológicas**

**Palavras-chaves:** Isolamento ambiental; urânio; radiação UV; astrobiologia.

### **INTRODUÇÃO**

A astrobiologia atualmente é descrita como uma ciência que estuda a origem da vida, sua evolução ao longo do tempo, distribuição, seu futuro e como ela interage com os corpos celestes e demais objetos no universo, e baseia seus estudos no modelo de vida terrestre conhecido (GALANTE et al., 2016). Devido a presença de vida em diversos ambientes inóspitos observados durante a busca atual por análogos habitáveis extraterrestres, os organismos extremófilos tem se tornado um dos focos principais de estudo, os quais são capazes de sobreviver e até mesmo prosperar em condições consideradas extremas do ponto de vista humano (MADIGAN & MARRS, 1997). Dentro deste contexto, estudar organismos oriundos de locais expostos a altos índices de radiação, análogos ao ambiente espacial é fundamental, pois rochas e minas ricas em urânio ou outros minerais radioativos podem fornecer um ambiente interessante, visto que as formas de vida que colonizam esse tipo de ambiente são expostas à radiação do decaimento radioativo, assim como a radiação solar. O estudo das populações de bactérias submetidas à exposição prolongada ao urânio em tais ambientes pode proporcionar uma oportunidade única para identificar espécies que se adaptaram à presença do mineral e da radiação produzida por seu decaimento (MONDANI et al., 2011). No Brasil, um local bastante estudado quanto à presença de minerais de urânio é a região de Perus – SP. A geologia do local é composta por grandes massas granítico-pegmatíticas intemperizadas, com a presença de minerais uraníferos formados por veios hidrotermais (ATENCIO, 1991). Dentre os minerais presentes na região, encontram-se minerais contendo urânio, como por exemplo, a Autunita, o Uranofano- $\beta$  e a Weeksita.

### **OBJETIVOS**

O presente estudo visou o isolamento, cultivo e testes de resistência dos microrganismos presentes em amostras de uma região contendo rochas ricas em urânio, a fim de identificar possíveis modelos, visando aplicá-los em uma perspectiva astrobiológica e biotecnológica.

## METODOLOGIA

- **Coleta**

Foi realizada uma saída de campo até uma pedreira onde é possível encontrar rochas do pegmatito uranífero de Perus - SP (-23.416771, -46.732934) expostas a céu aberto. Lá, foram coletados assepticamente diversos fragmentos rochosos contendo amostras de minerais de urânio. Os minerais foram colocados em sacos de coleta e tubos tipo Falcon de 50 ml, ambos estéreis, e depois mantidos em geladeira (4°C) até que isolamento fosse realizado.

- **Isolamento**

Cerca de 2g das amostras ambientais selecionadas dos minerais foram colocadas em 20 ml de solução salina (NaCl 0,9%) estéril e homogeneizada. Alíquotas de 100 µl foram inoculadas em placas de Petri contendo meio R2A (R) e TSA 10% (T). Após o crescimento dos organismos, foi feita identificação visual da diversidade das colônias através da observação de características como morfologia e coloração das mesmas. Desta forma, um exemplar de cada tipo de colônia foi coletado com auxílio de uma alça de platina e estriado em uma nova placa.

- **Testes e curvas de sobrevivência à radiação UV**

Os isolados foram submetidos ao teste de sobrevivência à radiação UV-C em solução salina com DO<sub>600</sub> igual a 0,125 e sob agitação, utilizando uma lâmpada UV-C (Philips TUV-20W; 254nm), com fluências de 0 J/m<sup>2</sup> e 500 J/m<sup>2</sup> para o processo inicial de triagem. Os isolados que apresentaram maior resistência ao UV-C foram expostos em triplicata a fluências de 0 J/m<sup>2</sup>, 150 J/m<sup>2</sup>, 300 J/m<sup>2</sup>, 500 J/m<sup>2</sup> e 700 J/m<sup>2</sup> para obtenção das curvas de resistência. Alíquotas de 20 µl foram retiradas em cada dose para plaqueamento em diversas diluições e as placas foram incubadas a 30°C por um período de 3 dias para a contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFCs).

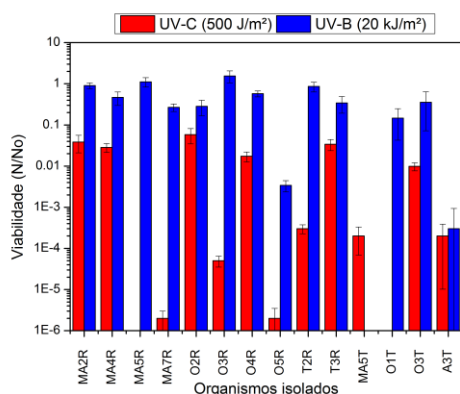
Para a realização dos testes de sobrevivência à radiação UV-B, um protocolo semelhante foi aplicado. Foram usadas lâmpadas UV-B (Philips TL20W Hg; 312nm), com fluências de 0 J/m<sup>2</sup> e 20.000 J/m<sup>2</sup> para o processo inicial de triagem, e de 0 J/m<sup>2</sup>, 30 kJ/m<sup>2</sup>, 60 kJ/m<sup>2</sup>, 90 kJ/m<sup>2</sup> e 120 kJ/m<sup>2</sup> para as curvas de resistência. Para UV ambiental (UV-A + UV-B) não foi feita triagem, apenas a geração das curvas de resistência. Foi utilizando um simulador solar (Oriel Sol UV-2 Solar simulator - 85.7% UV-A, 11% UV-B e 3.3% de luz visível), com doses de 25,9 W/m<sup>2</sup> de UV-A (365nm) e 15,9 W/m<sup>2</sup> de UV-B (312nm), sendo os isolados amostrados após períodos de 0, 20, 40, 60, 80, 100 e 120 minutos de exposição. Como organismo modelo, foi usada a bactéria *Deinococcus radiodurans*, organismo extremófilo resistente à altas doses de radiação.

## RESULTADOS E DISCUSSÕES

Com a ajuda do Prof. Daniel Atencio, quatro minerais coletados assepticamente foram devidamente identificados visualmente para serem utilizados neste projeto, três contendo urânio, sendo eles: Autunita (A) – Ca (UO<sub>2</sub>)<sub>2</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>·10H<sub>2</sub>O; Meta-Autunita (MA) - Ca(UO<sub>2</sub>)<sub>2</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O; e Opala Uranífera (O) - SiO<sub>2</sub>·nH<sub>2</sub>O + U; e um sem a presença desse elemento, a Turmalina (T) - Na(Fe<sup>2+</sup>·<sup>3+</sup>)Al<sub>6</sub>(Si<sub>6</sub>O<sub>18</sub>)(BO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>(OH)<sub>3</sub>(OH). O processo de isolamento dos organismos, como descrito na Seção 3.2, provenientes do pegmatito uranífero de Perus resultou na obtenção de 15 isolados, sendo que, quase a metade apresentou algum grau de pigmentação. Essa é uma característica interessante, pois a presença de pigmentos nesses microrganismos pode, em alguns casos, fornecer aos mesmos um grau maior de proteção

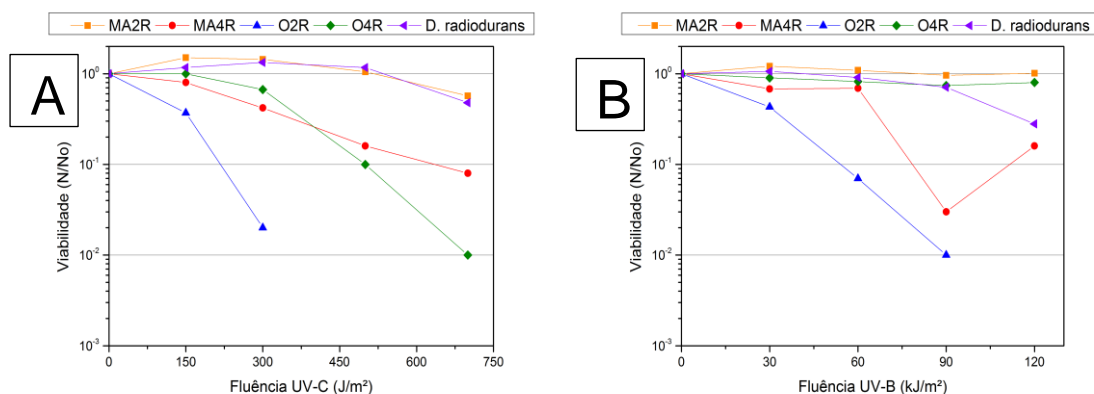
contra radiações, se comparados a microrganismos não pigmentados (TIAN et al., 2009). Para avaliar a resistência dos isolados, os mesmos foram submetidos a uma triagem inicial de sobrevivência a UV-C e UV-B, conforme descrito na Seção 3.3. Optou-se por realizar a triagem utilizando uma fluência de 500 J/m<sup>2</sup> para o UV-C e uma fluência de 20.000 J/m<sup>2</sup> para o UV-B, desta forma, esperava-se ser capaz de selecionar aqueles isolados que apresentassem boa resistência a uma dose substancial de UV-C e UV-B. O Gráfico 1 apresenta os resultados da sobrevivência dos isolados após a exposição ao UV em comparação à sobrevivência quando não expostos à radiação.

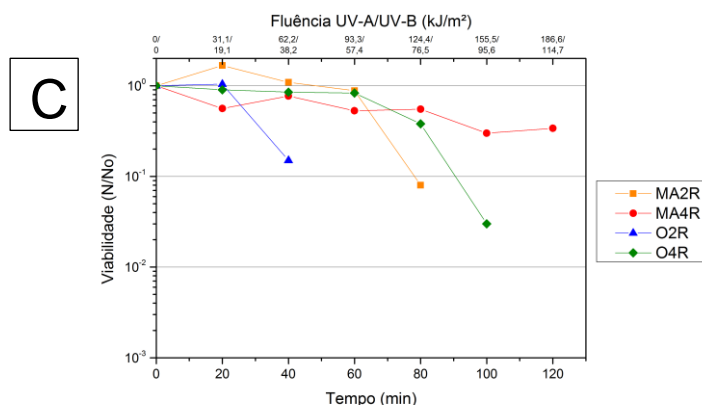
**Gráfico 1** – Taxa de sobrevivência dos isolados após exposição a UV-C e UV-B.



A partir dos resultados das triagens realizadas nos testes de sobrevivência à radiação UV-C e UV-B, foram escolhidos 4 isolados que apresentaram as maiores taxas de sobrevivência tanto à radiação, sendo eles: MA2R, MA4R, O2R e O4R. A bactéria radorresistente *Deinococcus radiodurans* foi utilizada como controle positivo de resistência para as curvas de UV-C e UV-B e foi submetida aos mesmos valores de radiação dos demais organismos. Os dados da curva de sobrevivência dos isolados à radiação UV-C, UV-B e UV ambiental, comparados à sobrevivência dos organismos quando não submetidos à radiação estão apresentados no Gráfico 2.

**Gráfico 2** – Curva de sobrevivência dos isolados após exposição a: A) UV-C; B) UV-B; C) UV ambiental.





Para o UV-C, os valores de sobrevivência das curvas foram, no geral, inferiores aos obtidos pela *D. radiodurans* ( $LD_{10} = 1 \text{ kJ/m}^2$ ). Porém, foi possível observar que a curva de sobrevivência do isolado MA2R foi semelhante à do organismo modelo dentro da faixa de valores estudada, o que demonstra que a mesma aparenta apresentar uma boa resistência à radiação UV-C. Dos quatro isolados, o que apresentou a menor resistência foi o organismo O2R, o único dos 4 que não apresenta pigmentação aparente. Para o UV-B, apesar da bactéria *D. radiodurans* ainda apresentar uma boa sobrevivência, 2 dos 4 isolados apresentaram viabilidade superior dentro da faixa de valores estudada, sendo ambos organismos pigmentados. No caso do UV ambiental, novamente o organismo não pigmentado O2R foi aquele que apresentou a menor resistência, enquanto o isolado MA4R foi o que obteve a maior sobrevivência. Nesse caso, não foi possível a realização da curva de sobrevivência para o organismo modelo, porém, de acordo com Pulschen et al., (2015), o valor máximo ao qual ele resistiu foi de 160  $\text{kJ/m}^2$  para UV-A e 116  $\text{kJ/m}^2$  para UV-B.

## CONCLUSÕES

O ambiente do qual são provenientes os organismos isolados propiciam a alta taxa de exposição à radiação solar (que possui em seu espectro radiação ultravioleta UV-A e UV-B) e à radiação de alta energia proveniente do decaimento radioativo do urânio (emissão de partículas  $\alpha$  e  $\beta$ ). Os resultados obtidos nesse trabalho demonstraram a presença de organismos com grande capacidade de resistir à presença de radiação UV. Os organismos isolados pré-selecionados pela triagem, no geral, apresentam grande resistência às radiações UV-C, UV-B e UV ambiental, alcançando valores comparáveis ao organismo modelo *D. radiodurans*, bactéria classicamente conhecida por ser altamente radioresistente. Os três isolados mais resistentes às doses de radiação UV apresentaram pigmentação com colorações tipicamente associadas à presença de carotenoides, indicando assim um aparente papel na proteção dos organismos. Assim, a alta resistência ao UV observada para alguns isolados mostrou que eles representam modelos interessantes para sobrevivência em ambientes extraterrestres. Além disso, observou-se que ambientes naturais com urânio apresentam potencial para pesquisas dentro do contexto da astrobiologia.

## REFERÊNCIAS

ATENCIO, D.; Furcalita e outros minerais uraníferos secundários de Perus, São Paulo. Tese (Doutorado Mineralogia e Petrologia) - Instituto de Geociências, Universidade de São Paulo, 1991.

GALANTE, D.; SILVA, E.; RODRIGUES, F.; HORVATH, J.; AVELLAR, M.; Astrobiologia: Uma ciência emergente. Tikinet, 2016.

MADIGAN, M.; MARRS, B.; Extremophiles. Scientific American, v. 276, n. 4, p.82-87, Scientific American, abr. 1997.

MONDANI, L.; BENZERARA, K.; CARRIÈRE, M.; CHRISTEN, R.; PAJANY, Y. M.; FÉVRIER, L.; MARMIER, N.; ACHOUAK, W.; NARDOUX, P.; BERTHOMIEU, C.; CHAPON, V.; Influence of Uranium on Bacterial Communities: A Comparison of Natural Uranium-Rich Soils with Controls. Plos One, v. 6, n. 10, p.1-10, Public Library of Science (PLoS), 5 out. 2011.

PULSCHEN, A. A.; RODRIGUES, F.; DUARTE, R. T. D.; ARAÚJO, G. G.; SANTIAGO, I. F.; PAULINO-LIMA, I. G.; ROSA, C. A.; KATO, M. J.; PELLIZARI, V. H.; GALANTE, D.; UV-resistant yeasts isolated from a high-altitude volcanic area on the Atacama Desert as eukaryotic models for astrobiology. Microbiology Open, v. 4, n. 4, p.574-588, Wiley-Blackwell, 4 jul. 2015.

TIAN, B.; SUN, Z.; SHEN, S.; WANG, H.; JIAO, J.; WANG, L.; HU, Y.; HUA, Y.; Effects of carotenoids from *Deinococcus radiodurans* on protein oxidation. Letters in Applied Microbiology, v. 49, p. 689-694, 2009.