

Universidade Federal de  
Santa Catarina

Curso de Ciências  
Biológicas

Campus Universitário  
Trindade

Florianópolis- SC

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado  
ao Curso de Ciências Biológicas,  
Departamento de Microbiologia, Imunologia e  
Parasitologia do Centro de Ciências Biológicas  
da Universidade Federal de Santa Catarina,  
como requisito parcial para obtenção do grau  
de bacharel no Curso Ciências Biológicas

Orientador: Rubens Tadeu Duarte Delgado

Florianópolis, 2019

Desenvolvimento de metodologias para descontaminação de testemunhos  
de gelo para análises de Ecologia Microbiana e Astrobiologia  
Camila Tomazini Kinasz

Desenvolvimento de  
metodologias para  
descontaminação de  
testemunhos de gelo para  
análises de ecologia Microbiana  
e astrobiologia  
Camila Tomazini Kinasz

Orientador:

Rubens Tadeu Delgado  
Duarte

Camila Tomazini Kinasz

**Desenvolvimento de metodologias para descontaminação de  
testemunhos de gelo para análises de Ecologia Microbiana e  
Astrobiologia**

Trabalho Conclusão do Curso de  
Graduação em Ciências Biológicas do  
Centro de Ciências Biológicas da  
Universidade Federal de Santa Catarina  
como requisito para a obtenção do Título  
de Bacharela em Ciências Biológicas  
Orientador: Prof. Dr. Rubens T. D. Duarte

Florianópolis, 2019



## Ficha de identificação da obra

Kinasz, Camila Tomazini  
Desenvolvimento de metodologias para  
descontaminação de testemunhos de gelo para análises  
de Ecologia Microbiana e Astrobiologia / Camila  
Tomazini Kinasz ; orientador, Rubens Tadeu Delgado  
Duarte , 2019.  
48 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -  
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de  
Ciências Biológicas, Graduação em Ciências Biológicas,  
Florianópolis, 2019.

Inclui referências.

1. Ciências Biológicas. 2. Microbiologia. 3.  
Descontaminacao de gelo. 4. Astrobiologia. 5.  
Ecologia Microbiana. I. , Rubens Tadeu Delgado  
Duarte. II. Universidade Federal de Santa Catarina.  
Graduação em Ciências Biológicas. III. Título.

Camila Tomazini Kinasz

**Desenvolvimento de metodologias para descontaminação de  
testemunhos de gelo para análises de Ecologia Microbiana e  
Astrobiologia**

Florianópolis, 03 de julho de 2019.

---

Prof. Dr. Carlos Roberto Zanetti  
Coordenador do Curso

**Banca Examinadora:**

---

Prof. Dr. Rubens Tadeu Delgado Duarte  
Orientador  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof. Dr. Márcio José Rossi  
Membro Titular  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Joana Camila Lopes  
Membro Titular  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof. Dr. Admir José Giachini  
Membro Suplente  
Universidade Federal de Santa Catarina

Dedico este trabalho a João Alves.  
Amor à primeira vista.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que contribuíram de qualquer forma com a realização deste trabalho, e com a minha formação pessoal e acadêmica. Agradeço a orientação do professor Rubens Tadeu Delgado Duarte, o qual considero uma inspiração para vários aspectos da minha vida. A todos do Laboratório de Microrganismos e Processos Biotecnológicos (LAMPB), desculpem pelos vários indivíduos de *Drosophila* alimentados à ágar nutriente, e obrigado pela manutenção do laboratório e amizade. Aos integrantes do Laboratório de Ecologia Molecular e Extremófilos (LEMEx), pelas conversas interessantes, auxílios, entre outras coisas. Agradeço principalmente a Joana, por aceitar participar da minha banca, e a Bruna pelo cafezinho. Ao CNPq pela concessão da bolsa PIBIC durante a realização deste trabalho. À Universidade Federal de Santa Catarina, aos seus doces docentes e aos colegas discentes. Obrigada Utah por me ensinar a amar a neve e o gelo. Agradeço ao meu companheiro João, pela paciência, e por todo o ensinamento de ciências biológicas e humanas. Agradeço também pelos seus dois melhores gametas, e a mim mesma pela gestação dessas vidas. Cora e Tetei vocês dão significado à minha vida. À minha família e amigos, principalmente à Sirlei “Seléia” por toda a ajuda feita com amor. Agradeço a mim pela minha dedicação e determinação. E a todas as mulheres cientistas que me antecederam, obrigada pela sua contribuição, inspiração e por abrirem as portas para que eu pudesse estar onde estou.

*“Life is what happens to you while you're busy  
making other plans.”*

John Lennon

## RESUMO

Estudos realizados em amostras de gelo para análise de Ecologia Microbiana e de Astrobiologia estão sujeitos a contaminação de diversas fontes, incluindo equipamentos de coleta, recipientes de transporte, local de armazenamento, entre outros. Para promover a autenticidade dos estudos que utilizam testemunhos de gelo, elaborou-se um protocolo de descontaminação, baseado em testes com diferentes metodologias. Para chegar a esse resultado, foram criados testemunhos artificiais estéreis e contaminados externamente com culturas de *Escherichia coli*, *Deinococcus radiodurans* e *Geobacillus stearothermophilus*. O testemunho foi derretido em três camadas, sendo a mais externa denominada camada 1, a do meio camada 2, e a camada mais interna de camada 3. Os tratamentos de desinfecção testados individualmente foram etanol 70%, hipoclorito de sódio 5,25%, cloreto de benzalcônio (BKC) 0,5%, e radiação UV-C (280 nm, 27.540 J.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>). Para a camada 1, com exceção do BKC, todos os tratamentos não eliminaram as contaminações. Na camada 2, o tratamento UV-C foi o único que eliminou os contaminantes. A camada 3 revelou-se estéril após o tratamento BKC 0,5% e UV-C, enquanto os tratamentos com hipoclorito de sódio 5,25% e etanol 70% ainda apresentaram contaminantes. Portanto, a solução BKC e radiação UV-C foram os que demonstraram melhores resultados devido à ausência de microrganismos nas camadas 1 e 2, respectivamente. Considerando os resultados obtidos, sugere-se aplicar os métodos de radiação UV-C em conjunto com banho de BKC 0,5% na descontaminação de testemunhos de gelo para estudos de microbiologia.

**Palavras-chave:** microbiologia, protocolo de descontaminação, amostra de gelo, astrobiologia, ecologia microbiana



## ABSTRACT

Microbial Ecology and Astrobiology studies on ice samples are subject to contamination from several sources, including sampling equipment, drilling fluids, transport, storage, among others. For the integrity of microbiological studies using ice cores, we developed a decontamination protocol based on tests with different methodologies. To reach this result, we produce a synthetic sterile ice core, which was exteriorly contaminated with *E. coli*, *D. radiodurans* e *G. stearothermophilus* cultures. The synthetic ice core was melted in three shells, the external was named shell 1, the middle shell 2, and the inner shell 3. The methods individually tested were 70% ethanol, 5.25% sodium hypochlorite, 0.5% benzalkonium chloride (BKC), and UV-C radiation (280 nm, 27.540  $\mu\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ). On shell 1, all methods except BKC showed contamination. For shell 2 UV-C did not show contaminants, but all the other methods showed microorganisms. Shell 3 was sterile for UV-C and BKC. However, 70% ethanol and 5.25% sodium hypochlorite showed contamination in shell 3. The BKC and UV-C radiation presented the best results due to the absence of microorganisms on shells 1 and 2, respectively. Considering the results, it is suggested to apply both UV-C radiation and BKC 0,5% methods for decontamination of ice core samples for microbiological studies.

**Keywords:** microbiology, decontamination protocol, ice sample, astrobiology, microbial ecology

## LISTA DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| Figura 1 - Esquema de diluição seriada  | 26 |
| Figura 2 - Esquema de plaqueamento em gota para contagem de células viáveis   | 26 |
| Figura 3 - Esquema mostrando a ordem das camadas derretidas no gelo artificial                                      | 29 |
| Figura 4 - Descontaminação utilizando radiação UV-C   | 30 |
| Figura 5 - Esquema da metodologia utilizada nos procedimentos de descontaminação. Adaptado de Rogers et al. (2005). | 31 |
| Figura 6. Derretimento do testemunho artificial em camadas  | 33 |
| Figura 7. Gráfico apresentando a média de UFC.10 $\mu$ L-1 para camada 1 em cada método utilizado                   | 36 |
| Figura 8. Gráfico apresentando a média de UFC.10 $\mu$ L-1 para camada 2 em cada método utilizado                   | 37 |
| Figura 9. Gráfico apresentando a média de UFC.10 $\mu$ L-1 para camada 3 em cada método utilizado                   | 37 |

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resumo dos parâmetros físico-químicos que definem um organismo extremófilo. Adaptado de Duarte et al. (2012). **14**

Tabela 2. Número de UFC contaminantes contadas nas camadas 1, 2 e 3 do testemunho de gelo após a exposição a UV-C (280 nm, 27.540 J.m-2.s-1) por 4 minutos. Números entre ponto-e-vírgula indicam os resultados discriminados por triplicata. As letras após as médias indicam valores significativos após o teste de Wilcoxon-Mann-Whitney ( $p \leq 0,05$ ). **33**

Tabela 3. Número de UFC contaminantes contadas nas camadas 1, 2 e 3 do testemunho de gelo após a descontaminação com solução de Hipoclorito de Sódio 5,25%. Números entre ponto-e-vírgula indicam os resultados discriminados por triplicata. As letras após as médias indicam valores significativos após o teste de Wilcoxon-Mann-Whitney ( $p \leq 0,05$ ). **33**

Tabela 4. Número de UFC contaminantes contadas nas camadas 1, 2 e 3 do testemunho de gelo após a descontaminação com solução de Etanol 70%. Números entre ponto-e-vírgula indicam os resultados discriminados por triplicata. As letras após as médias indicam valores significativos após o teste de Wilcoxon-Mann-Whitney ( $p \leq 0,05$ ). **34**

Tabela 5. Número de UFC contaminantes contadas nas camadas 1, 2 e 3 do testemunho de gelo após a descontaminação com solução de BKC 0,5%. Números entre ponto-e-vírgula indicam os resultados discriminados por triplicata. As letras após as médias indicam valores significativos após o teste de Wilcoxon-Mann-Whitney ( $p \leq 0,05$ ). **34**

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

HCl - Ácido clorídrico  
cm - Centímetro  
BKC - Cloreto de Benzalcônio  
KCl - Cloreto de Potássio  
NaCl - Cloreto de Sódio  
Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> - Fosfato de sódio bibásico dibásico  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> - Fosfato monobásico de potássio  
g - Gramas  
°C - Graus Celsius  
gy - Gray (unidade)  
h - Hora  
J - Joule  
L - Litro  
μL - Microlitro  
mL - Mililitro  
Mn - Manganês  
M - Molar  
O<sub>2</sub> - Oxigênio  
kg - Quilograma  
kj - Quilojoule  
km<sup>2</sup> - Quilômetro quadrado  
pb - Par de bases  
PBS - Tampão fosfato-salino (Phosphate-buffered saline)  
s - Segundo  
UFC - Unidade Formadora de colônias  
UV-C - Ultravioleta C  
V - Volt

## SUMÁRIO

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1-INTRODUÇÃO</b> .....   | <b>13</b> |
| 1.1 Ambientes extremos.....   | 13        |
| 1.2 Microrganismos psicrófilos.....   | 15        |
| 1.3 Contaminação e autenticidade de microrganismos em testemunhos de gelo ..... | 18        |
| <b>2- JUSTIFICATIVA</b><br>.....  | <b>22</b> |
| <b>3- OBJETIVOS</b> .....   | <b>23</b> |
| 3.1- OBJETIVO GERAL .....   | 23        |
| 3.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....  | 23        |
| <b>4- METODOLOGIA</b> .....   | <b>23</b> |
| 4.1 Construção dos testemunhos de gelo artificiais.....                         | 23        |
| 4.2 Culturas padrão.....  | 24        |
| 4.3 Contaminação dos testemunhos.....   | 25        |
| 4.4 Determinação do número inicial de células contaminantes.....                | 27        |
| 4.5 Avaliação dos métodos de descontaminação do gelo.....                       | 28        |
| <b>5-RESULTADOS</b> .....   | <b>30</b> |
| 5.1 Padronização do procedimento de contaminação.....                           | 30        |
| 5.2 Avaliação dos métodos de descontaminação.....                               | 31        |
| <b>6-DISCUSSÃO</b> .....  | <b>38</b> |
| 6.1 Eficiência das metodologias de descontaminação.....                         | 38        |
| 6.2 Recomendações para descontaminação de testemunhos de gelo ....              | 40        |
| <b>7. CONCLUSÕES</b> .....  | <b>41</b> |
| <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....   | <b>42</b> |

# 1-INTRODUÇÃO

## 1.1 Ambientes extremos

Ambientes extremos sempre despertaram curiosidade entre os cientistas. Até meados do século XX, acreditava-se que esses locais não tinham condições favoráveis à vida. Entretanto, em 1967 o microbiologista norte-americano Thomas Brock (Indiana University) conseguiu identificar bactérias vivas a 70 °C em fontes termais do Parque Nacional do Yellowstone, USA, (BROCK, 1967). Essa descoberta inaugurou um novo campo de estudo na Biologia: a microbiologia de ambientes extremos.

As bactérias descobertas por Brock nos anos 60 representam apenas um exemplo da capacidade de microrganismos sobreviverem em condições extremas. Essas bactérias possuem adaptações morfológicas, bioquímicas e genéticas para sobreviver em altas temperaturas, sendo denominadas termófilas. Do outro extremo da temperatura, os psicrófilos vivem em geleiras, neve, e solos permanentemente congelados. Outros habitats extremos ocorrem na Terra, todos eles habitados por um conjunto de microrganismos como bactérias, arqueias, fungos e vírus. Por exemplo, os chamados acidófilos e alcalófilos vivem respectivamente em áreas com pH ácido ou alcalinos (próximos a 0 ou próximos de 14). Os halófilos sobrevivem em ambientes com alta salinidade, piezófilos vivem sob altas pressões hidrostáticas do oceano, xerófilos habitam áreas com baixa disponibilidade de água como os desertos, e radiotolerantes sobrevivem a doses de radiação 2000 vezes maiores que uma célula humana consegue resistir (MERINO et al 2019) (Tabela 1).

Tabela 1. Resumo dos parâmetros físicoquímicos que definem um organismo extremófilo. Adaptado de Duarte et al. (2012).

| <b>Parâmetro ambiental</b> | <b>Tipo de extremófilo</b>        | <b>Definição (condições de crescimento)</b> | <b>Exemplo</b>   |
|----------------------------|-----------------------------------|---|--|
| Temperatura                | Hipertermófilo                    | > 85 °C                                     | <i>Pyrolobus fumarii</i> (113 °C)                      |
|                            | Termófilo                         | 45–85 °C                                    | <i>Synechococcus lividus</i>                           |
|                            | Psicrófilo                        | Crescimento ótimo < a 15 °C, máximo a 20 °C | <i>Psychrobacter sp.</i>                               |
| pH                         | Acidófilo                         | pH < 5                                      | <i>Cyanadium caldarium</i> (pH 0)                      |
|                            | Alcalófilo                        | pH > 8                                      | <i>Bacillus firmus</i>                                 |
| Salinidade                 | Halófilo                          | 2-5 M NaCl                                  | Família Halobacteriaceae (arqueias)                    |
| Pressão                    | Piezófilo                         | > 400 atm                                   | <i>Shewanella oneidensis</i>                           |
| Dessecação                 | Xerófilo                          | $A_w < 0,8$                                 | <i>Trichosporonoides nigrescens</i> (levedura)         |
| Radiação                   | Radiotolerante                    | Até 60 Gy.h <sup>-1</sup>                   | <i>Deinococcus radiodurans</i> (10 000 Gy)             |
| Oxigênio                   | Anaeróbico                        | Ausência de O <sub>2</sub>                  | <i>Methanococcus jannaschii</i> (arqueia metanogênica) |
|                            | Microaerófilo                     | Pouco O <sub>2</sub>                        | <i>Clostridium sp.</i>                                 |
| Nutriente                  | Oligotrófico ou ultraoligotrófico | Pouco nutriente                             | <i>Nitrosopumilus</i> (arqueia oxidadora de amônia)    |

Ambientes extremos não são exclusivos do nosso planeta. Outras partes do Sistema Solar apresentam condições onde, teoricamente, microrganismos extremófilos poderiam se desenvolver, tais como o planeta Marte e as luas de gelo do Sistema Solar (DES MARAIS, 2008).

A Astrobiologia é um ramo multidisciplinar da ciência que envolve a busca por planetas potencialmente habitáveis dentro e fora do nosso Sistema Solar. Além disso, a astrobiologia estuda as condições que possibilitaram a origem e evolução da vida na Terra. Na década de

60, Ledeborg e Sagan (1962) publicaram um artigo que discute duas maneiras de provar a existência de vida em Marte. O primeiro é um modelo de construção especulativa do ambiente e da ecologia do planeta e, o segundo se baseia na indicação de vida através de visualizações por telescópio. Com o avanço da tecnologia desde então, é difícil limitar essa ciência a especulações e indicações. Em ambos os contextos, o estudo dos extremófilos toma importância para a astrobiologia. Os extremófilos determinam quais são as condições limitantes para existir vida, direcionando as pesquisas de astrobiologia a buscar áreas fora da Terra com maiores chances de encontrar vida. No caso da origem dos seres vivos na Terra, há um consenso na literatura que indica que o primeiro ser vivo foi um microrganismo extremófilo. As condições da Terra há 3,8 bilhões de anos atrás (época estimada da origem da vida) eram muito diferentes das atuais, e a vida provavelmente se originou nessas condições extremas da Terra primitiva (SCHOPF, 2002).

## 1.2 Microrganismos psicrófilos

Apesar de muitos estudos de extremófilos terem sido realizados com base em termófilos, as publicações sobre microrganismos psicrófilos vem aumentando a cada ano (MARGESIN & MITEVA, 2011). Segundo Priscu & Christner (2004), grande parte da Biosfera terrestre está a temperaturas de até 5 °C, sendo que quase três quartos do planeta são cobertos por oceanos que estão constantemente entre 2 e 4 °C. Outros exemplos de condições extremamente frias são solos de *permafrost*<sup>1</sup>, solos alpinos, sedimentos marinhos de regiões profundas, neve, glaciares e o gelo marinho.

---

<sup>1</sup>Para os termos estrangeiros sobre feições da neve e do gelo, como sobre a geografia polar em geral, utilizou-se o glossário de língua portuguesa da neve e do gelo, desenvolvido por Simões (2004). Muitas palavras não encontram similares na língua portuguesa, em decorrência da cultura e histórico limitado da exploração e presença portuguesa naquelas regiões. Alguns termos já consagrados na literatura polar como *permafrost* e *firn*, foram mantidos originais.

No planeta atualmente só existem dois mantos de gelo, o Antártico com 13.9 milhões de km<sup>2</sup> e da Groenlândia com 1.7 milhões km<sup>2</sup>. Mais de 84% do gelo na Terra está na Antártica. A distribuição dos glaciares fora dos mantos de gelo ocupa uma área de aproximadamente 785.103 km<sup>2</sup>. Dentro desses, o Ártico ocupa 40%, o restante está distribuído em ambientes incluindo geleiras montanhosas, calotas de gelo, campos de gelo, entre outros com temperaturas polares (DYURGEROV & MEIER, 2005). O manto Antártico começou a se formar durante o limite Paleógeno/Neógeno a cerca de 35 milhões de anos (DAVIES et al, 2012).

A formação de geleiras ocorre a partir da precipitação da neve, que sofre compressão e recristalização. A neve possui em sua composição 90% ar e 10% água. Com o acúmulo de neve ao longo do tempo, as camadas profundas de neve são comprimidas, expulsando o ar que havia antes e criando uma estrutura denominada *firn* (50% ar, 50% água). O processo continua com o contínuo acúmulo de neve, e o *firn* sofre ainda mais compressão e recristalização, formando o gelo glacial (10% ar, 90% água). O processo todo leva em torno de 100 anos, dependendo da precipitação de neve (MA et al. 2005).

O ar aprisionado no interior do gelo glacial é um importante registro para a glaciologia e paleoclimatologia, pois contém a composição de gases da atmosfera do período de formação do gelo (HUBBARD & GLASSER, 2005). Assim como o ar, a fração de gelo encontrada nessas áreas pode nos prover registros paleontológicos de temperatura, composição química da atmosfera, erupções vulcânicas, variabilidade solar, produtividade da superfície oceânica, emissões antropogênicas, e uma enorme variabilidade de indicadores climáticos. O material biológico do gelo recebeu atenção apenas em momentos posteriores (CHRISTNER 2005). Esses ambientes são, na verdade, colonizados por uma grande variedade de microrganismos incluindo bactérias, arqueias, fungos, algas e vírus (MARGESIN & MITEVA, 2011).

As condições do interior do gelo glacial impõem vários desafios para a vida, incluindo baixas velocidades de reações enzimáticas, limitados recursos nutricionais, e em alguns casos pH e salinidade

extremos (Hodson et al., 2008). Consequentemente, para viverem nesses ambientes, os psicófilos desenvolveram complexas adaptações. Um ser psicófilo possui uma temperatura ótima de 15 °C ou menos para reprodução, já os psicrotolerantes são organismos mesófilos, ou seja, possuem temperatura ótima de crescimento entre 20-40 °C, mas conseguem se reproduzir também até 0 °C (Madigan et al., 2015). Apesar de encontrados em regiões permanentemente geladas, a maioria dos microrganismos encontrados em ecossistemas frios é psicrotolerante e não psicófilos (MARGESIN & MITEVA, 2011). Essa distribuição é resultado da circulação de massas de ar atmosféricas.

De acordo com Margesin & Miteva (2011), a circulação de fluxos eólicos e a precipitação faz com que a riqueza de microrganismos encontrados na neve seja semelhante à da atmosfera, variando conforme a altitude e latitude. A neve também é fonte para formação de geleiras e pode impactar o solo. Ainda segundo os autores, muitos estudiosos consideram que a abundância de células encontradas nesses ambientes varia de  $10^3$  a  $10^5$  células.mL<sup>-1</sup> de neve derretida. Os geleiras, se comparados a outras partes da criosfera (rios congelados, nevados sazonais, etc) são ambientes inóspitos, pouco favoráveis à vida. Isso acontece devido às condições particulares das geleiras, como por exemplo temperaturas entre -56 °C a -1 °C, elevada pressão hidrostática, pouca matéria orgânica, e altas doses de radiação na superfície. Segundo Abyzov (1993), a concentração celular nas geleiras da Antártica varia de acordo com a precipitação de neve e apresenta uma média entre  $10^2$  a  $10^6$  células.mL<sup>-1</sup>.

Segundo Knowlton et al. (2013), as temperaturas baixas do gelo criam um ambiente ideal para preservação de microrganismos e biomoléculas. Esse gelo age como uma matriz protetora e duradoura que fornece registros de evolução e antiga riqueza microbiana do planeta, alguns dos quais foram depositados há 700.000 anos (ROGERS, 2004). As geleiras apresentam veias de água líquida e hipersalina, num sistema interligado e dinâmico (Price, 2000). Segundo esse autor, microrganismos psicófilos podem se mover por essas veias líquidas, obtendo energia e carbono a partir de íons em solução e células mortas.

### 1.3 Contaminação e autenticidade de microrganismos em testemunhos de gelo

De acordo com Willerslev et al. (2004), vários trabalhos que relataram a recuperação de sequências antigas de DNA e/ou RNA e células viáveis de gelo e *permafrost* possuem resultados altamente conflitantes, provavelmente provenientes de contaminação. Os microrganismos e DNA microbiano são ubíquos, fazendo com que o risco de contaminação com células microbianas seja alto. Sendo assim, as amostragens de testemunhos de gelo sempre resultam em algum grau de contaminação. As principais fontes são os equipamentos de coleta (piquetas de gelo, testemunhadores, fluidos de perfuração, etc.) e os recipientes de transporte em campo, local de armazenamento, etc.

Com relação a amostras de DNA antigo, o DNA bacteriano sob condições ideais de congelamento apresenta uma sobrevivência máxima (amplificável em PCR) de 400 mil a 1,5 milhões de anos. As alegações relativas a microrganismos antigos são extremamente difícil de autenticar, uma vez que apenas 1–5% dos potenciais contaminantes modernos são consideradas conhecidas. Além disso, estudos sugerem que os microrganismos contemporâneos possuem uma distribuição global (WILLERSLEV & COOPER 2004).

De acordo com Bulat et al. (2009), os procedimentos utilizados para remoção dos contaminantes da superfície das amostras de gelo podem servir para o estudo de futuras amostras extraterrestres. O gelo do Lago Vostok (Antártica), por exemplo, representa uma amostra congelada a milhões de anos e com baixa concentração celular, servindo como um análogo de amostras que possam ser coletadas em Marte, satélites de Júpiter (Europa) ou Saturno (Encélado). As instituições que realizam estudos de astrobiologia necessitam de constante renovação de protocolos que garantam a autenticidade do material biológico encontrado, já que o conhecimento sobre a tenacidade de vida só aumenta (CHRISTNER et al 2004).

Willerslev & Cooper (2004) sugerem que algumas medidas podem mitigar a contaminação das amostras de testemunhos de gelo. Segundo os autores, os laboratórios que trabalham com amostras de

DNA antigo devem estar completamente isolados fisicamente de toda pesquisa de biologia molecular. Limpeza extensiva de reagentes (por exemplo, ultrafiltração) e ferramentas é essencial. A descontaminação completa requer exposição prolongada, por exemplo, a radiação UV, alta temperatura (mais de 180 °C por 12 h), ácido (2,5 M HCl por 48 h) e/ou hipoclorito de sódio (50% por 48 h). Reagentes de laboratório e equipamentos comerciais marcados como "estéreis" não garantem estar livre de células viáveis ou ácidos nucleicos. A autoclavagem não impede a amplificação de fragmentos curtos de DNA (menores ou iguais a 150 pb). Ainda seguindo todas as medidas citadas a contaminação não pode ser completamente descartada.

Rogers et al. (2005) também propuseram recomendações para que apenas os microrganismos e ácidos nucleicos originais da amostra sejam isolados/caracterizados. Dentre as medidas, estão a limitação ou desuso de fluidos para perfuração, evitar quebra ou fissura das amostras, manutenção de condições estéreis, replicação de resultados para cada amostra, inclusão de muitos controles durante o processo, replicação e confirmação em mais de um laboratório.

Christner et al. (2005) e Miteva (2008) revisaram os métodos de descontaminação até então utilizados e apontaram a importância de se desenvolver critérios rígidos para garantir a autenticidade dos resultados microbiológicos obtidos de testemunhos de gelo da Terra ou, eventualmente, de estudos futuros com amostras de Marte ou as luas geladas do Sistema Solar.

O primeiro relato de um procedimento de descontaminação foi no trabalho de Abyzov (1993) com amostras de gelo sobre o Lago Vostok, no qual foi utilizado um aparelho que derrete o interior da amostra de forma asséptica. Dancer et al. (1997) utilizaram piquetas de gelo flambadas no momento da coleta das amostras, mas nenhum outro método foi utilizado posteriormente. Já Willerslev (1999) utilizou hipoclorito de sódio 5% para descontaminar os instrumentos de coleta das amostras de gelo da Groenlândia, com posterior lavagem da superfície das amostras com hipoclorito de sódio 5%. Priscu et al. (1999) e Karl et al. (1999) utilizaram procedimentos de lavagem com etanol 70% e água ultrapura, respectivamente, para amostras de gelo de

acrecção do Lago Vostok (Antártica). Castello (1999) utilizou radiação UV-C (941,7 kJ.m<sup>-2</sup>) para descontaminar a superfície de amostras de gelo da Groenlândia, e posteriormente usou uma furadeira portando uma serracopo esterilizada para acessar o interior dos testemunhos de forma asséptica. Cabe ressaltar que esse estudo (CASTELLO, 1999) foi o primeiro relato do uso de testemunhos de gelo artificiais contendo células contaminantes como controle dos métodos de descontaminação, demonstrando a crescente preocupação com o estudo da microbiologia de amostras de gelo.

Estudando o gelo de acreção do Lago Vostok, Christner et al. (2000, 2001) também utilizaram um dispositivo que acessa e derrete o interior do gelo de forma asséptica. Gelo artificial rinsado com células de *Serratia marcesens* foram utilizados para controle da descontaminação. O dispositivo utilizado no procedimento, similar a um pequeno tubo de aço inox, foi previamente esterilizado em autoclave e inserido no interior do gelo. A inserção foi feita na base do gelo, a qual foi lavada com solução de etanol 95% por 2 minutos. Uma corrente de água quente flui apenas pelo interior do dispositivo, aquecendo o gelo causando seu derretimento no interior do tubo de aço inox para coleta do material interno de forma asséptica. Miteva et al. (2004) trabalharam com testemunhos de gelo da Groenlândia e utilizaram o calor de uma resistência elétrica de 6 V para remover os contaminantes da superfície do gelo, seguido por um tratamento com etanol 70% e uma sub-amostragem do interior da amostra com uma furadeira portando uma serracopo estéril.

Basicamente os procedimentos mais utilizados para desinfecção de testemunhos de gelo envolvem o uso de agentes químicos oxidantes (ex. hipoclorito de sódio 5,25%), sendo o procedimento realizado em uma câmara de fluxo laminar dentro de uma sala fria e com pressão positiva. Entretanto, Christner et al. (2004) concluíram que a remoção de 3 cm da camada exterior do testemunho com o auxílio de um micrótomo também pode remover todo o fluido de perfuração, além da contaminação microbiana e macromolecular.

Em Bulat et al. (2004), foi utilizado um método diferente para controle dos contaminantes. Nesse trabalho os autores prepararam

bibliotecas de clones do gene RNAr 16S a partir de amostras coletadas dos instrumentos, soluções e do ambiente onde as amostras de gelo foram manipuladas, estabelecendo assim um banco de dados contendo possíveis contaminantes. Nesse banco foram incluídas sequências de RNAr 16S de microrganismos dos fluidos de perfuração e até mesmo os descritos como contaminantes em outros trabalhos de gelo glacial. Os autores então descontaminaram as amostras de gelo de acreção do Lago Vostok utilizando uma lâmina (tratada com etanol 70%) para remover a camada superficial dos testemunhos. Os microrganismos identificados por sequenciamento do gene RNAr 16S no gelo foram comparados com o banco de dados de contaminantes. Apenas as sequências encontradas exclusivamente no gelo do Lago Vostok foram consideradas autênticas.

## **2- JUSTIFICATIVA**

Para a coleta dos testemunhos de gelo, as operações e manuseio, bem como fluido de perfuração ou materiais utilizados, podem causar contaminação (BULAT 2011). Prova disso são os estudos realizados sobre gelo do núcleo de Vostok (Antártica) que mostraram a porção externa das amostras com até 3 ordens de grandeza maior de densidade bacteriana e carbono orgânico dissolvido (DOC) do que a porção interna das amostras, como resultado da perfuração e manuseio (CHRISTNER et al 2004).

São necessários, portanto, rigorosos procedimentos de descontaminação. Diversos autores têm isolado microrganismos e ácido nucléicos por décadas utilizando uma variedade de protocolos de descontaminação. Em 2004, o trabalho de Rogers e colaboradores (2004) propuseram uma padronização nos protocolos de descontaminação baseado na comparação de diferentes metodologias. Assim, cada laboratório, de acordo com sua estrutura e disponibilidade de recursos, necessita padronizar seu protocolo para descontaminação de amostras de gelo.

No Brasil não há nenhum laboratório adaptado para realizar os procedimentos de descontaminação sugeridos por Rogers et al. (2005) e Christner et al. (2004), ou ainda a biblioteca de Bulat (2004). Desse

modo, os projetos que envolvem o estudo de microrganismos do gelo realizam procedimentos de descontaminação em outras condições, não padronizadas, e que resultam na perda de grandes volumes da amostra. Por exemplo, Duarte (2010) utilizou um procedimento similar ao de Rogers et al. (2004) em amostras de ~8 kg de gelo da Antártica, resultando em apenas 670-1800 mL de amostra descontaminada.

Nesse contexto, pretende-se estabelecer um método rápido e eficiente de descontaminação sem uso de sala fria e que não perca excessivo volume de amostra no processo, sendo utilizado como base alguns dos procedimentos descritos por Rogers et al. (2004), com inclusão de novos agentes de desinfecção.

### **3- OBJETIVOS**

#### **3.1- OBJETIVO GERAL**

Elaborar um protocolo de descontaminação microbiológica de testemunhos de gelo que possa ser aplicado para estudos de ecologia microbiana e astrobiologia.

#### **3.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Os objetivos específicos do projeto buscam responder as seguintes perguntas:

- Qual dos quatro métodos avaliados é mais eficiente para descontaminação da superfície dos testemunhos de gelo?
- Os métodos de descontaminação estudados neste trabalho são mais eficientes que outras metodologias descritas na literatura?

### **4- METODOLOGIA**

A avaliação dos diferentes métodos de descontaminação foi realizada em testemunhos de gelo artificiais. Os testemunhos foram

contaminados com microrganismos na superfície e tratados com diferentes métodos de descontaminação físico e químicos, considerando também a perda de volume da amostra.

#### 4.1 Construção dos testemunhos de gelo artificiais

Os testemunhos foram construídos com 100 mL água destilada esterilizada, colocada em cilindros de aço inox de 5 cm de diâmetro por 9,5 cm de comprimento, e mantidos por 24h em freezer a -20 °C para a formação do gelo.

#### 4.2 Culturas microbianas

Culturas de *Escherichia coli*, *Geobacillus stearothermophilus* e *Deinococcus radiodurans*, denominadas culturas padrão, foram escolhidas para representar os contaminantes dos testemunhos de gelo. Essas culturas foram selecionadas com base em critérios que envolvem alta resistência à parâmetros ambientais (*G. stearothermophilus* e *D. radiodurans*), e serem contaminantes comuns em amostras de gelo (*E. coli*).

*Deinococcus radiodurans* é uma bactéria Gram-positiva conhecida por sua capacidade extraordinária em sobreviver a altos níveis de radiação ionizante. Essa resistência parece ser mediada por processos passivos e ativos (enzimáticos). Os mecanismos passivos incluem a presença de múltiplas cópias do genoma, um nucleóide altamente condensado que previne difusão de fragmentos de DNA gerados durante a radiação, e acúmulo de íons de Mn(II) que podem prevenir a geração de tipos de oxigênio reativos. Os processos enzimáticos incluem os convencionais métodos de reparo de DNA entre outras funções (COX & BATISTA, 2005).

*Geobacillus stearothermophilus* é uma bactéria Gram-positiva cujos esporos resistem a esterilização por microondas, vapor, e até mesmo por agentes químicos como formaldeído e peróxido de hidrogênio. Devido a essa alta resistência ao calor e umidade, *G. stearothermophilus* é comumente utilizado como indicador biológico de

processos de esterilização em autoclave (GUIZELINI et al. 2012).

*Escherichia coli* é uma bactéria Gram-negativa, sendo uma espécie que contém vários biótipos, alguns desses são colonizadores comensais de mamíferos e outros que podem causar doenças (MALTBY et al. 2013). Sendo assim, a presença de *E. coli* em amostras de gelo normalmente indica contaminação humana.

As culturas padrão foram cultivadas em Ágar Nutriente (peptona 5,0; extrato de levedura 3,0; NaCl 5,0; ágar bacteriológico 15,0 em g/L e pH 6,8) na temperatura de 37 °C (*E. coli* e *G. stearothermophilus*) ou 28 °C (*D. radiodurans*) por 24-48 h.

#### 4.3 Contaminação dos testemunhos

Após o cultivo em Ágar Nutriente das culturas padrão, selecionou-se uma colônia de cada microrganismos e essas foram inoculados cada uma em 5 mL de Caldo Nutriente (mesma composição, exceto pela ausência do ágar). As culturas foram em seguida incubadas em agitação 120 rpm por 24 h por volta de 28 °C. Após 24 h de agitação, as culturas foram quantificadas através do método da diluição seriada e plaqueamento em gotas. Foram consideradas válidas as contagens entre 3 e 30 UFC por gota (NAGHILIL et al., 2013) (Figuras 1 e 2).

Um volume de 4 mL de cada cultura (12 mL no total) foi misturado em um tubo de centrífuga de 50 mL para o preparo da solução contaminante. Diluições seriadas até  $10^{-7}$  foram preparadas retirando 100 µL dessa solução e misturados à um tubo de microcentrífuga contendo 900 µL de solução tampão fosfato-salino, PBS (em g/L: NaCl 8,0; KCl 0,2; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,44; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,24).

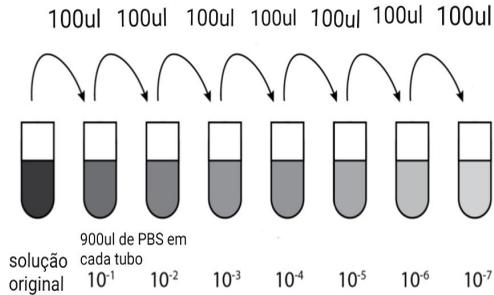


Figura 1 - Esquema de diluição seriada

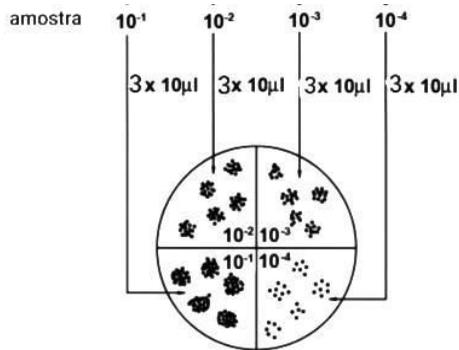


Figura 2 - Esquema de plaqueamento em gota para contagem de UFCs.

Após o congelamento do testemunho de gelo artificial, seu conteúdo foi removido do cilindro de aço inox e banhado em um becker com a solução contaminante. Após a contaminação da superfície do testemunho, esse foi submetido a diferentes tratamentos de descontaminação (item 4.4). O controle de esterilidade do testemunho foi preparado removendo 100 µL do gelo antes da sua contaminação, e inoculado em meio de cultura Ágar Nutriente.

#### 4.4 Determinação do número inicial de células contaminantes

O número de bactérias que estava presente na solução

contaminante foi estimado conforme o descrito no item 4.1. Porém, devido à características específicas como hidrofobicidade e carga, a aderência das células ao gelo pode ser afetada. Faz-se portanto necessário determinar o número de microrganismos que efetivamente contaminaram o testemunho artificial. Para isso, o gelo estéril foi banhado por aproximadamente 5 s na solução contaminante e rinsado com 20 mL de água esterilizada gelada. Após esse processo, o gelo foi derretido em câmara de fluxo laminar perto próximo ao bico de Bunsen em três etapas (camadas) de aproximadamente 20 mL cada (Figura 3). Uma alíquota de 100  $\mu$ L de cada camada foi utilizada para contagem de células contaminantes através do método da diluição seriada e plaqueamento em gotas. A diferença entre o número de células na solução contaminante e da encontrada na contagem das camadas foi utilizada para determinar a porcentagem de descontaminação sofrida pela amostra.

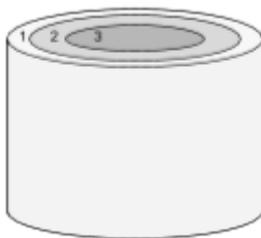


Figura 3 - Esquema mostrando a ordem das camadas derretidas no gelo artificial

#### 4.5 Avaliação dos métodos de descontaminação do gelo

O procedimento de descontaminação foi realizado segundo a metodologia proposta por Rogers et al. (2004), com algumas alterações. Resumidamente, o testemunho de gelo artificial contaminado com as culturas padrões fora submetido a métodos de descontaminação no qual camadas progressivas da superfície do testemunho foram removidas e avaliadas quanto à presença dos contaminantes. Foi classificado como melhor método aquele que demonstrou maior eficiência na

descontaminação, e menor volume de gelo desperdiçado no procedimento.

Inicialmente, os testemunhos de gelo foram tratados com um dos seguintes métodos de descontaminação: a) Imersão em 40 mL de solução de hipoclorito de sódio 5,25% por 10 segundos; b) Imersão em 40 mL de solução de etanol 70% por 10 segundos; c) Imersão em 40 mL de solução de cloreto benzalcônio (BKC) 0,5%; d) Exposição do gelo à radiação UV-C (280 nm,  $27.540 \text{ J.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) por 2 minutos de cada lado, totalizando 4 min (Figura 4). Todas as soluções desinfetantes foram previamente resfriadas a  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$  para evitar choque térmico com o gelo. Após o tratamento de descontaminação, o testemunho foi lavado em 20 mL de água destilada autoclavada e resfriada à temperatura de  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$  para remoção de resíduos das soluções químicas. A lavagem em água foi realizada também após o tratamento com UV-C para fins de comparação.



Figura 4. Descontaminação utilizando radiação UV-C

Após a lavagem, o gelo foi derretido no interior de uma cabine de fluxo laminar. O volume líquido resultante do descongelamento foi coletado progressivamente, das camadas superficiais até as camadas internas do testemunho. Foram coletadas um total de 4 amostras de gelo derretido. A primeira amostra de  $100 \mu\text{L}$  foi coletada para verificar se de

veras o gelo estava estéril antes de ser contaminado, conforme descrito anteriormente, e as restantes com cerca de 20 mL cada, sendo 1 – superfície; 2 - a intermediária; e 3 – camada mais interna (Figura 3). Para cada camada derretida foi realizada uma diluição seriada em solução PBS. As alíquotas foram semeadas em placas de Ágar Nutriente e incubadas a 28 °C por até 48 h. Após a incubação, foram avaliados quais métodos apresentaram maior eficiência em eliminar os microrganismos, e qual a maior quantidade de líquido na camada 3 (final) (Figura 5).

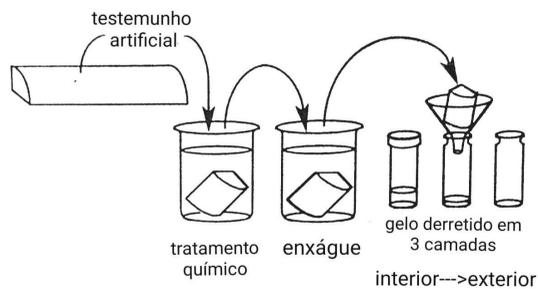


Figura 5 - Esquema da metodologia utilizada nos procedimentos de descontaminação. Adaptado de Rogers et al. (2005).

## 5-RESULTADOS

### 5.1 Padronização do procedimento de contaminação

No início do experimento foram realizadas padronizações na confecção do testemunho de gelo, da solução contaminante, e na permanência dos contaminantes na superfície do testemunho.

Não foram observadas colônias nos testemunhos controle, garantindo que todos estavam estéreis antes de serem banhados pela solução contaminante. As soluções contaminantes apresentaram uma concentração média de aproximadamente  $1 \times 10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup>, considerando as três espécies microbianas juntas. Com relação a efetividade da contaminação, os resultados demonstraram que com uma solução contaminante contendo  $3 \times 10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup>, a camada 1 apresentou  $1,1 \times 10^2$  UFC.mL<sup>-1</sup>. O número de células detectadas para as camadas 2 e 3 foram entre 0 e 3, por isso foram desprezadas (NAGHILIL et al., 2013).

## 5.2 Avaliação dos métodos de descontaminação

Os experimentos de descontaminação foram repetidos 3 vezes (Experimento I, II e III) (Figura 6). As células bacterianas presentes nas três camadas derretidas foram detectadas utilizando-se o método da diluição seriada e plaqueamento em gota em triplicata, conforme descrito na metodologia (item 4.5). Para cada metodologia de descontaminação foram feitas as médias das UFC.10  $\mu\text{L}^{-1}$  das triplicatas na diluição de  $10^{-1}$  e depois as médias das repetições dos experimentos.



Figura 6. Derretimento do testemunho artificial em camadas

A exposição a UV-C (280 nm,  $27.540 \text{ J.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) apresentou em média  $0,7 \text{ UFC}.10 \mu\text{L}^{-1}$  na camada 1 e, como as outras camadas apresentaram entre 0 e 3  $\text{UFC}.10 \mu\text{L}^{-1}$ , não foram consideradas na contagem. O desvio padrão foi de 2  $\text{UFC}.10 \mu\text{L}^{-1}$  para a camada 1 e zero para as demais (Tabela 2).

Tabela 2. Número de UFC de contaminantes detectados em 10  $\mu\text{L}$  de amostras das camadas 1, 2 e 3 de testemunho de gelo artificial após a exposição a UV-C (280 nm, 27.540  $\text{J}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) por 4 minutos. Números entre ponto-e-vírgula indicam os resultados das triplicatas.

| UV-C     | Experimento I | Experimento II | Experimento III | Média | Desvio Padrão |
|----------|---------------|----------------|-----------------|-------|---------------|
| Camada 1 | 0; 0; 0       | 6; 0; 0        | 0; 0; 0         | 0.7   | 2.00          |
| Camada 2 | 0; 0; 0       | 0; 0; 0        | 0; 0; 0         | 0.0   | 0.00          |
| Camada 3 | 0; 0; 0       | 0; 0; 0        | 0; 0; 0         | 0.0   | 0.00          |

O tratamento com solução de hipoclorito de sódio 5,25% obteve médias de 3,4 e 3,7  $\text{UFC}\cdot 10\ \mu\text{L}^{-1}$  para as camadas 1 e 2. Já a camada 3 apresentou média 0,3  $\text{UFC}\cdot 10\ \mu\text{L}^{-1}$ . O desvio padrão para camada 1 foi de 6,84; para a camada 2 de 4,39 e 1 para a camada 3 (Tabela 3).

Tabela 3. Número de UFC de contaminantes detectados em 10  $\mu\text{L}$  de amostras das camadas 1, 2 e 3 de testemunho de gelo artificial após a descontaminação com solução de Hipoclorito de Sódio 5,25%. Números entre ponto-e-vírgula indicam os resultados das triplicatas.

| Hipoclorito de Sódio 5,25% | Experimento I | Experimento II | Experimento III | Média | Desvio Padrão |
|----------------------------|---------------|----------------|-----------------|-------|---------------|
| Camada 1                   | 15; 16; 0     | 0; 0; 0        | 0; 0; 0         | 3.4   | 6.84          |
| Camada 2                   | 9; 9; 8       | 7; 0; 0        | 0; 0; 0         | 3.7   | 4.39          |
| Camada 3                   | 0; 0; 0       | 3; 0; 0        | 0; 0; 0         | 0.3   | 1             |

Para o tratamento de descontaminação por imersão em 40 mL de solução de etanol 70% obteve-se médias de 5,3; 2,9 e 2,9  $\text{UFC}\cdot 10\ \mu\text{L}^{-1}$  para as camadas 1, 2, e 3, respectivamente. (Tabela 4). Os desvios ficaram em 7,35 para camada 1; 4,01 para camada 2; e 4,37 para a camada 3.

Tabela 4. Número de UFC de contaminantes detectados em 10 µL de amostras das camadas 1, 2 e 3 de testemunho de gelo artificial após a descontaminação com solução de Etanol 70%. Números entre ponto-e-vírgula indicam os resultados das triplicatas.

| <b>Etanol 70%</b> | <b>Experimento I</b> | <b>Experimento II</b> | <b>Experimento III</b> | <b>Média</b> | <b>Desvio Padrão</b> |
|-------------------|----------------------|-----------------------|------------------------|--------------|----------------------|
| Camada 1          | 11; 22; 0            | 0; 0; 0               | 4; 7; 3                | 5.3          | 7.35                 |
| Camada 2          | 11; 0; 0             | 0; 0; 0               | 5; 3; 7                | 2.9          | 4.01                 |
| Camada 3          | 13; 0; 0             | 0; 0; 0               | 5; 3; 5                | 2.9          | 4.37                 |

O tratamento de descontaminação com solução de cloreto benzalcônio (BKC) 0,5% apresentou uma média de 0,6 UFC.10 µL<sup>-1</sup> para a camada 2 apenas, as demais somaram menos de 3, ou 0. O desvio padrão foi de zero para as camadas 1 e 3; e 1,67 para a camada 3 (Tabela 5).

Tabela 5. Número de UFC de contaminantes detectados em 10 µL de amostras das camadas 1, 2 e 3 de testemunho de gelo artificial após a descontaminação com solução de BKC 0,5%. Números entre ponto-e-vírgula indicam os resultados das triplicatas.

| <b>BKC 0,5%</b> | <b>Experimento I</b> | <b>Experimento II</b> | <b>Experimento III</b> | <b>Média</b> | <b>Desvio Padrão</b> |
|-----------------|----------------------|-----------------------|------------------------|--------------|----------------------|
| Camada 1        | 0; 0; 0              | 0; 0; 0               | 0; 0; 0                | 0.0          | 0.00                 |
| Camada 2        | 5; 0; 0              | 0; 0; 0               | 0; 0; 0                | 0.6          | 1.67                 |
| Camada 3        | 0; 0; 0              | 0; 0; 0               | 0; 0; 0                | 0.0          | 0.00                 |

Dentre os tratamentos de descontaminação, para a camada 1 o método que apresentou maior eficácia foi o cloreto de benzalcônio 0,5%, pois não se detectou os contaminantes (Figura 7).

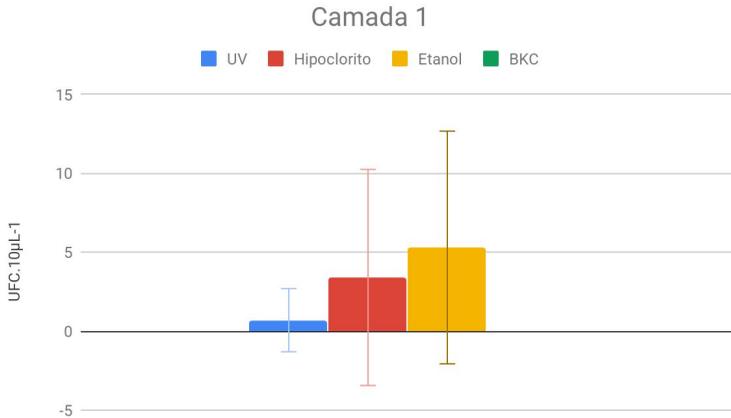


Figura 7. Detecção de contaminantes na camada 1 de testemunhos artificiais de gelo para diferentes tratamentos de descontaminação

Para camada 2 apenas o tratamento com radiação UV-C não permitiu detectar os contaminantes, indicando maior eficiência de eliminação. O cloreto de benzalcônio, apesar de parecer eliminar todos contaminantes na camada 1, apresentou na camada 2 um total de 5 UFC.10 µL<sup>-1</sup> em uma das triplicatas do experimento I. Tanto o hipoclorito 5,25% quanto o etanol 70% apresentaram média entre 3,7 e 2,9 UFC.10 µL<sup>-1</sup> nessa camada, respectivamente (Figura 8).

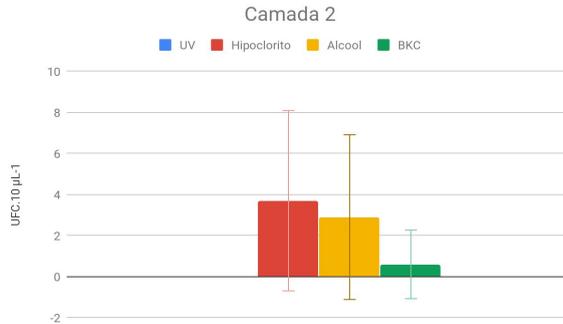


Figura 8. Detecção de contaminantes na camada 2 de testemunhos artificiais de gelo para diferentes tratamentos de descontaminação

Na camada 3, tanto o cloreto de benzalcônio quanto a UV-C foram efetivos. O hipoclorito 5,25% apresentou apenas 3 UFC em uma das triplicatas, estando no limite mínimo da técnica de contagem. O etanol 70% foi o método que menos evitou a presença de contaminantes na camada 3, resultando em uma média de 2,9 UFC.10 µL<sup>-1</sup> na parte mais interna do testemunho de gelo (Figura 9).

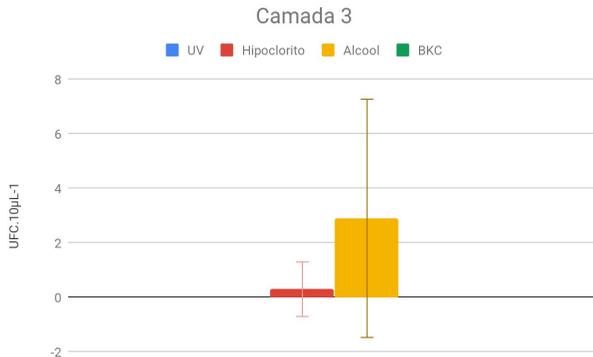


Figura 9. Detecção de contaminantes na camada 3 de testemunhos artificiais de gelo para diferentes tratamentos de descontaminação

O testemunho artificial de gelo foi construído originalmente apresentou com um volume total de 100 mL. Para as camadas 1 e 2 foram utilizados 20 mL em todos os métodos. Já a camada 3, que representaria o volume de água resultante no gelo, apresentou volume em média de 30 mL para todos os métodos de descontaminação. Não foram obtidos portanto números que expressam significativa diferença para comparação. O total de volume perdido durante a descontaminação foi, portanto, em média 30%.

## 6-DISCUSSÃO

### 6.1 Eficiência das metodologias de descontaminação

O método de construção e contaminação artificial de testemunho de gelo se mostrou adequado ao estudo, já que o testemunho apresentou contaminantes quando derretido. Segundo Alekhina (2007) a contaminação pode ocorrer também no interior do testemunho através de micro fissuras ou rachaduras no gelo, fazendo com que as camadas internas podem apresentar contaminantes. Isso pode explicar a ocorrência de microrganismos contaminantes nas camadas 2 e 3 do testemunho de gelo. Outra explicação é que, como durante o derretimento ocorre uma continuidade constante de contato entre a camada mais externa em derretimento com a camada mais interna ainda congelada, as células que sobrevivem ao processo de descontaminação podem nesse momento contaminar as partes mais internas do testemunho.

O etanol 70% como método de descontaminação apresentou menor eficiência, já que as 3 camadas tiveram resultado positivo para contaminantes. De acordo com Madigan et al. (2015) o etanol pode agir como antisséptico e desinfetante, dependendo de sua concentração que pode variar de 60-85% para surtir efeito, além do tempo de contato. Os antissépticos eliminam ou inibem o crescimento microbiano, e não são tóxicos a animais quando aplicados a tecidos vivos. Já os desinfetantes são químicos que matam microrganismos, não necessariamente endósporos e são utilizados em objetos. O etanol segundo Sharifa et al. (2008) apresenta efeito contra bactérias Gram-positivas e Gram negativas. Nas Gram-positivas o etanol causa colapso da parede celular, já em Gram-negativas, a parede apresenta estrutura semelhantes a bolhas.

O hipoclorito de sódio 5,25%, foi método descrito em Rogers et al. (2004) como o de melhor resultado, sendo o único tratamento que não apresentou microrganismos contaminantes nas camadas internas e manteve a integridade dos internos. O hipoclorito de sódio age sobre uma série de moléculas orgânicas como proteínas, lipídeos, e ácidos

nucléicos. Seu mecanismo de ação é baseada na liberação do íon hipoclorito ( $\text{OCl}^-$ ) a partir do ácido hipocloroso ( $\text{HOCl}$ ) em solução aquosa, os quais possuem forte ação oxidante sobre biomoléculas (FUKUZAKI, 2006). No presente experimento, os testemunhos de gelo era inicialmente estéreis, portanto os dados de integridade interna são irrelevantes para esse estudo. Porém, nos testes realizados neste trabalho, todas as camadas apresentaram algum tipo de contaminação. Apesar disso, uma diminuição do número de contaminantes foi observado entre as camadas 2 e 3 (Tabela 3).

O cloreto de benzalcônio 0,5% (BKC) é um agente antimicrobiano que possui atividade contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, bem como fungos e vírus. O BKC possui propriedades bacteriostáticas (inibição do crescimento microbiano) e bactericidas (elimina bactérias). O agente altera a hidrofobicidade das membranas celulares, alterando assim suas funções (SHAH & NASEBY, 2017). O produto utilizado no experimento foi Herbalvet<sup>®</sup>, além de indicado como desinfetante, é também desodorizante com propriedade tensoativa biodegradável e não corrosiva, para uso em hospitais veterinários, mesas de atendimento e de cirurgia e instrumentais cirúrgicos. No presente experimento proporcionou descontaminação apenas para as camadas 1 e 3, em apenas um dos testes. Lucci et al (1999) propõe a diluição de BKC em álcool para descontaminação de esclera humana *in vitro*. Esse tipo de diluição em álcool não foi testada, mas parece promissora. Não foram encontrados dados na literatura do seu uso para descontaminação de gelo.

O tratamento com radiação UV-C (280 nm,  $27.540 \text{ J.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) apresentou contaminação apenas na camada mais externa, e apenas para um dos testes. A UV-C foi utilizada como parte do método de descontaminação em Castello et al. (1999), o protocolo foi testado através da criação de núcleos artificiais de gelo semeados com pigmentação bactérias indicadoras (núcleo interior semeado com *Chromobacterium* sp., e núcleo externo semeado com *Serratia marcescens*).

Com relação ao volume de gelo obtido após a utilização das metodologias podemos dizer que os métodos foram comparativamente

eficientes. Dos 100 mL, apenas 30 mL foram perdidos durante o processo, ou seja, um total de 30%. Segundo Duarte (2010) em aproximadamente 8 kg de gelo, o aproveitamento foi em menos de 2 kg, ou seja, em torno de 60% do volume do gelo foi perdido durante a descontaminação. Os processos de descontaminação a perda de volume foi relativamente baixa.

## 6.2 Recomendações para descontaminação de testemunhos de gelo

Devido a nenhuma das metodologias testadas apresentar eliminação de 100% dos contaminantes nas 3 camadas, o processo ideal pode ser de somar a utilização do cloreto de benzalcônio (BKC) 0,5% e da irradiação UV-C (280 nm,  $27.540 \text{ J.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ). Rogers et al. (2005) argumentam que apesar de promissora, a irradiação UV-C não elimina microrganismos como *Ulocladium atrum*. Porém, a utilização de *D. radiodurans* indicou que a metodologia foi eficiente. A robusta bactéria *D. radiodurans* é extremamente resistente a muitos agentes que causam dano ao DNA como radiação ionizante e radiação UV (DEA & RADMAN 2011). Seria importante, além dos métodos de descontaminação, o uso de cepas de referência e construção de uma biblioteca de contaminantes, incluindo resistentes a BKC e UV-C. Sabe-se que a UV-C tem efeitos mutagênicos sobre o DNA, logo uma exposição de testemunhos de gelo à esta radiação pode comprometer a comunidade microbiana da amostra (MADIGAN et al. 2015). Nos experimentos aqui apresentados, o efeito da UV-C não foi avaliado na mutagenicidade de moléculas de DNA. Recomenda-se um estudo mais específico para avaliar a dose de 2 min de UV-C sobre a comunidade microbiana do gelo por métodos moleculares.

O protocolo de descontaminação desenvolvido para análises de Ecologia Microbiana e Astrobiologia de microrganismos do gelo é baseado nos resultados apresentados acima. Antes de realizar o procedimento de descontaminação, adicionar todo o material necessário e soluções em geladeira ou freezer, para minimizar fraturas no gelo. Após retirados do freezer e colocados sob uma capela de fluxo laminar

os testemunhos devem ser colocados em um becker estéril resfriado. A solução de BKC 0,5% gelada também deve ser adicionada ao becker e deixada em contato com o gelo por 10 segundos. O volume de BKC 0,5% deve ser suficiente para cobrir a amostra (para o estudo em um testemunho de 100 mL devem ser utilizados 40 mL de solução). Transferir a amostra para um funil estéril e lavá-la com água destilada autoclavada resfriada (para 100 mL são utilizados 20 mL, o suficiente para uma rinsagem de 3 segundos de água corrente). Com outro funil forrado com papel alumínio, colocar a amostra sob luz UV-C (280 nm,  $27.540 \text{ J.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) por 2 min, virar a amostra e deixar o outro lado exposto por mais 2 min. O manuseio do testemunho pode ser realizado com uma pinça kelly ou uma folha de papel alumínio previamente esterilizada. Após esses procedimentos, transferir a amostra para um novo funil esterilizado para o derretimento e obtenção das alíquotas em tubos estéreis. A água obtida dessas camadas pode então ser analisada para procedimentos de cultura celular, contagem em microscopia, entre outros.

## 7. CONCLUSÕES

O presente estudo desenvolveu um protocolo de descontaminação de amostras de gelo para análises de Ecologia Microbiana e Astrobiologia. Dentre os métodos testados (etanol 70%, hipoclorito de sódio 5,25%, cloreto de benzalcônio 0,5%, e radiação UV-C 280 nm  $27.540 \text{ J.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ), nenhum método se mostrou totalmente eficaz quando avaliado individualmente. Entretanto, o BKC 0,5% e radiação UV-C demonstraram capacidade similar de eliminar os contaminantes nas camadas 1 e 2, respectivamente. Dessa forma, conclui-se que o emprego desses dois métodos em conjunto pode ser suficiente para realizar a descontaminação de amostras de gelo.

Os resultados obtidos neste estudo diferiram dos encontrados na literatura, sendo que não foram verificados dados de utilização do cloreto de benzalcônio para descontaminação de gelo.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABYZOV S. S. **Microorganisms in the Antarctic Ice.** In: FRIEDMAN, E.I. (Ed). Antarctic Microbiology, John Willey & Sons, Inc, New York, p. 265-295, 1993.

ABYZOV S. S.; HOOVERB R. B.; IMURAC S.; MITSKEVICH I. N.; NAGANUMAD T.; POGLAZOVAA M. N.; IVANOVA M. V. **Use of different methods for discovery of ice-entrapped microorganisms in ancient layers of the Antarctic glacier.** Advances in Space Research, 33:1222 -1230, 2004.

ALEKHINA I. A.; MARIE D.; PETIT R.; LUKIN V. V.; ZUBKOV V. M.; BULAT S. A. **Molecular analysis of bacterial diversity in kerosene-based drilling fluid from the deep ice borehole at Vostok, East Antarctica.** FEMS Microbiology Ecology, 59 (2): 289-299, 2007.

BROCK, T. D. **Life at high temperatures.** Science, 158: 1012-1019, 1967.

BULAT S. A.; ALEKHINA I. A.; BLOT M; PETIT J.R.; ANGELIS M.; WAGENBACH D.; LIPENKOV V. Y.; VASILYEVA L. P.; WLOCH D. M.; RAYNAUD D.; LUKIN V. V. **DNA signature of thermophilic bacteria from the aged accretion ice of Lake Vostok, Antarctica: implications for searching for life in extreme ice environments.** International Journal of Astrobiology, 3 (1): 1–12, 2004.

BULAT S. A.; ALEKHINA I. A.; LIPENKOV Y. V.; LUKIM V. V.; MARIE D.; PETOT J. R. **Cell concentrations of microorganisms in Glacial and Lake Ice of the Vostok ice core, East Antarctica.** Microbiology, 78 (6): 808–810, 2009.

BULAT S. A.; ALEKHINA I. A.; MARIE D.; MARTINS J.; PETIT J. R. **Searching for life in extreme environments relevant to Jovian's Europa: Lessons from subglacial ice studies at Lake Vostok (East**

**Antarctica**). *Advances in Space Research*, 48: 697-701, 2011.

CASTELLO J. D.; ROGERS S. O.; STARMER W. T.; CATRANIS C. M.; MA L.; BACHAND G. D.; ZHAO Y.; SMITH J. E. **Detection of tomato mosaic tobamovirus RNA in ancient glacial ice**. *Polar Biology*, 22: 207-212, 1999.

CHRISTNER B. C.; MIKUCKI A.; FOREMAN C. M.; DENSON J.; PRISCU J. C. **Glacial ice cores: A model system for developing extraterrestrial decontamination protocols**. *Icarus*, 174: 572-584, 2005.

CHRISTNER B. C. **Detection, recovery, isolation, and characterization of bacteria in glacial ice and Lake Vostok accretion ice**. Ph.D thesis, Department of Microbiology, The Ohio State University, 2002

COX M. M.; BATTISTA J. R. ***Deinococcus radiodurans* — the consummate survivor**. *Nature Reviews Microbiology* 3:882–892, 2005.

DANCER S. J.; SHEARS P.; PLATT D. J. **Isolation and characterization of coliforms from glacial ice and water in Canada's High Arctic**. *Journal of applied microbiology* 82 (5), 597-609, 1997.

DAVIES B. J.; HAMBREY M. J.; SMELLIE J. L.; CARRIVICK J. L. GLASSER N. F. **Antarctic Peninsula Ice Sheet evolution during the Cenozoic Era**. *Quaternary Science Reviews*, 31:30-66, 2012.

DEA S.; RADMAN M. **Oxidative Stress Resistance in *Deinococcus radiodurans***. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 75(1):133, 2011.

DES MARAIS D. J. D.; NUTH III J. A.; ALLAMANDOLA L. J.; BOSS A. P.; FARMER J. D.; HOEHLER T. M.; JAKOSKY B. M.;

MEADOWS V. S.; POHORILLE A.; RUNNEGAR B.; SPORMANN A. M. **The NASA Astrobiology Roadmap**. ASTROBIOLOGY Volume 8, Number 4, 2008

DUARTE, R. T. D. **Micro-organismos em ambientes criogênicos: gelo glacial, solos expostos por recuo de geleiras e *permafrost* polares**. 2010. 201f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

DUARTE, R. T. D.; NÓBREGA, F.; NAKAYAMA, C. R.; PELLIZARI, V. H. **Brazilian research on extremophiles in the context of astrobiology**. International Journal of Astrobiology, 11:325-333, 2012.

DYURGEROV M. B. MEIER M. F. **Glaciers and the changing Earth system: a 2004 snapshot**. Vol. 58. Boulder: Institute of Arctic and Alpine Research, University of Colorado, 2005.

GUIZELINI B. P.; VANDENBERGHE L. P. S.; SELLA S. R. **Study of the influence of sporulation conditions on heat resistance of *Geobacillus stearothermophilus* used in the development of biological indicators for steam sterilization**. Archives of Microbiology, 94:991–999, 2012.

HODSON A.; ANESIO A. M.; TRANTER M.; FOUNTAIN A.; OSBORN M.; PRISCU J.; LAYBOURN-PARRY J.; SATTLER B. **Glacial Ecosystems**. Ecological Monographs, Vol 78(1), 2008.

HUBBARD, B.; GLASSER, N. (Eds.) **Field Techniques in Glaciology and Glacial Geomorphology**. John Wiley & Sons, West Sussex, Inglaterra, 2005.

KIRBY B. M.; BANARD D.; TUFFIN I. M.; COWAN D. A. **Ecological Distribution of Microorganisms in Terrestrial, Psychrophilic Habitats**. Extremophiles Handbook, pp 839-863.

Springer Japan, 2011.

LEDERBERG J.; SAGAN C. **Microenvironments for life on Mars.** Proceedings of the National Academy of Science (PNAS). 8:1473-1475, 1962.

LUCCI L. M.; YU M. C.; HOFLING-LIMA A. L. **Decontamination of human sclera: an in vitro study.** Cornea Sep;18(5):595-8, 1999.

MA L.; CATRANIS C. M.; STARMER W.T.; ROGERS S. O. **The significance and implications of the discovery of filamentous fungi in glacial ice.** In: COSTELLO J. D.; ROGERS S. O. (Eds.) Life in Ancient Life. Princeton University, NJ. 2005.

MADIGAN M. T.; MARTINKO J. M.; BENDER K. S.; BUCKLEY D. H.; STAHL D. A.; BROCK T. **Brock Biology of Microorganisms.** 14th Edition. Pearson, 2015.

MALTBY R.; LEATHAM-JENSEN M. P.; GIBSON T.; COHEN P. S.; CONWAY T. **Nutritional Basis for Colonization Resistance by Human Commensal *Escherichia coli* Strains HS and Nissle 1917 against *E. coli* O157:H7 in the Mouse Intestine.** PLoS One, Vol 18(1), 2013.

MARGESIN R., MITEVA V. **Diversity and ecology of psychrophilic microorganisms.** Research in Microbiology, 162:346-361, 2011.

MARGESIN R.; SCHINNER F.; MARX J.C.; GERDAY C. **Psychrophiles: from Biodiversity to Biotechnology.** Primeira Edição, Springer; 2008.

MERINO, N.; ARONSON, H.; BOJANOVA, DP.; FEYHL-BUSKA, J.; WONG, ML; ZHANG, S.; GIOVANNELLI, D. **Living at the extremes: Extremophiles and the limits of life in a planetary context.** Microbiology, 10:780, 2019.

MITEVA, V. I. Bacteria in snow and glacier ice. In: MARGESIN, R.; SCHINNER, F.; MARX, J.-C.; GERDAY, C. (Eds). **Psychrophiles: from biodiversity to biotechnology**. Springer, Berlin, p. 31-50, 2008.

MITEVA, V. I.; SHERIDAN, P. P.; BRENCHLEY, J. E. **Phylogenetic and Physiological Diversity of Microorganisms Isolated from a Deep Greenland Glacier Ice Core**. *Appl Environ Microbiol*, 70:202-213, 2004.

NAGHILIL H. TAJIK H.; MARDANIL K.; ROUHANIL S. M. R.; EHSANIL A.; ZARE P. **Validation of drop plate technique for bacterial enumeration by parametric and nonparametric tests**. *Veterinary Research Forum*, 4 (3):179-183, 2013.

PRICE B. P. **A habitat for psychrophiles in deep Antarctic ice**. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(3):1247-1251, 2000.

PRICE B. P. **Microbial life in glacial ice and implications for a cold origin of life**. *FEMS Microbiology Ecology*, 59 (2):217-231, 2007.

PRISCU J. C.; ADAMS E. E.; LYONS W. B.; VOYTEK M. A.; MOGK D. W.; BROWN R. L.; MCKAY C. P. TAKACS C. D.; WELCH K. A.; WOLF C. F.; KRISHTEIN J. D.; AVCI R. **Geomicrobiology of subglacial ice above Lake Vostok, Antarctica**. *Science* 286 (5447), 2141-2144, 1999

ROGERS S. O.; MA L.; ZHAO Y.; SHIN S.; ZHANG G.; CATRANIS C. M.; STARMER W. T.; CASTELLO J. D. **Recommendations for Elimination of Contaminants and Authentication of Isolates in Ancient Ice Cores**. In: COSTELLO J. D.; ROGERS S. O. (Eds.) *Life in Ancient Life*. Princeton University, NJ. 2005.

ROGERS S. O.; THERAISNATHAN V.; MA L. J.; ZHAO Y.; ZHANG

G.; SHIN S. -G.; CASTELLO J. D.; STARMER W. T. **Comparisons of Protocols for Decontamination of Environmental Ice Samples for Biological and Molecular Examinations.** Applied Environment Microbiology, 70(4):2540-2544, 2004.

SCHOPF, J. W. When did life begin?. In: SCHOPF, J. W. (Ed). **Life's Origin: the beginnings of biological evolution.** University of California Press, Berkeley, USA, p. 158-180, 2002.

SHAH N.; NASEBY D. C. **Efficacy of benzalkonium chloride against bioluminescent *Pseudomonas aeruginosa* ATCC9027 constructs.** Biosensors and Bioelectronics, 97:8–15, 2017.

SHARIFA A. A.; NEOH Y. L. KHAIRUL O.; HALIM A. M.; JAMALUDIN M.; AZMAN M. A. B.; HING H. L. **Effects of methanol, ethanol and aqueous extract of *Plantago major* on Gram positive bacteria, Gram negativa and yeast.** Annals of Microscopy, Vol 8, 2008.

SIMÕES J. C. **Glossário da língua portuguesa da neve, do gelo e termos correlatos.** Pesquisa Antártica Brasileira 4:119-154, 2004.

WILLERSLEV E.; COOPER A. **Ancient DNA.** Proceedings of the Royal Society B, 272: 3–16, 2004.

WILLERSLEV E.; HANSEN A. J.; POINAR H. N. **Isolation of nucleic acids and cultures from fossil ice and permafrost.** Trends in Ecology and Evolution, no 3, Vol 19, 2004.

WILLERSLEV E.; HANSEN A. J.; CHRISTENSEN B.; STEFFESEN J. P.; ARCTANDER P. **Diversity of Holocene life forms in fossil glacier ice.** Proceedings of the National Academy of Sciences 96 (14), 8017-8021, 1999.