

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA PARA A SUSTENTABILIDADE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DOS MATERIAIS

Thaís de Agrella Janolla

**CARACTERIZAÇÃO DE BIOMINERAIS A PARTIR DAS INTERAÇÕES ENTRE
VIVIANITA E *Acidithiobacillus ferrooxidans*, SOB DIFERENTES SUBSTRATOS
SEDIMENTARES, COMO POTENCIAL PARA BIOASSINATURAS EM
CONDIÇÕES MARCIANAS PRETÉRITA**

Sorocaba
Setembro de 2023

Thaís de Agrella Janolla

**CARACTERIZAÇÃO DE BIOMINERAIS A PARTIR DAS INTERAÇÕES ENTRE
VIVIANITA E *Acidithiobacillus ferrooxidans*, SOB DIFERENTES SUBSTRATOS
SEDIMENTARES, COMO POTENCIAL PARA BIOASSINATURAS EM
CONDIÇÕES MARCIANAS PRETÉRITAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Ciência dos Materiais para obtenção do título de
Mestre em Ciência dos Materiais.

Orientação: Prof. Dr. Airton N. Coelho Dias

Co-orientação: Profa. Dra. Mírian Liza A. F. Pacheco

Financiamento: CAPES (Coordenação de
Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior)
(33002010191P0-DO)

Sorocaba

Setembro de 2023

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

I authorize the reproduction and total or partial disclosure of this work, via any conventional or electronic medium, for aims of study and research, with the condition that the source is cited.

Janolla, Thaís

caracterização de biominerais a partir das interações entre Vivianita e Acidithiobacillus ferrooxidans, sob diferentes substratos sedimentares, como potencial para bioassinaturas em condições marcianas pretérita / Thaís Janolla -- 2023.
232f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de São Carlos, campus Sorocaba, Sorocaba

Orientador (a): Airtton Natanael Coelho Dias

Banca Examinadora: Gabriel Ladeira Osés, Gabriel Gonçalves Silva

Bibliografia

1. Astrobiologia. 2. Biominerais . 3. Espectroscopia micro-Raman . I. Janolla, Thaís. II. Título.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências e Tecnologias Para a Sustentabilidade
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais

Folha de Aprovação

Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Thaís de Agrella Janolla, realizada em 27/08/2023.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Ailton Natanael Coelho Dias (UFSCar)

Prof. Dr. Gabriel Ladeira Osés (USP)

Prof. Dr. Gabriel Gonçalves Silva (USP)

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais.

Thaís de Agrella Janolla

CARACTERIZAÇÃO DE BIOMINERAIS A PARTIR DAS INTERAÇÕES ENTRE
VIVIANITA E *Acidithiobacillus ferrooxidans*, SOB DIFERENTES SUBSTRATOS
SEDIMENTARES, COMO POTENCIAL PARA BIOASSINATURAS EM CONDIÇÕES
MARCIANAS PRETÉRITAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Ciência dos Materiais para obtenção
do título de Mestre em Ciência dos Materiais.
Sorocaba, 27 de setembro de 2023.

Orientador

Prof. Dr. Airton Natanael Coelho Dias
UFSCar - Universidade Federal de São Carlos

Co-orientadora

Profa. Dra. Mírian Liza Alves Forancelli Pacheco
UFSCar - Universidade Federal de São Carlos

Examinador I

Dr. Gabriel Ladeira Osés
Instituto de Física, Universidade de São Paulo, USP

Examinador II

Dr. Gabriel Gonçalves Silva
Instituto de Química, Universidade de São Paulo, USP

Examinador Suplente I

Profa. Dra. Adriana de Oliveira Delgado Silva
CCTS, Universidade Federal de São Carlos, UFSCar – campus Sorocaba

Examinador Suplente II

Dr. Douglas Galante
LNLS - Laboratório Nacional de Luz Síncrotron

AGRADECIMENTOS

Com muito apreço, expresso minha gratidão aos meus familiares, que estiveram incondicionalmente ao meu lado ao longo da minha trajetória, em especial à minha mãe, Adriane Aparecida de Agrella, pelo apoio essencial durante a graduação e a pós-graduação. Aos meus amigos, Vanessa Avila, Giovanni Miravetti, Guilherme Pegoraro, Henrique Solowej e Lucas Repecka, compartilho minha gratidão pelos momentos de lágrimas e risadas ao longo das disciplinas. E aos meus amigos do Old Lab Remake, Gabriel Baréa, Julia D'Oliveira, Gabriel Romano, Eduardo Alves e Beatriz Corazza, agradeço por ouvirem sempre meus dramas acadêmicos e amorosos, e por nunca deixarem de acreditar em mim. E aos meus melhores amigos o senhor Matheus Naracci e a senhora Dayane Valentim que hoje carregam minha sobrinha Maya.

Tenho como obrigação agradecer também a Ele, aos meus pastores da Cidade Refúgio church Eduardo Moraes e Elvis Moraes, por todo apoio e direcionamento em meus momentos de desespero e provação, e pelo acolhimento de todos os meus amigos Raynan Souza, Taylor Prado, Raquel Teixeira, Muriel Brigues, Karen Siero, Tamara e Leonardo Zacharias e a todas as outras pessoas que fazem parte desta família.

Gostaria de expressar minha sincera gratidão aos professores Douglas Galante e Fabio Rodrigues, assim como aos membros do Astrolab grupo Quimiosfera, que me acolheram durante minha permanência na USP-SP. Em especial, meu agradecimento mais profundo ao colaborador, mentor e amigo, Gabriel Silva, também conhecido como Funny, que se mostrou o maior companheiro no desenvolvimento completo do projeto, desde a preparação e delineamento das amostras até as análises de Espectroscopia micro-Raman. À professora doutora Flavia Caleffo (CNPEM), sou imensamente grata por toda a ajuda na escrita e idealização do projeto. Também, gostaria de estender meu agradecimento ao professor Fábio Yamagi e seus alunos, Diego Gracero e Vitor Lima (UFSCar Sorocaba), pelo valioso auxílio nas análises de Microscopia. Não posso deixar de agradecer ao meu colaborador Henrique Solowej (FATEC-Sorocaba) pela ajuda nas medidas de FT-IR. Por fim, expresso minha apreciação à professora doutora Marcia Rizzutto e ao seu pós-doutorando, Gabriel Osés, pela contribuição fundamental na obtenção das fluorescências de raios-X no Instituto de Física da USP.

Agradeço ao meu orientador Airton Dias, por sua paciência e confiança em meu crescimento, tanto como aluna quanto como pessoa. Seu apoio e incentivo foram essenciais para o meu desenvolvimento acadêmico e pessoal. Também desejo agradecer à minha co-

orientadora Mirian Pacheco, que diariamente demonstra o que significa ser uma mulher-pesquisadora implacável em nossa sociedade atual. Sua determinação e dedicação são verdadeiras inspirações, e sou grata por tê-la como exemplo durante essa jornada de aprendizado e pesquisa.

Gostaria de agradecer também a secretária do PPGCM, Doris Albuquerque, e ao Professor Coordenador, Junior Menezes, pela constante disponibilidade e auxílio em resolver questões burocráticas relacionadas ao programa de pós-graduação.

Além disso, sou imensamente grata pelo apoio e financiamento concedidos pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela minha bolsa de Mestrado (Processo: 88882.461700/2019-01). Também, gostaria de expressar minha gratidão à Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), em especial ao Departamento de Física, Química e Matemática (DFQM) de Sorocaba, pela oportunidade e suporte oferecidos durante minha jornada acadêmica.

“For myself, I like a universe that includes much that is unknown and, at the same time, much that is knowable. A universe in which everything is known would be static and dull, as boring as the heaven of some weak-minded theologians. A universe that is unknowable is no fit place for a thinking being. The ideal universe for us is one very much like the universe we inhabit. And I would guess that this is not really much of a coincidence.”

Carl Sagan

RESUMO

JANOLLA, Thaís de Agrella. **Caracterização de biominerais a partir das interações entre Vivianita e *Acidithiobacillus ferrooxidans*, sob diferentes substratos sedimentares, como potencial para bioassinaturas em condições marcianas pretéritas.** 2023. Dissertação de Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais – Universidade Federal de São Carlos, *campus* Sorocaba, 2023.

O conceito de “vida” ainda não foi estabelecido e, tampouco, sua origem foi esclarecida. Isso se reflete como um desafio para as áreas da ciência que se esforçam por investigar a possibilidade de vida em outros ambientes além da Terra. Assim, cada vez mais a NASA, em um esforço transdisciplinar, tem fomentado tecnologias espaciais com o objetivo de investigar lugares propícios ao estabelecimento da vida em Marte e identificar suas bioassinaturas. Desta forma, o estudo e a caracterização de biominerais e quimiofósseis em nosso planeta se revestem de importância, inteiramente os processos fundamentais que levam à síntese de minerais na presença de microrganismos. Isso fornecerá uma base de conhecimento que viabilizará comparações com rochas e sedimentos de Marte. As abordagens experimentais *in vitro* tornam-se importantes pela possibilidade do estudo detalhado desses processos em ambientes controlados. Assim foi estudada a oxidação da Vivianita, fosfato de ferro comum na Terra e potencialmente presente em Marte, pela bactéria *Acidithiobacillus ferrooxidans* para a sua obtenção de energia, com o objetivo de caracterizar os precipitados formados quando da presença de diferentes substratos. Essa contribuição apresenta os resultados obtidos por análises de espectroscopia micro-Raman, FT-IR e MEV-EDS. Esperamos contribuir para o entendimento da formação de bioassinaturas sob a influência de diferentes substratos, podendo ser aplicado para ambientes terrestres e marcianos.

Palavras-chave: Marte, astrobiologia, paleometria, microrganismos extremófilos micro-Raman, MEV/EDS

ABSTRACT

JANOLLA, Thaís de Agrella. **Characterization of biominerals from relaxants between Vivianita and *Acidithiobacillus ferrooxidans*, under different sedimentary substrates, as potential for biosignatures in past martian conditions.** 2023. Master's Dissertation in the Graduate Program in Materials Science – Federal University of São Carlos, *campus* Sorocaba, 2023.

The concept of “life” has not yet been established, nor has its origin been clarified. This represents a challenge for the areas of science that strive to investigate the possibility of life in environments other than Earth. Thus, NASA, in a transdisciplinary effort, has increasingly promoted space technologies with the aim of investigating places suitable for the establishment of life on Mars and identifying their biosignatures. Therefore, studying and characterizing biominerals and chemiofossils on our planet is extremely important, considering the fundamental processes that lead to the synthesis of minerals in the presence of microorganisms. This will provide a knowledge base that will enable comparisons with rocks and sediments from Mars. *In vitro* experimental approaches become important due to the possibility of a detailed study of these processes in controlled environments. Thus, the oxidation of Vivianite, iron phosphate common on Earth and potentially present on Mars, by the bacteria *Acidithiobacillus ferrooxidans* was studied to obtain energy, with the aim of characterizing the precipitates formed when different substrates are present. To this end, characterization techniques such as micro-Raman FT-IR and SEM-EDS were applied. Therefore, we contributed to the understanding of the formation of biosignatures and the influence of substrates, and can be applied to terrestrial and Martian environments.

Keywords: Mars, astrobiology, paleometry, extremophile microorganisms, micro-Raman, SEM/EDS.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Escala de tempo geológico de Marte Modificada de Carr & Head	18
Figura 2. Mapa topográfico global de Marte	20
Figura 3. Diagrama de identificação de variáveis do experimento	27
Figura 4a e b. Curva de calibração obtida para o Fe^{3+} e Fe^{2+}	28
Figura 5. Representação visual concentração de Fe^{3+} e Fe^{2+}	33
Figura 6. Espectros com a Montmorilonita (M)	39
Figura 7. Espectros com a Mistura Areia + Montmorilonita (A+M)	40
Figura 8. Espectros obtidos da condição dinâmica	41
Figura 9. Espectros obtidos da condição estática	42
Figura 10. Imagem MEV (Dinâmica) B-V-A pt.4	44
Figura 11. Imagem MEV (Dinâmica) B-V-M+A pt.4	45
Figura 12. Imagem MEV (Dinâmica) B-V-M+A pt.5	46
Figura 13. Imagem MEV (Estático) B-V-A pt.5	47
Figura 14. Espectros FT-IR correspondentes a condição Dinâmica.	48
Figura 15. Espectros FT-IR correspondentes a condição Estática.	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Cronograma programático de coletas para UV-Vis e pH	28
Tabela 2. Resultados das análises de pH para a condição dinâmica e estática	30
Tabela 3. Tabela com os valores para a curva de calibração do Fe ²⁺ e Fe ³⁺	31
Tabela 4. Dados espectroscopia micro-Raman (Condição Dinâmica)	35
Tabela 5. Dados espectroscopia micro-Raman (Condição Estática)	37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
PPGCM	Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais
DFQM	Departamento de Física, Química e Matemática
LNLS	Laboratório Nacional de Luz Síncrotron
UFSCar	Universidade Federal de São Carlos
USP	Universidade de São Paulo
CNPEM	Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais
LaPTec	Laboratório de Plasmas Tecnológicos
FATEC	Faculdade de Tecnologia do Estado de São Paulo
NASA	<i>National Aeronautics and Space Administration</i>
FT-IR	Fourier-transform infrared spectroscopy
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
EDS	Espectroscopia por Energia Dispersiva
XRF	Fluorescência de Raios-X
UV-Vis	Espectroscopia de absorção na região do UV-Vis
pH	Potencial Hidrogeniônico
Mini-TES	Miniature Emission Spectrometer
ESA	Agência Espacial Europeia
EPS	Substância Polimérica Extracelular
RPM	Rotação por Minuto
NAP	Núcleo de Pesquisa em Astrobiologia
IQ	Instituto de Química
CCD	<i>Charge-Coupled Device</i>
PCA	Análise de Componentes Principais
MANOVA	Análise de Variância Multivariada
IR	<i>Relative Intensity</i>
FWHM	<i>Full Width at Half Amplitude</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	17
1.1 <i>Contexto marciano</i>	17
1.2 <i>Bioassinaturas</i>	21
1.3 <i>Acidithiobacillus ferrooxidans e a precipitação mineral</i>	23
2. OBJETIVOS	25
3. MATERIAIS E MÉTODOS	26
3.1 <i>Delineamento experimental</i>	26
3.2 <i>Métodos de caracterização</i>	28
3.2.1 <i>Análises químicas e mineralógicas</i>	28
3.2.2 <i>Espectroscopia micro-Raman</i>	29
3.2.3 <i>MEV-EDS</i>	30
3.2.4 <i>Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier FT-IR</i>	32
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
4.1 <i>Análises químicas e mineralógicas</i>	33
4.1.1 <i>pH</i>	33
4.1.2 <i>UV-VIS</i>	34
4.2 <i>Espectroscopia micro-Raman</i>	36
4.3 <i>MEV-EDS</i>	44
4.4 <i>FT-IR</i>	448
5. CONCLUSÕES	49
6. REFERÊNCIAS	52

ANEXOS

Anexo 1. Procedimento de Produção de meio de cultura para Acidithiobacillus ferrooxidans.

Erro! Indicador não definido.

Erro! Indicador não definido.

Anexo 2. Procedimento de análise de Ferro (II) – Fe²⁺

Erro! Indicador não definido.

Anexo 3. Procedimento de análise de Ferro (III) – Fe³⁺

Erro! Indicador não definido.

- Anexo 4. Dados obtidos através do UV-VIS para os sistemas dinâmico e estático***Erro! Indicador não d**
- Anexo 5 - Dados correspondentes as Condição Dinâmica* **Erro! Indicador não definido.**
- Anexo 6 - Dados correspondentes as Condição Estática* **Erro! Indicador não definido.**
- Anexo 7 – Tabela de assinaturas de moléculas para a espectroscopia de micro-Raman***Erro! Indicador**
- Anexo 8 - Imagens do MEV correspondentes as Condição Dinâmica***Erro! Indicador não definido.**
- Anexo 9 - Imagens do MEV correspondentes as Condição Estática***Erro! Indicador não definido.**
- Anexo 10 - Dados do EDS correspondentes as Condição Dinâmica***Erro! Indicador não definido.**
- Anexo 11 - Dados do EDS correspondentes as Condição estática***Erro! Indicador não definido.**
- Anexo 12 - Mapas do EDS correspondentes as variáveis da Condição Dinâmica***Erro! Indicador não de**
- Anexo 13 - Mapas do EDS correspondentes as variáveis da Condição Estática***Erro! Indicador não defj**

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

1.1 Contexto marciano

Marte é um dos corpos do Sistema Solar de maior interesse para a astrobiologia, pois pode ter apresentado clima e condições parecidas às da Terra Arqueana - justamente o momento em que ocorria a irradiação e a diversificação das primeiras formas de vida no planeta Terra. No entanto, muitos detalhes sobre a geologia e fisiografia de Marte (atual e pretérita) ainda permanecem desconhecidas. Na década de 1970, descobriu-se que a superfície marciana era coberta por um manto de intemperismo, ou seja, um material não consolidado compondo o regolito (ou “solo”) do planeta, embasado por rochas basálticas (RONCA, 1970). Mais recentemente, com a exploração da superfície marciana pelas sondas *Spirit* e *Opportunity*, informações mais detalhadas sobre a geologia de Marte foram disponibilizadas.

De acordo com dados obtidos da exploração por essas sondas, pode se verificar que o regolito marciano é rico em elementos como ferro (Fe), magnésio (Mg), enxofre (S) e titânio (Ti) (que compõem importantes ciclos biogeoquímicos terrestres), além de outros elementos, como sódio (Na) e potássio (K) (NASCIMENTO-DIAS *et al.*, 2022). Resultados mineralógicos mais detalhados obtidos com o *Miniature Emission Spectrometer* (Mini-TES) no *Opportunity* permitiram a identificação de minerais de interesse para o estudo da possibilidade de vida pretérita no planeta. Por exemplo, foram identificadas áreas com presença de minerais ricos em sulfato, como a Jarosita, a análise dos dados coletados por sondas e rovers em Marte, como o rover *Curiosity*, revelou a presença de jarosita em várias regiões do planeta como em áreas como na cratera Jezero com aproximadamente 750 m de profundidade (CHRISTENSEN *et al.*, 2004; KLINGELHÖFER *et al.*, 2004).

Além disso, a presença de ambientes ácidos indicam implicações para a habitabilidade passada de Marte, uma vez que certos microorganismos na Terra são capazes de sobreviver em ambientes ácidos, o que levanta questões sobre a possibilidade de no passado do planeta.

A identificação da jarosita e a compreensão de sua formação em Marte são exemplos de como a investigação mineralógica e química das rochas e do solo marciano pode nos ajudar a reconstruir a história do planeta e a entender melhor as condições que prevaleceram em sua superfície ao longo do tempo. Essas descobertas continuam a desempenhar um papel importante no estudo da geologia e da astrobiologia de Marte. (HYNEK *et al.*, 2019)

Enquanto isso, áreas com altas concentrações de carbonatos ricos em Mg e Fe como Magnesita e Siderita foram detectadas pela sonda *Spirit*, o que pode significar a ocorrência pretérita de um sistema aquoso alcalino favorável à deposição dos minerais carbonáticos (MORRIS *et al.*, 2010).

Além disso, foram observadas regiões específicas enriquecidas com outros elementos de grande importância para a vida (ao menos a vida como compreendida no ambiente terrestre), ele desempenha um papel fundamental em vários processos biológicos como (1) ser um componente crucial das moléculas de energia como o ATP (adenosina trifosfato) e o GTP (guanossina trifosfato) (2) é um componente fundamental dos ácidos nucleicos, como o DNA (ácido desoxirribonucleico) e o RNA (ácido ribonucleico) (BERG *et al.*, 2002); (3) Os fosfolípidios são os principais constituintes das membranas celulares; muitas enzimas, que são proteínas que catalisam reações químicas no corpo, requerem a presença de íons de fósforo (fosfatos) para funcionar adequadamente; (4) e também são autores da fosforilação que é uma modificação pós-traducional comum em proteínas, onde grupos fosfato são adicionados a proteínas para regular sua atividade. (NELSON & Cox 2000).

O fósforo (P), foi detectado em concentrações de até 2,4% (massa/massa). Esse P pode estar presente nesses ambientes na forma de diferentes minerais, como fosfatos ricos em Mg e Fe, que ainda não podem ser identificados pelas técnicas analíticas empregadas na exploração científica do planeta até agora (DYAR *et al.*, 2014).

Atualmente, as expectativas para o aprofundamento do conhecimento sobre a estrutura física da crosta, manto e núcleo marcianos aumentaram significativamente com o sucesso do pouso da Missão *InSight* (*Interior Exploration using Seismic Investigations, Geodesy and Heat Transport*), que tem enviado para a Terra dados sísmicos e de fluxo de energia térmica do planeta. Outra missão importante é a *Mars 2020*, que enviou o *rover Perseverance* que pousou em Marte em fevereiro de 2021 com propósito de buscar por sinais de vida fóssil e coletar amostras de rocha e solo para serem retornadas a Terra em missões futuras.

Acredita-se que a crosta de Marte foi formada especialmente durante o período Amazoniano (**Figura 1**). Esse período é cronologicamente correlato com o Éon Proterozoico na Terra (ca. 2,5 Ga - 541Ma), no qual a vida microbiana se diversificou e tornou-se abundante (CARR *et al.*, 2010). A presença de água no estado líquido durante este período em Marte é especialmente importante, para a correlação com a Terra do Proterozoico, principalmente considerando as possibilidades de vida pretérita marciana. Porém, esta é uma questão que ainda se encontra aberta, sendo que deverá ser acessada não só pelas missões supracitadas, mas também por outras em fase de desenvolvimento como a *Exomars* da

Agência Espacial Europeia (ESA), com a sonda Rosalind Franklin (SALESE *et al.*, 2016; STEIN *et al.*, 2018; OROSEI *et al.*, 2018).

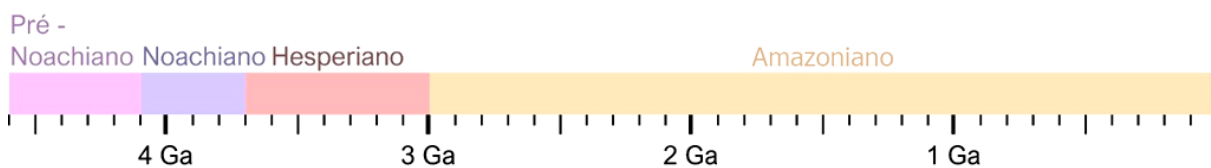


Figura 1. Escala de tempo geológico de Marte Modificada de Carr & Head (2010)

Na Terra, alguns argilominerais, importantes para a produção de bioassinaturas e a fossilização excepcional de organismos (CUADROS, 2017; GOMES *et al.*, 2019) se formam a partir de intemperismo próximo à superfície para produzir sedimentos em sistemas hidrotérmicos localizados, principalmente, em centros de disseminação do fundo do mar, ou mais raramente por precipitação direta em bacias lacustres (EBERL & BARRER, 1984). Os argilominerais são então erodidos, transportados, enterrados e metamorfoseados¹ em processos impulsionados pelo clima e tectônica. As mudanças químicas que acompanham a influência da formação dos argilominerais durante os ciclos geoquímicos globais (MERRIMAN, 2005; KUMP *et al.*, 2000) e os tipos e distribuições destes minerais e seus contextos estratigráficos registram e permitem a reconstrução de histórias ambientais em escalas globais e regionais. Há uma tendência a restrição dos argilominerais em terrenos mais antigos de Marte, é na região conhecida como a Planície do Norte, que abriga algumas das características geológicas mais antigas do planeta. Essa área remonta ao período chamado de Noachiano, que ocorreu entre cerca de 4,1 e 3,7 bilhões de anos atrás, neste período a superfície era rica em água em estado líquido, com o pH de quase neutro indicado pelas estimativas do pH do solo. Estas informações são baseadas principalmente em modelos e simulações, bem como em análises de minerais e dados de missões espaciais que detectaram minerais que podem estar associados a condições ácidas ou alcalinas. Por outro lado, os terrenos mais jovens demonstram traços característicos de transição de um período, com uma significativa mudança composicional, apresentando uma predominância de sulfatos. Indicando que a superfície se tornou um ambiente árido com águas superficiais salinas e ácidas (BIBRING, 2006; CHEVRIER & BIBRING, 2007).

¹ O metamorfismo é um processo geológico que envolve a transformação de rochas pré-existentes (geralmente rochas sedimentares ou ígneas) em novas rochas, devido a mudanças na pressão, temperatura e/ou na composição química.

A presença de argilominerais em Marte já foi confirmada em diferentes locais por meio de mapeamentos por missões de orbitadores e por análises *in loco*, como a identificação de unidades ricas em argilominerais na cratera Gale pelo *rover Curiosity* (BENNETTI *et al.*, 2019). Enquanto isso, na região nordeste do *Syrtis Major Planum*, são observadas crateras como a Antoniadi e Toro que apresentam grandes depósitos eólicos de sílica (ricos em quartzo ou opala) assemelhando-se a areia. Indicando a presença de meio aquoso alcalino com potencial para preservação de bioassinaturas. Essa sílica está associada com outros sedimentos e minerais alterados (filossilicatos) datando do Noachiano tardio (SMITH & BANDFIELD, 2012).

Existem diversos locais de interesse pontual para a investigação de bioassinaturas em Marte como a região de *Nili Fossae* e o paleolago formado pela cratera de impacto Jezero com ~45 km de diâmetro (**Figura 2**), ambos entre o *Syrtis Major Planum* e a *Isidis Planitia*. A cratera de Jezero classificada como hidrologicamente aberta, foi alimentada por dois vales de entrada ao norte e oeste, e drenada por um vale de saída ao leste (FASSETT & HEAD, 2005). A análise dos vales indica que o sistema deixou de ter atividade fluvial durante o Noachiano-Hesperiano (4600-3000Ma), semelhante a outros sistemas de rede de grandes vales em Marte (FASSETT & HEAD, 2008; HOKE & HYNEK, 2009). Ainda, a cratera de Jezero contém dois depósitos de delta fluvio-lacustres bem expostos (EHLMANN *et al.*, 2008a; FASSETT & HEAD, 2005; GOUDGE *et al.*, 2017, 2015; SCHON *et al.*, 2012), bem como grandes depósitos de minerais carbonáticos (EHLMANN *et al.*, 2008a, 2008b, 2009; GOUDGE *et al.*, 2017, 2015). A exploração *in situ* desta região pode fornecer novas informações importantes sobre o registro sedimentar fluvial e a história de alteração aquosa do início de Marte. Esses afloramentos contribuíram para a seleção da cratera Jezero como local de pouso do *rover Mars 2020* (WILLIFORD, 2018).

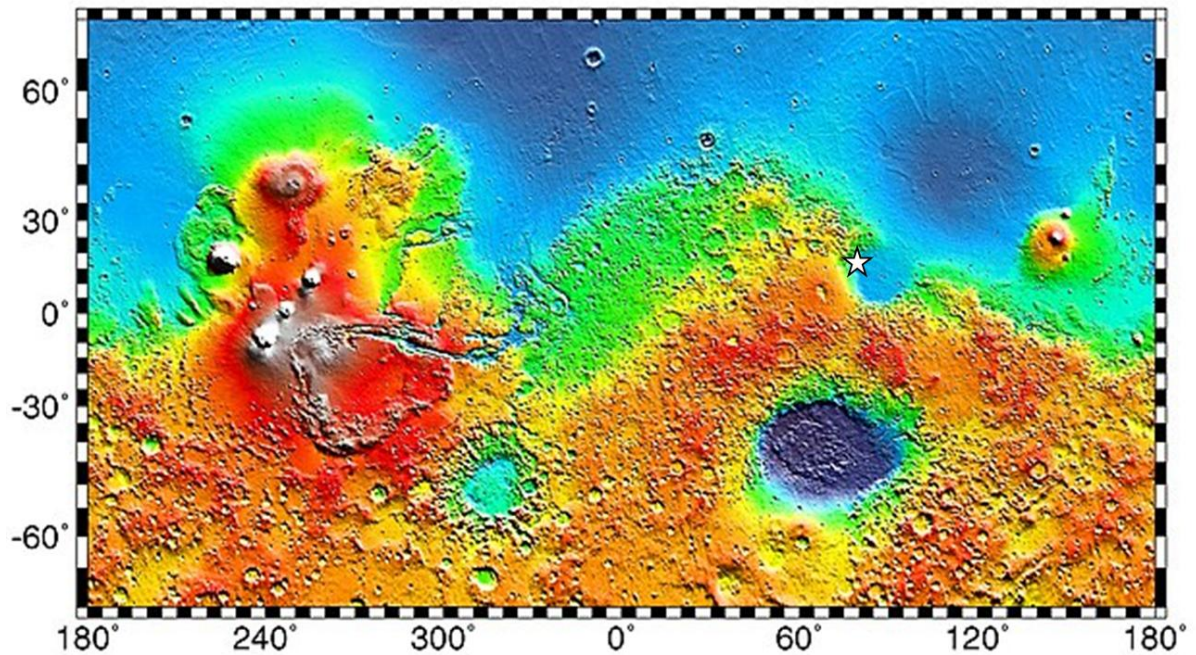


Figura 2. Mapa topográfico global de Marte. A coloração do mapa base indica as elevações relativas, com base nos dados do equipamento *Mars Orbiter Laser Altimeter* do orbitador *Mars Global Surveyor* da NASA. Brancos e marrons indicam as maiores elevações (+12 a +8 km); seguido por rosas e vermelhos (+8 a +3 km); amarelo é 0 km; verdes e azuis são elevações mais baixas (até -8 km). Os eixos são a latitude e a longitude marciana; a localização da cratera Jezero é identificada com uma estrela de cor branca. **Fonte:** planetary.org

1.2 Bioassinaturas

As bioassinaturas são quaisquer sinais, objetos, substâncias ou padrões gerados por meio de atividade biológica (MARAIS *et al.* 2002). As bioassinaturas incluem, entre outras coisas: (1) características morfológicas, como células preservadas ou componentes extracelulares, como substância polimérica extracelular (EPS) fossilizado ou não; (2) minerais biogênicos, como os produzidos por mineralização biologicamente induzida (dolomita biogênica precipitada em microbialitos e tapetes microbianos) ou biologicamente controlada (endosqueletos e partes mineralizadas duras de metazoários), que podem apresentar características cristalográficas ou propriedades físicas que podem ser distinguidas dos minerais abióticos (como magnetitas produzidas dentro das células de bactérias magnetotáticas - magnetossomas); (3) texturas específicas ou tecidos biogênicos em rochas originadas por atividade microbiana, como texturas fenestrais em microbialitos; (4) vestígios moleculares ligados à atividade biológica, como ligantes orgânicos de membrana celular bacteriana, lipídios, macromoléculas orgânicas, etc.; (5) características químicas específicas do bioprocessamento, como quiralidade em moléculas orgânicas; (6) isótopos estáveis favoráveis aos padrões biogênicos e ao bioprocessamento, e a (7) o desenvolvimento tecnológico.

Apesar de todas as possibilidades acima citadas, bioassinaturas (ou sinais delas) nem sempre são fáceis de serem identificados, especialmente se essas amostras são de contexto de tempo profundo e na escala de Javaux, ela é uma escala geocronológica sugerida para a utilização na datação e categorização das primeiras evidências de vida na Terra com base na presença de microfósseis. (JAVAUX, 2019; CALLEFO *et al.*, 2019). A Escala de Javaux categoriza os microfósseis em três faixas temporais principais: (1) Eoarqueano (4,0 a 3,6 bilhões de anos atrás), esta é a faixa mais antiga da escala e é associada ao período em que a Terra estava esfriando após sua formação. Os microfósseis encontrados nesta faixa são considerados os mais antigos conhecidos e são altamente controversos. Eles incluem estruturas como filamentos e grânulos que foram interpretados como potenciais vestígios de vida, mas também podem ser explicados por processos geológicos não biológicos; (2) Paleoarqueano (3,6 a 3,2 bilhões de anos atrás), esta faixa é associada a evidências mais robustas de microfósseis, incluindo estruturas filamentosas e esféricas que são interpretadas como os restos de organismos microbianos. No entanto, ainda há algum debate sobre a origem biológica versus a origem abiótica de alguns desses microfósseis; e (3) Mesoarqueano (3,2 a 2,8 bilhões de anos atrás), esta faixa abrange uma variedade de microfósseis que são considerados mais bem preservados e mais consistentemente associados à atividade biológica. É importante observar que a interpretação de microfósseis e evidências de vida nas rochas antigas é um campo altamente complexo e sujeito a debate. A natureza microscópica e a preservação precária dessas estruturas tornam a identificação de evidências de vida extremamente desafiadora. (JAVAUS, 2017).

Uma boa estratégia para se avaliar a presença de vida em Marte é buscar por bioassinaturas químicas que possam ter resistido aos efeitos do tempo, intemperismo de diversas naturezas e as condições extremas do planeta desde o Amazoniano. Diante disso, os biominerais merecem especial atenção por consistirem bioassinaturas mais resistentes do que moléculas orgânicas ou bioassinaturas morfológicas (microfósseis bacterianos, por exemplo) (JIMENEZ-LOPEZ, 2010; CALLEFO *et al.*, 2019). Assim como o termo “bioassinatura”, a definição de “biomineral” é ampla, mas em geral, é usada para descrever minerais que foram produzidos por organismos vivos (WEINER & DOVE 2003; SKINNER & JAHREN, 2003).

Os biominerais possuem algumas propriedades específicas que os diferencia dos minerais produzidos inorganicamente. Essas diferenças resultam em parâmetros e podem ser utilizados como critérios de comparação, tais como: forma, cristalinidade, tamanho, composição de elementos traços e de isótopos (WEINER & DOVE 2003).

Diante disso, estudos que visam investigar contextos de síntese e preservação, além de formas combinadas de detecção de biominerais revestem-se de importância. Esses estudos devem incluir abordagens experimentais capazes de gerar dados imprescindíveis para estudos comparativos com o registro geológico da Terra e os contextos sedimentares de outros mundos habitáveis.

1.3 Acidithiobacillus ferrooxidans e a precipitação mineral em diferentes sedimentos

A *Acidithiobacillus ferrooxidans* é uma bactéria gram-negativa acidofílica (crescendo de maneira ótima em pH 1,8 a 2,0 na presença de H₂SO₄), mesófila (preferindo temperatura ótima em torno de 30°C) e quimiolitotrófica, ou seja, obtém energia por meio da oxidação de espécies inorgânicas enquanto é capaz de fixar o CO₂ do ar para a produção de biomassa. Devido ao seu metabolismo, esta bactéria desempenha um papel importante na ciclagem biogeoquímica dos metais, sendo capaz de obter energia por meio de diferentes pares de espécies inorgânicas doadoras eceptoras de elétrons. Dentre esses pares, se destacam a oxidação de espécies de S ou Fe na presença de oxigênio (O₂). No caso da oxidação de grandes quantidades do íon Fe²⁺ a Fe³⁺, reação de baixo ganho energético para o organismo, pode ocorrer a precipitação de minerais capazes de mobilizar outros metais do meio ambiente. Primeiramente há a formação de Schwertmannita (Fe³⁺₈O₈(OH)_{8-2x}(SO₄)_x•nH₂O, x - 0,5 a 2 e n - 13 a 17), mineral metaestável de baixa cristalinidade e muitas vezes com hábito de ouriço que, em pouco tempo, é substituído por Jarosita (KFe³⁺₃(SO₄)₂(OH)₆), mineral com alta cristalinidade.

Ambos os minerais apresentam poucos micrômetros de diâmetro. Esses minerais, que podem se formar tanto de maneira abiótica ou biótica em diferentes ambientes terrestres, também podem levar à remoção de íons metálicos da solução por meio de substituição de íons, adsorção ou coprecipitação (SILVA *et al.* 2018).

A versatilidade desse organismo é explorada em processos de biolixiviação² e biomineração para a extração de metais de interesse de minérios ricos em sulfetos. Diversas rochas e minerais também podem apresentar a biodisponibilidade de Fe²⁺ em solução quando em condições ácidas ótimas do microrganismo. Além do uso do organismo para a solubilização de minerais de interesse econômico, como a Calcopirita para a exploração em minas de cobre, outros minerais têm sido ofertados para o crescimento do *A. ferrooxidans*.

² Biolixiviação é um processo biotecnológico utilizado na indústria de mineração e metalurgia para extrair metais valiosos de minérios, concentrados ou resíduos minerais utilizando microorganismos, principalmente bactérias, como agentes de lixiviação

São exemplos, experimentos em que foram ofertados minerais como a Siderita ($\text{Fe}^{2+}\text{CO}_3$) e a Vivianita ($\text{Fe}^{2+}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$) (SILVA *et al.*, 2020, VICENZI *et al.*, 2019), minerais considerados comuns na Terra. Em ambos os casos, foi demonstrada a capacidade do organismo de consumir o Fe^{2+} que se solubilizou, de forma que as células puderam realizar sua oxidação para manter seu metabolismo e crescimento.

Além disso, já foi demonstrada a capacidade de crescimento do *A. ferrooxidans* em simulados simples de solo marciano (BAUERMEISTER *et al.*, 2014) e simulados de meteoritos (GRONSTAL *et al.* 2009), foram produzidas culturas de *A. ferrooxidans* em meteoritos metálicos e condritos carbonáceos reais mostrando que o organismo foi capaz de oxidar o ferro meteorítico, o que fica evidenciado pelo aumento da concentração celular. Durante o experimento usando o meteorito metálico sem agitação, foi observado o processo de oxidação e formação de precipitado primeiramente sobre a amostra e posteriormente, deposição do mineral no fundo e paredes do frasco de cultura. Quando a isotopia do ferro ($^{57}\text{Fe}/^{54}\text{Fe}$) foi avaliada nos precipitados formados sobre o meteorito e nas paredes dos frascos nos experimentos abióticos e bióticos, foram observados dois comportamentos distintos: enquanto no experimento abiótico ambas amostras de precipitado mostraram iguais proporções isotópicas, no experimento biótico houve um fracionamento representado pelo enriquecimento de isótopos pesados no precipitado junto ao meteorito (associado à ação direta do organismo) e enriquecimentos de isótopos mais leves na fração precipitada longe do meteorito nas paredes dos frascos (associados à uma oxidação predominantemente abiótica). Isso foi interpretado como um indicativo que a ação biológica causou uma mudança na relação de isótopos do mineral formado, demonstrando que biogenicidade desses minerais pode ser acessada através da isotopia e que eles podem servir como bioassinaturas. (SILVA *et al.*, 2018).

Uma questão ainda pouco explorada em detalhes é o efeito dos argilominerais e areia na preservação e detecção de bioassinaturas. Alguns estudos constatam que em ambientes argilosos, bactérias termoacidofílicas, prosperam, como em canais de efluente de Cyanidium Creek (BROCK, 1978). Análises microscópicas desses sedimentos revelaram células bacterianas em vários estágios de mineralização. O papel das bactérias como elementos de seletividade para argilominerais ricos em Fe é atribuído a sua capacidade de interação com íons metálicos (FERRIS, 1987) e pela diagênese inicial de sedimentos (BROUWER *et al.*, 2011; DECHO 2000; GOLUBIC *et al.*, 2000).

Sendo assim, sedimentos como areia e argilominerais se tornam excelentes candidatos para experimentos envolvendo *A. ferrooxidans* são, já que possuem históricos de resultados promissores.

Em escalas micro e ultraestruturais, o uso combinado de algumas técnicas, como as espectroscópicas e espectrométricas, têm permitido não apenas a detecção de bioassinaturas, mas também o refinamento dos critérios de biogenicidade (e.g. SCHOPF *et al.*, 2005; 2012). Por esta razão, a Paleometria tem constante preocupação com aperfeiçoamentos, desenvolvimentos, estudos comparativos e propostas de métodos cada vez mais eficazes e eficientes voltados à investigação de seus objetos de estudo. Neste contexto, se insere a necessidade de um maior conhecimento das espécies de bioassinaturas que poderiam ter surgido em condições frequentes de ambientes terrestres e, caso a vida tenha se desenvolvido, em ambientes marcianos. Apesar das limitações impostas pelos poucos dados obtidos em ambientes passados e até mesmo presentes, a complexidade da simulação de ambientes e ecossistemas naturais em laboratório, e as extrapolações que precisamos fazer devido ao fato da vida terrestre ser a única que conhecemos, urge a necessidade da realização de experimentos que possam se aproximar dessas condições, para que seja possível obter uma melhor interpretação dos dados obtidos, principalmente no que tange a exploração marciana.

Diante do exposto acima, uma abordagem multitécnica faz-se necessária para a detecção das bioassinaturas preservadas. As técnicas utilizadas para análise de um possível padrão de biogenicidade foram: espectroscopia micro-Raman, Microscopia eletrônica de varredura com Espectroscopia de Dispersão de Energia (MEV/EDS). Ainda, análises de Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR), pH, UV-Vis e Fluorescência de Raio-X foram aplicadas de forma complementar. Esta última análise ainda está sendo tabulada e portanto, não está inserida nesta dissertação. Dos demais, os resultados e discussões destas análises são apresentação das próximas seções.

2. OBJETIVOS

Esse projeto teve o objetivo de investigar o uso da Vivianita como fonte de Fe^{2+} para a produção de energia no crescimento do microorganismo *Acidithiobacillus ferrooxidans*, durante suas interações com diferentes substratos como a montmorilonita (argilomineral) e a areia, na conseqüente formação de biominerais a partir do íon de Fe^{3+} produzido por ação de oxidação da bactéria.

O projeto foi realizada a partir da identificação e caracterização dos biominerais precipitados que pelo microrganismo, observando que os mesmos poderiam ser indicativos de potenciais bioassinaturas para investigação de vida em Marte.

Como um direcionamento e objetivos específicos, tivemos:

- Acompanhamento de crescimento do organismo *A. ferrooxidans* na presença de diferentes sedimentos, usando o mineral Vivianita como fonte de Fe^{2+} , em cultivos dinâmicos e estáticos;
- Verificação da eficácia e da complementariedade de técnicas espectroscópicas na análise do substrato, para a identificação de eventual ocorrência dos precipitados minerais, para observar as mudanças causadas por diferentes condições, substratos e a presença ou não do *A. ferrooxidans*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Delineamento experimental

Foram testados, de forma exploratória dois delineamentos: um estático e outro dinâmico. Ambos foram exequíveis, portanto, optou-se por se seguir com as análises de caracterização com ambas as condições. Essas condições foram propostas considerando avaliar a diferença de ambientes mais agitados (ou seja, mais parecidos com sistemas fluviais, por exemplo) e mais calmos (mais semelhantes a sistemas parados como os lacustres), representadas pelo uso de dois frascos de cultura diferentes para os experimentos.

Esse sistema permitiu observar possíveis diferenças entre os bioprecipitados quando produzidos em contato direto com o sedimento e em suspensão com movimentação do líquido. Desta forma foram escolhidos os seguintes recipientes: (1) condição estática: placas de Petri sem agitação, que permitem a formação de uma condição que representa de maneira mais fidedigna um ambiente natural de sedimentação, possuindo uma área superficial grande e profundidade pequena, de forma com que o experimento seja regido por processos difusionais caracteristicamente mais lentos; (2) condição dinâmica: frascos Erlenmeyer, que tem sua área superficial reduzida e sua profundidade maior, representando um ambiente fluvial mais homogêneo devido à agitação e aos processos turbulentos. As especificações dos recipientes foram: Erlenmeyer de 50 ml e Placa de Petri de 25 ml e 90 mm de diâmetro.

Todos os recipientes continham 20 mL de meio de cultura T&K modificado sem Fe solúvel esterilizado contendo: $Mg(SO_4) \cdot 7H_2O$ (0,4g/L), K_2HPO_4 (0,4g/L), $(NH_4)_2(SO_4)$

(0,4g/L) e H₂SO₄ até atingir pH - 1,8 (SILVA *et al.*, 2018). A fonte de Fe nos experimentos foi o mineral Vivianita, Fe²⁺₃(PO₄)₂•8H₂O) triturado e peneirado em peneira de 120 Mesh (permitindo a passagem de material particulado com ao menos uma das dimensões inferiores a 125 µm), que foi adicionado para que a concentração inicial em cerca de 5mM (~50 mg/frasco). Nos experimentos bióticos, foi inoculado 400 µL (2% v/v) de uma solução contendo *Acidithiobacillus ferrooxidans* vindos de um cultivo em fase exponencial crescendo em meio T&K modificado com 120 mM de FeSO₄ (veja **Anexo 1**).

É importante destacar que na ausência de uma fonte de Fe (no caso, a Vivianita), não há sentido a realização de experimentos bióticos (com presença do *A. ferrooxidans*) já que esse não seria capaz de se desenvolver. Ao sistema também foram adicionados um ou dois sedimentos, representados pela areia (10g) e o argilomineral Montmorilonita (4,5g) que, quando ambos os sedimentos estavam presentes, foi utilizada metade de massa de cada (5g e 2,25g respectivamente). Portanto, como variantes dos sistemas, em condição dinâmica ou estática, os sedimentos (areia e o argilomineral), a Vivianita, e a presença ou não do microrganismo. Ambos os experimentos permaneceram a 30° C, que é temperatura ótima para o crescimento do *A. ferrooxidans*. Os experimentos estáticos ficaram em estufa termostatizada enquanto os experimentos dinâmicos ficaram sob agitação a 150 rpm em mesa agitadora (*shaker*). Os sistemas definidos nesta etapa do projeto estão descritos na **Figura 3**.

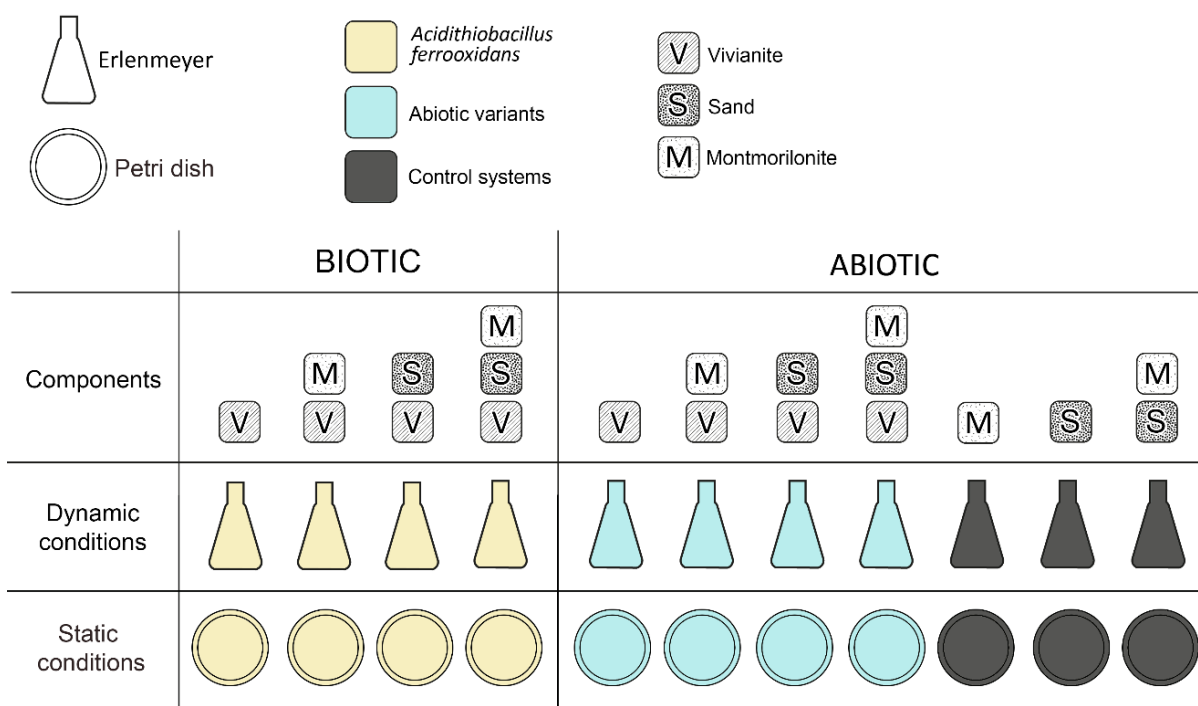


Figura 3: Diagrama de identificação de variáveis do experimento. (Ilustração: Júlia D'Oliveira) - Diagrama dos 11 tratamentos para cada tipo de sistema (Dinâmico ou Estático). A primeira letra indica se a variável é biótica

(presença de bactéria, representada pela letra “B”) ou abiótica (ausência de bactérias, representadas por “A”). A letra “V” indica a presença ou ausência do mineral Vivianita. A inclusão de sedimentos nos experimentos será indicada por “S” (presença de areia) e “M” (presença do argilomineral Montmorilonita), essas frações sedimentares podem coexistir, o que será indicado com o sinal “+” entre as abreviaturas.

3.2 Métodos de caracterização

O substrato e sedimentos foram submetidos a análises de caracterização antes e após a realização dos experimentos. As análises foram importantes para a caracterização e diferenciação entre os insumos e os diferentes minerais produzidos de forma biótica e abiótica ao final do processo.

3.2.1 pH e UV-Vis

Devido à diferença dos processos físicos que regem os experimentos, o tempo necessário para a solubilização e a oxidação biótica do Fe foi diferente entre os ensaios dinâmicos e estáticos. Assim, as amostragens foram realizadas no momento da preparação dos experimentos e então, em uma frequência de 15 dias, com a adição de uma amostragem no sétimo dia, no caso dos experimentos dinâmicos bióticos. A repetição das amostragens continua nesta frequência, sendo encerradas quando os recipientes secaram ou atingiram volume inferior ao necessário para os testes.

As análises químicas pertinentes a este delineamento têm como base a solubilização de Fe^{2+} e sua oxidação abiótica ou biótica, seguida de eventual precipitação de minerais. Ainda, controle para que o pH permaneça próximo do ótimo (faixa de 1.8 a 3 para o crescimento do organismo enquanto houver Fe^{2+} biodisponível em experimento biótico). Devido ao baixo volume de líquido nos experimentos, optou-se pela análise de pH por fitas com papel indicador de pH. Foram feitas análises colorimétricas para medição da concentração de Fe^{2+} (complexação com *o*-fenantrolina) e Fe^{3+} (complexação com tiocianato de potássio) na fase solúvel e insolúvel (Silva *et al.*, 2018).

A quantificação de Fe na fase insolúvel da condição sob agitação foi possível mediante a sua separação por centrifugação, descarte do sobrenadante e adição de uma solução de mesmo volume de HCl (~1M), por pelo menos 24h. Devido à deposição e forte aderência dos precipitados nas paredes dos frascos, não se esperava obter a recuperação total do Fe durante o decorrer dos experimentos, gerando um desvio no balanço de massa desse elemento. O cronograma para estas análises está demonstrado na Tabela 1 e foram realizadas seguindo protocolos já estabelecidos anteriormente (veja **Anexos 2 e 3**).

Cronograma de Análises Químicas						
Dias	0	7	15	30	45	...
Condições dinâmicas	x	x	x	x	x	x
Condições estáticas	x		x	x	x	x

Tabela 1: Cronograma programático para realização de coletas e análises colorimétricas e de pH.

3.2.2 Espectroscopia micro-Raman

Dentre as técnicas utilizadas tivemos a espectrometria de micro-Raman que é uma técnica analítica avançada amplamente utilizada em diversas áreas da ciência, incluindo química, física, biologia e materiais. Seu princípio básico repousa na dispersão inelástica da luz, que ocorre quando a luz incide sobre uma amostra e uma pequena fração dos fótons incidentes sofre espalhamento Raman. Esse fenômeno ocorre devido às vibrações moleculares na amostra, resultando em frequências Raman únicas para cada substância. Isso permite a identificação e análise detalhada da estrutura molecular e composição química da amostra.

Para realizar uma análise Raman, é necessário um espectrômetro de Raman equipado com um laser monocromático para excitar a amostra. A luz dispersada Raman é então direcionada para um monocromador que a separa em diferentes frequências. Um detector converte esses sinais em um espectro que exhibe as frequências e intensidades das bandas Raman. Essas frequências Raman são características de ligações químicas específicas e fornecem informações valiosas sobre a amostra.

Uma das vantagens significativas da espectrometria de micro-Raman é que ela não requer um preparo complexo da amostra, tornando-a adequada para uma variedade de tipos de amostras, incluindo sólidos, líquidos e gases. Além disso, a técnica pode fornecer informações sobre a estrutura molecular, composição e orientação das ligações químicas presentes na amostra.

A espectrometria de micro-Raman tem uma ampla gama de aplicações, incluindo a caracterização de materiais, como polímeros, minerais, semicondutores e compostos orgânicos. Ela também é usada em estudos de biologia, permitindo a análise de células e tecidos. Além disso, é aplicada na análise de produtos farmacêuticos e alimentos, bem como no monitoramento de reações químicas e processos em tempo real.

Entretanto, existem algumas limitações na técnica. A intensidade do sinal Raman geralmente é fraca, o que pode exigir tempos de aquisição mais longos para obter dados confiáveis. Além disso, algumas amostras podem ser fotossensíveis e danificadas pelo laser, o que requer cuidados especiais. A sobreposição de bandas Raman em amostras complexas também pode dificultar a análise. (Smith & Dent 2005).

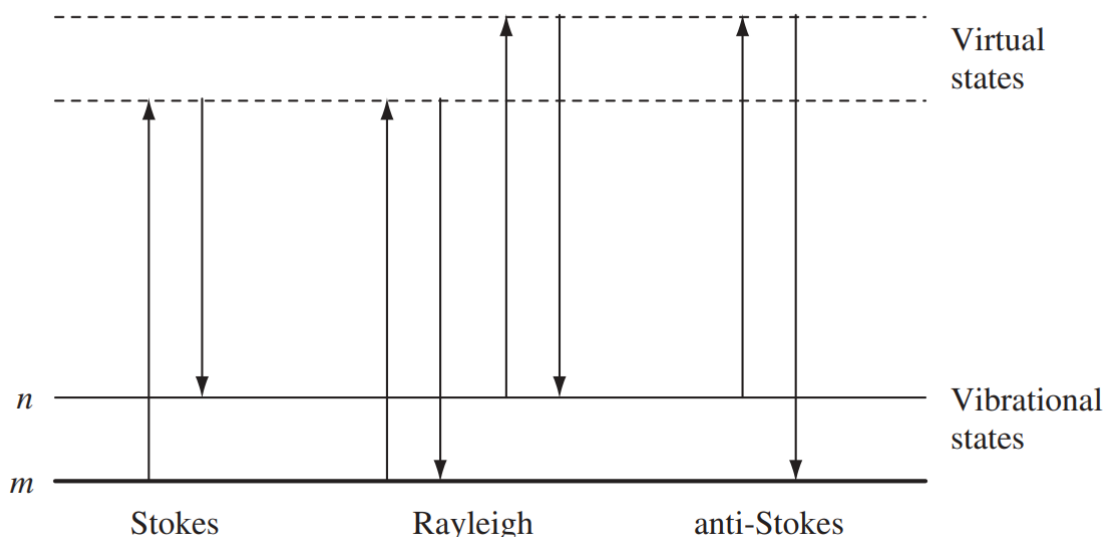


Figura 4: Diagrama dos processos de espalhamento Rayleigh e Raman. O mais baixo estado vibracional de energia m é mostrado na base com estados de energia crescente acima isto. Tanto a energia baixa (setas para cima) quanto a energia dispersa (setas para baixo) têm energias muito maiores do que a energia de uma vibração. (Smith & Dent 2005).

Trata-se de uma técnica não destrutiva que não necessita de preparações ou manipulações de qualquer natureza, como lixamentos, polimentos ou qualquer preparação mais complexa. Esta análise foi realizada no Astrolab, IQ-USP. O equipamento utilizado foi um micro-Raman da marca Renishaw modelo in-Via Reflex acoplado ao microscópio.

Laser 632,8 nm (He-Ne) – 50 mW, Laser 785 nm (laser de diodo) - 500 mW, Laser 532 nm (laser de diodo) - 500 mW, com rede de difração de 1200 linhas (quando usado os lasers 632,8 ou 785 nm) e de 2400 linhas (quando usado o laser 532 nm) com um detector CCD (1040X256 pixels) resfriado termoeletricamente com uma base motorizada nas direções X, Y e Z com passo de 0,1 μm (acessório fundamental na aquisição de imagens Raman), acessório para coleta de espectros a diferentes temperaturas (N_2 líquido até 300 $^\circ\text{C}$) e polarizadores para a luz incidente e espalhada.

Na análise conduzida neste projeto, empregamos um laser com comprimento de onda de 532 nanômetros, juntamente com configurações de sistema fixadas em 30 acumulações (acc), 5% de potência do laser e 1 segundo de tempo de exposição para cada um dos 20 pontos avaliados nas 22 amostras coletadas. Cabe destacar que esses parâmetros foram otimizados por meio de uma análise prévia.

3.2.3 MEV/EDS

A técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) em combinação com a Espectroscopia de Dispersão de Energia de Raios-X (EDS) é uma poderosa ferramenta

analítica amplamente utilizada em diversas áreas da ciência e da indústria. Essa técnica oferece insights valiosos sobre a morfologia e composição química de amostras microscópicas e nanométricas. Vamos criar um texto parecido para essa técnica:

A Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) associada à Espectroscopia de Dispersão de Energia de Raios-X (EDS) é uma técnica analítica avançada que desempenha um papel fundamental em diversas áreas da pesquisa científica e na indústria. O princípio básico do MEV envolve o uso de feixes de elétrons para explorar a morfologia da superfície de uma amostra em escala micro ou nanométrica.

O MEV oferece imagens de alta resolução, revelando detalhes estruturais que são essenciais para a análise de materiais. A capacidade de explorar a topografia da superfície torna o MEV um instrumento valioso em campos como geologia, metalurgia, ciência dos materiais e nanotecnologia.

Além disso, a técnica de Espectroscopia de Dispersão de Energia de Raios-X (EDS) permite a análise da composição química de uma amostra. Ao direcionar feixes de elétrons na amostra, ocorre a emissão de raios-X característicos, cujas energias são medidas pelo EDS. Isso fornece informações sobre os elementos químicos presentes na amostra e suas concentrações.

A combinação do MEV e EDS nos permite visualizar estruturas de uma amostra em alta resolução, mas também determinem sua composição química. Isso é fundamental em uma ampla gama de aplicações, desde a análise de minerais e materiais semicondutores até a pesquisa em biologia, além de possibilitar estudar amostras biológicas, incluindo células e tecidos.

No entanto, é importante notar que a técnica MEV-EDS requer equipamentos complexos e conhecimento especializado para sua operação e interpretação dos dados. Além disso, a preparação adequada da amostra é essencial para obter resultados precisos. A técnica MEV-EDS é uma ferramenta valiosa que continua a desempenhar um papel crucial na pesquisa e na indústria, fornecendo informações detalhadas sobre a morfologia e a composição química de amostras em escalas micro e nanométricas. (GOLDSTEIN *et al.*, 2017)

As análises via MEV/EDS foram realizadas no Laboratório de Plasmas Tecnológicos (LapTec) do campus Experimental de Sorocaba, sob coordenação da Profa. Dra. Elidiane Cipriano Rangel. O modelo do MEV é JEOL – JSM-6010LA (*Analytical Scanning Electron*

Microscope) com as seguintes especificações detector EDS de silicone (resolução de energia: 133 eV ou melhor), EDS com a condição de análise de WD 10 mm a ângulo de saída de 35° (apenas JSM-60LA) com uma resolução máxima de 4 nm. Atingindo resolução de 8 nm a 3 kV e 15 nm a 1 kV (baixas voltagens de aceleração). A função de baixo-vácuo e detector de elétron-retroespalhado é equipado como padrão. Pode-se observar amostras não-condutivas facilmente sem preparações complicadas. Possui duas portas para uma grande unidade opcional e são equipadas para a câmara de amostras com diâmetro máximo de 150 mm. O aumento nominal é de até 300.000×, voltagem de aceleração de 0,5 a 20 kV.

3.2.4 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier, FT-IR

A Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR) é uma técnica analítica fundamental utilizada em diversas áreas da ciência e da indústria para analisar a composição química e estrutura molecular de amostras. Vamos criar um texto semelhante ao anterior, abordando a técnica FT-IR:

A Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) é uma técnica analítica altamente versátil e amplamente aplicada em várias disciplinas da ciência e indústria. A base do FT-IR reside na interação da luz infravermelha com uma amostra, fornecendo informações cruciais sobre sua composição química e estrutura molecular.

Ela funciona medindo as variações na absorção da luz infravermelha pela amostra. As diferentes ligações químicas presentes em uma substância vibram em frequências específicas, e essas vibrações são capturadas pelo seu espectrômetro. O resultado é um espectro que mostra picos de absorção característicos, revelando as ligações químicas e os grupos funcionais presentes na amostra. Esta técnica é amplamente usada em áreas como química orgânica, análise de polímeros, controle de qualidade de produtos farmacêuticos e análise de alimentos. Além disso, é uma ferramenta valiosa em estudos de biologia, onde pode ser usada para analisar proteínas, ácidos nucleicos e outras biomoléculas.

Uma das vantagens desta técnica são notáveis, como a sua capacidade de análise não destrutiva e não invasiva. Isso significa que as amostras podem ser analisadas sem a necessidade de preparação complexa, tornando-o adequado para uma ampla variedade de materiais, incluindo sólidos, líquidos e gases.

No entanto, é importante destacar que o FT-IR tem suas limitações, como a necessidade de amostras transparentes ao infravermelho e a sobreposição de bandas espectrais em amostras complexas, que pode dificultar a interpretação dos resultados e é uma ferramenta essencial, que desempenha um papel fundamental na pesquisa científica e na indústria,

forneendo informações detalhadas sobre a composição química e a estrutura molecular de amostras de maneira não invasiva e de alta precisão. (GRIFFITHS & HASETH, 2007)

Para a análise FT-IR, foi utilizado um espectrômetro Perkin Elmer Frotier no modo de reflexão total atenuada. Foram realizadas 64 varreduras em resolução de 4 cm⁻¹, nos comprimentos de onda de 4000 cm⁻¹ a 400 cm⁻¹. Foram analisadas as amostras das condições dinâmica e estática nas seguintes condições: A–M, A–V, A–V–M, B–V, B–V–M.

Devido ao risco potencial de danificar o equipamento e à limitação de tempo que impossibilitou a preparação adequada das amostras que continham areia, não foi viável incorporar essas variáveis na análise em questão.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análises químicas e mineralógicas

4.1.1 pH

Os valores de pH em ambas as condições exibiram um comportamento semelhante. As variáveis contendo Montmorilonita como único componente ou como sedimento complementar apresentaram valores de pH dentro da faixa de 2-3, enquanto todas as outras variáveis mantiveram-se em um pH entre 1-2.

pH Dinâmica								pH Estática					
15-mai.		22-mai.		5-jun.		19-jun.		15-mai.		22-mai.		5-jun.	
Amostra	pH	Amostra	pH	Amostra	pH	Amostra	pH	Amostra	pH	Amostra	pH	Amostra	pH
B-V	1-2	B-V	1-2	B-V	1-2	B-V	1-2	B-V	-	B-V	1-2	B-V	-
B-V-M	2-3	B-V-M	2-3	B-V-M	2-3	B-V-M	2-3	B-V-M	-	B-V-M	3	B-V-M	-
B-V-S	1-2	B-V-S	1-2	B-V-S	1-2	B-V-S	1-2	B-V-S	-	B-V-S	1-2	B-V-S	-
B-V-S+M	2-3	B-V-S+M	2-3	B-V-S+M	2-3	B-V-S+M	2-3	B-V-S+M	-	B-V-S+M	2-3	B-V-S+M	-
A-V	1-2	A-V	1-2	A-V	1-2	A-V	1-2	A-V	-	A-V	1-2	A-V	-
A-V-M	2-3	A-V-M	2-3	A-V-M	2-3	A-V-M	2-3	A-V-M	-	A-V-M	2-3	A-V-M	-
A-V-S	1-2	A-V-S	1-2	A-V-S	1-2	A-V-S	1-2	A-V-S	-	A-V-S	1-2	A-V-S	-
A-V-S+M	2-3	A-V-S+M	2-3	A-V-S+M	2-3	A-V-S+M	2-3	A-V-S+M	-	A-V-S+M	2-3	A-V-S+M	-
A-M	2-3	A-M	2-3	A-M	2-3	A-M	2-3	A-M	-	A-M	2-3	A-M	2-3
A-S	1-2	A-S	1-2	A-S	1-2	A-S	1-2	A-S	-	A-S	1-2	A-S	1-2
A-S+M	1-2	A-S+M	1-2	A-S+M	2-3	A-S+M	2-3	A-S+M	-	A-S+M	1-2	A-S+M	1-2

Tabela 2: Resultados das análises de pH para a condição dinâmica e estática. A primeira letra indica se a variável é biótica (presença de bactéria, representada pela letra “B”) ou abiótica (ausência de bactérias, representadas por “A”). A letra “V” indica a presença ou ausência do mineral Vivianita. A inclusão de sedimentos nos experimentos será indicada por “S” (presença de areia) e “M” (presença do argilomineral), essas frações sedimentares podem coexistir, o que será indicado com o sinal “+” entre as abreviaturas.

Isso pode ser justificado pelo argilomineral ser de uma classe de minerais silicáticos que possui uma estrutura de camadas. Cada camada do argilomineral é composta por tetraedros e octaedros que se unem para formar uma estrutura em folhas. Uma característica

importante das camadas deste argilomineral é a presença de espaços intersticiais (vazios) entre essas camadas, nos quais íons e moléculas podem ser encontrados. Esses espaços intersticiais são vitais para muitos processos químicos e físicos que ocorrem nestes argilominerais. Esses espaços são muitas vezes chamados de "espaços de troca" porque cátions (íons positivamente carregados) podem ocupá-los e serem trocados por outros cátions em reações químicas. Os cátions que ocupam os espaços intersticiais entre as camadas do argilomineral podem incluir íons de sódio (Na^+), potássio (K^+), cálcio (Ca^{2+}), magnésio (Mg^{2+}), entre outros. A presença desses cátions nos espaços intersticiais é importante para a estabilidade das camadas do argilomineral e também desempenha um papel na capacidade de troca de cátions (CTC) do argilomineral em virtude de suas características, que contém cátions nos espaços intersticiais de suas camadas. Esta é uma das hipóteses apresentadas para elucidar a discrepância de valores de pH observados nas variáveis que incluíam a presença de argilominerais. (GARCIA-GONZÁLEZ *et al* 2016).

4.1.2 UV-VIS

Apresentação gráfica do acompanhamento para a variação da concentração de Fe^{3+} e Fe^{2+} ao longo do tempo em ambas às condições.

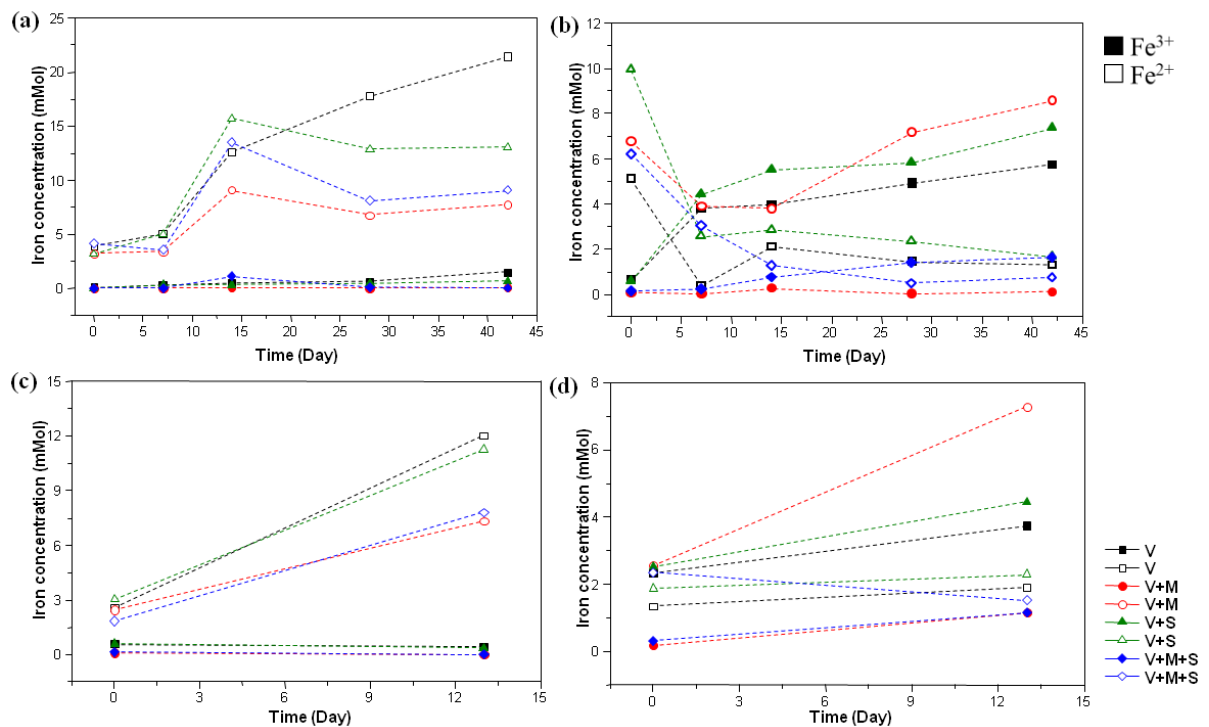


Figura 5 – Acompanhamento da concentração de Fe^{3+} e Fe^{2+} nas variáveis ao decorrer do experimento. (a) representa as variáveis abióticas do sistema dinâmico; (b) representa as variáveis bióticas do sistema dinâmico; (c) representa as variáveis abióticas do sistema estático; (d) representa as variáveis bióticas do sistema estático. As formas preenchidas representam o progresso de Fe^{3+} , enquanto as formas vazadas representam o progresso de Fe^{2+} .

A variação significativa nas concentrações de Fe^{3+} e Fe^{2+} indicam que houve a oxidação de Fe^{2+} para Fe^{3+} tanto nos tratamentos bióticos quanto nos abióticos independente do desenvolvimento do *A. ferrooxidans*. Os resultados obtidos confirmam a capacidade da bactéria em oxidar Fe^{2+} e acumular Fe^{3+} total em todas as culturas (**Anexo 5 e Figura 5**).

Nos tratamentos dinâmicos, o sistema biótico com Vivianita (B-V) ou com Vivianita e areia (B-V-S), apresentou tendência de diminuição das concentrações de Fe^{2+} ao longo do tempo (exceto no final do monitoramento B-V, quando o meio seca naturalmente, levando a um aumento na concentração de íons na solução). Por outro lado, as concentrações de Fe^{3+} aumentaram significativamente em comparação aos sistemas abióticos (A-V e A-V-S). Isto indica o sucesso do desenvolvimento das bactérias e sua capacidade de obter energia através da oxidação do Fe^{2+} , em contraste com o sistema abiótico, que não apresentou oxidação significativa deste íon.

Após uma semana, foi observado o desenvolvimento metabólico dos microrganismos na cultura biótica sem sedimento, juntamente com a redução da concentração inicial de Fe^{2+} em solução de 12,514 mM para 6,679 mM e o aumento de Fe^{3+} de 6,526 mM para 11,263 mM. A amostra contendo areia exibiu um padrão de crescimento semelhante, com a concentração inicial de Fe^{2+} diminuindo de 17,170 mM para 8,705 mM no mesmo período, enquanto Fe^{3+} aumentou de 6,266 mM para 13,746 mM. Isto sugere que a areia se comporta como substrato inerte, não afetando o crescimento de *A. ferrooxidans*.

O mesmo padrão foi observado nas concentrações de Fe^{3+} para tratamentos estáticos. Nestes casos, embora não tenha havido variações significativas no Fe^{2+} ao longo do período de observação para B-V e B-V-S, suas concentrações foram menores quando comparadas aos sistemas abióticos (A-V e A-V-S), novamente indicando sucesso no desenvolvimento de *A. ferrooxidans*.

Quase não houve variação na concentração de íons de ferro nos sistemas bióticos com Montmorilonita e Vivianita (B-V-M). Tanto nos sistemas estáticos quanto nos dinâmicos, as concentrações de Fe^{3+} permaneceram baixas, e as concentrações de Fe^{2+} permaneceram altas quando comparadas aos sistemas abióticos (A-V-M).

Nos tratamentos dinâmicos dos sistemas bióticos com Vivianita, areia e a Montmorilonita (B-V-M+S) houve ligeiro aumento nas concentrações de Fe^{3+} e diminuição de Fe^{2+} , quando comparado aos sistemas abióticos. Essa mesma tendência foi verificada nos tratamentos estáticos, nas culturas com Montmorilonita (A-V-M, B-V-M, A-V-S + M e B-V-S+M). (**Anexo 4 e Figura 5**)

Portanto, não foi possível mensurar o sucesso no desenvolvimento de *A. ferrooxidans* em sistemas com Montmorilonita. Nestes casos, as medições da concentração de Fe^{3+} podem ter sido distorcidas devido à capacidade de troca catiônica da Montmorilonita. Este tipo de argilomineral possui cátions (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+}) que podem ser substituídos por Fe^{3+} no espaço intersticial entre suas camadas. (GARCIA-GONZÁLEZ *et al* 2016). Neste cenário, as bactérias podem de facto ter-se desenvolvido em sistemas com Montmorilonite, mas os íons Fe^{3+} podem ter sido sorvidos entre as camadas de minerais argilosos, tornando-os indisponíveis na solução.

Outra possível explicação é que o Fe^{2+} pode ter sido absorvido ou sorvido pela Montmorilonita e, portanto, não estar totalmente disponível para as bactérias, ou apenas em pequenas quantidades. Alguns experimentos mostraram que a absorção de Fe^{2+} segue o comportamento de sorção de outros metais de transição divalentes e que a sorção deste cátion pode aumentar até duas vezes em montmorilonitas que foram enriquecidas com Fe^{3+} . (SOLTERMANN *et al* 2014) Este fenômeno também poderia explicar o ligeiro aumento nas concentrações de Fe^{3+} observado em sistemas bióticos com areia e Montmorilonita (B-V-M+S). A massa de Montmorilonita adicionada a estes sistemas foi menor (=2,25 g). Neste caso, é possível que a quantidade relativamente menor de Montmorilonita no sistema tenha sido insuficiente para absorver a quantidade de Fe^{3+} produzida.

4.2 Espectroscopia micro-Raman

Não foram obtidos espectros significativamente representativos de Montmorilonita em nenhum dos tratamentos onde este sedimento foi adicionado. Além disso, os sinais obtidos revelaram um fundo de alta fluorescência (não apresentadas nos espectros devido ao tratamento de baseline feito anteriormente). Nas misturas envolvendo este filossilicato, o fundo de fluorescência interferiu na identificação dos espectros característicos do quartzo (areia) e da Vivianita, com apenas uma exceção, no sistema estático em B-V-M.

Os dados analíticos são apresentados nas **Tabelas 4 e 5**. A primeira apresenta os dados resumidos das análises em condições dinâmicas. Maior detalhamento dos dados nesta condição pode ser encontrado no **Anexo 5**.

A-S											
Ponto 1				Ponto 5				Ponto 10			
v	Intensity	[IR]	(FWHM)	v	Intensity	[IR]	(FWHM)	v	Intensity	[IR]	(FWHM)
211.21 ¹	4362.29	21%	20.98	209.64 ¹	5403.14	19%	21.82	210.83 ¹	2721.87	20%	21.36
267.54 ¹	923.97	4%	3.95	266.41 ¹	1160.77	4%	5.61	267.01 ¹	972.50	7%	7.27
357.67 ¹	1627.24	8%	5.49	356.75 ¹	363.43	1%	4.68	357.45 ¹	1130.56	8%	6.22

394.94 ¹	368.80	2%	3.13	395.27 ¹	422.43	2%	4.68	465.52 ¹	13795.03	100%	7.59
403.34 ¹	299.70	1%	5.05	402.23 ¹	596.95	2%	6.04	808.29 ¹	850.15	6%	11.43
467.05 ¹	20702.72	100%	8.93	466.67 ¹	28026	100%	9.88	983.51	1191.72	9%	23.36
511.80	555.88	3%	13.35	697.22 ¹	313.19	1%	11.78	1049.55	1332.94	10%	31.00
809.83 ¹	821.12	4%	11.22	796.50 ¹	720.26	3%	9.71				
1083.20 ¹	597.99	3%	9.08	804.97 ¹	391.53	1%	11.40				
1161.89 ¹	275.49	1%	6.88	1066.82 ¹	671.70	2%	10.78				
				1161.52 ¹	777.74	3%	10.19				

A-M

Ponto 11				Ponto 19			
v	Intensity	[IR]	(FWHM)	N	Intensity	[IR]	(FWHM)
466.00	5742.15	100%	7.36	465.68	1828.57	100%	8.60

A-V

Ponto 2				Ponto 6				Ponto 9			
v	Intensity	[IR]	(FWHM)	v	Intensity	[IR]	(FWHM)	v	Intensity	[IR]	(FWHM)
192.47	2283.02	3%	62.68	199.73 ³	3455.23	22%	27.53	151.24 ³	611.46	16%	14.98
457.88 ³	5394.57	7%	24.64	319.62 ⁴	8503.57	55%	31.79	309.53 ³	1941.41	43%	25.95
613.24 ³	2803.60	4%	14.12	431.64 ³	3198.94	21%	12.06	384.03	759.47	17%	19.07
626.60 ³	2453.84	3%	12.96	459.32 ³	2782.06	18%	11.20	428.80 ³	1982.07	44%	28.25
984.09 ³	79854.70	100%	5.34	476.35 ³	3236.04	21%	16.75	529.79 ³	2850.47	64%	16.96
				640.36	3194.02	21%	11.44	928.44	2202.11	49%	23.85
				967.96 ⁴	6112.81	40%	23.57	984.00 ³	4464.55	100%	5.38
				1023.58 ⁴	4789.24	31%	20.90	1005.45	2371.50	53%	8.60
				1084.54 ³	15360.97	100%	26.17	1029.44 ⁴	2260.91	51%	19.83
				1259.01	2361.34	15%	20.01	1098.10	3732.19	84%	36.57

A-V-S

Ponto 1				Ponto 9				Ponto 16			
v	Intensity	[IR]	(FWHM)	v	Intensity	[IR]	(FWHM)	v	Intensity	[IR]	(FWHM)
210.02 ¹	6277.92	20%	22.26	343.96 ³	1062.72	29%	7.78	156.98 ³	40063.89	100%	11.83
266.28 ¹	1047.42	3%	7.22	376.00 ⁴	3625.35	100%	7.59	196.93 ⁴	787.41	2%	7.60
357.27 ¹	1138.06	4%	5.14	464.37	640.39	18%	9.88	217.59	4287.70	11%	7.60
395.12 ¹	1029.77	3%	4.11					250.14 ³	10593.96	26%	7.70
400.04 ¹	885.06	3%	5.66					288.26	4948.33	12%	11.35
466.10 ¹	30944.15	100%	9.33					325.82 ³	10978.42	27%	17.61
696.20 ¹	616.40	2%	10.25					369.01 ⁴	11845.67	30%	10.10
797.41 ¹	480.70	2%	9.22					395.87	829.40	2%	7.60
1162.19 ¹	1160.64	4%	8.19					414.65 ³	1696.65	4%	12.61
								464.09 ³	5785.48	14%	17.72
								502.85 ⁴	2217.86	6%	12.61
								546.66 ³	4368.11	11%	17.61
								585.47 ³	2117.01	5%	13.86
								634.62	4646.66	12%	27.63

A-V-M

Ponto 4				Ponto 18				Ponto 19			
v	Intensity	[IR]	(FWHM)	v	Intensity	[IR]	(FWHM)	v	Intensity	[IR]	(FWHM)
146.54	4971.62	6%	5.06	265.92 ²	2926.53	24%	16.77	1355.66 ³	2817.79	100%	37.62
239.76 ³	27769.21	31%	70.30	448.31	12429.63	100%	39.72				
443.86	88939.36	100%	41.13	612.33 ³	11438.25	92%	35.13				
607.70 ³	58720.79	66%	40.00								
706.71	6024.48	7%	50.14								

A-V-M+S

Ponto 2				Ponto 5				Ponto 12			
v	Intensity	[IR]	(FWHM)	v	Intensity	[IR]	(FWHM)	v	Intensity	[IR]	(FWHM)
210.02 ¹	4186.91	19%	20.98	147.80	51077.82	100%	7.55	146.58 ⁴	5799.60	4%	4.55
267.69 ²	1012.10	5%	5.90	397.71 ¹	1923.26	4%	9.56	240.01 ³	38826.90	28%	66.85
357.80 ¹	963.92	4%	5.90	466.74 ¹	14324.37	28%	7.81	443.86	136642.60	100%	40.84
396.05 ¹	680.19	3%	2.92	517.67 ³	3147.73	6%	16.85	609.13 ³	90037.30	66%	39.59
404.02 ¹	622.55	3%	4.34	639.72	6039.28	12%	20.52				
466.70 ¹	21607.43	100%	9.20								
1162.23	912.32	4%	6.64								

B-V

Ponto 4				Ponto 9				Ponto 14			
v	Intensity	[IR]	(FWHM)	v	Intensity	[IR]	(FWHM)	v	Intensity	[IR]	(FWHM)
222.31 ³	314.40	15%	12.18	255.59 ⁴	1192.54	30%	138.43	140.91 ⁴	772.54	24%	7.14
340.52 ³	594.59	29%	12.37	468.96 ³	1241.12	31%	62.68	226.90 ³	3265.42	100%	14.48
372.56	2046.42	100%	9.88	607.74 ³	621.79	16%	94.81	306.09 ³	772.47	24%	14.48
427.48 ³	371.37	18%	11.98	1010.39 ³	3980.67	100%	64.97	431.09*	2589.39	79%	14.48
433.44	448.57	22%	4.53					454.04 ⁴	535.63	16%	9.88

624.95 ³	315.94	15%	3.78	626.10*	1668.08	51%	7.59
1011.81 ³	956.41	47%	62.68	1008.10	2648.47	81%	5.29
				1096.47*	1549.63	47%	16.77
				1161.79	831.44	25%	21.36

B-V-S

Ponto 6				Ponto 16				Ponto 18			
v	Intensity	[IR]	(FWHM)	v	Intensity	[IR]	(FWHM)	v	Intensity	[IR]	(FWHM)
209.81 ¹	4412.84	21%	24.19	207.44 ¹	3043.96	25%	23.46	209.27 ¹	4889.98	21%	22.51
266.98 ¹	751.72	4%	8.37	267.43 ¹	1027.42	8%	7.44	267.97 ¹	662.48	3%	9.00
357.63 ¹	1699.86	8%	5.25	293.87 ³	4007.46	32%	18.30	293.08 ¹	1730.47	7%	22.51
465.52 ¹	20980.31	100%	9.88	317.02 ⁴	4566.45	37%	32.44	316.15 ⁴	1996.95	8%	24.56
510.33	726.28	3%	7.64	357.16 ¹	1245.68	10%	7.91	335.23 ⁴	1657.37	7%	25.52
809.16 ¹	614.61	3%	11.20	431.09 ³	563.09	5%	10.80	357.05 ¹	2129.59	9%	6.49
1083.14 ¹	895.60	4%	11.28	466.67 ¹	12392.09	100%	9.88	394.94 ¹	1239.00	5%	4.94
				611.21 ³	422.82	3%	12.09	404.73	637.67	3%	5.98
				639.32	1560.34	13%	11.51	466.67 ¹	23512.12	100%	7.59
				809.99 ¹	312.33	3%	3.29	637.53*	840.36	4%	15.81
				969.75 ⁴	5913.71	48%	29.17	978.75	1691.78	7%	36.08
				983.96 ³	9346.09	75%	7.57	1021.19 ⁴	2347.41	10%	31.12
				1020.95 ⁴	3896.06	31%	24.79	1085.74 ¹	2055.22	9%	31.01
				1083.38 ¹	2010.14	16%	18.76	1162.32 ¹	912.16	4%	10.74
				1257.64	1669.53	13%	23.93	1252.89	936.23	4%	24.68

B-V-M

Ponto 17			
N	Intensity	[IR]	(FWHM)
147.68 ⁴	13188.40	30%	8.36
445.68	36742.64	85%	33.25
611.82	43329.59	100%	37.64

B-V-M+S

Ponto 1				Ponto 3				Ponto 18			
v	Intensity	[IR]	(FWHM)	v	Intensity	[IR]	(FWHM)	v	Intensity	[IR]	(FWHM)
209.46 ¹	4262.18	20%	23.33	152.94 ³	578.39	4%	6.04	209.77 ¹	5057.30	20%	21.43
266.58 ¹	936.27	4%	7.44	210.54 ¹	3024.12	24%	23.10	267.26 ¹	1492.13	6%	4.00
356.95 ¹	1697.84	8%	6.50	292.31 ³	1074.90	8%	9.21	357.4 ¹⁸	1193.03	5%	4.97
394.88 ¹	811.66	4%	8.38	357.12 ¹	1047.59	8%	5.09	401.13 ¹	1278.14	5%	6.43
403.78 ¹	1268.71	6%	5.10	466.37 ¹	12855.43	100%	8.94	466.69 ¹	24956.98	100%	8.71
466.54 ¹	21079.27	100%	8.49	480.87	2101.36	16%	8.52				
				509.00	2431.23	19%	8.10				

Identificação de cada pico característico identificado: ¹Areia ²Montimorilonite ³Vivianite ⁴Metavivianite *Novo fosfato de ferro não identificado..

$\bar{\nu}$ (cm^{-1}) é o número de onda do espectro Raman. IR é a intensidade relativa referente ao pico mais intenso da variável. FWHM é a largura total na metade da amplitude do pico.

Tabela 4: Dados de espectroscopia micro-Raman em condição dinâmica (número de onda, intensidade, FWHM).

A seguir, na **Tabela 5**, são apresentados os dados resumidos das análises em condições estáticas. Maior detalhamento dos dados nesta condição pode ser encontrado no **Anexo 6**.

A-S

Ponto 8				Ponto 11				Ponto 15			
v	Intensity	[IR]	(FWHM)	v	Intensity	[IR]	(FWHM)	v	Intensity	[IR]	(FWHM)
209.14 ¹	5899.28	22%	23.67	208.83 ¹	5009.90	19%	21.79	207.14 ¹	1566.27	3%	28.06
266.69 ¹	1223.01	4%	6.82	267.54 ¹	989.52	4%	4.61	453.17	5869.96	13%	12.63
357.00 ¹	1295.11	5%	5.83	356.58 ¹	1994.13	8%	5.06	465.93 ¹	4284.01	9%	10.04
466.44 ¹	27341.61	100%	8.57	394.87 ¹	726.97	3%	4.17	616.62	3707.16	8%	9.99
612.31	975.40	4%	8.66	403.90 ¹	959.99	4%	4.61	624.95	1615.88	4%	7.40
975.19	13873.52	51%	5.28	465.19 ¹	25991.12	100%	9.69	976.05	45933.66	100%	6.80
1083.68 ¹	975.65	4%	6.80	807.98 ¹	1010.90	4%	9.69	998.92	2518.88	5%	5.23
				1162.06 ¹	940.56	4%	9.69				

A-M+S											
Ponto 5				Ponto 10				Ponto 15			
v	Intensity	[IR]	(FWHM)	v	Intensity	[IR]	(FWHM)	v	Intensity	[IR]	(FWHM)
212.21	5916.82	18%	21.94	146.8849	5865.396	100%	10.11	209.14 ¹	5266.64	21%	20.71
267.30 ²	1467.35	4%	7.59					267.01 ¹	1265.06	5%	5.46
356.78 ¹	854.46	3%	5.39					308.30	552.93	2%	1.84
395.06 ¹	1369.50	4%	4.25					357.91 ¹	796.59	3%	4.91
451.69	3186.13	10%	6.76					396.30 ¹	494.02	2%	3.77
465.88 ¹	32729.09	100%	8.39					403.53 ¹	1040.26	4%	3.77
1162.91 ¹	1149.03	4%	7.72					451.43	1768.57	7%	4.91
								465.86 ¹	24737.31	100%	7.94

A-V											
Ponto 12				Ponto 17				Ponto 18			
v	Intensity	[IR]	(FWHM)	v	Intensity	[IR]	(FWHM)	v	Intensity	[IR]	(FWHM)
983.49 ¹	5898.48	79%	5.49	451.37 ³	3558.12	9%	11.70	529.61 ³	2356.81	32%	14.83
1002.91	5087.24	69%	7.59	616.08	2226.62	6%	10.88	606.25 ³	1629.20	22%	28.17
1018.21	7421.75	100%	5.68	623.99 ³	1782.79	5%	9.07	925.42	1342.53	18%	21.97
				975.76	38306.32	100%	5.89	983.55 ³	5667.92	77%	8.81
								1009.33 ³	7335.03	100%	29.44

A-V-S											
Ponto 1				Ponto 4				Ponto 13			
v	Intensity	[IR]	(FWHM)	v	Intensity	[IR]	(FWHM)	v	Intensity	[IR]	(FWHM)
208.10 ¹	4380.56	19%	25.95	209.15 ¹	4617.25	21%	23.85	210.20 ¹	4897.90	20%	23.85
266.29 ¹	483.22	2%	6.86	266.98 ¹	1478.99	7%	6.68	266.90 ¹	1535.91	6%	7.81
356.52 ¹	1901.68	8%	5.48	357.00 ¹	1441.83	6%	6.68	357.45 ¹	1127.61	5%	5.83
395.50 ¹	785.46	3%	4.46	395.20 ¹	854.52	4%	6.68	394.97 ¹	789.47	3%	6.48
402.31 ¹	820.29	4%	7.53	403.81 ¹	1037.37	5%	6.68	403.90 ¹	1154.82	5%	6.17
466.24 ¹	23213.34	100%	9.69	466.24 ¹	22519.72	100%	7.59	465.19 ¹	24014.99	100%	9.69
1161.10 ¹	736.55	3%	6.61	697.99 ¹	747.44	3%	8.43	699.16 ¹	645.83	3%	8.77
				808.04 ¹	738.73	3%	7.71	807.96 ¹	940.30	4%	9.84
				1083.61 ¹	652.36	3%	7.56	1064.78 ¹	564.92	2%	6.90
				1161.21 ¹	708.13	3%	9.40	1082.86 ¹	576.33	2%	4.37
								1160.78 ¹	738.17	3%	10.90

A-V-M+S											
Ponto 1				Ponto 10				Ponto 13			
v	Intensity	[IR]	(FWHM)	v	Intensity	[IR]	(FWHM)	v	Intensity	[IR]	(FWHM)
204.08 ¹	1168.19	35%	23.85	209.15 ¹	5611.10	21%	19.83	208.10 ¹	6496.53	19%	21.74
466.24 ¹	3357.11	100%	7.59	267.14 ¹	1025.58	4%	3.36	356.06 ¹	2899.60	9%	5.49
952.89 ³	2356.35	70%	15.62	356.87 ¹	1946.76	7%	5.33	398.91 ¹	1348.29	4%	7.59
				394.52 ¹	1252.39	5%	3.36	466.24 ¹	33375.54	100%	7.59
				403.30	980.35	4%	5.74	1162.01 ¹	1034.88	3%	5.97
				465.82 ¹	26400.84	100%	7.94				

B-V											
Ponto 1				Ponto 5				Ponto 19			
v	Intensity	[IR]	(FWHM)	v	Intensity	[IR]	(FWHM)	v	Intensity	[IR]	(FWHM)
451.99 ³	3640.47	12%	17.73	451.37 ³	3558.12	9%	11.70	218.33	918.27	30%	11.61
615.16 ³	3247.26	11%	11.61	616.08 ³	2226.62	6%	10.88	339.71 ³	1525.63	50%	9.69
976.10	25161.73	83%	6.79	623.99*	1782.79	5%	9.07	372.42 ⁴	3081.32	100%	13.71
983.50 ³	30339.38	100%	4.58	975.76	38306.32	100%	5.89				

B-V-S											
Ponto 3				Ponto 6				Ponto 19			
v	Intensity	[IR]	(FWHM)	v	Intensity	[IR]	(FWHM)	v	Intensity	[IR]	(FWHM)
211.16 ¹	4661.91	22%	25.95	209.48 ¹	6063.13	20%	24.11	209.28 ¹	5208.40	20%	23.10
265.91 ¹	1122.42	5%	5.52	267.35 ¹	833.65	3%	6.42	266.23 ¹	687.75	3%	6.16
356.80 ¹	429.83	2%	3.50	357.06 ¹	2504.89	8%	5.94	357.00 ¹	1130.58	4%	4.83
396.14 ¹	387.40	2%	5.17	394.74 ¹	746.13	2%	5.49	395.71 ¹	727.37	3%	4.41
402.74 ¹	624.10	3%	3.84	403.88 ¹	1032.25	3%	5.02	400.38 ¹	977.77	4%	5.75
433.15*	590.23	3%	17.73	465.73 ¹	30506.40	100%	9.70	465.19 ¹	25747.12	100%	7.59
466.24 ¹	21220.98	100%	7.59	696.79 ¹	433.35	1%	7.19	697.00 ¹	351.45	1%	6.40
624.78*	518.19	2%	7.94	808.39 ¹	500.66	2%	6.58	797.65 ¹	336.48	1%	9.35
698.54 ¹	416.80	2%	3.78	1160.15 ¹	873.60	3%	7.45	1161.97 ¹	841.63	3%	8.46
796.29 ¹	501.04	2%	6.86	1232.41	338.58	1%	8.54				
1007.08	694.24	3%	7.16								
1067.41 ¹	559.64	3%	10.14								
1159.79 ¹	576.65	3%	9.67								

B-V-M											
Ponto 10				Ponto 13				Ponto 19			
v	Intensity	[IR]	(FWHM)	v	Intensity	[IR]	(FWHM)	v	Intensity	[IR]	(FWHM)
153.82 ³	2415.04	29%	5.716	153.42 ³	1411.48	16%	3.94	146.89 ⁴	4312.27	5%	6.09

190.07*	1169.95	14%	7.815	189.63*	2134.57	24%	8.37	166.30	23288.96	26%	7.14
212.23	1139.03	13%	5.867	213.04	1391.84	16%	4.83	214.22	21946.15	24%	21.74
254.95 ⁴	1757.02	21%	6.602	272.28	1599.56	18%	6.38	237.75 ³	41877.17	46%	40.11
271.41	1077.20	13%	8.586	293.33 ⁴	3134.76	35%	6.79	254.01 ⁴	71005.17	79%	19.83
293.37 ³	2364.84	28%	7.043	457.85 ⁴	2167.46	24%	3.27	318.28 ⁴	23863.25	26%	25.95
331.77	1298.08	15%	4.287	480.49	7549.84	85%	7.01	337.70	30180.37	33%	21.94
408.97	692.42	8%	4.864	508.65 ⁴	8873.88	100%	6.79	426.46 ³	16389.11	18%	9.50
419.02 ³	939.35	11%	6.517	764.30	2045.18	23%	6.21	469.30 ³	66022.42	73%	15.62
480.53 ³	4338.84	51%	6.479	816.27	1972.54	22%	6.50	545.82 ³	35357.36	39%	30.16
508.40 ⁴	8449.20	100%	7.325	1098.92*	2403.13	27%	9.14	608.09 ³	90167.67	100%	28.06
763.62	1478.30	17%	7.570					867.19	4506.51	5%	34.18
816.49	1165.88	14%	7.602					913.10	11017.87	12%	19.83

B-V-M+S

Ponto 4				Ponto 5				Ponto 8			
ν	Intensity	[IR]	(FWHM)	ν	Intensity	[IR]	(FWHM)	ν	Intensity	[IR]	(FWHM)
263.19 ¹	1088.12	37%	130.015	1001.85	375.47	100%	62.68	264.24 ¹	1338.27	47%	140.15
471.31 ¹	972.16	33%	62.681					462.13 ¹	1170.77	41%	105.53
602.92	391.15	13%	93.287					1009.98 ³	2849.91	100%	78.94
1008.93 ³	2960.97	100%	81.045								

Identificação de cada pico característico identificado: ¹Areia ²Montmorilonite ³Vivianite ⁴Metavivianite *Novo fosfato de ferro não identificado..

$\bar{\nu}$ (cm^{-1}) é o número de onda do espectro Raman. IR é a intensidade relativa referente ao pico mais intenso da variável. FWHM é a largura total na metade da amplitude do pico.

Tabela 5: Dados de espectroscopia micro-Raman em condição estática (número de onda, intensidade, FWHM).

Os dados forneceram espectros micro-Raman que são apresentados nas **Figuras 6 à 9**.

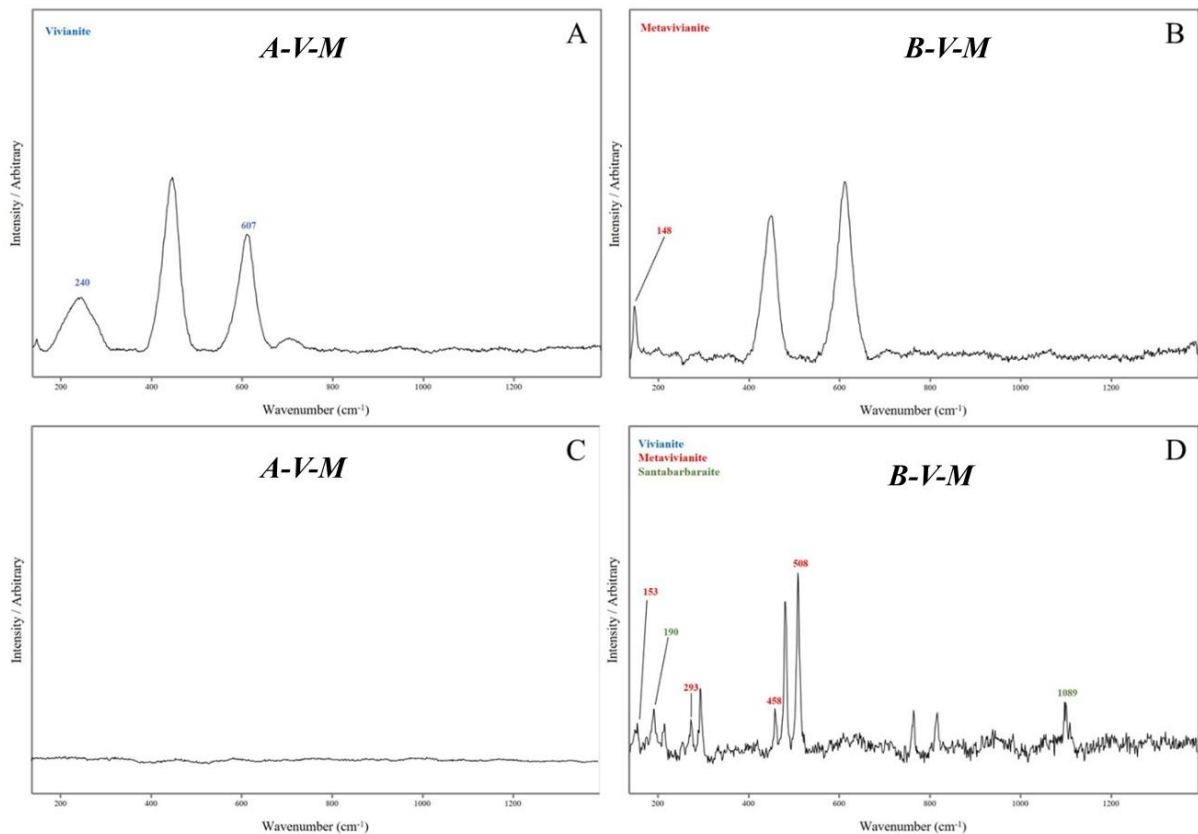


Figura 6. Espectros com apenas a Montmorilonita de sedimento (M), obtidos das seguintes variáveis a) (Dinâmico) A-V-M pt. 4; b) (Dinâmico) B-V-M pt.17; c) (Estático) A-V-M pt. 2; e d) (Estático) B-V-M pt. 13.

Os picos mais evidentes nas misturas com Montmorilonita foram atribuídos ao quartzo nas misturas com areia (**Figura 7**). Outros estudos também relataram dificuldades na identificação de espectros Raman de minerais de interesse astrobiológico, como a Jarosita, quando misturados com a montmorilonita (LIU *et al* 2020).

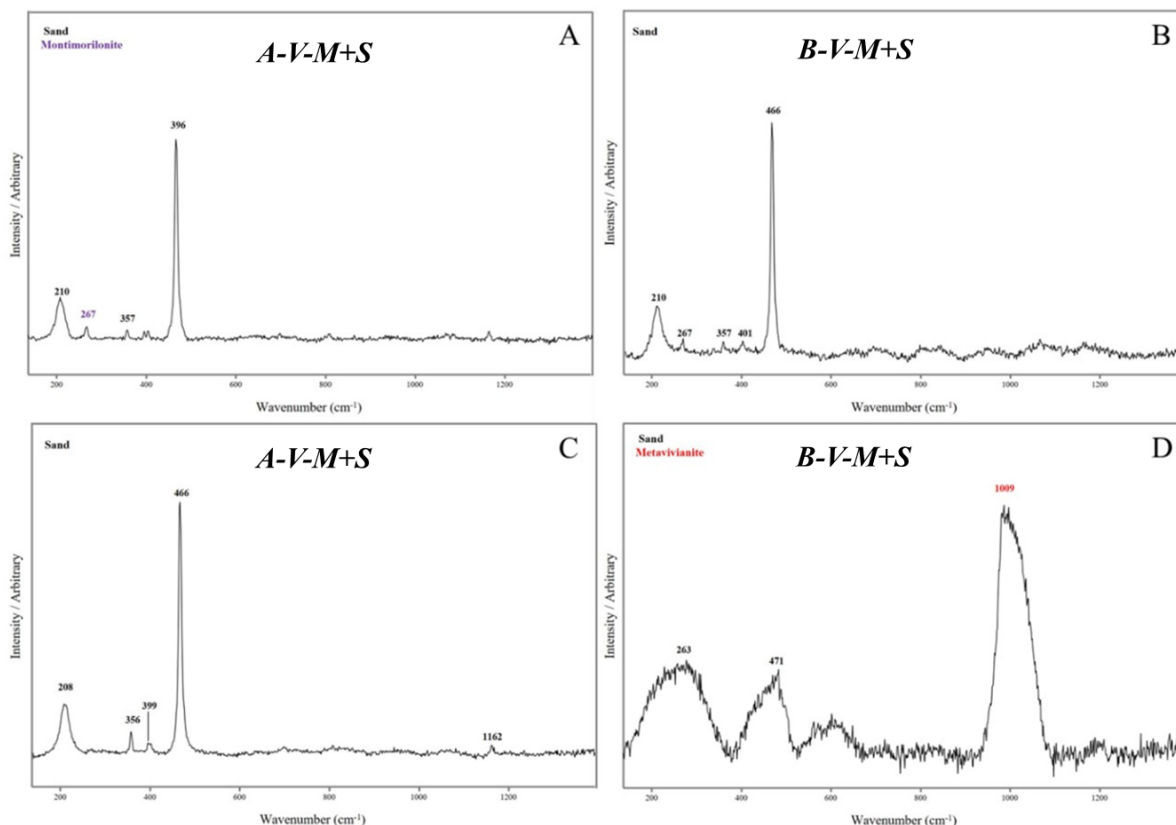


Figura 7. Espectros com ambos os sedimentos (M+S), obtidos das seguintes variáveis a) (Dinâmico) A-V-M+S pt. 2; b) (Dinâmico) B-V-M+S pt.18; c) (Estático) A-V-M+S pt. 13; e d) (Estático) B-V-M+S pt. 4.

Os minerais argilosos são dispersores Raman intrinsecamente muito fracos. Algumas complicações envolvidas na identificação e caracterização de argilominerais por espectroscopia Raman podem estar relacionadas à baixa cristalinidade do mineral e/ou à tendência desses grãos placoides ultrafinos (mesmo menores que 2 μm) de se organizarem como agregados. Isso pode reduzir a intensidade do sinal Raman pela intensa dispersão do laser e dos fótons gerados nas superfícies e limites dos grãos. Outro problema é a fluorescência de fundo que pode ser causada pela emissão de contaminação por matéria orgânica (muito comum nos argilominerais terrestres), o que complica ainda mais a detecção dos já fracos sinais Raman dos argilominerais. (WANG *et al* 2015) Os tratamentos sem a Montmorilonita apresentaram resultados mais promissores, em ambos os sistemas em geral, pois apresentaram maior número de picos identificáveis e melhor resolução dos espectros.

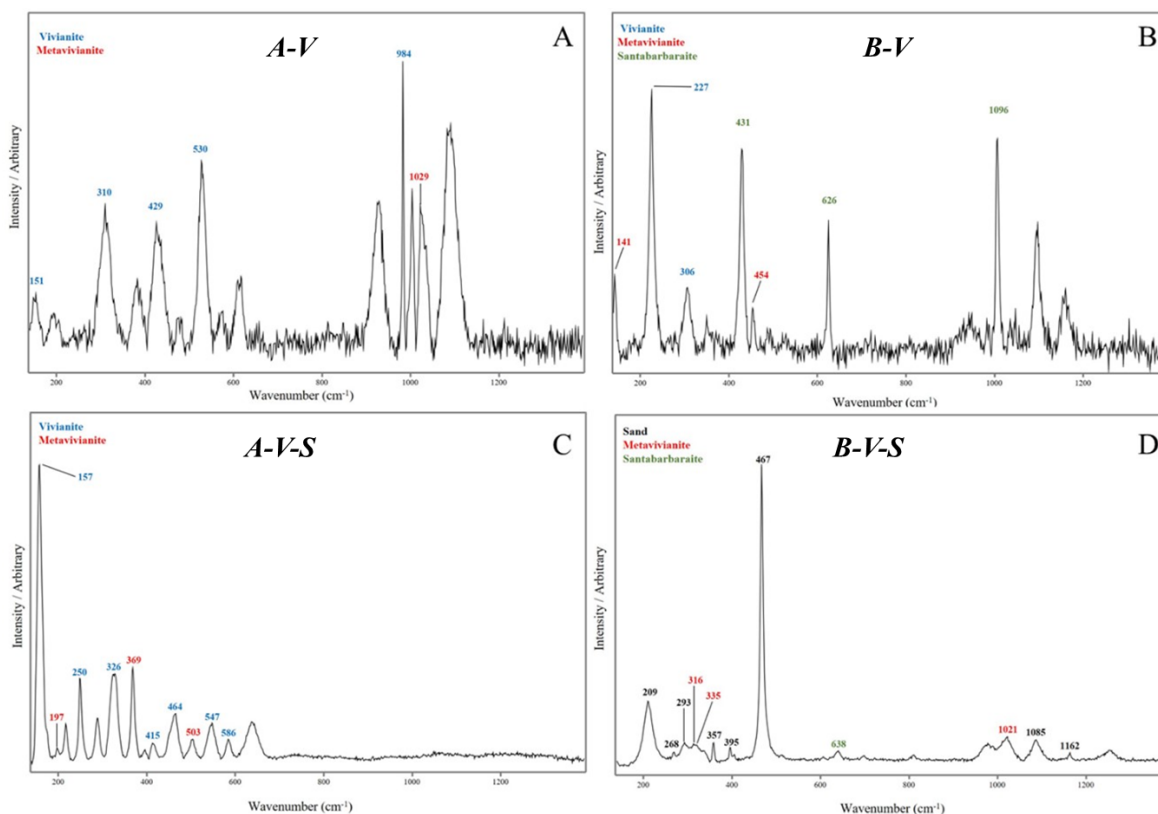


Figura 8. Espectros obtidos da condição dinâmica sem adição de sedimentos e/ou apenas com a areia (A) obtidos das seguintes variáveis **a)** A-V pt. 9; **b)** B-V pt.14; **c)** A-V-S pt. 16; e **d)** B-V-S pt.18.

Quanto às condições dinâmicas, obtivemos resultados promissores em sistemas sem Montmorilonita. Para A-V e para A-V-S (Figura 8a e c), detectamos picos em 197, 369, 503 cm^{-1} e 1029 cm^{-1} , atribuídos à Metavivianita, uma forma parcialmente oxidada de Vivianita que ocorre abioticamente devido à característica fotooxidante do próprio mineral. (PRATESI *et al* 2003). A Vivianita utilizada no experimento está ligeiramente diferente do ideal, pois já estava parcialmente oxidado antes do início, fato este que foi identificado por análises prévias. A fórmula da composição química da Vivianita é $\text{Fe}^{2+}_{2.202}\text{Fe}^{3+}_{0.798}(\text{PO}_4)_2(\text{OH})_{0.798} \cdot 7.063\text{H}_2\text{O}$. Foi demonstrada uma tendência nos tratamentos bióticos B-V e B-V-A, do aparecimento de um maior número de picos característicos desta forma oxidada. Além da maior dificuldade de identificar alguns deles quando tínhamos areia na variável. Em B-V, temos os picos deste mineral em 141 e 454 cm^{-1} , enquanto em B-V-S, eles são apresentados em 316, 335 e 1021 cm^{-1} (Figura 8b e d).

Picos compatíveis com Santabarbaraita foram detectados em B-V (431, 626 e 1096 cm^{-1}) e em B-V-S (638 cm^{-1}). Como este tipo de fosfato de ferro não foi detectado nos tratamentos abióticos, podemos deduzir a participação de *A. ferrooxidans* na síntese deste mineral. A santabarbaraita é o resultado de uma oxidação completa do mineral Vivianita

através de um processo de substituição de Fe^{2+} por Fe^{3+} , sendo um mineral amorfo com semelhanças ópticas com a Vivianita. (FROST *et al* 2016) A identificação dos picos atribuídos à Santabarbaraita e outros minerais como Vivianita, Metavivianita e quartzo (areia) para condições dinâmicas são mostradas na **Tabela 4**.

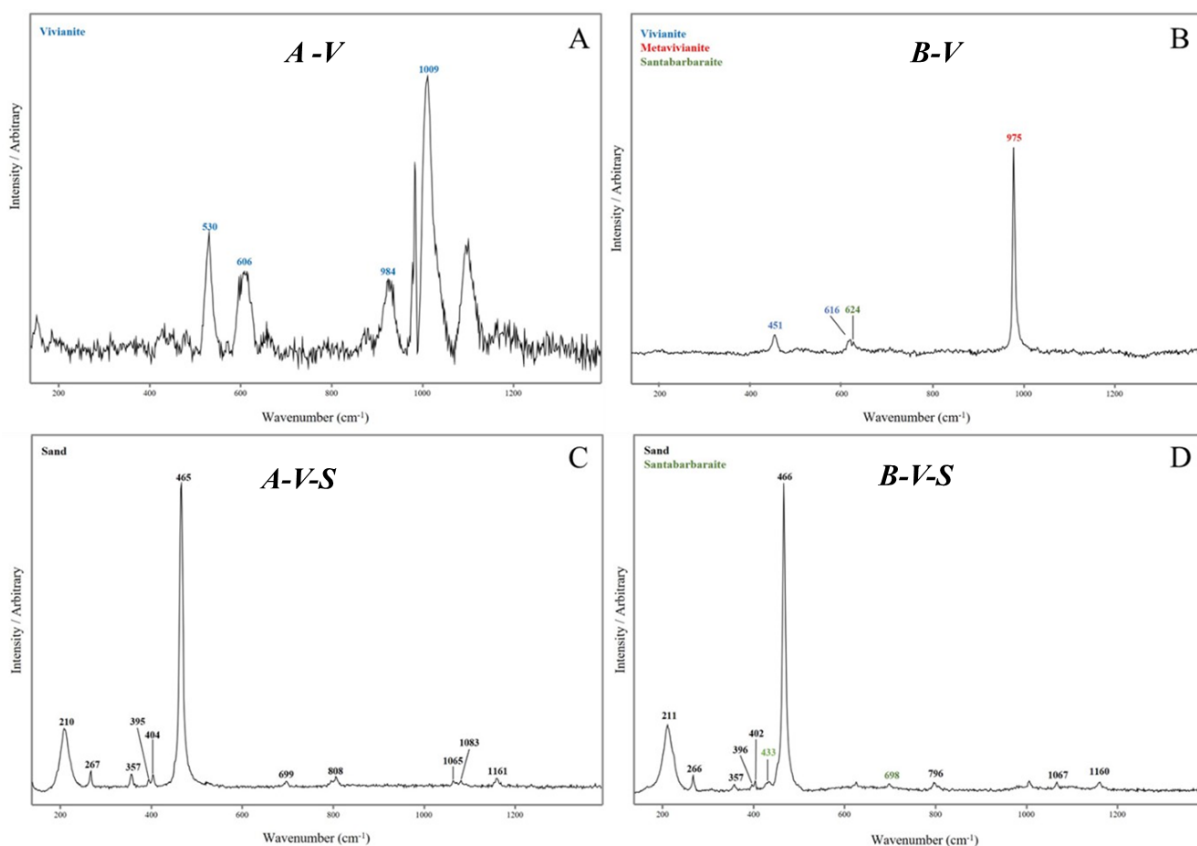


Figura 9. Espectros obtidos da condição estática sem adição de sedimentos e/ou apenas com a areia (A) obtidos das seguintes variáveis **a)** A-V pt. 18; **b)** B-V pt.18; **c)** A-V-S pt. 13; e **d)** B-V-S pt.3.

Em condições estáticas, foi identificado um número menor de picos em comparação com os resultados das condições dinâmicas (**Figura 8a, b, c e d**). Foi observado o mesmo padrão de maior número de picos de minerais oxidados em sistemas bióticos, em comparação aos abióticos. Porém, na variável B-V, é evidente a presença de Metavivianita, em 963 e 1026 cm^{-1} , e Santabarbaraita, em 319, 433 e 640 cm^{-1} . Em B-V-S, como sedimento único, foram detectados picos em 211, 266, 357, 396, 402, 466, 796, 1067 e 1160 cm^{-1} correspondendo apenas ao quartzo, e 433 e 640 cm^{-1} correspondendo para Santabarbaraita. A identificação e atribuição dos picos para a condição estática são mostradas na **Tabela 5**.

Todos os picos identificados neste trabalho estão descritos no **Anexo 7**.

4.3 MEV/EDS

Os resultados mostram que algumas características podem ser consideradas como um indício de atividade microbológicas, mas apesar deste indicativo, não foi possível obter muitas informações morfológicas concretas que comprovassem biogenicidade. Porém todas as imagens obtidas podem ser visualizadas no **Anexo 8** para a condição dinâmica e no **Anexo 9** para a condição estática.

A quantificação dos elementos químicos através da análise de EDS de cada amostra está disposta no **Anexo 10** para a condição dinâmica e no **Anexo 11** para a condição estática, e os mapas para a localização e identificação deles estão dispostos no **Anexo 12 e 13**, para ambas as condições respectivamente.

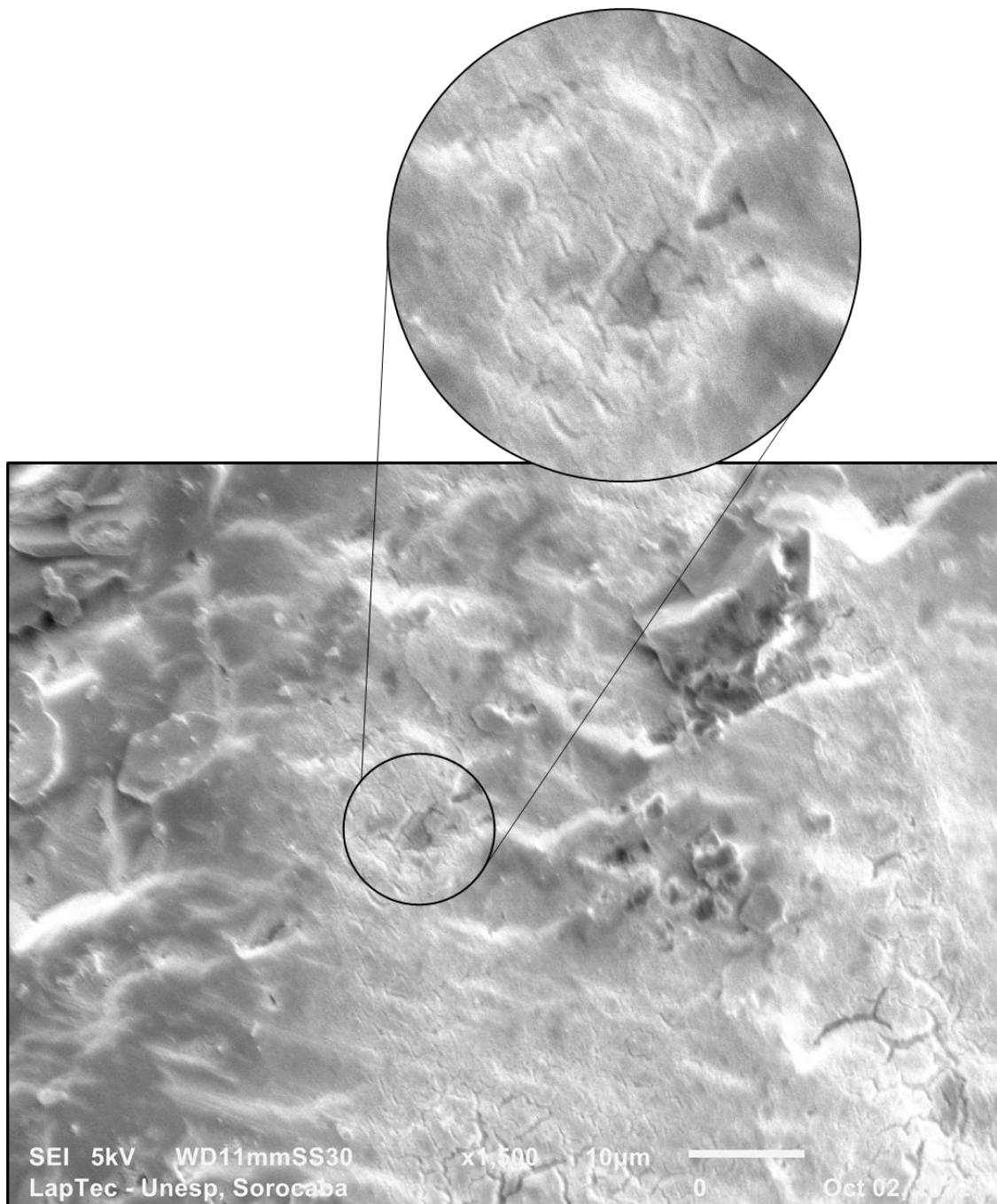


Figura 10. Imagem MEV (Dinâmica) B-V-S Área 4- honeycombs aparentes.

Na parte superior da **Figura 10** pode-se observar o aparecimento de estruturas similares a *honeycomb*. A *honeycomb* é uma estrutura geométrica semelhante a um favo de mel criado por algumas espécies de bactérias. Essa estrutura peculiar é uma forma de organização microbiana que pode ser encontrada em várias situações naturais, especialmente em ambientes aquáticos, onde as bactérias precisam se agrupar e se proteger. Ela geralmente é formada quando as bactérias estão enfrentando condições adversas, como escassez de nutrientes. (PAERL & STEPPE, 2003; HUISMAN *et al* 2018).

Na mesma imagem (setas amarelas) observamos micro gretas de dessecação que podem estar relacionadas a crescimento de biofilmes.

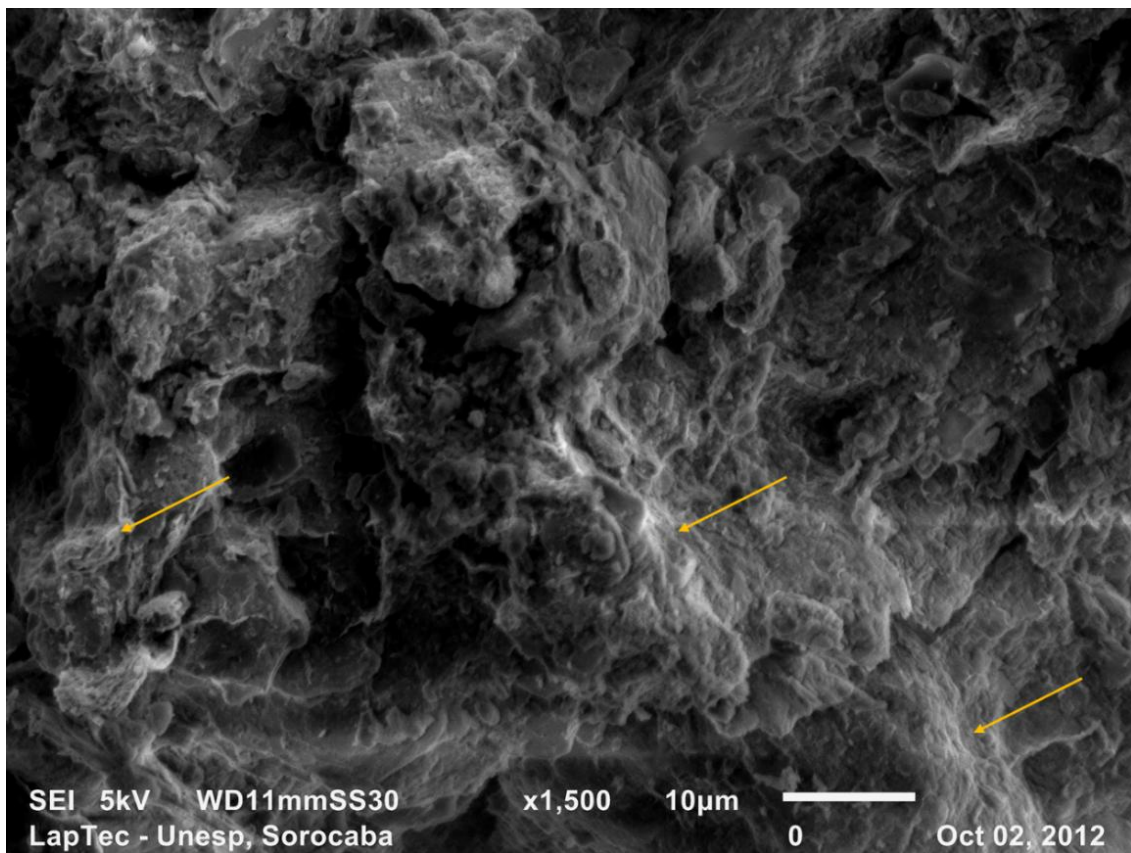


Figura 11. Imagem MEV (Dinâmica) B-V-M+S Área 4 – Possíveis estruturas de filamentos e biofilmes.

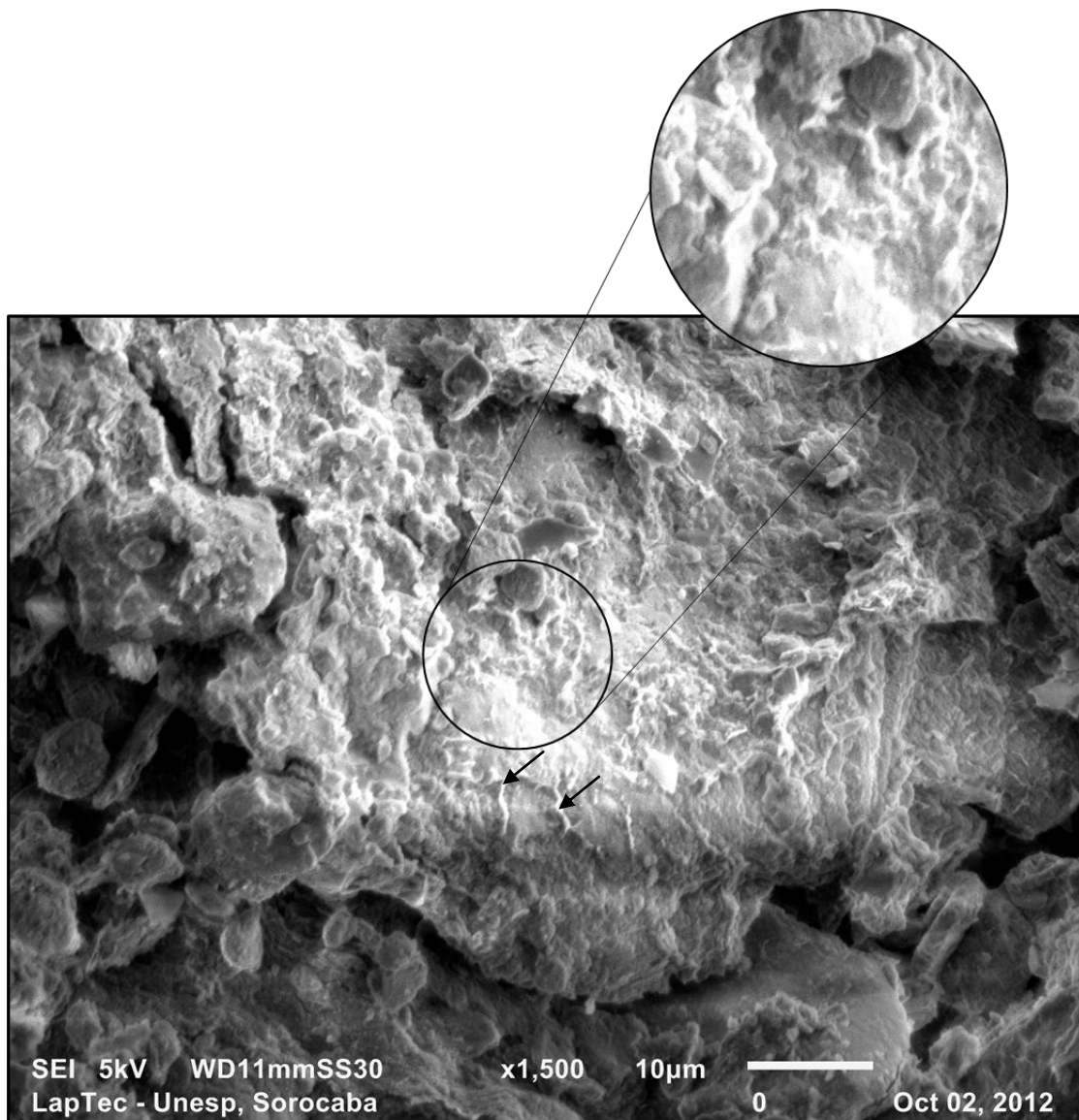


Figura 12. Imagem MEV (Dinâmica) B-V-M+S - Área 5 Possíveis estruturas de filamentos e biofilmes.

Estas estruturas podem ser esteiras microbianas em forma de filamentos e biofilmes que crescem na superfície da areia demonstradas na figura 11 e 12 (LYBRAND *et al* 2019). Os filamentos microbianos podem aderir a superfícies sólidas, como rochas, sedimentos e substratos biológicos. Isso os torna fundamentais na formação de biofilmes e na estabilização de estruturas microbianas (DECHO, 2000).

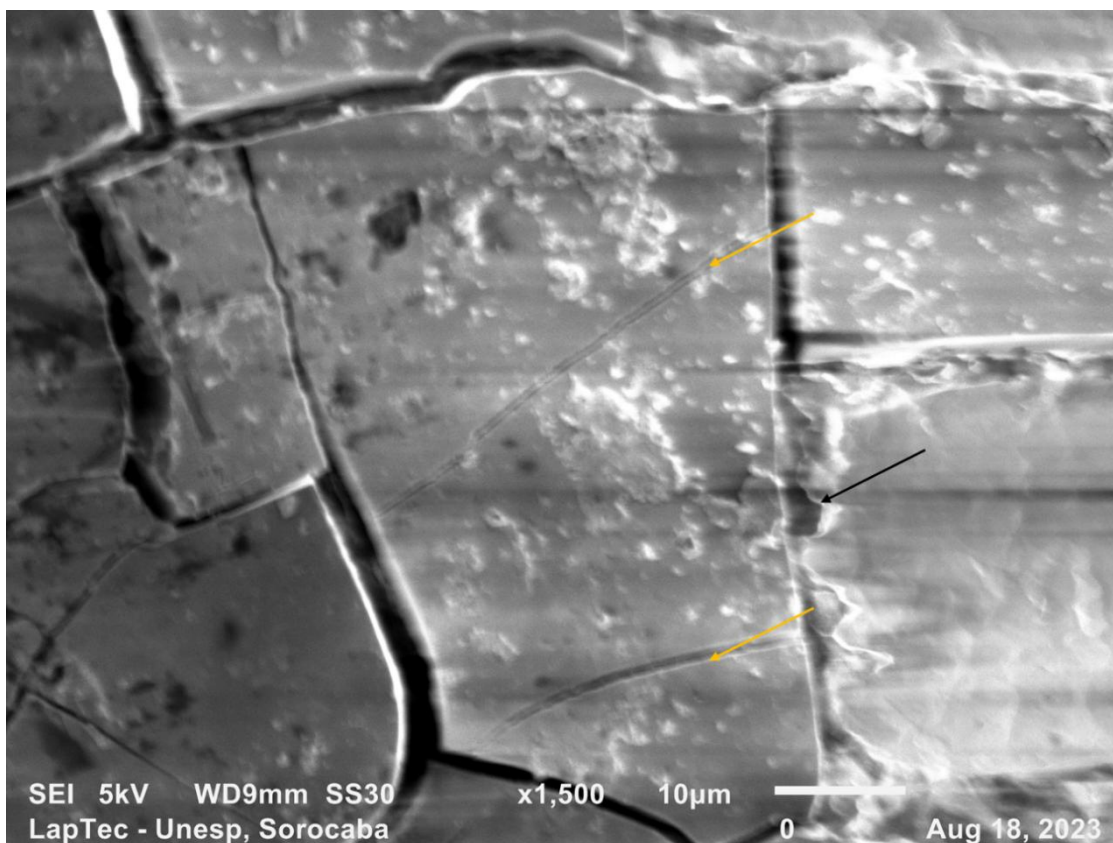


Figura 13. Imagem MEV (Estático) B-V-S pt.5

O que se pode observar na **Figura 13** (setas amarelas) é uma possível estrutura que deixada pelo “rolamento de bactérias” em gretas de dessecação de um possível biofilme. Essas trilhas são o resultado da modificação do substrato pelas bactérias à medida que se movem, seja por secreção de substâncias viscosas, produção de enzimas ou outras adaptações metabólicas que alteram as propriedades do substrato (SCHARF, *et al.*, 2016).

Após o processamento dos dados por meio de análise estatística, não foi possível identificar qualquer padrão ou diferença específica. É relevante mencionar que, nos sistemas Dinâmico e Estático (considerando Controle, Abiótico e Biótico), foram constatadas diferenças significativas somente nos elementos O, Si e Fe. Essa discrepância pode ser atribuída exclusivamente à adição ou remoção de sedimentos e à presença da Vivianita como variáveis influentes. Este resultado está em consonância com as expectativas. Por outro lado, no que diz respeito aos demais elementos que poderiam indicar traços de biogenicidade, como Ca, N, Na, Mg, Al, P, S e K, conforme descrito por (ROMPELOTTO, 2012).

4.4 FT-IR

É importante informar que durante o processo de medição, nos deparamos com algumas variáveis que possuíam areia (A-A, A-M+A, A-V-A, B-V-A, A-V-M+A e B-V-M+A) que não foi possível realizar a obtenção do espectro devido às limitações do equipamento utilizado. Submetido às tentativas de medição dessas variáveis, correu o risco de danificar sua lente, o que poderia afetar negativamente sua funcionalidade. Portanto, foi necessário tomar a decisão de não realizar essas medições específicas no momento. Em vez disso, estamos considerando a possibilidade de realizar o pastilhamento das amostras relevantes como uma alternativa viável para futuras análises.

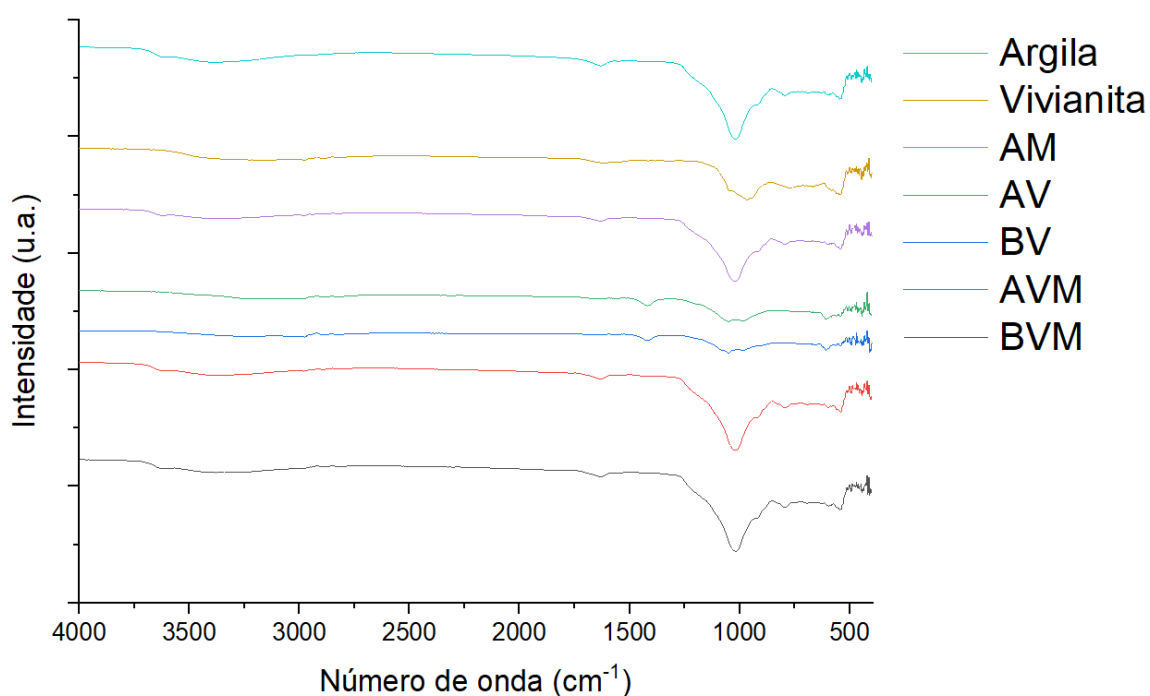


Figura 14. Espectros FT-IR correspondentes à condição Dinâmica.

Em ambas as condições existem um padrão de aparecimento de bandas em 1640 e em 1030 cm^{-1} é exclusivamente evidenciado nas amostras que continham a Montmorilonita e onde ela estava pura, A-M, A-V-M e B-V-M. Isso é identificado como o de estiramento de OH retida na da folha octaédrica característica da deste argilomineral e em toda água (H_2O) adsorvida. (TYAGI et al., 2006)

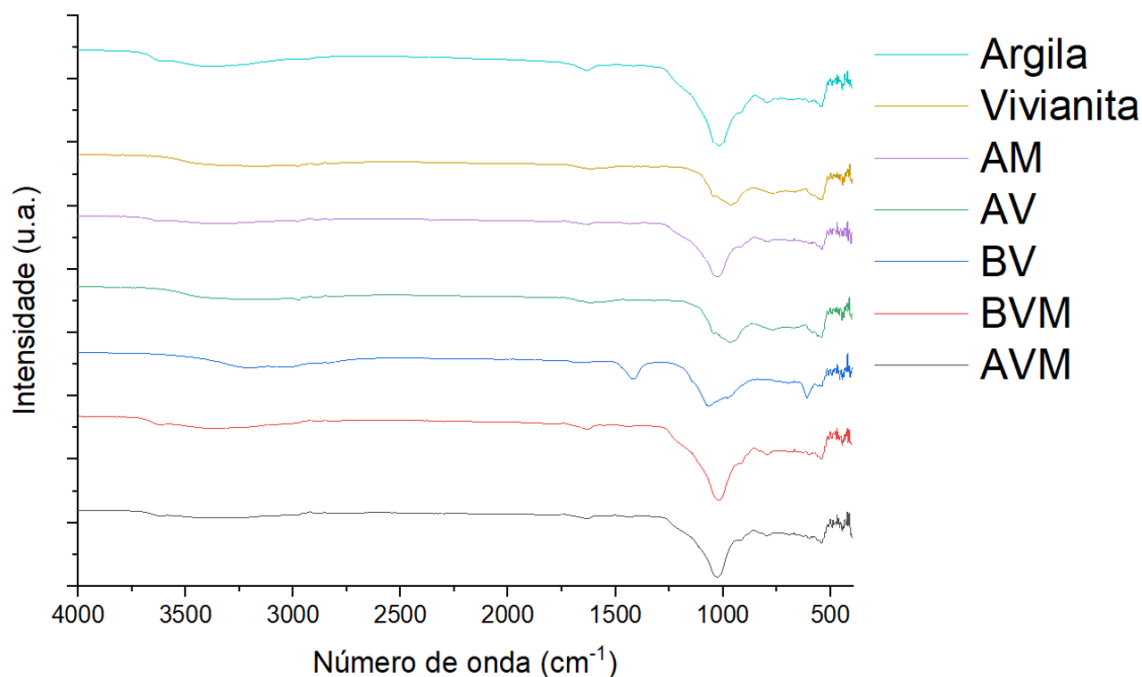


Figura 15. Espectros FT-IR correspondentes à condição Estática.

A respeito da banda observada em 1420 cm^{-1} nas variáveis A-V e B-V em ambos os sistemas, a suposição mais plausível é que esta esteja relacionada à presença de sais de amônio no meio de cultura, conforme discutido por (PASECHNIK *et al.*, 2018). É importante notar que, nas variáveis em que a Montmorilonita está presente, esse pico não é evidenciado, o que pode ser explicado pela capacidade de troca iônica deste argilomineral, que favorece a entrada de íons positivos, como os cátions, em sua estrutura. Esta tendência foi consistentemente observada ao longo de todas as fases do experimento (TYAGI *et al.*, 2006).

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Concluimos que para as análises de monitoramento do crescimento do *A. ferrooxidans* pode ser verificado pela oxidação do Fe^{2+} e a produção e acúmulo de Fe^{3+} total nos cultivos. Verificou-se o crescimento dos organismos na cultura biótica sem sedimento, observando a redução da concentração do Fe^{2+} inicial em solução e o aumento do Fe^{3+} o esperado e já descrito na literatura. Em amostra com areia foi observado um padrão de crescimento semelhante. Isso sugere que a areia se comporta como um substrato inerte, não afetando o crescimento do *A. ferrooxidans*. Contudo, as culturas com a Montmorillonita (puras ou misturadas com areia) apresentaram alteração no pH, que alcançou a faixa entre 2 a 3. Nas condições dos substratos estavam misturados houve uma demonstração sutil do crescimento, entretanto, nas condições em que a Montmorillonita era o único sedimento não foi possível

observar o crescimento. Em todas as condições em que o argilomineral estava presente, observou-se uma tendência do sequestro do Fe^{3+} da solução, contudo, efeito semelhante foi observado para o Fe^{2+} . A hipótese mais aceita para este fenômeno foi explicada pela capacidade de troca iônica deste argilomineral e pode ser observada para todas as outras técnicas.

Os dados de Espectroscopia micro-Raman mostram indicam picos compatíveis com a um novo fosfato de ferro, que pode ser atribuído ao mineral Santabarbaraita (FROST *et al* 2016). Esta observação é evidente tanto em condições estáticas quanto dinâmicas. Isto representa a primeira observação da formação de um mineral fosfato Fe^{3+} associado a *A. ferrooxidans*, embora sua síntese por outros microrganismos tenha sido relatada anteriormente (STEGBAUER *et al* 2021).

Além disso, as análises demonstraram que a fluorescência gerada pela Montmorilonita dificulta a detecção Raman de bioassinaturas e sinais de outros compostos de importância astrobiológica (LIU *et al* 2020). Isto sublinha a importância de reconhecer e abordar as limitações técnico-metodológicas e explorar o uso de técnicas complementares para avançar a investigação em astrobiologia.

Os resultados de MEV/EDS mostram que algumas características podem ser consideradas como um indício da atividade microbiológicas, tais como a possível presença de *honeycomb*, estruturas de rolamento de bactérias e de filamentos microbianos, mas mantendo certo grau de criteriosidade, apesar destes indicativos, não se pode afirmar que temos dados morfológicos que sejam concretos para comprovar a biogenicidade.

A capacidade de troca iônica da Montmorilonita foi evidenciada em todas as técnicas de caracterização utilizadas. Isso incluiu análises preliminares, como aquelas baseadas na medição de pH e espectroscopia UV-Vis, bem como nas análises mais detalhadas envolvendo espectroscopia de micro-Raman e espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR). Em contrapartida, a areia demonstrou ser um sedimento inerte em todas as caracterizações, com exceção da análise por FT-IR, na qual sua viabilidade para análise foi limitada. A espectroscopia de micro-Raman destacou a ocorrência da substituição bióticas nos minerais, fornecendo indícios significativos de atividade microbiológica. Além disso, a análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV) corroborou esses indícios, mostrando evidências concretas de atividade microbiana. No entanto, as análises de mapeamento por espectroscopia de energia dispersiva (EDS) não produziram resultados relevantes ou informativos para o estudo em questão.

Entende-se que os dados de Fluorescência de Raio-X poderão fornecer mais indicativos que permitam uma conclusão mais clara. A complementaridade de técnicas espectroscópicas desempenha um papel crucial na astrobiologia, uma vez que permite uma abordagem abrangente na busca por vida e nas condições que a suportam em ambientes extraterrestres. A combinação de várias técnicas espectroscópicas fornece uma visão mais completa e precisa, aumentando nossa capacidade de identificar possíveis indicadores de vida e entender as condições habitáveis em outros planetas e luas.

6. REFERÊNCIAS

BAUERMEISTER, *et al.*, Growth of the acidophilic iron-sulfur bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans* under Mars-like geochemical conditions. *Planetary and Space Science*, v. 98, p. 205-215, 2014.

BENNETT K. A. *et al.* Results from the Curiosity Rover's Traverse Through the Clay-Bearing Glen Torridon Region in Gale Crater, American Geophysical Union, 2019.

BERG JM, *et al.*, *Biochemistry*. 5th edition. W H Freeman. 2002.

BIBRING, *et al.* Global Mineralogical and Aqueous Mars History Derived from OMEGA/Mars Express Data. *Jean-Pierre Bibring Science* 312, 400, 2006.

BISHOP *et al.* Characterization of Minerals and Biogeochemical Markers on Mars: A Raman and IR Spectroscopic Study of Montmorillonite. *Journal of Raman Spectroscopy*, 2004.

BROCK. *Thermophilic Microorganisms and Life at High Temperatures*. Springer-Verlag, New York, 1978.

BROWER. Micro Raman spectroscopic investigations of mineral assemblages parallel to bedding laminae in 2.9 Ga sandstones of the Pongola Supergroup, South Africa: *Journal of Raman Spectroscopy*, v. 42, p. 1626–1633, 2011.

CALLEFO, *et al.* Evaluating Biogenicity on the Geological Record With Synchrotron-Based Techniques. *Frontiers In Microbiology*, v. 10, p. 1-12, 11, 2019.

CARR & HEAD. Geologic history of Mars. *Earth And Planetary Science Letters*, v. 294, n. 3-4, p. 185-203, 2010.

- CHEVRIER *et al.* Early geochemical environment of Mars as determined from thermodynamics of phyllosilicates, *Nature* volume 448, pages 60–63, 2007.
- CHUKANOV, *et al.* Metavivianite, $\text{Fe}^{2+} \text{Fe}^{3+} 2 (\text{PO}_4) 2 (\text{OH}) 2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: New Data and Formula Revision. *Mineralogical Magazine*, 76 (3), 725–741, 2012.
- CHRISTENSEN, *et al.*, Mineralogy at Meridiani Planum from the Mini-TES Experimento on the Opportunity Rover. *Science*, v. 306, p. 1733-1739, 2004.
- CUADROS, *et al.*, Mineral precipitation on modern siliciclastic tidal flats colonized by microbial mats: *Sedimentary Geology*, v. 271–272, p. 58–66, 2017.
- DECHO, Microbial biofilms in intertidal systems: an overview: *Continental Shelf Research*, v. 20, p. 1257–1273, 2000.
- DYAR, *et al.*, Mössbauer parameters of iron in phosphate minerals: Implications for interpretation of martian data, *American Mineralogist*, v. 99, p. 914-924, 2014.
- EBERL, *et al.*, Clay mineral formation and transformation in rocks and soils. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. A* 311, 241–257, 1984.
- EHLMANN, *et al.*, Clay minerals in delta deposits and organic preservation potential on Mars. *Nat. Geosci.* 1, 355–358. 2008a.
- EHLMANN, *et al.*, Orbital Identification of Carbonate-Bearing Rocks on Mars. *Science* 322, 1828–1832. 2008b.
- EHLMANN, *et al.*, Identification of hydrated silicate minerals on Mars using MRO-CRISM: Geologic context near Nili Fossae and implications for aqueous alteration. *J. Geophys.* 2009.
- FASSETT & HEAD, Valley network-fed, open-basin lakes on Mars: Distribution and implications for Noachian surface and subsurface hydrology. *Icarus* 198, 37–56. 2008.
- FASSETT & HEAD, Fluvial sedimentary deposits on Mars: Ancient deltas in a crater lake in the Nili Fossae region. *Geophys. Res. Lett.* 32, L14201. 2005.
- FERRIS *et al.*, Bacteria as Nucleation Sites for Authigenic Minerals in a metal-contaminated lake sediment. *Chem. Geol.* 63: 225-32, 1987.

FROST *et al.*, Raman and Infrared Spectroscopic Study of the Vivianite-Group Phosphates Vivianite, Baricite and Bobierrite. *Mineralogical Magazine*, 66 (6), 1063–1073, 2002.

FROST *et al.*, Raman Spectroscopic Study of the Vivianite Arsenate Minerals. *Journal of Raman Spectroscopy* 34 (10), 751–759, 2003.

FROST *et al.*, Raman Spectroscopic Study of Vivianites of Different Origins. *Neues Jahrbuch für Mineralogie, Monatshefte*, 2004.

FROST *et al.*, Thermogravimetric, Scanning Electron Microscope and Vibrational Spectroscopic Study of the Phosphate Mineral Santabarbarite from Santa Barbara Mine, Tuscany, Italy. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* 2016.

GARCÍA-GONZÁLEZ, *et al.*, Evaluation of Fe³⁺ Fixation into Montmorillonite Clay and Its Application in the Polymerization of Ethylenedioxythiophene. *Royal Society of Chemistry*. 2016.

GOMES *et al.*, Paleometry as a key tool to deal with paleobiological and astrobiological issues: Some contributions and reflections on the Brazilian fossil record, *International Journal of Astrobiology*, 2019.

GOUDGE, *et al.*, Assessing the Mineralogy of the Watershed and Fan Deposits of the Jezero Crater Paleolake System, Mars. *J. Geophys. Res. Planets* 2014 JE 004782, 2015.

GOUDGE. Sedimentological evidence for a deltaic origin of the western fan deposit in Jezero crater, Mars and implications for future exploration. *Earth Planet. Sci. Lett.* 458, 357– 365, 2017.

GOLDSTEIN, *et al.*, *Scanning Electron Microscopy and X-ray Microanalysis*. Springer. 2017.

GOLUBIC, Cyanobacteria: architects of sedimentary structures, in Riding, R.E., and Awramik, S.M., eds., *Microbial Sediments*: Berlin, Springer-Verlag, p. 57–67, 2000.

GRIFFITHS & DE HASETH. *Fourier Transform Infrared Spectrometry*. John Wiley & Sons. 2007.

GRONSTAL, A. *et al.*, Laboratory experiments on the weathering of iron meteorite and carbonaceous chondrites by iron-oxidizing bacteria. *Meteoritics & Planetary Science* 44, n. 2, 233-247. 2009.

HOKE & HYNEK, Roaming zones of precipitation on ancient Mars as recorded in valley networks. *J. Geophys. Res.* 114. 2009.

HSU, *et al.*, Authigenesis of Vivianite as Influenced by Methane-Induced Sulfidization in Cold-Seep Sediments off Southwestern Taiwan. *Journal Asian Earth Science*, 89, 88–97, 2014.

HUISMAN *et al.*, Cyanobacterial blooms. *Nature Reviews Microbiology*, 16(8), 471-483. 2018.

HYNEK, B. *et al.* Sulfur Cycling and Mass Balance at Meridiani, Mars. *Geophysical Research Letters*, v. 46, n. 21, p. 11728-11737, 2019.

JAVAUX, E. J. Questions about the oldest fossils: a contemporary view of the oldest putative biological remains. *Comptes Rendus Palevol*, 16(1-2), 11-21, 2017.

JAVAUX. Challenges in evidencing the earliest traces of life. *Nature*, v. 572, n. 7770, p. 451-460, 21, 2019.

JIMENEZ-LOPEZ, *et al.*, Concepcion Magnetite as a prokaryotic biomarker: a review. *Journal Of Geophysical Research: Biogeosciences*, v. 115, n. 2, p. 1-19, 22. 2010.

KLINGELHÖFER, *et al.*, Jarosite and Hematite at Meridiani Planum from Opportunity's Mössbauer Spectrometer. *Science*, v.306, p. 1740-1745, 2004.

KUMP, *et al.*, Chemical Weathering, Atmospheric CO₂, and Climate, *Annual Review of Earth and Planetary Sciences*, Vol. 28:611-667, 2000.

LYBRAND *et al.*, A coupled microscopy approach to assess the nano-landscape of weathering, *Scientific Reports* | (2019) 9:5377. 2019.

LIU, *et al.* Laboratory Raman and VNIR Spectroscopic Studies of Jarosite and Other Secondary Mineral Mixtures Relevant to Mars. *Journal of Raman Spectroscopy*, 2020.

MARAIS, *et al.*, Remote Sensing of Planetary Properties and Biosignatures on Extrasolar Terrestrial Planets. *Astrobiology*, v. 2, n. 2, p. 153-181, 2002.

- MERRIMAN, *et al.*, Clay minerals and sedimentary basin history, *European Journal of Mineralogy* 17 (1): 7–20. 2005
- MORRIS, *et al.*, Identification of carbonate-rich outcrops on Mars by the spirit rover. *Science*, vol. 329, no. 5990, pp. 421-424. 2010.
- NASCIMENTO-DIAS, *et al.*, The Study of Mineralogy in the Geological Evolution of the Surface of Mars, *Boletim de Geociências paraence*, vol. 80, p. 70-87, 2022.
- NELSON & COX., *Lehninger Principles of Biochemistry*. 3rd edition. Worth Publishers. 2000
- OGORODOVA, *et al.*, I. Enthalpy of Formation of Natural Hydrated Iron Phosphate: Vivianite. *Journal of Chemical Thermodynamics*, 110, 193–200. 2017.
- OROSEI *et al.*, Radar evidence of subglacial liquid water on Mars, *SCIENCE*, Vol 361, Issue 6401, pp. 490-49325. 2018.
- PAERL & STEPPE. New Nuisance Microbial "Blooms": The Dreaded "CyanoHABS". *Harmful Algae*, 2(2), 367-367. 2003.
- PASECHNIK, *et al.*, Polymorphism and properties of ammonium scandium sulfate $(\text{NH}_4)_3\text{Sc}(\text{SO}_4)_3$: new intermediate compound in scandium production, *CrystEngComm*, 2018.
- PIRIOU & POULLEN. Raman Study of Vivianite. *Journal of Raman Spectroscopy*, 1984.
- PRATESI, *et al.* Santabarbaraite: A New Amorphous Phosphate Mineral. *European Journal of Mineralogy*. 2003
- ROMPELOTTO, P. H., The chemistry of life as we do not know it, *Revisão, Quím. Nova* 35, (8), 2012.
- RONCA, L. B. An introduction to the geology of Mars. *Proceedings Of The Geologists' Association*, [S.L.], v. 81, n. 1, p. 111-128, jan. 1970.
- SAKSENA. Analysis of the Raman and Infra-Red Spectra of α -Quartz. *Proceeding Indian Academy of Sciences (Mathematical and Science)*. 1940.

- SALESE, *et al.* A sedimentary origin for intercrater plains north of the Hellas basin: implications for climate conditions and erosion rates on early Mars. *Journal Of Geophysical Research: Planets*, [S.L.], v. 121, n. 11, p. 2239-2267, 2016.
- SANTOS, *et al.*, Raman Spectroscopy Application in the Characterization of Pertaining Minerals of a Geocollection. *Química Nova*. 2019.
- SCHARF, *et al.*, Chemotaxis signaling systems in model beneficial plant–bacteria associations *Plant Molecular Biology* volume 90, pages 549–559. 2016.
- SCHON *et al.*, An overfilled lacustrine system and progradational delta in Jezero crater, Mars: Implications for Noachian climate. *Planet. Space Sci.* 67, 28–45. 2012.
- SCHOPF, *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.
- SCHOPF, *et al.* The Fossil Record of Cyanobacteria. *Ecology of Cyanobacteria II* pp 15–36. 2012.
- SILVA, *et al.*, Application of capillary electrophoresis combined with conductometric and UV detection to monitor meteorite simulant bioleaching by *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Electrophoresis* 39, 2898-2905. 2018
- SILVA, *et al.*, Blue food for life on the Red Planet: Vivianite as a substrate for chemolithoautotrophic organisms on Mars. *Astrobiology Graduates in Europe*. 2020.
- SKINNER & JAHREN; Biomineralization. In: Schlesinger, W.H., Ed., *Treatise on Geochemistry*, Elsevier, 117-184. 2003.
- SMITH & BANDFIELD. Geologia de depósitos contendo quartzo e sílica hidratada perto da Cratera Antoniadi, Marte. *Journal of Geophysical Research: Planets*, 117 (E6), n / a – n / a. 2012.
- Smith & Dent. *Modern Raman Spectroscopy - A Practical Approach*. John Wiley & Sons. 2005.
- SOLTERMANN, *et al.* Fe(II) Uptake on Natural Montmorillonites. I. Macroscopic and Spectroscopic Characterization. *Environmental Science & Technology*, 2014.

STEIN, *et al.*, Desiccation cracks provide evidence of lake drying on Mars, Sutton Island member, Murray formation, Gale Crater. *Geology*, [S.L.], v. 46, n. 6, p. 515- 518, 16 abr. 2018.

STEGBAUER, *et al.* Polyamorphism in the Chiton Tooth: From a New Biomineral to Inks for Additive Manufacturing. *Proceedings of the Nacional Academy Sciences*. 2021.

TAYLOR *et al.*, Early Diagenetic Vivianite $[\text{Fe}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}]$ in a Contaminated Freshwater Sediment and Insights into Zinc Uptake: A μ -EXAFS, μ -XANES and Raman Study. *Applied Geochemistry*, 23 (6), 1623–1633. 2008.

TUOVINEN & KELLY. Studies on the growth of *Thiobacillus ferrooxidans*, *Archiv für Mikrobiologie* volume 88, pages285–298.1973.

TYAGI B, *et al.*, Determination of structural modification in acid activated montmorillonite clay by FT-IR spectroscopy. *Spectrochim Acta A* 64:273–278, 2006.

VICENZI *et al.*, AbGranCon 2019 – Salt Lake City. Siderite as an unexplored growth substrate for the extreme acidophilic bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans*, São Paulo, p. 29. 2019.

WANG, *et al.* Understanding the Raman Spectral Features of Phyllosilicates. *Journal of Raman Spectroscopy*, 2015

WEINER & DOVE. An Overview of Biomineralization Processes and the Problem of the Vital Effect. *Reviews In Mineralogy And Geochemistry*, [S.L.], v. 54, n. 1, p. 1-29, 1 jan. 2003

WILLIFORD. The Mars2020 Rover - a progress report, in: *Mars: From Habitability to Life*. 2018.