

RESISTÊNCIAS INTRÍNSECAS DE POLIEXTREMÓFILOS E SUAS IMPLICAÇÕES ASTROBIOLÓGICAS.

Raphael Rutte¹, Mario Rene Sibut Mares de Souza²

Resumo

Este artigo de revisão objetiva explorar as resistências que microrganismos, especialmente bactérias, apresentam às condições inhóspitas e suas implicações para a astrobiologia. Muitos seres vivos microscópicos conseguem sobreviver à extremos de temperaturas, pressão, alguns tipos de radiação, dentre outros fatores concomitantes ou exclusivos, recebendo a denominação de “extremófilos”. Muitos desses conseguem sobreviver, inclusive, às técnicas e equipamentos mais avançados de esterilização que a humanidade já desenvolveu e que estão presentes, por exemplo, em salas limpas de instalações de montagem de espaçonaves. Tanto bactérias formadoras de esporos quanto não esporulantes, como *Bacillus pumilus* cepa SAFR-032, *Serratia liquefaciens*, *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*, e *Staphylococcus spp.* foram encontradas por vários estudos em diferentes salas limpas de instalações aeroespaciais, tanto antes quanto durante e depois da montagem de espaçonaves. Poliextremófilos conseguem sobreviver a mais de uma condição biocida concomitantemente, tendo maior facilidade para se adaptar a um ambiente novo e inhóspito (para a vida como a conhecemos). Portanto, surgem preocupações astrobiológicas. Microrganismos terrestres podem ser carregados na superfície ou em componentes internos de espaçonaves e acabar contaminando corpos celestes, prejudicando, e.g., uma missão de detecção de vida fora da Terra. Isso caracteriza a *forward contamination*. Conversivamente, microrganismos extraterrestres potencialmente prejudiciais podem ser inadvertidamente trazidos ao nosso planeta, afetando a nossa ecologia, o que caracteriza a *back contamination*. Seres vivos poliextremófilos são, teoricamente, mais propensos à sobreviver a uma viagem espacial e contaminar corpos celestes, adaptando-se a novos ambientes. As preocupações astrobiológicas são relevantes não somente para a exploração espacial, mas para as áreas da saúde e alimentícia, pois todos os avanços em tecnologias de esterilização beneficiarão a humanidade como um todo.

Palavras-chave: Astrobiologia. Extremófilos. Contaminação.

Abstract

The following article is a literature review that aims to explore the resistances that microorganisms, especially bacteria, show to inhospitable conditions and their implications to astrobiology. Many microscopic living beings can survive to extreme temperatures, pressure, some kinds of radiation, amongst other factors simultaneously or exclusively, receiving the denomination “extremophiles”. Many of these can survive the most advanced sterilization techniques and equipment that mankind has ever developed and that are present, for instance, in spacecraft assembly facility clean rooms. Both spore forming and non-sporulating bacteria, like *Bacillus pumilus* strain SAFR-032, *Serratia liquefaciens*, *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*, and *Staphylococcus spp.* were found by various studies in different assembly facility cleanrooms, before, during, and after spacecraft assembly processes. Poliextremophiles can survive more than one biocidal condition at the same time, thus having greater ease at adapting to a new and inhospitable (to life as we know it) environment. Therefore, astrobiological worries arise. Terrestrial microorganisms may be carried on the surface or in internal components of spacecraft and end up contaminating celestial bodies, harming, for example, a mission to detect life outside Earth. This characterizes forward contamination. Conversely, potentially harmful

1 Acadêmico do curso de Biomedicina, Universidade Tuiuti do Paraná, Curitiba, PR. Endereço eletrônico para correspondência: Raphael Rutte, r-rutte@hotmail.com

2 Biólogo, Professor Mestre, Universidade Tuiuti do Paraná, Curitiba, PR. Endereço eletrônico para correspondência: Mario Rene Sibut Mares de Souza, mario.rene@utp.br

extraterrestrial microorganisms may be, inadvertently, brought back to our planet, affecting our ecology, which characterizes back contamination. Poliextremophile life forms are, theoretically, more prone to survive a space trip and contaminate celestial bodies, adapting to new environments. The astrobiological worries are relevant not only to space exploration, but to the health and food industry, for every advance in sterilization techniques will benefit humankind as a whole.

Keywords: Astrobiology. Extremophiles. Contamination.

Introdução

Seres vivos que habitam ambientes extremos, com condições que outras formas de vida são incapazes de tolerar, são conhecidos como extremófilos. Acidez ou alcalinidade exacerbadas, altíssimas ou baixíssimas temperaturas, nichos hipo ou hiperbáricos, condições oligotróficas, dentre outros, são exemplos de ambientes extremos. Organismos poliextremófilos são seres vivos capazes de sobreviver a mais de uma condição físico-química concomitantemente. Por exemplo, o estudo de Schuerger *et al.* (2013) mostrou que uma cepa da bactéria Gram-negativa *Serratia liquefaciens* conseguiu proliferar em um ambiente rico em gás carbônico (anóxico), a 7 milibares de pressão (hipobárico), com temperatura de 0 °C (RAMPELOTTO, 2013).

A astrobiologia é um campo de pesquisa ainda muito jovem no Brasil e no mundo. Seu objetivo é buscar entender a vida no universo, seja sua origem ou sua evolução, de maneira transdisciplinar. Microrganismos são muito estudados nessa ciência emergente, pois entendendo melhor a vida na Terra por meio do estudo de organismos extremófilos, podemos especular que alguns seres vivos possam habitar planetas como Marte ou algumas luas de Júpiter. Alguns seres vivos conseguem sobreviver às condições inóspitas do espaço sideral devido às suas resistências intrínsecas. Isso gera uma grande preocupação para a comunidade científica, visto que, como é praticamente impossível esterilizar uma espaçonave tripulada ou não, há um risco de prejudicar missões de detecção de vida fora da Terra e até mesmo de contaminar corpos celestes. (GALANTE *et al.*, 2016; PRICE *et al.*, 2018).

Resistência intrínseca é toda e qualquer propriedade natural, genotípica, que um microrganismo apresenta, transmitida aos seus descendentes, e que lhe confere uma resistência a um parâmetro biocida. Um exemplo comum de resistência intrínseca é a membrana de bactérias Gram-negativas, que serve como barreira contra antibióticos. Outro exemplo: *Bacillus pumilus* cepa SAFR-032 produzem esporos intrinsecamente mais resistentes ao calor, radiações ultravioleta e gama, peróxido de hidrogênio, falta de nutrientes etc. Este artigo de revisão tem por fim explorar a resistência que certos microrganismos apresentam às condições excepcionalmente inóspitas e suas implicações astrobiológicas (ARZANLOU; CHAI; VENTER, 2017).

Método

Este artigo de revisão foi realizado utilizando artigos e publicações encontrados nos bancos de dados LILACS, PubMed, e SciELO. Foram utilizadas as palavras chave “astrobiologia”,

“extremófilos”, e “contaminação”. Apenas documentos dos últimos 8 anos foram utilizados. O período de pesquisa é de julho a novembro de 2018.

Discussão

Uma grande preocupação atual da comunidade científica, em se tratando de exploração espacial, é a *forward contamination*. Esta é definida como a contaminação de um corpo celeste por formas de vida terrestres. Uma hipótese é a sobrevivência de microrganismos à uma viagem pelo espaço (aderidos à parte externa de uma espaçonave) com destino à, por exemplo, Marte, prejudicando missões de detecção de vida fora da Terra. Por outro lado, teoricamente, pode ocorrer a *back contamination*, que seria a contaminação da Terra por formas de vida extraterrestres trazidas por humanos em missões de retorno ao nosso Pálido Ponto Azul. Segundo Venkateswaran, La Duc e Horneck (2014), a *forward contamination* apresenta perigo para a integridade científica de missões espaciais de detecção de vida, enquanto que a *back contamination* afeta a segurança da vida na Terra.

Portanto, há a necessidade de medidas de proteção planetária (PP), estabelecidas em um tratado pelo Comitê de Pesquisa Espacial (COSPAR) (ing.: *Committee on Space Research*), uma entidade internacional cuja responsabilidade é fazer com que todas as missões espaciais cumpram as normas acordadas. Exemplos de tais normas incluem a prioridade de impedir *back contamination*, avaliação robótica de regiões inexploradas anteriormente ao contato direto com humanos, e a proibição de sistemas robóticos e/ou humanos contaminarem Regiões Especiais de Marte. Desta maneira, repise-se, o objetivo prioritário da PP é evitar a *back contamination*, mas a *forward contamination* também é levada em consideração minuciosamente, devido ao risco anteriormente citado. (COSPAR, 2011; BENARDINI III *et al.*, 2014).

As Regiões Especiais de Marte são definidas como áreas onde há um potencial de existência de vida marciana ou onde organismos terrestres possivelmente possam proliferar, segundo Schuenger *et al.* (2013). Alguns exemplos dessas regiões incluem calotas polares, geleiras, depósitos de sais, e áreas de atividade hidrotermal. A carga microbiana ou bioburden de equipamentos destinados a pousar em Marte deve ser limitada a $\leq 5 \cdot 10^5$ esporos no total, de acordo com NASA (2011). O impacto que um equipamento ou uma espaçonave possa vir a sofrer durante o pouso em algum corpo celeste, pode ocasionar o desprendimento de esporos aderidos às superfícies do objeto fabricado pelo homem, espalhando-os inadvertidamente. Isso é um grande problema, especialmente ao considerarmos as Regiões Especiais de Marte, que são as prováveis áreas-alvo de futuras missões de detecção de vida. Esporos e células vegetativas resistentes, portanto, apresentam um risco significativo de *forward contamination* para tais missões (SCHWENDNER *et al.*, 2013).

Para combater a *forward contamination*, alguns dos procedimentos de descontaminação utilizados em instalações de montagem de espaçonaves, onde todo o processo de montagem propriamente dita ocorre em salas limpas, incluem exposição à calor seco (as peças são

submetidas à temperaturas de pelo menos 110° C por pelo menos 50 a 250 horas, de acordo com suas particularidades) e à radiação ionizante; uso de peróxido de hidrogênio vaporizado e álcool; além de limpeza completa de pisos e filtros de ar *High Efficiency Particulate Air* (HEPA), que conseguem remover 99,97% de partículas maiores que 0,3 microns de diâmetro (impossibilitando a passagem da maioria dos esporos, que possuem aproximadamente 1 micron de diâmetro), tapetes aderentes nas entradas trocados regularmente; EPIs que incluem toucas para cabelo e barba e máscaras faciais, tudo por baixo de trajes para sala limpa de corpo inteiro, botas especiais cobertas com propé, e luvas específicas. Pesquisas de contaminação rotineiras são realizadas para monitorar níveis de atividade biológica. Por último, a falta de nutrientes, água, e cofatores contribui para a inospitalidade dessas salas limpas (BENARDINI III *et al.*, 2014; BASHIR *et al.*, 2016).

As pesquisas de contaminação rotineiras são baseadas no uso de toalhetes ou swabs para coletar amostras, seguido de um choque térmico (~80° C por 15 minutos) que deveria matar todas as formas vegetativas de micróbios, restando apenas os esporos mais resistentes. Não é exatamente o que acontece, pois bactérias não-formadoras de esporos, como *Acinetobacter spp.*, *Micrococcus spp.*, e *Staphylococcus spp.* conseguem sobreviver ao choque térmico. Assim como o uso indiscriminado de antibióticos estimula o desenvolvimento de resistência dos microrganismos aos mesmos, as condições extremas impostas às comunidades microbianas em salas limpas apresentam um impacto às mesmas em níveis moleculares, de acordo com Muster *et al.* (2015). Mickol, Page e Schuerger (2017) explicam que, mesmo com várias técnicas de esterilização, é muito difícil esterilizar completamente uma espaçonave antes de seu lançamento.

Consequentemente, uma seleção artificial ocorre nas salas limpas: vários estudos relataram uma diminuição na diversidade de microrganismos ao longo do tempo, mas também descreveram um aumento na concentração individual dos micróbios que conseguem sobreviver às medidas de limpeza, o que sugere que medidas de descontaminação favorecem o crescimento de certos microrganismos, selecionando-os. Por exemplo, os *Acinetobacter spp.* investigados por Muster *et al.* (2014) aumentaram sua abundância em aproximadamente 11 vezes durante o processo de montagem de aeronaves, mesmo com os rigorosos procedimentos de descontaminação em vigor. O estudo de Bashir *et al.* (2016) encontrou patógenos potenciais e seus fatores de virulência nas três salas limpas examinadas, diferentes e distantes geograficamente entre si, durante a montagem de espaçonaves da NASA. Dentre os microrganismos encontrados, quatro foram detectados, em comum, em todas as salas limpas: *Acinetobacter baumannii*; *Acinetobacter lwoffii*; *Escherichia coli*; e *Legionella pneumophila*.

Uma bactéria muito estudada no campo da astrobiologia é *Bacillus pumilus* cepa SAFR-032, devido à sua resistência elevada à radiação UV. É um micróbio muito comumente encontrado em salas limpas de instalações de montagens de espaçonaves. Com o intuito de testar um cenário de *forward contamination*, Khodadad *et al.* (2017), lançaram um balão de alta altitude chamado de E-MIST na estratosfera, a ~31km acima do nível do mar, contendo alíquotas de esporos de

B. pumilus SAFR-032 tanto expostos à radiação solar quanto protegidos dela. Após as 8 horas do experimento, apenas 0,0007% dos esporos das alíquotas expostas à luz UV sobreviveu, enquanto que as populações protegidas da luz solar direta (mas expostas à pressão e temperatura reduzidas, dentre outros fatores) não sofreram perdas. Isto permite afirmar que a radiação UV é um dos principais fatores biocidas, especialmente a luz UV do tipo C. Berry *et al.* (2010) destacam que a exposição direta à luz solar consegue eliminar muito rapidamente qualquer microrganismo, mas uma camada de poeira ou pedras, mesmo que fina, pode conferir proteção contra a luz UV, possibilitando a sobrevivência de micróbios à viagens espaciais. Até mesmo camadas formadas pelos próprios microrganismos podem conferir proteção.

Uma esterilização completa de espaçonaves não é, atualmente, possível. Não somente por causa da resiliência que certos microrganismos apresentam, mas por causa da fragilidade dos instrumentos à bordo, componentes eletrônicos termolábeis e com geometria superficial mais elaborada do que a de um painel exterior, segundo Moissi-Eichinger, Rettberg, e Pukall (2012) e Khodadad *et al.* (2017). Stapelmann *et al.* (2013) testaram o uso de plasma de baixa pressão para inativar esporos de *B. pumilus* SAFR-032 e *Bacillus subtilis* 168 em parafusos, obtendo sucesso apenas com a utilização concomitante de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) vaporizado e, por fim, concluindo que mais estudos devem ser realizados sobre essa técnica e que a mesma possui potencial para ser usada a fim de esterilizar equipamentos mais sensíveis. Lang *et al.* (2017), em seu estudo realizado com amostras coletadas diretamente da Estação Espacial Internacional (EEI), frisam que a maior parte de microrganismos encontrados dentro de ambientes construídos por humanos provém de humanos. Na EEI, a única fonte de micróbios é a troca de pessoal ocasional ou entrega de cargas. De qualquer forma, esses microrganismos que chegam à EEI sobreviveram a todos os protocolos criados para destruí-los.

Por fim, fatores físicos como variações gravitacionais, radiação, extremos de temperatura, vácuo, falta de nutrientes estão presentes no espaço e são difíceis de serem simulados concomitantemente. Khodadad *et al.* (2017) destacam que nenhum arranjo de lâmpadas consegue simular todo o espectro de comprimentos de onda de radiações presentes no espaço e em Marte, muito menos zênites solares. Para um microrganismo que esteja viajando grudado à uma espaçonave conseguir proliferar após pousar, ele deve não somente sobreviver à todas essas intempéries, também deve conseguir se adaptar aos fatores do ambiente local e suas fontes de energia. Schuerger *et al.* (2013) sugerem que a variedade ecológica de uma espécie, ou seja, a capacidade de um ser vivo se adaptar a vários ambientes ecológicos (e.g. *Serratia liquefaciens* está presente em diversos ecossistemas, como rizosferas de diversas plantas, alimentos industrializados, água potável da EEI, além de ser um patógeno de peixes e humanos), pode ser muito mais relevante para que tal espécie evolua e prospere, desenvolvendo vias metabólicas que possibilitem a sobrevivência em ambientes novos e inesperados, em contraste com a “especialização” dos extremófilos, que geralmente evoluem de forma direcionada para somente um ou outro fator inóspito para a vida (SCHWENDNER *et al.*, 2013).

Conclusão

Em conclusão, as preocupações com a eficácia de métodos de esterilização não concernem apenas a exploração espacial. As indústrias biomédica e alimentícia, por exemplo, podem se beneficiar de quaisquer avanços científicos que possam melhorar procedimentos de esterilização.

A astrobiologia é um campo científico inter, multi, e transdisciplinar. Físicos teóricos e experimentais, microbiologistas, engenheiros (robóticos, espaciais), biólogos, geólogos, astrônomos, químicos e, por fim, biomédicos, são profissionais que podem contribuir com o avanço dessa ampla área de interesse internacional, beneficiando a humanidade como um todo.

Referências

ANDRADE, Leonardo Neves de. Estudo fenotípico e molecular de beta-lactamases de espectro estendido e AmpC em enterobactérias isoladas de pacientes com suspeita de meningite. 2008. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

ARZANLOU, Mohsen; CHAI, Wern Chern; VENTER, Henrietta. Intrinsic, adaptive and acquired antimicrobial resistance in Gram-negative bacteria. *Essays in Biochemistry*, v. 61, p. 49-59, 2017.

BASHIR, Mina; AHMED, Mahjabeen; WEINMAIER, Thomas; CIOBANU, Doina; IVANOVA, Natalia; PIEBER, Thomas R.; VAISHAMPAYAN, Parag A. Functional Metagenomics and Spacecraft Assembly Cleanrooms: Presence of Virulence Factors Associated with Human Pathogens. *Frontiers in Microbiology*, v. 7, p. 1-12, 2016.

BENARDINI III, James N.; LA DUC, Myron T.; BEAUDET, Robert A.; KOUKOL, Robert. Implementing Planetary Protection Measures on the Mars Science Laboratory. *Astrobiology*, v. 14, n. 1, p. 27-32, 2014.

BERRY, Bonnie J; JENKINS, David G.; SCHUERGER, Andrew C. *Effects of Simulated Mars Conditions on the Survival and Growth of Escherichia coli and Serratia liquefaciens*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 76, n. 8, p. 2377-2386, 2010.

COSPAR, 2011. *COSPAR Planetary Protection Policy (20 October, 2002, as amended to 24 March 2011)*, COSPAR, Paris. Disponível em: < <https://cosparhq.cnes.fr/sites/default/files/pppolicy.pdf>>. Acesso em: 06/10/2018.

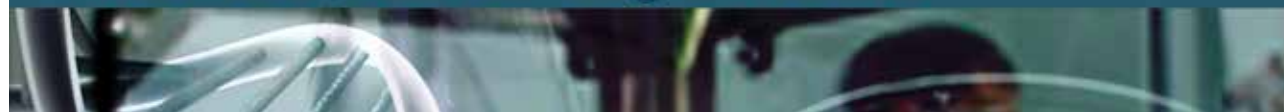
GALANTE, Douglas; SILVA, Evandro P.; RODRIGUES, Fabio; HORVATH, Jorge E.; AVELLAR, Marcio G. B. *Astrobiologia [livro eletrônico]: uma ciência emergente*. 1 ed. São Paulo: Tikinet Edição, 390 p., 2016.

KHODADAD, Christina L.; WONG, Gregory M.; JAMES, Leandro M.; THAKRAR, Prital J.; LANE, Michael A.; CATECHIS, John A.; SMITH, David J. Stratosphere Conditions Inactivate Bacterial Endospores from a Mars spacecraft Assembly Facility. *Astrobiology*, v. 17, n. 4, p. 337-350, 2017.

LANG, Jenna M.; COIL, David A.; NECHES, Russell Y.; BROWN, Wendy E.; CAVALIER, Darlene; SEVERANCE, Mark; HAMPTON-MARCELL, Jarrad T.; GILBERT, Jack A.; EISEN, Jonathan A. A microbial survey of the International Space Station. *PeerJ*, p. 1-20, 2017.

MICKOL, Rebecca L.; PAGE, Jessica L.; SCHUERGER, Andrew C. Magnesium Sulfate Salt Solutions and Ices Fail to Protect *Serratia liquefaciens* from the Biocidal Effects of UV Irradiation under Martian Conditions. *Astrobiology*, v. 17, n. 3, p. 1-12, 2017.

MOISSL-EICHINGER, Christine; RETTBERG, Petra; PUKALL, Rüdiger. The First Collection of Spacecraft-Associated Microorganisms: A Public Source for Extremotolerant Microorganisms from Spacecraft Assembly



Clean Rooms. *Astrobiology*, v. 12, n. 11, p. 1024-1034, 2012.

MUSTER, N.; DERECHO, I.; DALLAL, F.; ALVAREZ, R.; MCCOY, K. B.; MOGUL, R. Purification, Biochemical Characterization, and Implications of an Alkali-Tolerant Catalase from the Spacecraft-Associated and Oxidation-Resistant *Acinetobacter gyllenbergii* 2P01AA. *Astrobiology*, v. 15, n. 4, p. 291-300, 2015.

NASA. Planetary protection provisions for robotic extraterrestrial missions. NPR 8020.12D, National Aeronautics and Space Administration, Washington, 2011.

PRICE, Alex; PEARSON, Victoria K.; SCHWENZER, Susanne P.; MIOT, Jennyfer; OLSSON-FRANCIS, Karen. Nitrate-Dependent Iron Oxidation: A Potential Mars Metabolism. *Frontiers in Microbiology*, v. 9, 15 p., March/2018.

RAMPELOTTO, Pabulo Henrique. Extremophiles and Extreme Environments. *Life*, v. 3, p. 482-485, 2013.

SCHUERGER, Andrew C.; ULRICH, Richard; BERRY, Bonnie J.; NICHOLSON, Wayne L. Growth of *Serratia liquefaciens* under 7mbar, 0°C, and CO₂-Enriched Anoxic Atmospheres. *Astrobiology*, v. 13, n. 2, p. 115-131, 2013.

SCHWENDNER, Petra; MOISSEL-EICHINGER, Christine; BARCZYK, Simon; BOHMEIER, Maria; PUKALL, Rüdiger; RETTBERG, Petra. Insights into the Microbial Diversity and Bioburden in a South American Spacecraft Assembly Clean Room. *Astrobiology*, v. 13, n. 12, p. 1140-1154, 2013.

STAPELMANN, Katharina; FIEBRANDT, Marcel; RAGUSE, Marina; AWAKOWICZ, Peter; REITZ, Günther; MOELLER, Ralf. Utilization of Low-Pressure Plasma to Inactivate Bacterial Spores on Stainless Steel Screws. *Astrobiology*, v. 13, n. 7, p. 597-606, 2013.

VENKATESWARAN, Kashturi; LA DUC, Myron T.; HORNECK, Gelda. Microbial Existence in Controlled Habitats and Their Resistance to Space Conditions. *Microbes and Environments*, v. 29, n. 3, p. 243-249, 2014.