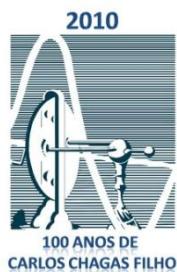


IVAN GLÁUCIO PAULINO LIMA

INVESTIGAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE SOBREVIVÊNCIA
DE MICRORGANISMOS EXTREMÓFILOS EM AMBIENTES
EXTRATERRESTRES SIMULADOS

TESE SUBMETIDA À UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
VISANDO A OBTENÇÃO DO GRAU DE
DOUTOR EM CIÊNCIAS



Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho
2010

Ficha Catalográfica

PAULINO-LIMA, Ivan Gláucio

Investigação das condições de sobrevivência de microrganismos extremófilos em ambientes extraterrestres simulados. Rio de Janeiro, UFRJ, IBCCF, 2010.

x..., 256f.

Tese: Doutor em Ciências Biológicas (Biofísica)

- | | |
|-----------------------------------|---------------|
| 1. Astrobiologia | 2. Atacama |
| 3. <i>Deinococcus radiodurans</i> | 4. Panspermia |
| 5. Síncrotron | |

I Universidade Federal do Rio de Janeiro

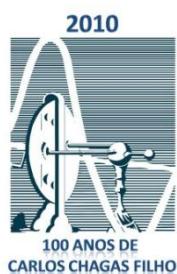
II Título

IVAN GLÁUCIO PAULINO LIMA

**INVESTIGAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE SOBREVIVÊNCIA
DE MICRORGANISMOS EXTREMÓFILOS EM AMBIENTES
EXTRATERRESTRES SIMULADOS**

Tese apresentada ao Programa de Doutorado em Biofísica,
do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, da
Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito
parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientadora: Prof^a Dr^a Claudia de Alencar Santos Lage



Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho
2010

"INVESTIGAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE SOBREVIVÊNCIA DE MICROORGANISMOS
EXTREMÓFILOS EM AMBIENTES EXTRATERRESTRES SIMULADOS"

IVAN GLÁUCIO PAULINO LIMA

TESE DE DOUTORADO SUBMETIDA À UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
VISANDO A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM CIÊNCIAS.

APROVADA POR:

RIO DE JANEIRO, 29 DE JULHO DE 2010.

PROF^a. NARCISA LEAL DA CUNHA E SILVA (DOUTOR - UFRJ) - COORDENADORA DO CURSO
DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOFÍSICA)

PROF^a. CLAUDIA DE ALENCAR SANTOS LAGE (DOUTOR - UFRJ) – ORIENTADORA

PROF. ÁLVARO AUGUSTO DA COSTA LEITÃO (DOUTOR – UFRJ) – REVISOR

PROF. CARLOS FREDERICO MARTINS MENCK (DOUTOR – USP)

PROF. GILBERTO WEISSMÜLLER (DOUTOR – UFRJ)

PROF^a. JENNIFER LOWE (DOUTOR – UFRJ)

PROF^a. LYNN JUSTINE ROTHSCHILD (DOUTOR – BU/USA)

*Où finit le télescope, le microscope commence.
Lequel des deux a la vue la plus grande?*

Onde o telescópio termina, o microscópio começa.
Qual dos dois oferece visão mais grandiosa?

Victor Hugo (Les Misérables, 1862)

*A still more glorious dawn awaits
Not a sunrise, but a galaxy rise
A morning filled with 400 billion suns
The rising of the Milky Way*

Uma alvorada ainda mais gloriosa aguarda
Não um nascer do Sol, mas um nascer da Galáxia.
Uma manhã preenchida com 400 bilhões de sóis.
O nascer da Via Láctea.

Carl Sagan – A Glorious Dawn ft Stephen Hawking
<http://www.symphonyofscience.com/>

Agradecimentos

Sou grato pelo momento em que vivo, pela crescente liberdade de questionar a realidade, utilizando o método científico para investigar a natureza. Ao contrário da tendência geral da pesquisa contemporânea, dirigida pelo mercado ao que convém conhecer, este trabalho se baseia na legítima curiosidade a respeito de uma das questões mais profundas da humanidade. Talvez este tipo de curiosidade jamais teria sido despertada na ausência das pessoas e entidades que também contribuíram direta ou indiretamente para alimentá-la. Desejo portanto declarar meus agradecimentos:

À minha orientadora Professora Claudia de Alencar Santos Lage pelo incentivo, por acreditar na linha de pesquisa, por acreditar no meu potencial proporcionando oportunidades de crescimento pessoal e profissional ao longo desses anos.

Ao Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro (IBCCF/UFRJ) por ter me aceitado como aluno, por ter me oferecido esta oportunidade de crescer profissionalmente.

Às agências de fomento à pesquisa: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelas bolsas de doutorado, doutorado sanduíche no exterior e por financiar projetos de pesquisa, bem como à Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa (FAPERJ) pelo financiamento de projetos de pesquisa do laboratório de Radiobiologia Molecular do IBCCF/UFRJ, e à Royal Society por financiar materiais de consumo e missões científicas no exterior.

À todos os amigos do Laboratório de Radiobiologia Molecular do IBCCF/UFRJ: Professor Álvaro Augusto da Costa Leitão, Janine Rurr, Gabriel Dalmaso, Marcelo de Pádua, Alicia Viviana Pinto, Cláudia Ribeiro, Léo Vidal, Tula Celeste e Raoni, Rita, Marcus, Larissa, Roberto, Luciana, Deise, Adriana, Sílvia, Tatiana, Nisreen, Carla, Bárbara, Suzana, Juliana, Renata, Gustavo, Carol, Alexandre, Amanda e Bruna pela agradável convivência.

Aos colegas do Laboratório de Radioproteção e Dosimetria do Rio de Janeiro (IRD/RJ), pela troca de cepas bacterianas e de conhecimento científico: Dr. Carlos Eduardo Bonacossa de Almeida, Hugo Leonardo do Valle, Leonardo Gonçalves de Oliveira e Amanda Valle de Almeida Paiva.

Ao pessoal do IBCCF/UFRJ: Adalberto Vieyra, Marcelo Morales, Jennifer Lowe, Thiago Britto, Ronaldo Mohana, Narcisa Leal e do Instituto de Física da UFRJ (IF/UFRJ): Professor Emérito Fernando Souza Barros e Professor Ricardo Barthem.

Aos companheiros de pesquisa do Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes (IMPG/UFRJ), Professor Alexandre Soares Rosado e Lia Teixeira.

Ao Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) pelo suporte aos projetos de pesquisa, e a todos os pesquisadores, estudantes, técnicos e funcionários que conheci por lá: João Alexandre Ribeiro Gonçalves Barbosa, Arnaldo Naves de Brito, Sérgio Pilling, Diana Pilling, Givanil, Zildene, Fabiana, Carol, Andréia, Veruska, Celisa, Jörg, Tatiana Brasil, Vanessa, Lorryne, Camila, Tatiana, Mariane, Guga, André Luiz, Andres Cernadas, Carol, Aline, Gustavo Arruda, Marcão, Yuri, Thiago, Daniel, Carlos, Ísis, Natália e os pesquisadores das linhas TGM e SXS, Reginaldo e Fábio.

Ao pessoal do Laboratório de Microbiologia Ambiental da Universidade de São Paulo (LMA/USP): Vivian Pellizari, Rubens Duarte, Cris Nakayama, Emanuele Kuhn e Dani, bem como do Instituto de Astronomia, Geofísica e Ciências Atmosféricas da USP (IAG/USP): Eduardo Janot Pacheco, Douglas Galante e Jorge Horvath e da Universidade Presbiteriana Mackenzie de São Paulo, e professora Adriana Válio pelas importantes contribuições científicas.

Aos professores da Universidade Estadual de Londrina (UEL), Luis Carlos Bruschi, Dimas Zaia, Rute Helena Trevisan por me mostrarem um mundo muito maior do que os meus olhos alcançavam e aos professores Rogério Fernandes, André Vanzela e Paulo Ruas por me mostrarem o maior espetáculo da Terra - a evolução das espécies. Às professoras Márcia Cristina Furlaneto e Maria Helena Pelegrinelli Fungaro pela minha formação acadêmica básica, por me iniciarem na carreira de pesquisador e por me concederem a oportunidade de fazer parte da sétima geração científica desde Gregor Mendel.

Ao Grupo de Estudo e Divulgação de Astronomia de Londrina (GEDAL) por ter plantado uma semente que hoje se tornou uma carreira científica, sendo alguns nomes importante mencionar: Miguel Fernando Moreno, fundador e presidente do GEDAL há mais de 10 anos, sua esposa Lislaine, Rubens, Cadu, Saulo, Paulo Bonagura, Ney Rafael, Gisele e João Paulo.

Aos profissionais do Centro de Estudos do Universo (CEU), por manterem acesa a chama do fascínio científico através da excelência em divulgar astronomia e ciência em geral e por proporcionarem e compartilharem momentos inesquecíveis: Johnny, Thiago, Paulo, Mauro, Ronaldo, Andy, Alessandro, Glaciele e Silmara.

Aos amigos da comunidade científica internacional de astrobiologia: Katherine Wright, Marina Quirino, Dimitra Atri, Shawn Goldman, Mark Claire, Jennifer Moberley, Kate Adamala, Aditya Chopra, Jimmy Saw, Julia DeMarines, Sanjoy Som, Eva Stueeken,

Damhnait Gleesson, Ximena Abrevaya, Rachel Horak, Emily Knowles, Lewis Dartnell, etc., por me proporcionarem momentos valiosos de discussão sobre esse fascinante empreendimento científico que é a astrobiologia.

Aos nossos colaboradores chilenos Armando Azúa-Bustos e Rafael Vicuña, por representarem uma parceria sólida nascida a partir da interação e troca de informações numa das conferências internacionais de astrobiologia da NASA (Astrobiology Graduate Conference - AbGradCon 2008).

Aos colegas do Instituto de Física e Astronomia da Open University: Professor Nigel Mason, Professor Nicholas Braithwaite, Professor Paul Hatherly, Sandra Mills, Beverley Harker, Tracey Woodcraft, Tracey Moore, Tracy Bartlett, Andy and Charles (taxi drivers), Sylwia Ptasinska, Gosia Smialek-Telega, Radmila Panajotovic, Sohan Jeetha, Bhalamurugan Sivaraman, Ania Kowalczyk, Andy Mason, Andy Carter, Agnieszka Stypczynska, Katarina, Stefano, Vladimir, Mihal, Barc, Jonti, Robin, Yvonne, Callum, Jimena, Julia Barkans (Life Sciences), etc.

Aos colegas do Planetary and Space Science Research Institute (PSSRI) da Open University: Professor Charles Cockell, Dr. Manish Patel, Dr. Karen Olsson-Francis, Dr. Richard Greenwood, Jon Mason, Paul Wilkinson, Annika Simpson, Tatjana Polacsek, Steve Summers, Laura Kelly, Yoseph Araya, Sunitha, Angus, Graham, John Watson (Earth Sciences), etc. Aos pesquisadores Dr^a. Heather Davies e Dr. Gordon Imlach pelo acesso aos microscópios eletrônicos. Aos colegas distribuídos em outros departamentos da Open University: Thomas, Liliane, George, Osvaldo, Brian, Mark, Mihn, Bethany, etc.

À Dr^a. Daisy Hirata e seu marido Tim Ray, por todo o apoio, pela amizade e por constantemente me ajudarem a levar uma vida agradável durante o estágio sanduíche no exterior. Ao Luciano Batista pela amizade e pelo contato no exterior durante experimentos no sincrotron Diamond em Oxford.

Aos colegas da Dinamarca: Dr^a. Nykola Jones, Dr. Soren Hoffmann e Kate Andersen por possibilitarem o uso das instalações do sincrotron Astrid em Aarhus, Dinamarca. Ao Kai Finster e Jon Merisson pela troca de informações e pelas discussões sobre câmaras de simulação de Marte. Ao Lutz, Julia e Natalya pela excelente convivência, pelos Fredagsbar (bar das sextas-feiras), pelos inúmeros momentos inesquecíveis.

Aos colegas do Instituto de Medicina Aeroespacial da Alemanha (DLR): Professora Gerda Horneck, Dr^a. Petra Rettberg, Marko Wassmann e Anja Bauermeister pela excelentes trocas de informações nas conferências internacionais na Europa e nos Estados Unidos.

Aos pesquisadores do sincrotron Diamond: Kawal Sawhney, Igor Dolbnyia, Andrew Malandain e a secretária Sue Judge, por possibilitarem a execução dos experimentos na linha de luz B16, pela atenção recebida e pela simpatia vivenciada.

Aos pesquisadores do Instituto de Física da Queens University Belfast, na Irlanda do Norte: Professor Bob McCullough e Dr. Tony Merrigan por possibilitarem a realização dos experimentos de irradiação com íons de carbono.

Ao Dr. John Robert Brucato do Osservatorio Astronomico di Arcetri em Florença, na Itália e aos pesquisadores do Osservatorio Astronomico di Catania (Sicília), Gianni Strazzulla e Giuseppe Baratta por possibilitarem a realização dos experimentos de irradiação com prótons.

Ao pessoal do alojamento estudantil da Open University: Adrian Gray (responsável pelos agendamentos), Victor, Haoda, Stephanie, Sammy e Violet (faxineira) pela convivência saudável e agradável. Ao pessoal da pensão da Jean Gates em Tinkers Briedge: Carlo Alloca, Gabriel Horeszka e Wi Pan Pan pela interação cultural.

Ao pessoal da república do sono, no condomínio Morada do Sol em Botafogo, no Rio de Janeiro: Eduardo, Rafael, Renan, Turco e Jéferson pela amizade, pelos momentos de discussões filosóficas e pela realização do I Ciclo de Seminários de Tema Livre da república do sono.

Ao Lucas Paixão pela amizade, pelo caráter e por ter compartilhado espaço no alojamento da UFRJ, onde morei por mais de 25% do tempo do meu doutorado.

Às amizades sem início e sem fim: Rodrigo Souza Grota, Erik Hatanaka Suzuki, Amaury Alves Aparecido Júnior, Jéferson Nunes Fregonezi, Rubens Tadeu Delgado Duarte, Fernando Lucas de Melo, Enelise Amado, Nina Padilha, por influenciarem na formação do meu caráter, da minha ideologia e da minha personalidade.

Aos amigos de Seropédica: Henrique Trevisan, Patrícia Barizon, Sabrina, Fernanda e todos os que conheci neste lugar pitoresco.

Aos amigos de Pirassununga, por quem tenho cada vez mais admiração: Família da Dani (Joao, Bete, Giovana, Fernando, Davi, Olívia, Georgina e Alípio), Mauro e Mila, Milá, Fernando Melo, Otávio, Marcus, Rodrigo Pion e Juliana, Fabi, Alóis, pessoal da banda Suéteres (Igor, Lucas, Gabriel e Guinho), Mateus, Renata, Ricardo, etc, etc, etc...

À minha avó Maria Cordeiro Lima pelo caráter, pelo vigor, pela paciência, pela serenidade e pela dedicação em educar e cuidar da grande família. Às minhas tias Anna Heloisa Cordeiro e Arlinda Cordeiro pelo apoio durante toda a minha formação acadêmica.

Agradeço especialmente aos meus tios Cícero Antônio Lima e Célia de Castro Lima que gentilmente me receberam no Rio de Janeiro e me forneceram total apoio durante todo o doutoramento. Aos meus primos Laura e Daniel pela amizade, pelo carinho e pelos momentos agradáveis em praias e baladas.

À minha prima Regina Lúcia dos Santos por ter me mostrado o bom caminho da vida, pelas visitas agradáveis e pelas caronas para Marília durante a minha iniciação científica.

Ao meu irmão Glauco Paulino Lima que, junto com sua esposa Marcela Raquel Lima me recebeu de braços abertos nos Estados Unidos nas duas ocasiões em que tive a oportunidade de visitá-los, por ocasião das conferências da NASA. Aos amigos Régis, Jorge, Ane e Luíza pela amizade, hospitalidade e carinho.

À minha irmã Ana Gláucia Paulino Lima, por quem tenho um carinho muito especial, pelas orações sinceras e conselhos inspiradores.

Aos meus pais, Carlos Roberto Lima e Nair Paulino Lima, que, sem medir esforços, me proporcionaram todas as oportunidades para que eu chegassem até aqui, aos quais devo tudo o que sou.

Meus sinceros agradecimentos!

Dedicatória

Dedico esta tese de doutorado para o grande amor da minha vida Daniele Fernanda Rosim, por sentir a emoção sincera em seus olhos nas abstrações infinitas, nas densas elucubrações sobre o futuro da humanidade e sobre o futuro das nossas próprias vidas. Hoje, o futuro já não é mais suficiente para representar nossas conquistas, pois já temos uma história juntos. Tenho imenso prazer, satisfação e orgulho por ter compartilhado todos os momentos durante o desenvolvimento deste trabalho ao lado de uma pessoa tão especial, tão bonita, tão sábia e inteligente, cujas qualidades não cabem em palavras. A Dani é de fato a maior inspiração da minha vida.

PAULINO-LIMA, Ivan Gláucio. Investigação das condições de sobrevivência de microrganismos extremófilos em ambientes extraterrestres simulados. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 2010.

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo principal ampliar o conhecimento sobre os limites físico-químicos para a existência de vida em ambientes extraterrestres, investigando a capacidade de sobrevivência de modelos biológicos submetidos a ambientes extremos simulados, considerando parâmetros como pressão, temperatura e radiação, atuando separadamente ou em conjunto. Os modelos biológicos utilizados foram a bactéria *Deinococcus radiodurans*, utilizada na maioria dos experimentos, e a cianobactéria *Chroococcidiopsis* sp., utilizada apenas nos últimos experimentos. As medidas de inativação bacteriana foram obtidas através de curvas de sobrevivência em função dos tempos de exposição aos tratamentos. De acordo com os resultados obtidos, a presença de substâncias orgânicas nas amostras evita a perda da viabilidade das células expostas ao vácuo equivalente à baixa órbita terrestre (10^{-5} Pa) por várias semanas, e é mais importante do que eventuais microambientes preservados em grãos micrométricos. Além disso, células embebidas em uma camada de poucos micrômetros, constituída por uma matriz orgânica cristalizada após desidratação, se beneficiam da proteção contra as radiações ultravioleta (UV) e ultravioleta de vácuo (UVV) e permanecem viáveis por longos períodos de tempo com frações de sobrevivência superiores a 0,1%. A presença de grãos de basalto com dimensões micrométricas afeta a sobrevivência microbiana após irradiação aguda com feixe de raios-X (1 keV a 20 keV) em condições de baixo vácuo (200 Pa). Provavelmente este efeito é devido a produção de fotoelétrons pela interação da radiação com os grãos, já que este fenômeno foi mais evidente para os grãos de basalto, que apresentam muito mais elementos pesados em sua composição. Ao contrário do que ocorre com a irradiação eletromagnética ionizante, os grãos micrométricos são capazes de proteger células microbianas contra a irradiação ionizante com feixe de partículas carregadas (elétrons, prótons e íons de carbono), mesmo para energias muito superiores às do vento solar. Já para energias comparáveis às do vento solar (2 keV a 4 keV), não foi observada nenhuma diferença na sobrevivência microbiana entre células livres ou protegidas por qualquer um dos dois tipos de grãos rochosos (basalto ou arenito). Além das curvas de sobrevivência obtidas sob condições experimentais inovadoras, foi feito também um trabalho em colaboração com pesquisadores chilenos utilizando amostras de solo do deserto do Atacama, considerado um ambiente análogo a alguns locais da superfície do planeta Marte. O objetivo foi isolar microrganismos resistentes a radiação ultravioleta para testes em novas câmaras de simulação em fase de construção em São Paulo. A utilização de instalações que simulam ambientes extraterrestres para o isolamento de novos microrganismos se mostrou eficiente, e representa uma boa ferramenta para a utilização de recursos biológicos com possíveis aplicações em diferentes setores, como por exemplo a própria exploração espacial. O conjunto de dados experimentais é favorável a uma versão moderna da hipótese da Panspermia, em que formas microscópicas de sistemas biológicos minimamente protegidos em grãos de poeira, são capazes de se dispersar por diferentes regiões do espaço, contribuindo para uma transferência horizontal de genes em nível galáctico. Esta é a primeira tese experimental em astrobiologia desenvolvida no Brasil.

Palavras-chave: Astrobiologia, Atacama, *Deinococcus radiodurans*, Panspermia, Síncrotron.

PAULINO-LIMA, Ivan Gláucio. Investigation of survival conditions of extremophilic microorganisms in simulated extraterrestrial environments. Thesis (Ph.D. in Sciences) - Institute of Biophysics Carlos Chagas Filho, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 2010.

ABSTRACT

This study aimed to expand knowledge about the physical-chemical limits for life on extraterrestrial environments, investigating the survivability of biological models subjected to simulated extreme environments, considering parameters such as pressure, temperature and radiation, acting separately or simultaneously. The biological models used were the bacterium *Deinococcus radiodurans*, which was used in most experiments, and the cyanobacteria *Chroococcidiopsis* sp., used in the final experiments only. Measurements of bacterial inactivation were obtained by survival curves as a function of exposure times to treatments. According to the results, the presence of organic substances in the samples avoids the loss of cell viability when cells are exposed to the vacuum equivalent to the low earth orbit (10^{-5} Pa) for several weeks, and it is more important than any microenvironment preserved in micrometric grains. Moreover, cells embedded in a layer few micrometers thick, comprising an organic matrix, crystallized after dehydration, benefit from protection against ultraviolet (UV) and vacuum ultraviolet (VUV) remaining viable for long periods of time, with survival fraction greater than 0.1%. The presence of micrometric grains of basalt affects microbial survival after acute irradiation with X-ray beam (1 keV to 20 keV) in low vacuum (200 Pa). Probably this effect is due to the production of photoelectrons by interaction of radiation with the grains, since this phenomenon was most pronounced for grains of basalt, which have more heavy elements in their composition. Contrary to what occurs with ionizing electromagnetic radiation, micrometric grains are able to protect microbial cells against ionizing radiation beam of charged particles (electrons, protons and carbon ions), even for energies much higher than those of the solar wind (2keV). As for energy comparable to the solar wind (2 keV to 4 keV), there was no difference in survival between free cells or cells protected by any of the two types of rocky grains (basalt or sandstone). Besides the survival curves obtained under innovative experimental conditions, part of this work was also done in collaboration with Chilean researchers using samples of soil from the Atacama Desert, considered an environment similar to some places on the surface of Mars. The goal was to isolate microorganisms resistant to ultraviolet radiation for testing under new simulation chambers, which are now being constructed in São Paulo. The use of facilities that simulate extraterrestrial environments for the isolation of new microorganisms was efficient and represents a good tool for the use of biological resources with potential applications in different sectors, such as space exploration itself. The set of experimental data supports a modern version of the Panspermia hypothesis, in which microscopic forms of biological systems minimally protected from dust grains, are able to disperse in different regions of space, contributing to a horizontal gene transfer in a galactic level. This is the first experimental thesis in astrobiology developed in Brazil.

Keywords: astrobiology, Atacama, *Deinococcus radiodurans*, Panspermia, Synchrotron.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Localização geográfica das amostras coletadas no deserto do Atacama. 1. Laguna Llamara ($21^{\circ}16'07.54''S$, $69^{\circ}37'03.90''W$. Altitude: 751m); 2. Sítio Cuarzos B2 ($23^{\circ}48'59.15''S$, $70^{\circ}29'25.59''W$. Altitude: 538m); 3. Capa Negra La Portada ($23^{\circ}29'58.61''S$, $70^{\circ}25'42.10''W$. Altitude: 27m); 4. Gypsum ($23^{\circ}49'01.14''S$, $70^{\circ}29'22.98''W$. Altitude: 531m); 5. Sítio 3 S4 ($23^{\circ}49'10.76''S$, $70^{\circ}28'36.77''W$. Altitude: 736m).	47
Figura 2. Fotografia da lâmpada de hidrogênio mostrando os principais componentes do aparato experimental.....	49
Figura 3. Sistema de irradiação com luz UV ($\lambda=254nm$) na linha de luz CD1 do sincrotron Astrid, Aarhus, Dinamarca. No detalhe à esquerda, amostras posicionadas nos discos metálicos e à direita o sistema de irradiação a ser posicionado contra o feixe.....	56
Figura 4. Posicionamento das amostras na direção do feixe (esquerda) e exposição das amostras ao feixe (direita) mostrando a cobertura de toda a amostra pela área irradiada.	58
Figura 5. Espectro da linha de luz TGM com o filtro harmônico do gás neônio, atenuando o fluxo de fôtons com energia acima de 21,5eV. Para comparação, o ponto denominado “H Lamp” se refere ao fluxo de fôtons da radiação Lyman-alfa ($\lambda=121,6nm$) emitida pela lâmpada de hidrogênio, também utilizada neste estudo.	59
Figura 6. Esquema e foto do Simulador Solar Oriel modelo 91192-100 (Newport) e foto do porta amostra utilizado para as irradiações.....	62
Figura 7. Espectro de emissão do Simulador Solar em comparação com o espectro solar na região da órbita da Terra (ASTM E490).	62
Figura 8. Micrografias ópticas de células de <i>D. radiodurans</i> misturadas com grãos de basalto (esquerda) e arenito (direita).....	69
Figura 9. Visão geral do porta amostras carregado com 72 amostras.	70
Figura 10. A, Esquema da câmara mostrando o anel de metal utilizado para prender a folha de kapton, a folha de kapton utilizada para vedar a câmara, o porta amostra e o sistema de resfriamento. O porta amostra foi montado sobre o sistema de resfriamento previamente afixado na flange superior. B, Detalhe do sistema de resfriamento mostrando as tubulações de entrada e saída de água.	72
Figura 11. A, Montagem do porta amostra sobre o sistema de resfriamento com os tubos conectados às mangueiras com água corrente. B, Conjunto do porta amostra e sistema de resfriamento dentro da câmara de irradiação. A seta mostra o sensor de temperatura fixado sobre o porta amostra para monitorar a eventual variação de temperatura através de um multímetro digital. C, Câmara de irradiação posicionada sobre a plataforma. D, O sistema de resfriamento conectado à câmara manteve a temperatura a $20^{\circ}C$. E, Alinhamento do porta amostra com o uso de um altímetro a laser.	73
Figura 12. Espectros do feixe branco atenuado com folhas de alumínio, molibdênio, ouro e carbono. Note que a presença de uma fina folha de carbono junto com o ouro tem somente a	

função de proteger a folha de ouro contra a radiação intensa. As fluências integradas (W) estão mostradas por cm ²	76
Figura 13. Etapas da pesquisa mostrando a localização geográfica do deserto do Atacama, no Chile, as amostras sendo coletadas no campo e uma ilustração sobre o procedimento experimental utilizado para determinar o número total de microrganismos cultiváveis antes e depois da irradiação UV (diluição seriada e plaqueamento em meio de cultura).	83
Figura 14. Comparação dos efeitos da irradiação UV ($\lambda>200\text{nm}$) sobre <i>D. radiodurans</i> em solução salina (NaCl 0,9%) utilizando diferentes filtros, conforme descrito na Tabela 17.	87
Figura 15. Comparação dos efeitos da irradiação com o simulador solar ($\lambda>200\text{nm}$) sobre <i>D. radiodurans</i> em solução salina (NaCl 0,9%) ou em meio de cultura.....	88
Figura 16. Comparação dos efeitos da irradiação com o simulador solar ($\lambda>200\text{nm}$) e com a lâmpada de mercúrio ($\lambda=254\text{nm}$), sobre <i>D. radiodurans</i> (Deira) em solução salina NaCl 0,9% ou meio de cultura (MC), em comparação com células de <i>E. coli</i> irradiadas com lâmpada de mercúrio.....	88
Figura 17. Amostras depositadas em 2 tipos de substratos, mostrando 3 situações distintas: A , monocamada de células formada sobre filtro Millipore. B , superfície da fita de carbono mostrando regiões de empilhamento de células. C , células embebidas na matriz formada através da cristalização do meio de cultura após desidratação. Uma análise computadorizada da superfície da fita de carbono é mostrada em D	90
Figura 18. Comparação dos efeitos da irradiação com a lâmpada de hidrogênio ($\lambda=121\text{nm}$) e com o simulador solar ($\lambda>200\text{nm}$) sobre células desidratadas de <i>D. radiodurans</i>	91
Figura 19. Efeitos da irradiação com a lâmpada de xenônio ($\lambda=145\text{nm}$) sobre células desidratadas de <i>D. radiodurans</i> . A barra de erro de um dos pontos é inferior ao tamanho da marca.	92
Figura 20. Comparação dos efeitos da irradiação na linha de luz CD1 do Laboratório Síncrotron Astrid ($\lambda=254\text{nm}$) e na linha de luz TGM do LNLS ($\lambda>57,47\text{nm}$) sobre células desidratadas de <i>D. radiodurans</i>	93
Figura 21. Comparação dos efeitos da irradiação com o Simulador Solar ($\lambda>200\text{nm}$) e com a linha de luz TGM do LNLS ($\lambda>57,47\text{nm}$) sobre células desidratadas de <i>D. radiodurans</i>	94
Figura 22. Comparação dos efeitos da irradiação com a lâmpada de hidrogênio ($\lambda=121\text{nm}$) e com o simulador solar ($\lambda>200\text{nm}$) sobre células desidratadas de <i>D. radiodurans</i> , na presença de meio de cultura.....	95
Figura 23. Comparação dos efeitos da irradiação com a lâmpada de xenônio ($\lambda=145\text{nm}$) e com a linha de luz CD1 do Laboratório Síncrotron Astrid ($\lambda=254\text{nm}$) sobre células desidratadas de <i>D. radiodurans</i> , na presença de meio de cultura.....	96
Figura 24. Comparação dos efeitos da irradiação com o Simulador Solar ($\lambda>200\text{nm}$) e na linha de luz TGM do LNLS ($\lambda>57,47\text{nm}$) sobre células desidratadas de <i>D. radiodurans</i> , na presença de meio de cultura.	97

Figura 25. Influência da concentração de células na fração de sobrevivência a $600\text{J}\cdot\text{m}^{-2}$ de radiação UV na linha de luz TGM do LNLS ($\lambda>57,47\text{nm}$). Amostras contendo 10^4 , 5×10^4 , 10^5 , 5×10^5 , 10^6 , 5×10^6 e 10^7 células foram irradiadas com a luz síncrotron. O empilhamento de células ($>10^6$ células por amostra) foi suficiente para aumentar a sobrevivência celular.	98
Figura 26. Efeitos da irradiação com lâmpada de xenônio ($\lambda=145\text{nm}$) nas cepas selvagem (esquerda) e mutante <i>recA</i> (direita) de <i>D. radiodurans</i> na presença (MC) ou ausência de meio de cultura.	99
Figura 27. Efeitos da irradiação na linha de luz CD1 do Laboratório Síncrotron Astrid ($\lambda=254\text{nm}$) nas cepas selvagem (esquerda) e mutante <i>recA</i> (direita) de <i>D. radiodurans</i> na presença (MC) ou ausência de meio de cultura.	99
Figura 28. Efeitos da irradiação na linha de luz TGM do LNLS ($\lambda>57,47\text{nm}$) nas cepas selvagem (esquerda) e mutante <i>recA</i> (direita) de <i>D. radiodurans</i> na presença (MC) ou ausência de meio de cultura. No gráfico da direita, a curva de sobrevivência do mutante <i>recA</i> está comparada com a da cepa selvagem, uma vez que as amostras <i>recA</i> não resistiram aos procedimentos experimentais na ausência de material orgânico.	100
Figura 29. Influência da presença de material orgânico proveniente do meio de cultura na sobrevivência de células irradiadas com o simulador solar ($\lambda>200\text{nm}$).	101
Figura 30. Influência da presença de grãos de arenito misturados (SST MC) ou não (SST) com material orgânico nas amostras irradiadas com o simulador solar ($\lambda>200\text{nm}$).	102
Figura 31. Influência da presença de grãos de basalto misturados (B + MC) ou não (B) com material orgânico nas amostras irradiadas com o simulador solar ($\lambda>200\text{nm}$).	103
Figura 32. Sobrevivência das células misturadas com os 3 tipos de grãos. Os dados foram obtidos dividindo-se os valores de recuperação dos controles externos pelos valores de recuperação dos controles internos.	106
Figura 33. Curvas de sobrevivência de <i>D. radiodurans</i> , misturadas ou não com grãos de basalto ou arenito, ao feixe branco de raios-X ($>1\text{ keV}$) atenuado com os seguintes atenuadores e filtros: 2mm de alumínio, $50\mu\text{m}$ de molibdênio e $100\mu\text{m}$ de carbono + $10\mu\text{m}$ de ouro. O valor mínimo do eixo vertical representa o máximo valor de inativação detectável pelo método utilizado (10^{-5}). O gráfico superior à direita mostra as fluências utilizadas.	108
Figura 34. Curvas de sobrevivência de <i>D. radiodurans</i> , na presença ou ausência de grãos de basalto ou arenito, ao feixe de 10keV , com irradiância de $2,53\times 10^3\text{W}\cdot\text{m}^{-2}$	109
Figura 35. Curvas de sobrevivência de células livres de <i>D. radiodurans</i> , ao feixe monocromado de raios-X (10keV), atenuado com diferentes atenuadores e filtros para atingir as mesmas doses após diferentes tempos de exposição. Os valores no eixo horizontal (abscissa) correspondem aos experimentos realizados com o feixe mais atenuado (maiores tempos de exposição).	110

Figura 36. Simulação da penetração de elétrons de 2keV, com um feixe de 10nm de diâmetro, em células de <i>D. radiodurans</i> , após 6min 45s de exposição, totalizando 7×10^4 elétrons. A simulação foi feita através do software CASINO v2.42.....	112
Figura 37. Curvas de sobrevivência de <i>D. radiodurans</i> na ausência (NC) ou presença de grãos de arenito ou basalto (SST ou B) irradiadas com feixe de elétrons de 2keV.....	115
Figura 38. Simulação da energia depositada por um feixe de elétrons de 2keV, com 10nm de diâmetro, em células de <i>D. radiodurans</i> , após 6min 45s de exposição, totalizando 7×10^4 elétrons. A simulação foi feita através do software CASINO v2.42.....	116
Figura 39. Simulação da trajetória de 10^5 prótons de 200keV em uma célula microbiana utilizando o software SRIM. Note que o poder de penetração das partículas ($2,83\mu\text{m}$) é maior do que o diâmetro da célula de <i>D. radiodurans</i> ($\sim 2\mu\text{m}$).	117
Figura 40. Curvas de sobrevivência de <i>D. radiodurans</i> na ausência (NC) ou presença de grãos de arenito ou basalto (SST ou B) irradiadas com feixe de prótons de 200keV.	118
Figura 41. Imagens de microscopia eletrônica (SEM) de células de <i>D. radiodurans</i> irradiadas (embaixo) ou não (em cima) com 10^{13} prótons· cm^{-2} . Células livres (esquerda) e células misturadas com grãos de arenito (centro) e basalto (direita) são mostradas.	119
Figura 42. Imagens de microscopia eletrônica (SEM) de células de <i>Chroococcidiopsis</i> sp. irradiadas (embaixo) ou não (em cima) com 10^{13} prótons· cm^{-2} . Células livres (esquerda) e células misturadas com grãos de arenito (centro) e basalto (direita) são mostradas.	120
Figura 43. Simulação da trajetória de 10^5 íons de carbono com energia de 4keV na parede celular de uma célula microbiana. A profundidade do alvo, no eixo x, é dada em Angstrons (\AA).....	121
Figura 44. Curvas de sobrevivência de <i>D. radiodurans</i> na ausência (NC) ou presença de grãos de arenito ou basalto (SST ou B) irradiadas com feixe de íons de carbono de 4keV... .	122
Figura 45. A, Taxa de recuperação dos controles mantidos durante tempos crescentes em condições ambientes (temperatura $\sim 22^\circ\text{C}$, pressão $\sim 1\text{ atm}$). B, Taxa de sobrevivência em relação aos controles após diferentes tempos de exposição ao alto vácuo (10^{-5} Pa). NC+CM, células misturadas com meio de cultura; SST+CM, células misturadas com meio de cultura e grãos de arenito; B+CM, células misturadas com meio de cultura e grãos de basalto; NC, células livres; SST, células misturadas apenas com grãos de arenito; B, células misturadas apenas com grãos de basalto.....	123
Figura 46. Abundância de microrganismos totais presentes em amostras de 5 diferentes localidades do deserto do Atacama (Chile), cultivados em 3 tipos de meio de cultura: (i) Agar Marinho (MA), (ii) Lysogeny Broth (LB) e (iii) TGY.....	125
Figura 47. Fração de sobrevivência (N/N_0) a UV-C ($300 \text{ J}\cdot\text{m}^{-2}$) dos microrganismos totais presentes em cada tipo de solo diluídos em solução salina (1g/10ml), após incubação nos 3 tipos de meio de cultura: (i) Agar Marinho (MA), (ii) Lysogeny Broth (LB) e (iii) TGY. ...	125

Figura 48. Isolamento de morfotipos pigmentados, com coloração variando entre amarela e vermelha, e incubação nos 3 tipos de meio de cultura: (i) Agar Marinho (MA), (ii) Lysogeny Broth (LB) e (iii) TGY.....	126
Figura 49. Inativação dos microrganismos presentes no solo 4 (Sitio 2 Gypsum) após irradiação com diferentes doses de UV-C ($\lambda=254\text{nm}$)	126
Figura 50. Resistência a UV-C de 40 isolados provenientes de 5 solos diferentes do deserto do Atacama. As barras foram coloridas de acordo com a pigmentação dos isolados.....	127
Figura 51. Curva de sobrevivência do isolado S3.300-2 ao UV-C, em comparação com as curvas obtidas com a linhagem AB1157 de <i>Escherichia coli</i> e a linhagem selvagem de <i>D. radiodurans</i>	128
Figura 52. Eletroforese em Gel com Gradiente de Desnaturação (DGGE) das sequências 16S rRNA mostrando comunidades microbianas complexas em todas as amostras. 1-Laguna Llamara, 2-Sitio Cuarzos B2, 3-Capa Negra La Portada, 4-Gypsum, 5-Sitio 3 S4.....	130
Figura 53. Sequência parcial do gene 16S rDNA do isolado LPMARS-1.....	130

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Desenho experimental para irradiação ultravioleta de vácuo (UVV) de <i>D. radiodurans</i> com lâmpada de hidrogênio ($\lambda=121,6\text{nm}$)	50
Tabela 2. Desenho experimental para irradiação UVV de amostras de biofilmes epilíticos e cepas de <i>D. radiodurans</i> com lâmpada de xenônio ($\lambda=145\text{nm}$)	53
Tabela 3. Comparação entre as propriedades da lâmpada de xenônio e o fluxo de fótons do Sol com comprimento de onda de 145nm.	54
Tabela 4. Desenho experimental para irradiação UV de cada material biológico na linha de luz CD1 do sincrotron Astrid, Aarhus, Dinamarca.	57
Tabela 5. Desenho experimental para irradiação ultravioleta de vácuo (UVV) de <i>D. radiodurans</i> com feixe branco ($\lambda >57,47\text{nm}$) na linha de luz TGM do laboratório sincrotron LNLS.	60
Tabela 6. Desenho experimental para irradiação das células em solução aquosa com o Simulador Solar Oriel.....	64
Tabela 7. Desenho experimental para irradiação das células desidratadas, misturadas ou não com meio de cultura, em presença ou ausência de grãos de arenito ou basalto.	65
Tabela 8. Elementos-traço presentes nos grãos de basalto e arenito, e na mistura 1:1.	68
Tabela 9. Minerais presentes nos grãos de basalto e arenito, bem como na mistura 1:1.	69
Tabela 10. Desenho experimental para irradiação de <i>D. radiodurans</i> com feixe branco de raios-X da linha de luz B-16 do sincrotron Diamon, Reino Unido.	75
Tabela 11. Desenho experimental para irradiação de microrganismos com feixe de elétrons de 2keV.	77
Tabela 12. Detalhamento das irradiações com feixe de elétrons de 2keV.	78
Tabela 13. Detalhamento das irradiações com feixe de prótons de 200keV em células de <i>D. radiodurans</i>	79
Tabela 14. Detalhamento das irradiações com feixe de prótons de 200keV em células de <i>D. radiodurans</i> misturadas com grãos de arenito.....	79
Tabela 15. Detalhamento das irradiações com feixe de prótons de 200keV em células de <i>D. radiodurans</i> misturadas com grãos de basalto.	80
Tabela 16. Detalhamento das irradiações com íons de carbono de 4keV.	81
Tabela 17. Irradiação de <i>D. radiodurans</i> em solução salina com o Simulador Solar utilizando diferentes filtros, resultando em diferentes espectros.....	86

Tabela 18. Tempo mínimo necessário (dias) para detecção da proliferação celular ao microscópio da cianobactéria <i>Chroococcidiopsis</i> sp. após irradiações com doses crescentes de luz ultravioleta ($\lambda=254\text{nm}$) no laboratório síncrotron Astrid, Dinamarca. A incubação foi feita a temperatura ambiente ($\sim 22^\circ\text{C}$) utilizando ciclos naturais de presença e ausência de luz.....	104
Tabela 19. Viabilidade dos controles externos e internos. Os valores de desvio-padrão (DP) representam 24 replicatas para as amostras denominadas células livres e 15 replicatas para as amostras correspondentes as células misturadas com grãos de basalto ou arenito.	105
Tabela 20. Crescimento observado de <i>Chroococcidiopsis</i> sp. após irradiação com feixe branco de raios-X ($>1\text{keV}$). Os valores representam o tempo mínimo necessário (dias) para observar algum crescimento.	111
Tabela 21. Identificação molecular dos 14 isolados mais resistentes à radiação UV-C.....	129
Tabela 22. Comparação da sequência parcial do gene 16S rDNA do isolado LPMARS-1 com as sequências depositadas no banco de dados NCBI mostrando os alinhamentos com maior índice de similaridade.....	131

GLOSSÁRIO DE TERMOS

DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ASTRID	<i>Aarhus Storage Ring in Denmark</i>
Al	alumínio
amu	atomic mass unit
B	<i>basalt</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
B16	<i>Beamline16</i>
C	carbono
CD1	<i>Circular Dichroism1</i>
CDA	<i>Cosmic Dust Analogs</i>
DGGE	<i>Denaturing Gradient Gel Eletrophoresis</i>
DO ₆₀₀	Densidade Ótica em 600nm
DLS	<i>Diamond Synchrotron Light</i>
DL ₁₀	Dose Letal que deixa 10% da população
DSB	<i>Double-Strand Break</i>
LNLS	Laboratório Nacional de Luz Síncrotron
LET	<i>Linear Energy Transfer</i>
Ly- α	Lyman-alfa
MC	meio de cultura
Mo	molibdênio
recA	mutante recA
NC	<i>Naked cells</i>
NCBI	<i>National Center of Biotechnological information</i>
Au	ouro
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RNAr	RNA ribossomal
rpm	rotações por minuto
SST	<i>sandstone</i>
SGR	<i>Soft Gamma Repeaters</i>
SRIM	<i>Stopping and Range of Ions in Matter</i>
TGM	<i>Toroidal Grating Monochromator</i>
UV	ultravioleta
UVV	ultravioleta de vácuo
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
wt	<i>wild-type</i>
XRF	X-Ray Fluorescence

GLOSSÁRIO DE UNIDADES

$^{\circ}\text{C}$	graus Celsius
μg	micrograma
μl	microlitro
μm	micrômetro
\AA	ângstrom
cm	centímetro
eV	eletron-volt
g	grama
Gy	Gray
J	Joule
keV	quiloeletron-volt
kGy	quiloGray
kJ	quiloJoule
m	metro
mg	milograma
MJ	MegaJoule
ml	mililitro
mm	milímetro
nm	nanômetro
Pa	Pascal
U.A.	unidades astronômicas
W	Watt ($\text{J}\cdot\text{s}^{-1}$)
λ	lambda (comprimento de onda)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	24
1.1. ORGANISMOS EXTREMÓFILOS	24
1.2. <i>DEINOCOCCUS RADIODURANS</i>	26
1.3. EXPERIMENTOS EM ÓRBITA	29
1.4. A HIPÓTESE DA PANSPERMIA	35
1.5. CARACTERIZAÇÃO DO PROBLEMA	40
2. OBJETIVOS.....	42
2.1. GERAL.....	42
2.2. ESPECÍFICOS	42
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	43
3.1. CEPAS BACTERIANAS	43
3.2. MEIOS DE CULTURA	43
3.2.1. TGY	43
3.2.2. BG-11	44
3.2.3. Meio de cultura LB	45
3.3. CONDIÇÕES DE CULTIVO	45
3.4. MATERIAL GEOLÓGICO	46
3.5. CURVAS DE SOBREVIVÊNCIA.....	47
3.6. IRRADIAÇÃO ULTRAVIOLETA	48
3.6.1. Lâmpada de hidrogênio ($\lambda = 121,6\text{nm}$)	48
3.6.2. Lâmpada de xenônio ($\lambda = 145\text{nm}$)	51
3.6.3. Lâmpada de mercúrio ($\lambda = 254\text{nm}$)	54
3.6.4. Feixe monocromático ($\lambda = 254\text{nm}$) na linha de luz CD1 do sincrotron ASTRID (Dinamarca)	55

3.6.5. Feixe branco ($\lambda > 57,47\text{nm}$) na linha de luz TGM do LNLS.....	58
3.6.6. Irradiação com simulador solar Oriel ($\lambda > 200\text{nm}$)	61
3.7. IRRADIAÇÃO IONIZANTE (RAIOS-X)	66
 3.7.1. Preparo das amostras	66
 3.7.2. Porta amostras	70
 3.7.4. Câmara de irradiação.....	71
 3.7.5. Irradiações	74
3.8. IRRADIAÇÃO COM PARTÍCULAS CARREGADAS.....	76
 3.8.1. Elétrons	76
 3.8.2. Prótons	78
 3.8.3. Carbono	81
3.9. EXPOSIÇÃO PROLONGADA DE <i>Deinococcus radiodurans</i> AO ALTO VÁCUO ..	82
3.10. ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS RESISTENTES ÀS CONDIÇÕES MARCIANAS	82
 3.10.1. Radiação ultravioleta.....	82
 3.10.2. Atmosfera marciana	84
4. RESULTADOS	85
4.1. EFEITOS DA RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA EXTRATERRESTRE.....	85
 4.1.1. Células em soluções aquosas	86
 4.1.2. Células desidratadas	89
 4.1.3. Células desidratadas misturadas com material orgânico	94
 4.1.4. Células desidratadas misturadas com grãos de poeira (arenito ou basalto) ..	100
 4.1.5. Células de <i>Chroococcidiopsis</i> sp.....	103
 4.1.6. Comunidade microbiana epilítica	104
4.2. EFEITOS DE SURTOS DE RADIAÇÕES IONIZANTES	104

4.2.1. Recuperação celular dos controles	105
4.2.2. Sobrevivência ao feixe branco de raios-X (>1keV)	106
4.2.3. Curvas de sobrevivência para feixe monocromático de raios-X (10keV).....	109
4.2.4. Resposta a taxa de dose	109
4.2.5. <i>Chroococcidiopsis</i> sp.	110
4.3. EFEITOS DE PARTÍCULAS DO VENTO SOLAR	111
4.3.1. Irradiação com elétrons de 2keV.....	112
4.3.2. Irradiação com prótons de 200keV	116
4.3.2.1. <i>Chroococcidiopsis</i> sp.....	119
4.3.3. Irradiação com íons carbono de 4keV	120
4.4. EXPOSIÇÃO PROLONGADA DE <i>Deinococcus radiodurans</i> AO ALTO VÁCUO	122
4.5. ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS RESISTENTES ÀS CONDIÇÕES MARCIANAS.....	123
4.5.1. Radiação ultravioleta.....	124
4.5.2. Atmosfera marciana	130
5. DISCUSSÃO	133
5.1. RADIAÇÕES ULTRAVIOLETA	134
5.2. RAIOS-X.....	140
5.3 PARTICULAS CARREGADAS	143
5.4. ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS RESISTENTES ÀS CONDIÇÕES MARCIANAS	148

6. CONCLUSÕES	152
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	154
APÊNDICE 1 – ENGLISH REPORT	164
APÊNDICE 2 – Artigo 1. Survival of <i>Deinococcus radiodurans</i> to laboratory-simulated solar wind charged particles	216
APÊNDICE 3 – Artigo 2. Laboratory Simulation of interplanetary ultraviolet radiation and its effects on <i>Deinococcus radiodurans</i>	246

1. INTRODUÇÃO

Os temas abordados nesta introdução foram divididos em 5 partes. Na primeira parte é apresentada uma visão geral sobre os microrganismos extremófilos e sua importância para a biotecnologia, para estudos evolutivos e para a exploração espacial. Na segunda parte, são apresentadas as principais informações sobre a bactéria *Deinococcus radiodurans*, o principal modelo biológico utilizado nos experimentos deste estudo. Na terceira parte, são apresentados os resultados de alguns experimentos biológicos realizados em órbita, relevantes para este trabalho. Em seguida, na quarta são levantados os principais aspectos relacionados à hipótese da Panspermia. Finalmente, a quinta parte compreende a caracterização do problema, ou seja, são apresentadas as motivações que levaram ao desenvolvimento deste trabalho.

1.1. ORGANISMOS EXTREMÓFILOS

Organismos extremófilos constituem os seres vivos capazes de sobreviver e proliferar em ambientes com parâmetros físicos (temperatura, pressão, radiação) e geoquímicos (salinidade, pH, potencial de oxido-redução) próximos ao limite da estabilidade das biomoléculas. A grande maioria dos organismos extremófilos pertence ao grupo dos procariotos, ou seja, são microrganismos correspondentes aos domínios archaea e bacteria. A definição de microrganismos extremófilos tem sido útil para a compreensão dos limites físico-químicos da vida, contribuindo para a discussão sobre a própria definição de vida e também tem norteado as missões espaciais destinadas a encontrar evidências atuais ou remotas de vida extraterrestre em planetas como Marte e Vênus e em luas dos planetas gigantes como Titã e Europa (ROTHSCHILD E MANCINELLI, 2001).

Os organismos extremófilos têm fornecido dados fundamentais para a biologia molecular, sendo que a biologia evolutiva, a qual faz uso das ferramentas da biologia molecular, tem se beneficiado basicamente de duas maneiras. Primeiro, a corrida para

descobrir os mais extremos organismos levou à descoberta de todo um domínio dos seres vivos, o domínio Archaea. Em segundo lugar, a habilidade de sobreviver em ambientes extremos evoluiu múltiplas vezes, levando a um novo entendimento do paradoxo “chance versus necessidade” nos caminhos evolutivos, especialmente ao nível molecular (ROTHSCHILD E MANCINELLI, 2001).

Nas últimas décadas os extremófilos atraíram a atenção de indústrias, como a agrícola, a indústria química de compostos sintéticos, detergentes e sabões, e a indústria farmacêutica. As enzimas dos extremófilos (extremozimas) apresentam grande potencial de aplicação em múltiplas áreas, tanto pelo seu próprio uso, como também por ser fonte de idéias para modificar enzimas derivadas de outros organismos. Um exemplo clássico de extremozima na biotecnologia é a fonte da Taq DNA polimerase, a enzima responsável pela reação em cadeia da polimerase (PCR), uma reação que constitui a base da genômica, filogenia molecular, diagnóstico molecular, testes de paternidade e criminalística. A Taq DNA polimerase foi isolada da bactéria termófila *Thermus aquaticus*, um organismo descoberto em 1969 no Parque Nacional de Yellowstone, Wyoming, EUA (BROCK E FREEZE, 1969). DNA polimerases de outros termófilos têm sido comercializadas por indústrias de biotecnologia como produtos para PCR de alta fidelidade, cada uma com suas próprias vantagens (ROTHSCHILD E MANCINELLI, 2001).

Existem outros extremófilos com aplicações industriais. Por exemplo, algumas bactérias da Antártica produzem ácidos graxos poli-insaturados, um ingrediente natural para muitas espécies aquáticas cultiváveis, como o salmão. As bactérias da Antártica também são aplicadas na biorremediação de águas que sofrem derramamento de óleo, o que é um problema em águas frias. Outro exemplo é a bactéria *Dunaliella salina*, amplamente usada na produção comercial de β-carotenos (como resultado da radiação solar) e glicerol (na tentativa de contrabalançar a pressão osmótica externa). Além das aplicações industriais, o

cotidiano das pessoas também tem se beneficiado indiretamente dos extremófilos através da biotecnologia e da biorremediação. Uma possível aplicação mais direta seria a introdução de extratos de *Dunaliella* como um suplemento nutricional, primariamente como um antioxidante. Proteínas anti-congelantes demonstram potencial para a preservação de órgãos congelados utilizados em transplantes (ROTHSCHILD E MANCINELLI, 2001).

1.2. *DEINOCOCCUS RADIODURANS*

D. radiodurans é uma bactéria heterotrófica pigmentada, não-esporulante, sem locomoção, de morfologia esférica com diâmetros que variam de 1,5 a 3,5 µm (MURRAY, 1986, 1992). As colônias são convexas, lisas, e variam de rosa a vermelhas. *D. radiodurans* é gram-positiva, mas apresenta um envelope celular complexo, semelhante ao dos microrganismos gram-negativos. Uma espessa camada de peptidoglicano é envolvida por uma membrana externa, e algumas cepas exibem uma camada-S paracristalina. As células são quimiorganotróficas com metabolismo respiratório e crescem tipicamente em condições de aeração em meio rico em nutrientes. Em condições ideais, o tempo de duplicação da cepa selvagem R1 é de aproximadamente 80 min. As células se dividem em dois planos, resultando em pares e tétrades em culturas líquidas. A temperatura ótima de proliferação é 30°C, mas o crescimento permanece vigoroso até 37 °C. A proliferação é interrompida em temperaturas superiores a 45 °C e abaixo de 4 °C (BATTISTA, 1997).

D. radiodurans é um dos organismos mais resistentes a radiação já descobertos, tolerando doses agudas de radiação ionizante que excedem 15 kGy (DALY et al., 1994; DALY, 2000), e crescendo sob irradiação crônica com raios gama (60 Gy/h) (Daly, 2000). Os mecanismos moleculares correspondentes a resistência à tais níveis de radiação são objeto da pesquisa básica há décadas (MAKAROVA et al., 2001; COX e BATTISTA, 2005).

Vários são os mecanismos celulares que contribuem para a alta resistência à radiação, podendo ser classificados em (i) mecanismos passivos, como a produção de carotenóides que funcionam como escudo contra as radiações não-ionizantes (ultravioleta), e (ii) os mecanismos ativos que incluem a reparação de danos no DNA (GHOSAL et al., 2005). Os mecanismos ativos compreendem pelo menos duas categorias (MAKAROVA et al., 2001; COX e BATTISTA, 2005; MAKAROVA et al., 2007): (i) um subconjunto de genes que codificam proteínas com funções ainda desconhecidas que podem aumentar muito a eficiência dos mecanismos de reparação do DNA, e (ii) complexos de manganês (Mn) não-enzimáticos presentes em microrganismos radioresistentes protegem as enzimas contra oxidação durante a irradiação (DALY et al., 2007), preservando os sistemas de reparação do DNA, que acabam funcionando com eficiência muito maior do que em microrganismos radiosensíveis (HE, 2009).

Essas duas categorias possuem um denominador comum: a forte correlação positiva entre a resistência à radiação ionizante e a tolerância à dessecação (SGHAIER et al., 2007). Atualmente, a comunidade científica assume que a resistência à radiação é uma consequência da adaptação à dessecação (hipótese da adaptação à dessecação), uma vez que o principal tipo de dano celular provocado por estes dois tipos de estresses é o mesmo, ou seja, quebra de fita dupla no DNA.

Essa hipótese afirma que a resistência à radiação ionizante de *D. radiodurans* é uma consequência da sua adaptação à dessecação. No entanto, não há dados genômicos ou experimentais sugerindo que a tolerância à dessecação é antecedente à resistência à radiação ionizante. Resumidamente, os dados apresentados por Mattimore e Battista (1996), apenas sugerem uma forte correlação positiva entre estes dois fenótipos. De fato, um co-autor da hipótese da adaptação à dessecação mostrou que a inativação de DRB0118, uma proteína constitutivamente expressa, sensibiliza *D. radiodurans* à dessecação, mas não à radiação

ionizante (BATTISTA et al., 2001). Além disso, a hipótese da adaptação a dessecação (MATTIMORE e BATTISTA, 1996) não explica a resistência extrema à radiação ionizante observada em vários membros do domínio Archaea (KOPYLOV et al., 1993). A hipótese alternativa, de que a tolerância de *D. radiodurans* à dessecação pode ser uma consequência da adaptação desse organismo à radiação ionizante (hipótese da adaptação à radiação) é também apoiada por várias linhas de evidências, devendo ser investigada com igual teor (SGHAIER et al., 2007).

A maioria das células resistentes às radiações ionizantes é capaz de acumular cerca de 300 vezes mais manganês (Mn) do que as células mais sensíveis às radiações ionizantes (DALY et al., 2004). Os depósitos de manganês estão espalhados em diferentes regiões do planeta. O Programa de Perfuração no Oceano (ODP), é uma organização internacional que tem conduzido centenas de expedições para pesquisa básica sobre a história do assoalho oceânico em diversas partes do mundo. Recentemente, o ODP conduziu um levantamento de uma grande variedade de sedimentos marítimos (D'HONDT et al., 2004). Entre as características mais marcantes dos sedimentos profundos (20 m a 100 m abaixo do assoalho marítimo) está a presença de sítios enriquecidos em manganês com altos níveis de radiação gama (SGHAIER et al., 2007). Curiosamente, microrganismos anaeróbios e hipertermofílicos pertencentes ao gênero *Deinococcus* foram isolados de fontes hidrotermais com profundidades entre 65 m e 129 m (abaixo do assoalho oceânico), onde a temperatura varia de 76°C a 91°C (KIMURA et al., 2003). Estes resultados sugerem que uma espécie ancestral resistente a radiação ionizante, compartilhada por espécies do gênero *Deinococcus* e outras espécies anaeróbias hipertermofílicas pode ter existido em sítios ricos em Mn, com altos níveis de radiação. Tendo em vista a necessidade de novos estudos sobre essa possibilidade, pesquisas em outros sítios ricos em Mn podem contribuir para novas evidências sobre a evolução da resistência à radiação.

1.3. EXPERIMENTOS EM ÓRBITA

A sobrevivência de *D. radiodurans* já foi testada em várias condições de laboratório e também em condições do espaço no dispositivo ERA (*Exobiology Radiation Assembly*), colocado em órbita numa missão da ESA chamada Eureca. Dose et al. (1995, 1996) relataram que embora não tenha sido possível registrar a taxa de sobrevivência devido às condições de armazenamento das amostras antes e depois da missão, a quantidade de quebras de fita dupla do DNA (DSB) por cromossomo foi determinada. Se exposto à luz solar ($\lambda > 170\text{nm}$, sendo $4 \times 10^8 \text{J}\cdot\text{m}^{-2}$ para o intervalo de 175 a 340 nm) em camadas de cerca de 1,5 milímetros, apenas os décimos superiores na camada de 1 milímetro do topo são afetados, onde mais de 12 quebras de fita dupla (DSB) foram detectados em comparação com 8 DSB para o controle no escuro. Os dados obtidos com as amostras equivalentes aos controles revelaram que *D. radiodurans* sobrevive relativamente bem (15-35% de sobrevivência) se for mantido em argônio seco por 17 meses, mas a sobrevivência em argônio úmido (acima de 20% de umidade relativa) foi inferior a 0,01% quando expostos durante o mesmo período de tempo. A sobrevivência pode ser melhorada em até 100%, se as células forem desidratadas na presença de matéria orgânica (triptona-extrato de levedura) (DOSE et al. 1995, 1996).

Outros microorganismos também foram testados no espaço. De acordo com Dose et al. (1996), monocamada de esporos, conídios ou células vegetativas (*D. radiodurans*) são extremamente sensíveis às condições do espaço (vácuo e radiação solar). Multi-camadas ou aglomerados macroscópicos, no entanto, podem resistir por meses ou anos, mesmo quando expostos à luz solar plena. Embora as camadas superficiais de células sejam inativadas, elas continuam protegendo as camadas inferiores dos potenciais danos causados pela radiação UV e também pela desidratação.

Saffary et al. (2002) verificaram os efeitos da radiação ultravioleta extrema (EUV), com $\lambda = 30.4 \text{ nm}$, em *Bacillus sp.* e *D. radiodurans* durante vôo de foguete. A exposição à

radiação EUV diminuiu a sobrevivência de ambos os organismos em uma ordem de magnitude em relação à sua tolerância à dessecação. Resultados semelhantes foram reportados pela primeira vez para um modelo halofílico, representado por um novo isolado do gênero *Haloarcula* exposto às condições reais do espaço por 15 dias no dispositivo Biopan-1 (MANCINELLI et al., 1998). Este isolado foi obtido a partir de cristais de sal (NaCl) e apresenta alta resistência à desidratação. Uma vez que a radiação EUV interage fortemente com alvos biológicos, Saffary et al. (2002) atribuíram tal inativação a danos celulares diferentes de DNA, tais como danos na membrana e em proteínas de superfície. Por outro lado, outras formas de organismos osmofílicos, como os líquens, foram capazes de restaurar completamente a sua capacidade de colonização e atividade fotossintética após uma exposição contínua de 16 dias às condições reais de espaço no dispositivo Biopan-5 (SANCHO et al., 2007).

O Biopan consiste numa cápsula capaz de abrigar amostras biológicas e bioquímicas para experimentos na baixa órbita terrestre (LEO). Após a preparação e o carregamento das amostras, a cápsula contendo as amostras é transportada ao local de montagem do foguete russo *Foton*. A cápsula pode ser aberta e fechada por telecomando, os dados sobre o funcionamento geral são armazenados durante o vôo e as condições do ambiente espacial são monitoradas por um conjunto de sensores integrados, sendo que a ocorrência de temperaturas indesejadas pode ser contrabalanceada por mecanismos ativos, através de aquecedores, ou por meios passivos, através de materiais isolantes térmicos, além do próprio fechamento da cápsula (BAGLIONE et al., 2007).

As amostras carregadas no Biopan correspondem a experimentos de exobiologia, radiobiologia, e ciências de materiais, com o propósito de se avaliar os efeitos individuais ou combinados da radiação ultravioleta solar, radiação cósmica, vácuo, temperaturas extremas e microgravidade em modelos biológicos, espécimes materiais e componentes eletrônicos. Após

um teste bem sucedido em 1992, o programa Biopan completou 5 missões operacionais em 1994, 1997, 1999, 2005 e 2007. Em 2002, uma unidade de vôo foi perdida em uma falha de lançamento do foguete *Foton M-1* (BAGLIONE et al., 2007).

O dispositivo Biopan tem sido utilizado em diversos tipos de experimentos, tais como a sobrevivência de modelos microbianos eucarióticos e procarióticos, bem como comunidades microbianas presentes em solos permanentemente congelados (Permafrost), tanto às condições inóspitas do espaço como às variações bruscas das condições físicas impostas durante a entrada atmosférica (OLSSON-FRANCIS e COCKELL, 2010). Para este propósito, esporos de *B. subtilis* e dois isolados halofílicos, *Synechococcus* e *Haloarcula-G*, foram embebidos em argila, pó de meteorito, solo marciano simulado, ou cristais de sal e foram expostos às condições do ambiente espacial, na presença ou ausência de radiação UV. Os esporos desprotegidos foram totalmente inativados pela radiação solar em questão de segundos. Entretanto, os esporos agregados em materiais particulados apresentaram altas taxas de sobrevivência. O experimento com halofílicos desprotegidos foi perdido, mas as amostras protegidas sobreviveram. (MANCINELLI et al., 1998; HORNECK et al., 2001a,b). Esporos de *B. subtilis* também foram utilizados no experimento “Marstox”. O objetivo deste experimento foi investigar a sobrevivência sob condições simuladas da superfície marciana. Os resultados demonstraram que esporos misturados diretamente com argila, rocha ou meteoritos sobreviveram às condições combinadas do ambiente espacial, incluindo radiação UV (RETTBERG et al., 2004).

No experimento “Lichen”, *Rhizocarpon geographicum* e *Xanthoria elegans* foram expostos ao ambiente espacial. Os liquens apresentaram a mesma atividade fotossintética dos controles e não houve mudança ultraestrutural detectável na maioria das células de algas e fungos do talo (SANCHO et al., 2007). O papel fisiológico da proteína D1, que é importante na recuperação após irradiação em organismos fotossintéticos, foi determinada no

experimento de “Photo”. *Chlamydomonas reinhardtii* (wt-IL, um mutante sem introns no gene *psbA* que codifica para a proteína D1, além de outros mutantes D1) foram expostos à radiação do espaço, em combinação com a luz solar, para testar os efeitos no funcionamento da proteína D1 e da atividade do fotossistema II. Foi observado que o efeito do estresse espacial na sobrevivência variou dependendo das condições de iluminação que as amostras foram expostas. Células fotossinteticamente ativas foram capazes de sobreviver à exposição à radiação solar (BERTALAN et al., 2007). O objetivo do experimento “Lithopanspermia” foi investigar a capacidade dos microrganismos de sobreviver a uma viagem espacial. Amostras dos líquens *R. geographicum*, *X. elegans* e *Aspicilia fruticulosa*, em seu substrato natural rochoso, bem como as suas estruturas de reprodução, além de comunidades microbianas presentes em halitas do deserto do Atacama, uma comunidade de cianobactérias endolíticas de Beer, Reino Unido e akinetes de *Anabaena cylindrica* foram expostos a condições de espaço . Todos os líquens foram resistentes à condição da baixa órbita terrestre (LEO). Um décimo da comunidade microbiana do Atacama sobreviveu. Uma cianobactéria da comunidade endolítica de Beer, foi isolada após a exposição ao espaço e os akinetes sobreviveram à exposição ao espaço, quando protegidos da radiação solar (DE LA TORRE et al., 2009; OLSSON-FRANCIS et al., 2009).

Para exposições mais longas, o “Expose” é o mais recente mecanismo desenvolvido pela ESA. Os experimentos são acomodados em centenas de células minúsculas que podem ser pressurizadas ou ventiladas, totalmente expostas ou protegidas contra a radiação através de diferentes filtros (SCHULTE et al., 2007). O dispositivo Expose inclui três bandejas experimentais, cada uma com quatro compartimentos de amostras, tanto com unidades ventiladas ou seladas. As unidades podem ser seladas e pressurizadas, sendo que a composição do gás pode ser previamente definida. Cada um dos compartimentos de amostras tem uma ou duas camadas, incluindo um controle escuro. As amostras biológicas são unidas

dentro da bandeja por uma variedade de métodos, incluindo a fixação de discos de quartzo. As amostras são mantidas abertas ao ambiente espacial, ou são cobertas com filtros ópticos que permitem o controle do comprimento de onda e da quantidade de luz que as amostras são expostas. Há uma série de sensores responsáveis por medir a temperatura, pressão, radiação UV, e radiação cósmica. O Expose inclui uma estrutura de interface com o adaptador na plataforma externa do módulo Columbus da estação espacial (EUTEF-CEPA) para o Expose-E ou com a plataforma externa do segmento russo da estação espacial (ISS) para o Expose-R. Os experimentos biológicos a bordo do Expose-R foi instalado em março de 2009 e estão previstos para serem expostos por um ano e meio. Depois disso, as placas serão retiradas e armazenadas em compartimentos selados dentro da ISS para posterior retorno à Terra a bordo do módulo de entrada Soyuz. Novos experimentos serão conduzidos no Expose-R no futuro. Em contrapartida, o Expose-E foi utilizado apenas em uma missão de dois anos, pois não apresenta compartimentos removíveis (BAGLIONE et al., 2007). Existem mais de 1000 amostras biológicas, químicas, e amostras de dosimetria de oito grupos científicos internacionais que estão atualmente alojadas no dispositivo Expose (OLSSON-FRANCIS e COCKELL, 2010).

A radiação solar (incluindo radiação UV e UVV) foi medida nas missões do Biopan através de 2 tipos de sensores. Um radiômetro monitorou o fluxo da radiação eletromagnética solar, desde a faixa do UV até o infravermelho. Sensores especiais de UV são adicionados para monitorar os comprimentos de onda que são específicos ao voo orbital, já que na superfície da Terra não há incidência de fótons com comprimento de onda inferiores aos correspondentes a UV-B. Nas 5 missões já completadas, a dose total da radiação solar variou de $8,2 \text{ kJ}\cdot\text{cm}^{-2}$ a $20,4 \text{ kJ}\cdot\text{cm}^{-2}$ (BAGLIONE et al., 2007). A dose total depende diretamente do tempo em que a cápsula está aberta no espaço. Este período, variou de 7,8 a 14,8 dias. Como

consequência, a dose diária variou de $0,99 \text{ kJ}\cdot\text{cm}^{-2}$ a $1,38 \text{ kJ}\cdot\text{cm}^{-2}$, correspondendo a uma exposição constante de 2,02 a 2,8 horas à radiação solar (BAGLIONE et al., 2007).

Em relação às radiações ionizantes, a dose absorvida pela radiação cósmica foi medida por diferentes experimentos de dosimetria. Dependendo do nível de blindagem, os experimentos do Biopan foram expostos a uma dose de até 5,6 Gy por dia, nível correspondente a 4 ordens de magnitude superior a dose recebida dentro da Estação Espacial Internacional (ISS), por exemplo. Entretanto, a dose verdadeiramente absorvida pelas amostras é geralmente bem menor devido à sua montagem. Uma pequena mudança na densidade de qualquer material protetor pode fazer uma grande diferença. Por exemplo, camadas protetoras pouco densas ($0.05 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-2}$) resulta num a queda de 1 ordem de magnitude, sendo 2 ordens de magnitude para camadas com $0.25 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-2}$, e 3 ordens de magnitude para camadas mais densas ($1 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-2}$) (BAGLIONE et al., 2007).

A blindagem contra radiações ionizantes deletérias é necessária para garantir a viabilidade de vírus, bactérias e esporos fúngicos desidratados, aliviando os efeitos da radiação aplicada em eventuais processos de transferência interplanetária. Cálculos feitos por Mileikowsky et al. (2000) previram que microorganismos, tais como *D. radiodurans* e *Bacillus* sp., devem ser protegidos contra a radiação espacial dentro de rochas, da ordem de 0.33 m, para manter uma população viável mínima durante intervalos de tempo adequados para suportar uma viagem interplanetária de Marte para Terra (~ 1 milhão de anos). Esses autores estimam também que mais de 1 bilhão de fragmentos com temperaturas abaixo de 100 °C foram expulsos de Marte e pousaram na Terra nos últimos 4 bilhões de anos. A Terra primitiva recebeu cerca de 10 vezes mais matéria extraterrestre durante o período de bombardeio pesado, de 4,5 a 4 bilhões de anos atrás. De fato, os 40 meteoritos marcianos descobertos até agora na Terra representam uma pequena fração dos meteoritos vindos de Marte durante a história da Terra (FRITZ et al., 2005).

A descoberta de meteoritos marcianos na Terra (DREIBUS e WANKE, 1985) sugere que fragmentos de rocha podem escapar de corpos planetários e interplanetários e que a transferência da matéria é possível de ocorrer no sistema solar (OKEEFE e AHRENS, 1986). Pelo menos cinco dos cerca de 40 meteoritos marcianos, pode não ter experimentado temperaturas de esterilização durante a ejeção de Marte e reentrada na atmosfera da Terra (SHUSTER e WEISS, 2005). No entanto, é ainda uma questão em aberto se os seres vivos podem ser transportados entre os planetas por meio de tais fragmentos, suportando as duras condições do espaço. As características biológicas de espécies microbianas extremofílicas podem ser muito úteis para suportar ambientes extraordinários como os encontrados no espaço interplanetário.

1.4. A HIPÓTESE DA PANSPERMIA

O filósofo grego Anaxágoras (500-428 aC) afirmava que as sementes da vida estão presentes em todo o universo. Sua afirmativa se tornou o ponto de partida filosófico de uma hipótese conhecida hoje como panspermia (literalmente, "sementes em toda parte"). A hipótese da panspermia postula que a vida poderia se originar em qualquer lugar do universo onde as condições são favoráveis, e que existem mecanismos para o movimento da vida de um local para outro através do espaço. Assim, a vida abundante observada no planeta Terra pode não ter se originado aqui. Um pensamento científico sobre panspermia começou a ganhar impulso no século XIX, depois que os químicos Thenard, Vauquelin e Berzelius nos anos 1830 relataram a descoberta de compostos orgânicos em amostras de meteorito. A possibilidade de que estes materiais carbonados efetivamente representam matéria viva inspirou o médico alemão H.E. Richter a propor em 1865, um mecanismo para panspermia, em que os meteoros passando pela atmosfera da Terra em um ângulo muito raso poderia

coletar microorganismos presentes na atmosfera antes de continuar sua trajetória pelo espaço (NICHOLSON, 2009).

A idéia original de Richter sobre meteoros como veículos de transferência para a vida através do espaço foi ampliada por dois dos principais físicos da época, Hermann von Helmholtz e William Thomson (Lord Kelvin). Em 1871, cada um propôs uma hipótese com muitos detalhes do que é conhecido desde então por vários nomes, tais como litopanspermia ("panspermia associada a rochas"), panspermia balística ou transpermia, onde a transferência poderia funcionar por impactos cósmicos. Thomson propôs que meteoros ou asteroides colidindo com um planeta contendo vida como o planeta Terra pode ejetar rochas contendo seres vivos para o espaço. De maneira semelhante, rochas ejetadas de outros planetas que contém vida podem ter inoculado a Terra primitiva. Além de meteoritos, von Helmholtz incluiu cometas como possíveis veículos e propôs um conceito chave para a litopanspermia – que os organismos do planeta doador e do planeta receptor compartilham um ancestral comum. Um mecanismo alternativo para a panspermia foi posteriormente proposto pelo químico sueco Svante Arrhenius, laureado com o Prêmio Nobel de Química em 1903 por sua teoria eletrolítica de dissociação. De acordo com Arrhenius, esporos poderiam ser transportados através do espaço pela pressão da radiação emitida por estrelas, numa versão da panspermia conhecida hoje como radiopanspermia (ARRHENIUS, 1903). Atualmente é sabido que a radiação ultravioleta solar intensa é letal para microrganismos não blindados. Arrhenius contribuiu muito para a popularização da hipótese da panspermia por meio de artigos, livros e palestras públicas sobre o tema. Atualmente é o nome mais associado à panspermia (NICHOLSON, 2009).

Em meados do século XX, Sir Fred Hoyle e Chandra Wickramasinghe propuseram uma versão não muito aceita da panspermia chamada de panspermia cíclica. De acordo com esses autores, os grãos de poeira interestelar são na verdade microrganismos viáveis que

foram amplificados no interior quente e aquoso dos cometas, sendo posteriormente inoculados em planetas através de impactos e por deposição de partículas. Segundo esta hipótese, após nova amplificação nos planetas, o material biológico resultante acaba voltando para o espaço e inicia um novo ciclo de dispersão (WICKRAMASINGHE, 2003).

A hipótese da panspermia como postulada por Arrhenius em 1903 considera que estruturas de organismos vivos podem existir por todo o universo e são capazes de se desenvolver em qualquer ambiente favorável. Esta hipótese implica que durante a evolução do universo, condições favoráveis ao desenvolvimento da vida prevaleceram em diferentes locais e em diferentes épocas. Por exemplo, no início do desenvolvimento do sistema solar, quando as condições da Terra primitiva eram inóspitas para o desenvolvimento da vida, condições favoráveis ao desenvolvimento de seres vivos podem ter existido simultaneamente em outros corpos do sistema solar (tais como Marte, Vênus, Europa – lua de Júpiter ou Titã – lua de Saturno) e também em corpos de outros sistemas planetários. A hipótese da panspermia não impõe a pré-condição de que a vida terrestre tenha necessariamente se originado na Terra. Os sistemas vivos podem ter se originado em outro lugar do sistema solar ou do universo e ter sido transportados para a Terra, onde encontraram condições favoráveis para o crescimento, proliferação e evolução, resultando em sistemas mais complexos. Uma vez estabelecida, a vida na Terra também estaria sujeita à transferência e dispersão para outros corpos celestes (BAGLIONE et al., 12007).

Desde a sua formulação, a hipótese da panspermia tem sido alvo de muita crítica, com argumentos tais como: (i) ela não pode ser testada, (ii) ela transporta o problema da origem da vida para outro lugar e época da evolução do universo, e (iii) organismos vivos não podem sobreviver longos períodos de exposição ao ambiente hostil encontrado no espaço. Entretanto, evidências experimentais apresentadas pela biologia, astronomia e geologia, têm levado a

novas considerações sobre a possibilidade da ocorrência de processos naturais de transporte interplanetário de seres vivos, particularmente microrganismos (BAGLIONE et al., 2007).

Atualmente, a versão mais aceita é a litopanspermia. Segundo esta versão, formas de vida simples, provavelmente microbiana, são capazes de sobreviver a três processos principais: (i) o mecanismo de escape, ou seja, a ejeção do material contaminado do planeta para o espaço, normalmente causado por um grande impacto sobre o planeta de origem dos microrganismos, (ii) a exposição às condições inóspitas do espaço através de escalas de tempo comparáveis com aquelas experimentadas pelos meteoritos marcianos (estimada em 1-15 milhões de anos), e (iii) o processo de aterrissagem de forma a permitir a deposição não-destrutiva do material biológico no planeta destinatário (HORNECK et al., 2003).

As etapas de escape e entrada são críticas devido à grande quantidade de energia que pode ser imposta aos organismos dentro de um curto período de tempo. Portanto, estudos recentes têm investigado essas etapas (BURCHELL et al., 2004; COCKELL et al., 2007; STOFFLER et al., 2007; HORNECK et al., 2008; MOELLER et al., 2008; DE LA TORRE et al., 2009; FAJARDO-CAVAZOS et al., 2009). Vários tipos de microorganismos, tais como esporos de bactérias ou fungos e vírus, bem como biomoléculas, como DNA, aminoácidos e lipossomas, têm sido expostos às condições do espaço de maneira selecionada ou combinada, tanto fora do campo magnético da Terra (Apollo 16), ou na baixa órbita terrestre (LEO) nas missões a bordo do Spacelab 1, Spacelab D2, ERA no veículo EURECA, LDEF, Biopan no veículo FOTON, e também exposição na Estação Espacial Internacional (HORNECK et al., 2010; OLSSON-FRANCIS e COCKELL, 2010). Parâmetros extraterrestres, tais como alto vácuo, radiação ultravioleta solar intensa, diferentes componentes da radiação cósmica e extremos de temperatura afetaram a estabilidade genética dos organismos no espaço, levando a taxas de mutação aumentadas, danos ao DNA e inativação celular (HORNECK, 1999). A radiação ultravioleta solar extraterrestre tem sido demonstrada como o fator mais letal para as

amostras totalmente expostas. Porém, quando protegidos contra a incidência de radiação UV solar, esporos de *Bacillus subtilis* sobreviveram por mais de cinco anos no espaço (HORNECK et al., 1994).

Recentemente, Horneck et al. (2008) testaram a primeira etapa da hipótese da panspermia, expondo os esporos de *B. subtilis*, células de *Chroococcidiopsis* e talos e ascocarpos do líquen *X. elegans* a choques de pressões na faixa de 5 a 40 Giga Pascal. Seus resultados suportam a hipótese de que material biológico pode ser ejetado com êxito de planetas, sendo possível que a própria Terra primitiva tenha sido contaminada em processo semelhante.

Em vista desses resultados surpreendentemente positivos e favoráveis à hipótese da panspermia, a etapa crítica da reentrada do processo foi verificada pelo experimento “Stone” da ESA (COCKELL et al., 2007). Estes autores demonstraram que a cianobactéria endolítica *Chroococcidiopsis* sp. inoculada em uma amostra de rocha metamórfica (gnaisse) não resistiu a rápida re-entrada na atmosfera da Terra devido ao aquecimento extremo alcançado até ~ 5 mm de profundidade da rocha. Este resultado indica a impossibilidade de transferência interplanetaria de microrganismos fotossintéticos nos moldes da hipótese da litopanspermia (COCKELL et al., 2007), sugerindo que a fotossíntese pode ter aparecido independentemente no planeta Terra (FOUCHER et al., 2010).

Embora as chamas provocadas pelo atrito com a atmosfera podem ter entrado por trás da amostra e queimado o biofilme, as transformações mineralógicas observadas na superfície da rocha indicam que a temperatura na parte de trás atingiu 650°C, muito alta para a estabilidade de qualquer composto orgânico (FOUCHER et al., 2010). Portanto, mesmo que as chamas não tenham atingido o biofilme, uma camada de 2 cm de proteção rochosa não é suficiente para proteger microrganismos endolíticos. Na superfície terrestre, microrganismos

endolíticos fotossintéticos, tais como *Chroococcidiopsis*, precisam ter um mínimo de acesso à luz e, portanto, não penetram na rocha a uma profundidade superior a 5 mm.

Entretanto, microrganismos litotróficos não são dependentes de luz, ou seja, podem obter carbono e energia a partir de fontes inorgânicas. Eles são colonizadores bastante comuns em rochas e tem sido encontrados em grandes profundidas em minas de ouro com 3 km de profundidade na África do Sul (LIN et al., 2006). Sabendo-se que rochas ejetadas durante um impacto podem ser provenientes da sub-superfície da crosta terrestre (MELOSH, 2003), é possível que as rochas contendo microrganismos litotróficos em suas fraturas pode ser ejetado pelo impacto. De fato, se a vida ainda está presente em Marte, ela irá ocorrer em ambientes protegidos subsuperfície. Horneck et al. (2001a) demonstraram que esporos microbianos podem resistir às condições do espaço se protegidos por uma camada de rocha, mas a sobrevivência de microrganismos à entrada atmosférica ainda não tinha sido testada até os experimentos Stone 5 e 6 (FOUCHER et al., 2010).

1.5. CARACTERIZAÇÃO DO PROBLEMA

Os diversos parâmetros físico-químicos que influenciam na sobrevivência microbiana durante o tempo de uma etapa de migração interplanetária nos moldes da hipótese da panspermia nunca foram estudados de maneira sistemática com um único modelo biológico, o que acaba tornando difícil a comparação dos resultados disponíveis na literatura. No nosso estudo, a sobrevivência de *D. radiodurans* a condições análogas às presentes no espaço interplanetário foi investigada em diversas estações de trabalho, incluindo fontes de radiação síncrotron ultravioleta, ultravioleta de vácuo e raios-X, além de radiações particuladas, com detalhes experimentais bastante semelhantes.

Além do conhecimento sobre a sobrevivência de modelos biológicos às condições extraterrestres, o isolamento de microrganismos naturalmente presentes em amostras de

ambientes extremos é fundamental para compreender a capacidade de adaptação da vida a ambientes tão extremos como os ambientes extraterrestres. Desta forma, em um segundo bloco de experimentos, foram desenvolvidos procedimentos de isolamento de microrganismos resistentes às condições marcianas, considerando a radiação incidente em Marte e a composição atmosférica marciana, atuando separadamente sobre os microrganismos. Este trabalho foi feito em colaboração com pesquisadores chilenos utilizando amostras de solo do deserto do Atacama, considerado um ambiente análogo a alguns locais da superfície do planeta Marte. O objetivo foi isolar microrganismos resistentes a radiação ultravioleta para testes em novas câmaras de simulação em fase de construção em São Paulo.

A simulação das condições do espaço interplanetário, além de servir para programas futuros de proteção planetária, tem adicionado novos dados ao debate milenar da hipótese da panspermia, segundo a qual a vida pode ter sido trazida ao planeta Terra por meteoróides ou pequenos cometas. Ainda que seja instigante a investigação concernente aos aspectos da origem da vida na Terra, é indispensável acrescentar que a exposição de seres vivos a condições extremas pode trazer contribuições para aplicação em diferentes setores como por exemplo, o desenvolvimento de melhores técnicas de cultivo de diferentes organismos levando à produção de bio-inssumos em condições extremas.

2. OBJETIVOS

2.1. GERAL

Estudar o comportamento de diferentes modelos biológicos submetidos a ambientes extremos, como os vigentes fora da Terra, considerando parâmetros como: pressão, temperatura e radiação, atuando separadamente e em conjunto sobre os microrganismos resistentes a essas condições, visando: ampliar o conhecimento sobre os limites físico-químicos para a existência de vida tal qual a conhecemos; analisar a possibilidade de ocorrência de processos de contaminação cruzada entre planetas do sistema solar e contaminação interestelar; identificar isolados procariontes com potencial valor para inovação de produtos biotecnológicos.

2.2. ESPECÍFICOS

- Isolar microrganismos extremófilos provenientes de amostras de solo do deserto do Atacama, no Chile utilizando como pressão seletiva estresses como radiação ultravioleta, dessecação, baixa pressão e baixa temperatura;
- Caracterizar o perfil de sobrevivência desses microrganismos sob as condições do espaço interplanetário, bem como dos planetas e luas do sistema solar;
- Desenvolver metodologias experimentais para o uso desses microrganismos em laboratórios de simulação, foguetes e veículos lançadores de satélites.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. CEPAS BACTERIANAS

A cepa selvagem GY9613 (R1) e o mutante *recA*, de *Deinococcus radiodurans* foram gentilmente cedidos pelo Dr. Carlos Eduardo Bonacossa de Almeida, do Instituto de Radioproteção e Dosimetria do Rio de Janeiro (IRD-RJ). A cepa AB1157 de *Escherichia coli* foi obtida no laboratório de Radiobiologia Molecular do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho (IBCCF), da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

A cianobactéria *Chroococcidiopsis* sp. foi isolada do deserto do Atacama (Chile), pelo grupo dos nossos colaboradores chilenos, Dr. Armando Azúa-Bustos e Dr. Rafael Vicuña, Departamento de Genética Molecular y Microbiología, da Pontificia Universidad Católica de Chile (PUC) e enviadas ao Laboratório de Radiobiologia Molecular do IBCCF-UFRJ.

A manutenção e o preparo dessas cepas foram feitos sob a supervisão da Prof^a Dr^a Cláudia Lage, no Laboratório de Radiobiologia Molecular do IBCCF-UFRJ, e do Prof. Dr. Charles Cockell, no Laboratório de Microbiologia Ambiental do Instituto de Pesquisas de Ciências Planetárias e Espaciais (PSSRI), da Open University (OU), Reino Unido.

3.2. MEIOS DE CULTURA

3.2.1. TGY (ANDERSON et al., 1956)

Reagente (Difco ou Sigma)	Solidificado	Líquido
Triptona	5 g	10 g
Extrato de Levedura	3 g	6 g
Glicose	1 g	2 g
Agar	15 g	-
Água destilada (q.s.p.)	1000 ml	1000 ml

Autoclavar a 121°C por 15min.

3.2.2. BG-11 (RIPPKA et al., 1979)

Solução 1	Estoque 10x
Na ₂ -EDTA	0,1 g/l 0,1 g/100ml
Ácido cítrico.1H ₂ O	0,6 g/l 0,6 g/100ml
CaCl ₂ .1 H ₂ O	3,6 g/l 3,6 g/100ml

Soluções-estoque (10 x) armazenadas a 4°C.

Solução 2 (Esterilizar por filtração e armazenar a 4°C)

MgSO₄.7H₂O 0,75 g/100 ml

Solução 3

K₂HPO₄ 0,305 g/100ml

Solução 4 (Esterilizar por filtração e armazenar a 4°C)

Citrato férrico de amônia 0,6 g/100 ml

Solução estoque 5 (g/l) (Autoclavar e armazenar a 4°C)

H_3BO_3	2,86
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1,81
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$	0,22
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$	0,04
$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{ H}_2\text{O}$	0,08
$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6 \text{ H}_2\text{O}$	0,05

Composição final

Solução 1	10 ml
Solução 2	10 ml*
Solução 3	10 ml
Solução 4	1 ml*
Solução 5	1 ml
Na ₂ CO ₃	0,02 g
NaNO ₃	1,5 g
Agar	10 g
Água destilada (q.s.p.)	1000 ml

Ajustar o pH para 7,4 ($\pm 0,2$) e autoclaravar. *Adicionar após a autoclavação.

3.2.3. Meio de cultura LB (MILLER, 1992)

NaCl (Reagen-Quimibrás Indústrias Químicas S/A)	10 g
Bacto-triptona (Difco)	10 g
Extrato de levedura (Difco)	5 g
Água destilada (q.s.p.)	1.000 mL

3.3. CONDIÇÕES DE CULTIVO

As cepas de *D. radiodurans* foram cultivadas em meio de cultura TGY líquido (item 3.2.1) por 15 h a 20 h a 32 °C, com agitação de 200 rpm. Alíquotas foram retiradas para monitoramento das culturas e aquelas com DO₆₀₀ > 1,0 (Concentração de células > 10⁸ células·ml⁻¹) foram submetidas aos procedimentos de preparação das amostras, de acordo com as metodologias descritas nos itens 3.6 a 3.9. Após os tratamentos, as amostras foram reconstituídas em TGY líquido e submetidas a diluição seriada em solução salina NaCl 0,9%

ou TGY. Em seguida, alíquotas foram inoculadas em placas de Petri contendo meio de cultura TGY solidificado (item 3.2.1) e as amostras foram incubadas a 30 °C por 48 h a 72 h.

A cianobactéria *Chroococcidiopsis* sp. foi cultivada em meio de cultura BG-11 líquido (item 3.2.2) à temperatura ambiente (~20 °C) por pelo menos 1 mês, com ciclos de iluminação utilizando lâmpada fluorescente a 50 cm de distância das culturas. Alíquotas foram retiradas para monitoramento das culturas e aquelas com DO₆₀₀ > 1,0 (Concentração de células > 10⁷ células·ml⁻¹) foram submetidas aos procedimentos de preparação das amostras, de acordo com as metodologias descritas nos itens 3.6.4. e 3.7.1. Após os tratamentos, as amostras foram reconstituídas em BG-11 e incubadas em placas de 12 ou 24 poços à temperatura ambiente (~22°C) por até 3 meses, com ciclos de 12 h de iluminação utilizando lâmpada fluorescente a 50 cm de distância das culturas.

3.4. MATERIAL GEOLÓGICO

Amostras de 5 diferentes localidades do deserto do Atacama (Chile), considerado pela NASA como um ambiente análogo ao planeta Marte (NAVARRO-GONZALEZ et al., 2003), foram coletadas pelos nossos colaboradores chilenos em julho de 2008 e enviadas em frascos de plásticos hermeticamente fechados (tubos falcon de 15 ml ou 50 ml), ao Laboratório de Radiobiologia Molecular do IBCCF-UFRJ. O material foi numerado e etiquetado conforme ilustrado na Figura 1.

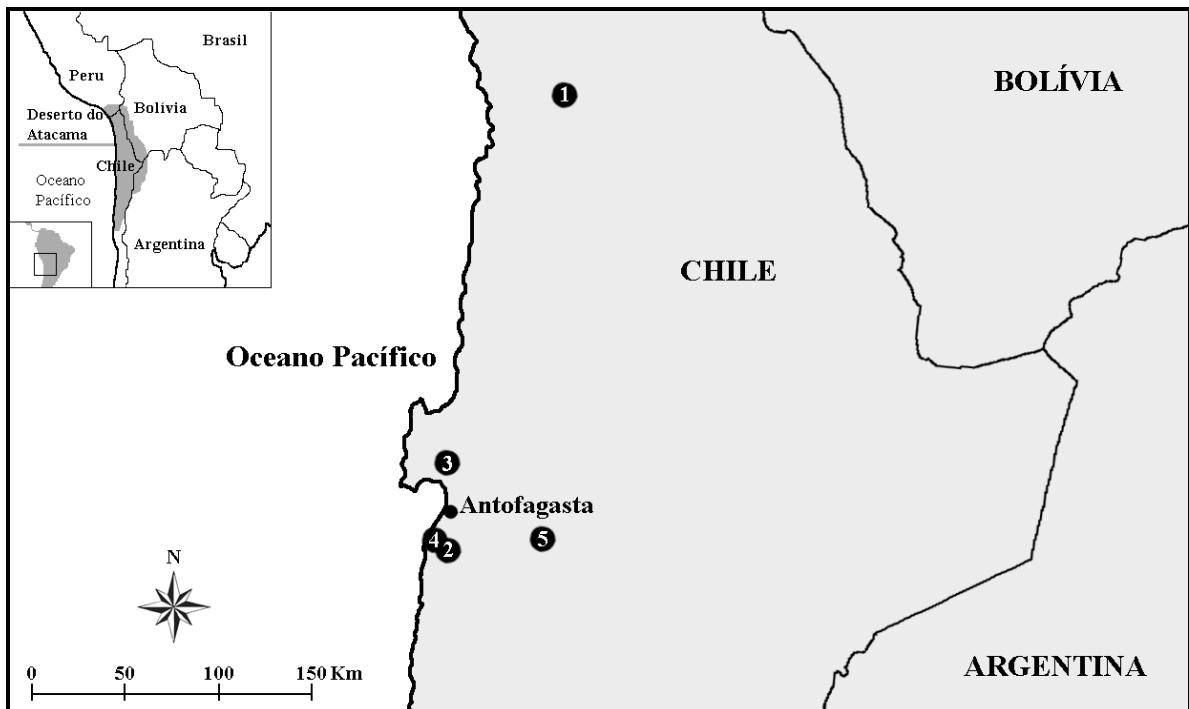


Figura 1. Localização geográfica das amostras coletadas no deserto do Atacama. **1.** Laguna Llamara ($21^{\circ}16'07.54''S$, $69^{\circ}37'03.90''W$. Altitude: 751 m); **2.** Sitio Cuarzos B2 ($23^{\circ}48'59.15''S$, $70^{\circ}29'25.59''W$. Altitude: 538 m); **3.** Capa Negra La Portada ($23^{\circ}29'58.61''S$, $70^{\circ}25'42.10''W$. Altitude: 27 m); **4.** Gypsum ($23^{\circ}49'01.14''S$, $70^{\circ}29'22.98''W$. Altitude: 531 m); **5.** Sitio 3 S4 ($23^{\circ}49'10.76''S$, $70^{\circ}28'36.77''W$. Altitude: 736 m).

Alíquotas dessas amostras foram diluídas em solução salina (NaCl 0,9%) e expostas à irradiação com lâmpada de mercúrio ($\lambda = 254$ nm) com o objetivo de isolar microrganismos fotorresistentes, sendo que a metodologia detalhada está descrita no item 3.10.1.

3.5. CURVAS DE SOBREVIVÊNCIA

As metodologias básicas utilizadas na maioria dos experimentos foram baseadas na técnica de diluição seriada e plaqueamento em meio de cultura solidificado com posterior contagem de unidades formadoras de colônias (UFC). Desta forma, os valores correspondentes às amostras submetidas aos tratamentos foram denominados Nt e as amostras

controles não submetidas aos tratamentos foram denominadas N_0 . Através da equação (N_t/N_0) foram obtidas as frações de sobrevivência em relação aos controles, as quais foram plotadas em gráficos mostrando curvas de sobrevivência.

3.6. IRRADIAÇÃO ULTRAVIOLETA

As amostras de *D. radiodurans* foram submetidas a diferentes fontes de radiação ultravioleta incluindo lâmpadas de hidrogênio, de xenônio e de mercúrio, fontes de luz síncrotron e um Simulador Solar Oriel. Já as amostras da cianobactéria *Chroococcidiopsis* sp. foram irradiadas apenas com feixe monocromático ($\lambda = 254\text{nm}$) na linha de luz CD1 do síncrotron Astrid (Dinamarca), já que essas amostras foram obtidas no final da parte experimental desta tese. Os procedimentos de preparo das amostras e os detalhes das irradiações estão descritos nas subseções a seguir.

3.6.1. Lâmpada de hidrogênio ($\lambda = 121,6\text{nm}$)

Culturas de *D. radiodurans* em início de fase estacionária $\text{DO}_{600} > 1,0$, (Concentração de células $> 10^8 \text{ células}\cdot\text{ml}^{-1}$) foram depositadas sobre filtros de policarbonato (Millipore) de 25 mm de diâmetro, porosidade de 0,45 μm (superfície lisa). As células foram desidratadas por 15 h a 20 h na bancada de trabalho em ambiente livre de contaminantes. Observações ao microscópio confirmaram que 10^8 células por amostra se distribuíram em monocamada pela superfície dos filtros. Os filtros foram fixados num porta-amostras metálico utilizando uma fita de carbono dupla-face (Shinto Paint Co.), e as amostras controle foram expostas às mesmas condições, exceto para a irradiação. O porta-amostras foi colocado dentro da câmara de vácuo a uma distância de 8 cm da fonte de luz (Figura 2). O fluxo de fôtons da lâmpada (Ophthos Instruments, Inc.), medido através de um fotodiodo, foi de $10^{15} \text{ cm}^{-2}\text{s}^{-1}$, correspondente a uma irradiância de $16,34 \text{ J}\cdot\text{m}^{-2}$ para uma atmosfera interna composta por

95% de argônio e 5% de hidrogênio a 60Pa ($I/I_0=99,86\%$). Várias doses foram administradas com tempos crescentes de exposição à radiação.

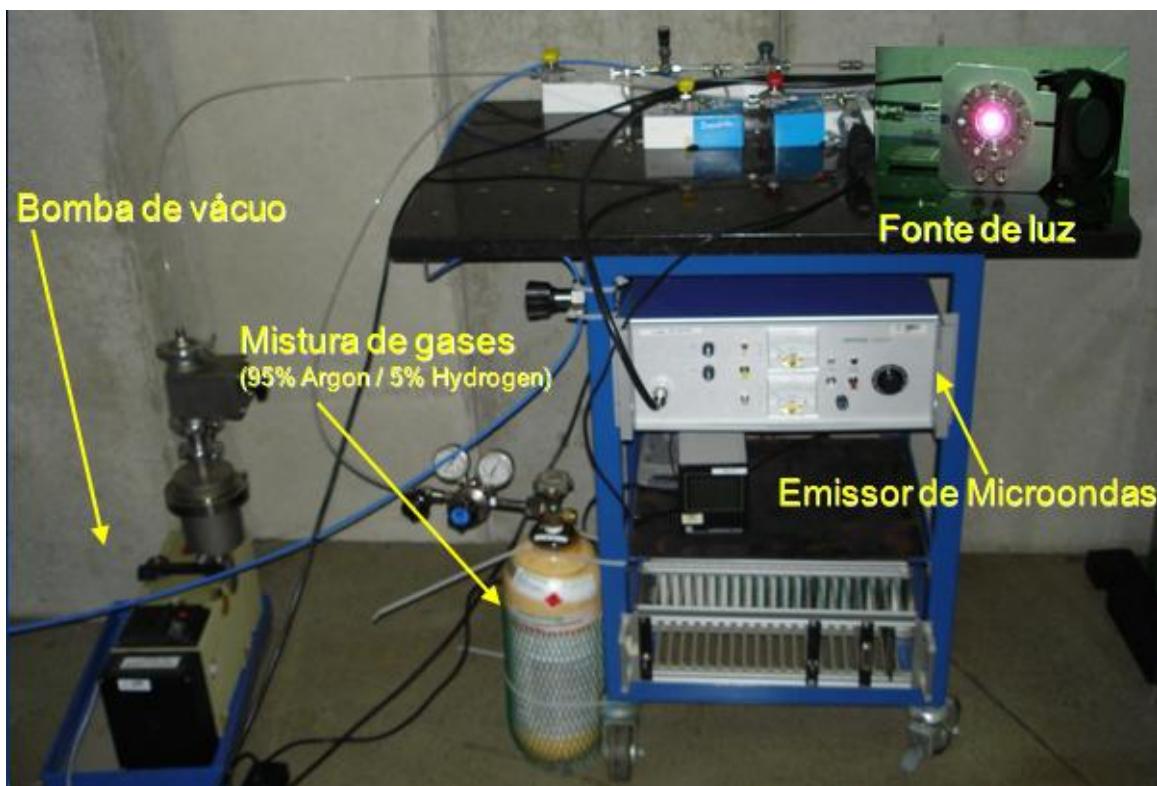


Figura 2. Fotografia da lâmpada de hidrogênio mostrando os principais componentes do aparato experimental.

Para irradiação das amostras na fita de carbono (superfície rugosa), culturas em início de fase estacionária $DO_{600} > 1,0$, (Concentração de células $> 10^8$ células· ml^{-1}) foram liofilizadas e o pó resultante foi espalhado em discos de fita de carbono (Shinto Paint Co.) de 25 mm de diâmetro, levando à formação de multi-camadas de células. Todas as amostras foram irradiadas em triplicata à temperatura ambiente, de acordo com a tabela 1.

Tabela 1. Desenho experimental para irradiação ultravioleta de vácuo (UVV) de *D. radiodurans* com lâmpada de hidrogênio ($\lambda=121,6\text{ nm}$).

Dose ($\text{kJ}\cdot\text{m}^{-2}$)	Tempo de irradiação			Amostras
	(s)	(min)	(h)	
0	0	0	0	3
1	60	1	0,02	3
5	300	5	0,08	3
12,5	780	13	0,22	3
50	3060	51	0,85	3
103	6300	105	1,75	3
223	13620	227	3,78	3
756	46260	771	12,85	3
TOTAL	70380	1173	19,55	24

Após os tratamentos, as células foram reconstituídas e homogenizadas em meio de cultura TGY líquido com posterior leitura da DO₆₀₀ em espectrofotômetro. Como a quantidade de material foi diferente entre as amostras e levando-se em consideração que a densidade ótica reflete o número de células presentes nas amostras, diferentes medidas de DO₆₀₀ foram feitas para suspensões celulares correspondentes ao controle não irradiado para estimar a viabilidade das células em pó. Uma curva de calibração foi produzida correlacionando a DO₆₀₀ e o número de células viáveis. Desta forma, foi possível determinar o número estimado de células viáveis das amostras controle (N_{0E}), mesmo sem saber de fato o número de células presentes no pó de células. Após calcular o N_{0E} para todas as amostras irradiadas, as taxas de sobrevivência foram determinadas da seguinte maneira: (N_t/N_{0E}) x 100, onde: N_t é o número de unidades formadoras de colônias (UFC) por alíquota correspondente

ao tempo de exposição t , N_{0E} é o número de UFC por alíquota das amostras controle (não-irradiadas). O desprendimento das células aderidas aos diferentes substratos após desidratação extrema resultou em uma perda da viabilidade entre 20% e 50% devido ao procedimento de liofilização e exposição ao vácuo. Essa perda foi incluída no cálculo da viabilidade dos controles (N_{0E}). Portanto, para cada experimento de irradiação, N_{0E} representa a média de 3 replicatas após liofilização, exposição ao vácuo e desprendimento das células aderidas ao substrato. Os valores foram marcados em gráficos semi-log em função da dose indicada no eixo das abscissas, revelando as curvas de sobrevivência para cada tratamento.

3.6.2. Lâmpada de xenônio ($\lambda = 145\text{nm}$)

Culturas de *D. radiodurans* em início de fase estacionária $\text{DO}_{600} > 1,0$, (Concentração de células $> 10^8 \text{ células}\cdot\text{ml}^{-1}$) foram filtradas em filtros de policarbonato (Millipore) de 25mm de diâmetro, porosidade de $0,45\mu\text{m}$ (superfície lisa). As células foram desidratadas por 15h a 20h na bancada de trabalho em ambiente livre de contaminantes. Observações ao microscópio confirmaram que 10^8 células por amostra se distribuíram em monocamada pela superfície dos filtros.

Para irradiação das amostras na fita de carbono (superfície rugosa), foram retirados volumes de 1ml de uma cultura em início de fase estacionária $\text{DO}_{600} > 1,0$, (Concentração de células $> 10^8 \text{ células}\cdot\text{ml}^{-1}$) e depositados sobre discos de fita de carbono dupla-face (Agar Scientific, UK) de 25mm de diâmetro, levando à formação de multi-camadas de células.

Amostras de um biofilme epilítico negro (que cresce sobre rochas) provenientes da região de La Portada, no Chile (seção 4.4), foram divididas em aliquotas de 10mg, diluídas em 1ml de meio de cultura BG-11 e filtradas em membranas de policarbonato (Millipore) com diâmetro de 25mm e porosidade de $0,2\mu\text{m}$ a fim de se produzir uma fina camada de material biológico sobre as membranas. Como o cilindro de filtração apresentava um diâmetro

de 16mm, as membranas contendo o material biológico foram cortadas para a retirada das bordas em excesso.

Os materiais resultantes foram desidratados por pelo menos 3 horas à temperatura ambiente na bancada de trabalho, e colados em um porta amostra metálico utilizando discos de fita de carbono dupla-face (Agar Scientific, UK). O porta amostra contendo até 6 amostras foi colocado dentro da câmera de vácuo (10^{-5} Pa). Uma lâmpada de xenônio emissora de luz UVV (Resonance, Canadá), foi acoplada à câmara de vácuo numa posição adequada para os experimentos de irradiação. O posicionamento das amostras diretamente contra o feixe de luz UVV foi feito através de um manipulador rotatório presente no topo do sistema de irradiação. Todas as amostras (biofilme artificial, e monocamadas de células) foram irradiadas de acordo com o esquema apresentado na Tabela 2.

Tabela 2. Desenho experimental para irradiação UVV de amostras de biofilmes epilíticos (cresce sobre rochas) e cepas de *D. radiodurans* com lâmpada de xenônio ($\lambda=145\text{nm}$).

Dose ($\text{J} \cdot \text{m}^{-2}$)*	Tempo de irradiação			Amostras
	(s)	(min)	(h)	
0	0	0	0	3
0,2	60	1	0,02	3
1,0	300	5	0,08	3
2,0	600	10	0,17	3
10,0	3000	50	0,83	3
20,0	6000	100	1,67	3
100,0	30000	500	8,33	3
TOTAL	39960	666	11,10	21

* Calculado para o pico de emissão da lâmpada ($\lambda=145\text{nm}$).

Apesar da luminosidade da lâmpada parecer bem fraca ($3\text{mW} \cdot \text{m}^{-2}$), seu fluxo de fótons é mais de 3 vezes superior ao fluxo de fótons do Sol no comprimento de onda de 145nm (WOODS, 2002), que representa o pico de emissão da lâmpada, como visto na Tabela 3. O fluxo de fótons da lâmpada foi determinado através de medidas diretas utilizando um fotodíodo, levando-se em consideração a eficiência quântica do fotodíodo, oferecida pelo fornecedor (Roithner LaserTechnik, Austria).

Tabela 3. Comparação entre as propriedades da lâmpada de xenônio e o fluxo de fôtons do Sol com comprimento de onda de 145nm.

Propriedade	Lâmpada de xenônio	UVV solar ($\lambda=145\text{nm}$)
Máximo fluxo (λ)	145nm	Não aplicável
Fluxo de fôtons	$10^{10}\text{cm}^{-2}\text{s}^{-1}$ ($10^{14}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$)	$3 \times 10^9\text{cm}^{-2}\text{s}^{-1}$ ($3 \times 10^{13}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$)*
Irradiância	$1,4 \times 10^{-4}\text{W}\cdot\text{m}^{-2}$	$4 \times 10^{-5}\text{W}\cdot\text{m}^{-2}$

*WOODS, 2002.

Após os tratamentos, as amostras do biofilme preto foram colocadas em placas de 6 poços contendo 5ml de meio de cultura BG-11 (item 3.2.2) e incubadas à temperatura ambiente (~22°C) por até 3 meses, com ciclos de 12h de iluminação utilizando lâmpada fluorescente a 50cm de distância da fonte de luz. Durante as semanas subsequentes, aliquotas de 10 μl foram retiradas dos poços e observadas ao microscópio óptico para verificar qualquer alteração nas morfologias celulares e eventuais aumentos do número total de células. Já as amostras de *D. radiodurans* foram diluídas após os tratamentos em meio de cultura TGY (item 3.2.1) e submetidas à diluição seriada utilizando solução salina (NaCl 0,9%), sendo posteriormente plaqueadas em placas de Petri contendo TGY solidificado, conforme descrito na seção 3.3. Após incubação a 30°C por até 72 horas, as colônias crescidas sobre o meio de cultura foram contadas e as taxas de sobrevivência foram descritas conforme o item 3.5. Os resultados foram plotados em gráficos mostrando curvas de sobrevivência.

3.6.3. Lâmpada de mercúrio ($\lambda = 254\text{nm}$)

Para confirmar o fenótipo natural de resistência da espécie, a cepa selvagem de *D. radiodurans* foi submetida a irradiação ultravioleta-C (UV-C) com lâmpada germicida de baixa pressão de mercúrio ($\lambda = 254\text{nm}$). Para isso, as células foram incubadas conforme descrito na seção 3.3. Após o período de incubação, todo o volume de cultura foi centrifugado

a 4 °C, 8000 rpm por 10 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o sedimento de células foi ressuspensão em 5ml de solução salina (NaCl 0,9%) através de agitação em vortex, modelo Gene-2 (Scientific Industries, NY - USA). Posteriormente, a suspensão de células foi submetida a nova centrifugação nas mesmas condições. O sedimento foi ressuspensão novamente em 5ml de solução salina e a suspensão de células foi colocada em uma placa de Petri de vidro previamente esterilizada. Antes de iniciar a exposição das células às diferentes doses de UV-C, foi retirado um volume de 100µl de células para a diluição seriada e posterior inóculo em placas de Petri de plástico contendo TGY solidificado. As colônias crescidas nestas placas foram utilizadas como referência (controle) para o cálculo da porcentagem de sobrevivência a UV-C. Para o cálculo da dose irradiada, foi utilizada uma fotocélula do tipo CX-254 (Vilber Loumat). Os valores medidos em $\text{mW}\cdot\text{cm}^{-2}$ foram convertidos para $\text{J}\cdot\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e os tratamentos foram feitos através de exposição das células em tempos equivalentes às doses desejadas, respeitando-se os efeitos cumulativa da irradiação. As doses de radiação incidente nas células, em $\text{kJ}\cdot\text{m}^{-2}$, foram de: 0; 0,5; 1,0; 2,0. Para cada dose, foram aliquotados 100µl de células para a diluição seriada e posterior inóculo em TGY solidificado. O cálculo da taxa de sobrevivência foi feito conforme descrito na seção 3.5.

Para efeito de comparação, o mesmo procedimento foi feito para a cepa AB1157 de *E. coli*, sendo que as principais diferenças do protocolo foram a utilização de LB no lugar de TGY, tempos de incubação 4 vezes menor e temperatura de incubação de 37 °C, em vez de 32 °C.

3.6.4. Feixe monocromático ($\lambda = 254\text{nm}$) na linha de luz CD1 do sincrotron ASTRID (Dinamarca)

Amostras do biofilme negro provenientes da região de La Portada, no Chile (seção 3.4), foram divididas em aliquotas de 10mg, diluídas em 1ml de meio de cultura BG-11 e filtradas em membranas de policarbonato (Millipore) com diâmetro de 25mm e porosidade de

0,2 μ m a fim de se produzir uma fina camada de material biológico sobre as membranas. Como o cilindro de filtração apresentava um diâmetro de 16mm, as membranas contendo o material biológico foram cortadas para a retirada das bordas em excesso. O material resultante foi desidratado por pelo menos 3 horas à temperatura ambiente na bancada de trabalho, e colado em discos de fita de carbono dupla face (Agar Scientific, UK). Posteriormente, o conjunto foi cortado em pedaços de 2mm² utilizando uma grade de lâminas construída especificamente para este propósito. Em seguida, os pedaços de 2mm² foram colados em porta-amostras metálicos. O sistema de irradiação foi montado na estação de trabalho da linha de luz CD1 do sincrotron Astrid, Aarhus, Dinamarca, conforme mostrado na Figura 3.

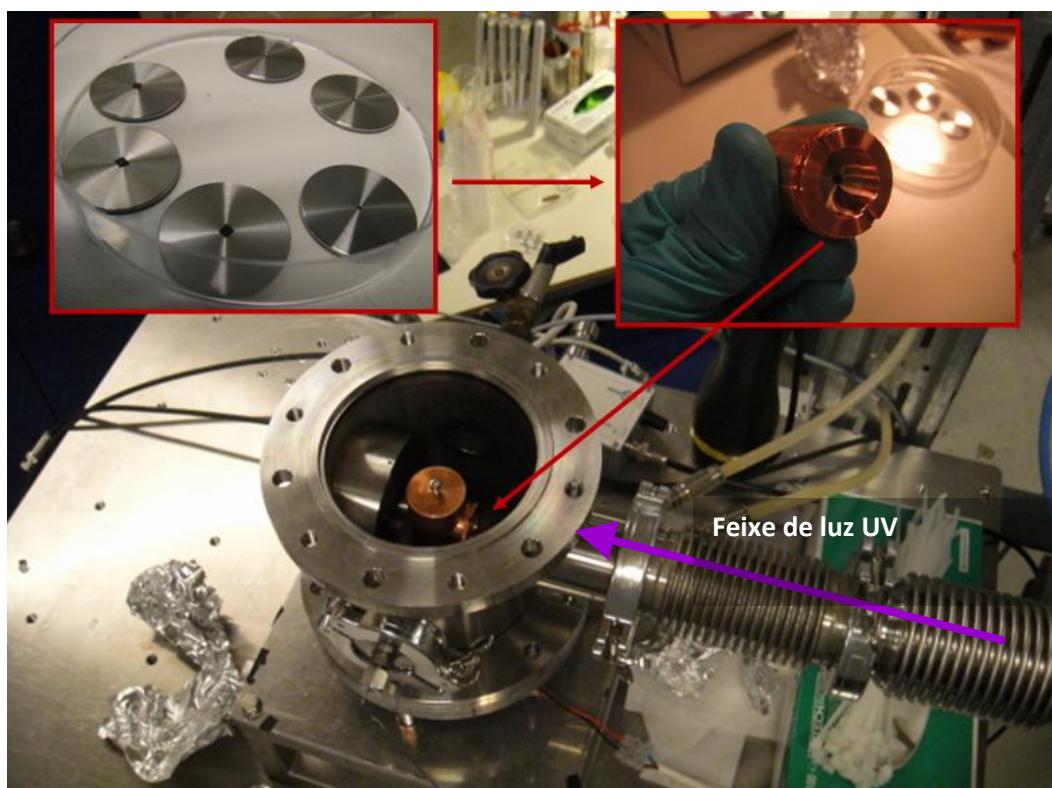


Figura 3. Sistema de irradiação com luz UV ($\lambda=254\text{nm}$) na linha de luz CD1 do sincrotron Astrid, Aarhus, Dinamarca. No detalhe à esquerda, amostras posicionadas nos discos metálicos e à direita o sistema de irradiação a ser posicionado contra o feixe.

As amostras de *D. radiodurans* (cepas selvagem e mutante *recA* deficiente para o reparo de DNA por recombinação homóloga), e da cepa selvagem da cianobactéria *Chroococcidiopsis* sp., isolada do Atacama, foram diluidas em alíquotas de 1ml e preparadas da mesma maneira que o biofilme preto para irradiação na linha de luz CD1. Adicionalmente, as amostras de *D. radiodurans* foram irradiadas também sobre a fita dupla-face de carbono para investigar a influência do tipo de substrato na sobrevivência bacteriana após a irradiação. Para isso, 1ml da cultura foi aplicado diretamente sobre a fita de carbono, seguido de desidratação por pelo menos 3 horas à temperatura ambiente na bancada de trabalho. Em seguida, as amostras foram cortadas em pedaços de 2mm² utilizando uma grade de lâminas e coladas no porta amostra metálico. As irradiações foram realizadas de acordo com as condições indicadas na Tabela 4.

Após os tratamentos, as amostras foram recuperadas e incubadas conforme descrito na seção 3.3.

Tabela 4. Desenho experimental para irradiação UV de cada material biológico na linha de luz CD1 do sincrotron Astrid, Aarhus, Dinamarca.

Dose (J·m ⁻²)*	Tempo de irradiação			Tempo	Amostras	Tempo final
	(s)	(min)	(h)			
0 (Controle)	0	0	0	0	3	0
3	60	1	0,02	1min	3	3min
30	600	10	0,17	10min	3	30min
300	6000	100	1,67	1h 40min	3	5h
TOTAL	6660	111	1,86	1h 51min	12	5h 33min

* Para um fluxo de fótons de até 10¹⁷m⁻²s⁻¹

3.6.5. Feixe branco ($\lambda > 57,47\text{nm}$) na linha de luz TGM do LNLS

Os procedimentos de irradiação na linha de luz TGM (Toroidal Grating Monochromator) do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) demandaram a construção de um porta-amostras específico, com o apoio da equipe técnica do LNLS, com o intuito de adaptar a metodologia microbiológica às exigências técnicas do experimento. Para isso, foi utilizada uma peça hexagonal de cobre com 10cm de comprimento e 4cm de diâmetro, com 36 parafusos de 5mm de diâmetro, sendo 6 em cada face, conforme mostrado na figura 4.

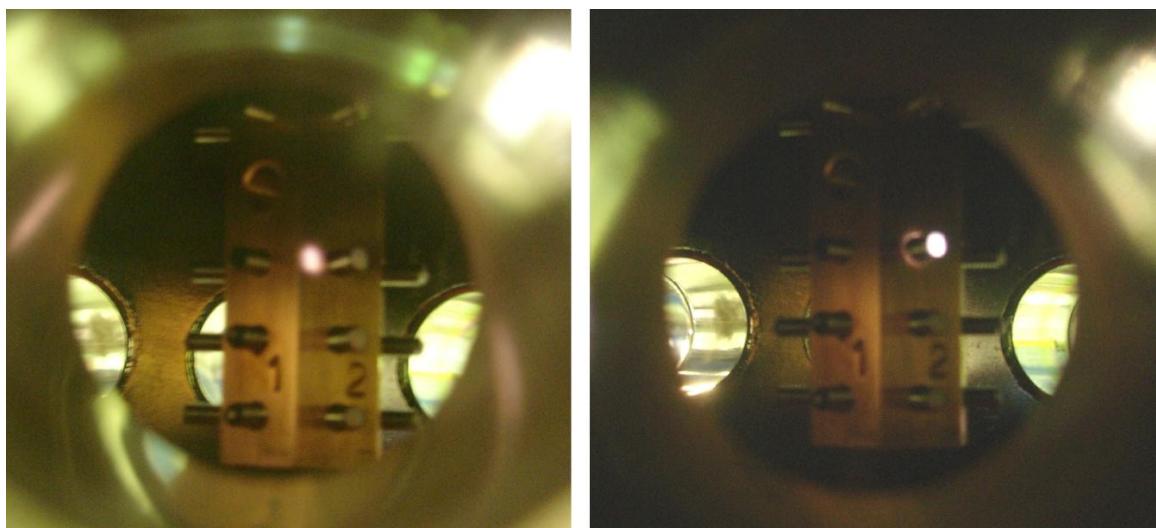


Figura 4. Posicionamento das amostras na direção do feixe (esquerda) e exposição das amostras ao feixe (direita) mostrando a cobertura de toda a amostra pela área irradiada.

Trinta e seis pedaços circulares de fita de carbono dupla-face (Shinto Paint Co) com 5mm de diâmetro, cobertos ou não com filtro de policarbonato (Millipore) foram distribuídos sobre os parafusos. Após contagem de células ao microscópio, os substratos de carbono foram carregados com $1\mu\text{L}$ da cultura de *D. radiodurans* em início de fase estacionária (seção 3.3), correspondente a 10^6 células por amostra dispostas em monocamada. O porta-amostras foi então colocado em freezer -80°C por pelo menos 30 minutos, seguido de exposição a baixo

vácuo (600Pa) em um liofilizador por pelo menos 5 horas. Após este período, o porta-amostras foi transportado em recipiente hermeticamente fechado para o anel experimental do LNLS, onde foi colocado na câmara de irradiação da estação de trabalho da linha de luz TGM. A montagem da linha de luz foi composta por um sistema de bombeamento diferencial para uso de uma seção da linha contendo gás neônio numa pressão maior do que o restante da linha. Este sistema foi utilizado para atenuar a porção do espectro eletromagnético correspondente a raios-X moles, com o intuito de tornar o feixe mais semelhante ao espectro eletromagnético solar na região do espaço equivalente à órbita da Terra (Figura 5).

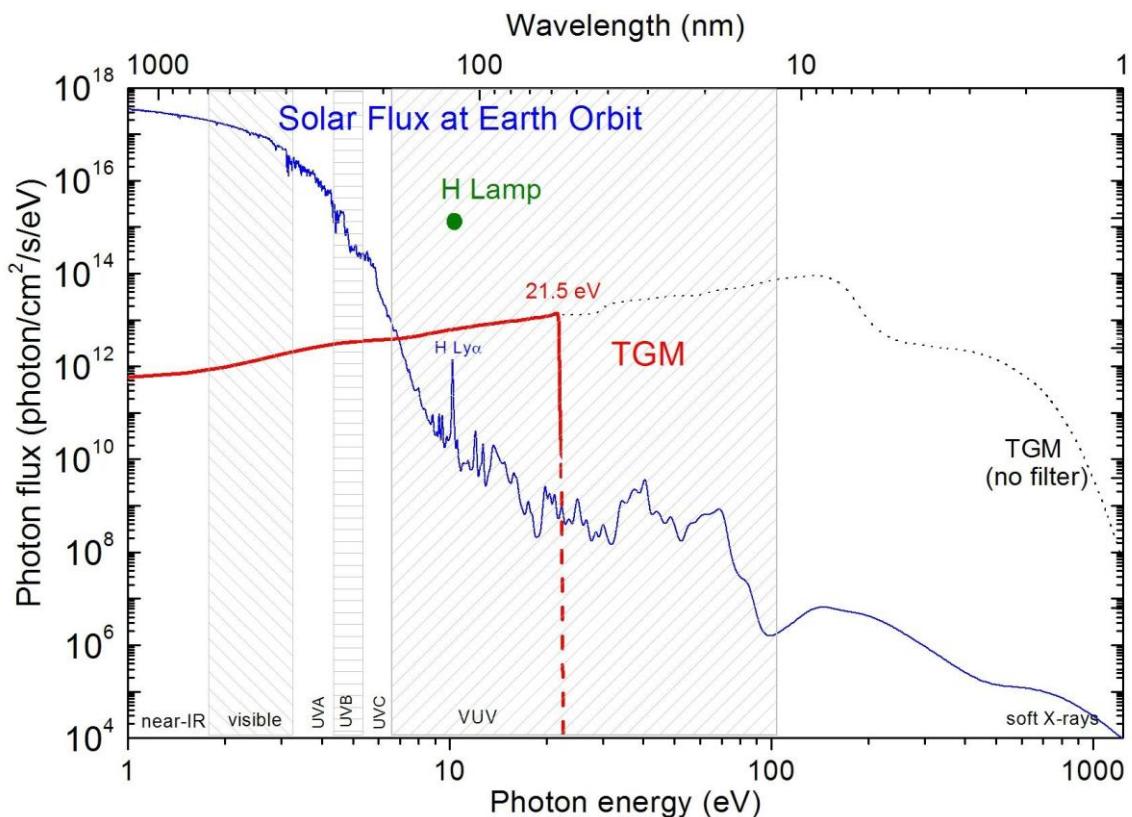


Figura 5. Espectro da linha de luz TGM com o filtro harmônico do gás neônio, atenuando o fluxo de fôtons com energia acima de 21,5eV. Para comparação, o ponto denominado “H Lamp” se refere ao fluxo de fôtons da radiação Lyman-alfa ($\lambda=121,6\text{nm}$) emitida pela lâmpada de hidrogênio, também utilizada neste estudo.

Para otimizar o tempo de uso da linha de luz, os experimentos foram planejados com o intuito de possibilitar um ensaio em triplicata em uma única rodada de irradiações, utilizando um manipulador rotatório para posicionar as amostras contra o feixe. As medidas de fluxo de fótons foram obtidas utilizando um fotodíodo e uma grade de ouro para checar variações na corrente elétrica (que reflete oscilações no fluxo de fótons) em tempo real. A pressão na câmara de irradiação foi mantida entre 10^{-4} e 10^{-5} Pa durante todos os experimentos de irradiação.

Curvas de sobrevivência foram obtidas através de 6 diferentes doses de irradiação síncrotron, além do controle não irradiado, conforme descrito na Tabela 5.

Tabela 5. Desenho experimental para irradiação ultravioleta de vácuo (UVV) de *D. radiodurans* com feixe branco ($\lambda > 57,47\text{nm}$) na linha de luz TGM do laboratório síncrotron LNLS.

Dose ($\text{kJ}\cdot\text{m}^{-2}$)*	Tempo de irradiação			Amostras
	(s)	(min)	(h)	
0	0	0	0	3
0,01	60	1	0,02	3
0,12	600	10	0,17	3
0,6	3000	50	0,83	3
1,2	6000	100	1,67	3
6,0	30000	500	8,33	3
12	60000	1000	16,67	3
TOTAL	99660	1173	19,55	21

Todos os ensaios de irradiação foram realizados à temperatura ambiente. As amostras foram recuperadas e analisadas conforme descrito nas seções 3.3 e 3.5. O desprendimento das células aderidas aos diferentes substratos após desidratação extrema resultou em uma perda da viabilidade entre 20% e 50% devido ao procedimento de liofilização e exposição ao vácuo. Essa perda foi incluída no cálculo da viabilidade dos controles (N_0). Portanto, para cada experimento de irradiação, N_0 representa a média de 3 replicatas após liofilização, exposição ao vácuo e desprendimento das células aderidas ao substrato. Os resultados foram plotados em gráficos mostrando curvas de sobrevivência.

3.6.6. Irradiação com simulador solar Oriel ($\lambda > 200\text{nm}$)

As amostras foram preparadas conforme descrito no item 3.7.1 e irradiadas utilizando o Simulador Solar Oriel Modelo 91192-1000 (Newport Inc.) em 3 situações distintas: (i) células em solução aquosa (NaCl 0,9% ou meio de cultura), (ii) células desidratadas com ou sem meio de cultura e (iii) células desidratadas na presença ou ausência de grãos de basalto ou arenito, misturados ou não com meio de cultura.

O Simulador Solar é composto por uma lâmpada de xenônio acoplada a um espelho elipsóide que direciona a radiação para o espelho plano primário, que por sua vez direciona a radiação para uma série de dispositivos óticos e filtros corretivos (Figura 6). A área retangular irradiada é superior a 100cm^2 e o feixe comprehende comprimentos de onda superiores a 200nm (Figura 7).

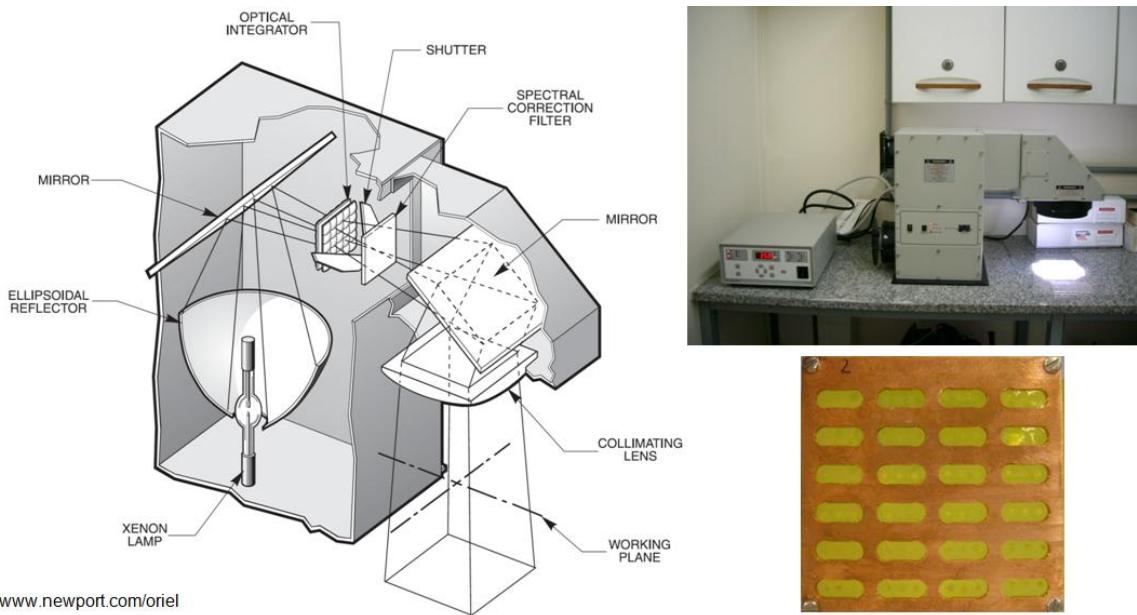


Figura 6. Esquema e foto do Simulador Solar Oriel modelo 91192-100 (Newport) e foto do porta amostra utilizado para as irradiações.

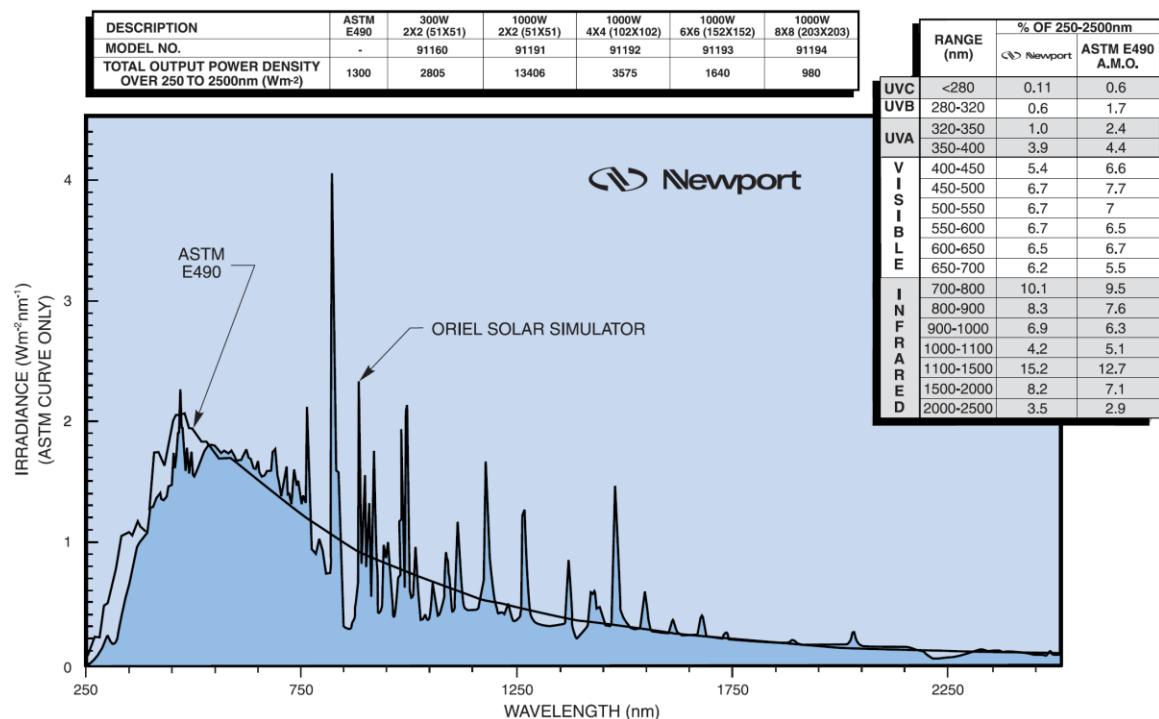


Figura 7. Espectro de emissão do Simulador Solar em comparação com o espectro solar na região da órbita da Terra (ASTM E490).

Para irradiação das células em solução aquosa, as amostras foram preparadas conforme descrito na seção 3.3. Após o período de incubação, uma parte da cultura foi centrifugada a 4 °C, 8000 rpm por 10 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o sedimento de células foi ressuspendido no mesmo volume de solução salina (NaCl 0,9%) através de agitação em vortex, modelo Gene-2 (Scientific Industries, NY - USA). Posteriormente, a suspensão de células foi submetida a nova centrifugação nas mesmas condições. O sedimento foi ressuspendido novamente no mesmo volume de solução salina e a suspensão de células foi colocada em uma placa de Petri de vidro previamente esterilizada. O restante da cultura foi depositado em outra placa de Petri correspondente às células misturadas com meio de cultura. Antes de iniciar a exposição das células às diferentes doses de irradiação, foi retirado um volume de 100 μ l de células de cada um dos experimentos para a diluição seriada e posterior inóculo em placas de Petri de plástico contendo TGY solidificado. As colônias crescidas nestas placas foram utilizadas como referência (controle) para o cálculo da porcentagem de sobrevivência irradiação das células em solução aquosa. As irradiações das células em solução aquosa foram realizadas conforme descrito na Tabela 6.

Tabela 6. Desenho experimental para irradiação das células em solução aquosa com o Simulador Solar Oriel.

Dose ($\text{kJ} \cdot \text{m}^{-2}$)			Tempo		Replicatas	Tempo final
UV-A	UV-B	UV-C	(s)	(min)		
0	0	0	0	0	3	0
7,5	1,2	0,06	15	0,25	3	15s
15	2,4	0,12	15	0,25	3	30s
22,5	3,6	0,18	15	0,25	3	45s
30	4,8	0,24	15	0,25	3	1min
37,5	6,0	0,30	15	0,25	3	1min15s
45	7,2	0,36	15	0,25	3	1min30s
52,5	8,4	0,42	15	0,25	3	1min45s
60	9,6	0,48	15	0,25	3	2min
67,5	10,8	0,54	15	0,25	3	2min15s
75	12,0	0,60	15	0,25	3	2min30s
TOTAL			150	2,50	33	7min30s

Para irradiação das células desidratadas com ou sem meio de cultura, as células foram preparadas conforme descrito na seção 3.3. Após o período de incubação, a cultura foi dividida em duas partes. Uma delas foi submetida ao procedimento de retirada do meio de cultura (centrifugação e ressuspensão em solução salina usando vortex) e a outra parte foi utilizada a fresco, ou seja, contendo meio de cultura. Após este preparo, volumes de $1\mu\text{l}$ dessa mistura foram distribuídos em espaços apropriados no porta amostra (item 3.7.2.), resultando em amostras contendo $\sim 10^5$ células misturadas ou não com meio de cultura. Todas

as amostras foram então desidratadas a temperatura ambiente por pelo menos 24 horas. As irradiações das células desidratadas foram realizadas conforme descrito na Tabela 7.

Tabela 7. Desenho experimental para irradiação das células desidratadas, misturadas ou não com meio de cultura, em presença ou ausência de grãos de arenito ou basalto.

Dose ($\text{kJ} \cdot \text{m}^{-2}$)			Tempo (s)		Replicatas	Tempo final
UV-A	UV-B	UV-C	(ad)	(final)		
0	0	0	0	0	3	0
7,5	1,2	0,06	15	15	3	15s
22,5	3,6	0,18	30	45	3	45s
45	7,2	0,36	45	90	3	1min30s
75	12,0	0,6	60	150	3	2min30s
225	36,0	1,8	300	450	3	7min30s
450	72,0	3,6	450	900	3	15min
750	120,0	6,0	600	1500	3	25min
TOTAL			1500	1500	24	25min

Para irradiação das células desidratadas na presença ou ausência de grãos de basalto ou arenito, misturados ou não com meio de cultura, as células foram preparadas conforme descrito na seção 3.3. Após o período de incubação, a cultura foi dividida em duas partes. Uma delas foi submetida ao procedimento de retirada do meio de cultura (centrifugação e ressuspensão em solução salina usando vortex) e a outra parte foi utilizada a fresco, ou seja, contendo meio de cultura. Após este preparo, células em presença ou ausência de meio de cultura foram misturadas com grãos de basalto (B) ou arenito (SST) com o intuito de se verificar a influência da composição elementar de dois tipos distintos de grãos na proteção

contra a radiação ultravioleta (item 3.7.1). Os grãos foram divididos em aliquotas de 1,25mg por tubo de microcentrifuga e autoclavados. Culturas em início da fase estacionária foram então misturadas com os grãos em volume suficiente para obter uma mistura com concentração final de grãos de 1,25%. Após homogenização, volumes de 1µl dessa mistura foram distribuídos em espaços apropriados no porta-amostras, resultando em amostras contendo $\sim 10^5$ células na presença ou ausência de grãos de basalto ou arenito, misturadas ou não com meio de cultura. Todas as amostras foram então desidratadas a temperatura ambiente por pelo menos 24 horas. As irradiações dessas amostras foram realizadas conforme descrito na tabela 2.

Após as etapas de irradiação, as células foram recuperadas e analisadas conforme descrito nas seções 3.3 e 3.5.

3.7. IRRADIAÇÃO IONIZANTE (RAIOS-X)

Células de *D. radiodurans* e *Chroococcidiopsis* sp. foram expostas ao feixe branco de raios-X ($\lambda > 0,04\text{nm}$) da linha luz B16 do Laboratório Síncrotron Diamond (Reino Unido). Os procedimentos foram realizados com o apoio da equipe técnica da Open University e do Diamond, e estão divididos conforme descrito a seguir:

3.7.1. Preparo das amostras

Células da cepa selvagem de *D. radiodurans* (wt) e da cianobactéria *Chroococcidiopsis* sp. isolada do deserto do Atacama (Chile) foram misturadas com grãos de basalto (B) ou arenito (SST) com o intuito de se verificar a influência da composição elementar de dois tipos distintos de grãos na proteção contra a radiação ionizante. Os grãos foram obtidos através da quebra e Trituração de 500g de rocha, seguido de seleção com peneiras de 90µm, 63µm e 38µm. Os grãos com dimensões inferiores a 38µm foram

selecionados e submetidos a uma nova etapa de Trituração em ultratriturador, resultando em um pó com muitos fragmentos amorfos nanométricos e alguns fragmentos micrométricos com dimensão média em torno de 10 μ m (Figura 8). Os grãos foram divididos em aliquotas de 1,25mg por tubo de microcentrifuga e autoclavados. Culturas em início da fase estacionária foram então misturadas com os grãos.

A composição química dos grãos foi determinada por fluorescência de raios-X (XRF), mostrando a presença de muitos elementos pesados nos grãos de basalto e 93,72% de SiO₂ nos grãos de arenito (Tabelas 8 e 9). A densidade celular das culturas foi determinada através de contagem de células ao microscópio óptico, sendo 2,84x10⁸ células.ml⁻¹ para *D. radiodurans* e 2x10⁷células.ml⁻¹ para *Chroococcidiopsis* sp. As células foram misturadas com os grãos num volume suficiente para obter uma mistura com concentração final de grãos de 1,25%. Após homogenização, volumes de 1 μ l dessa mistura foram distribuídos em espaços apropriados no porta-amostras (Figura 9), resultando em amostras contendo 10⁴-10⁵ células misturadas ou não com 12,5 μ g de grãos. Todas as amostras foram então desidratadas a temperatura ambiente por pelo menos 24 horas.

Tabela 8. Elementos-traço presentes nos grãos de basalto e arenito, e na mistura 1:1.

Elemento	Basalto	1:1 mix	Arenito
Rb	56	46	35
Sr	849	478	117
Y	28,8	15,6	3,7
Zr	308	179	55
Nb	69,4	34,8	1,1
Ba	568	558	494
Pb	8	7	10
Th	11	7	0
U	3	2	0
Sc	22	11	1
V	288	139	6
Cr	77	39	4
Co	29	14	1
Ni	31	15	3
Cu	53	29	2
Zn	78	40	3
Ga	20	11	4
Mo	3	1	1
As	0	0	0
S	4	99	180
TiO₂%	2,74	1,46	0,05
Fe₂O₃%	10,16	4,79	0,63

Tabela 9. Minerais presentes nos grãos de basalto e arenito, bem como na mistura 1:1.

Mineral	Basalto	1:1 mix	Arenito
SiO₂	47,24	71,06	93,72
TiO₂	2,96	1,54	0,05
Al₂O₃	16,51	10,21	3,88
Fe₂O₃	11,19	5,77	0,21
MnO	0,17	0,09	0,01
MgO	5,82	2,79	0,03
CaO	10,03	5,16	0,03
Na₂O	3,51	2,10	0,64
K₂O	2,23	2,01	1,77
P₂O₅	0,58	0,30	0,020

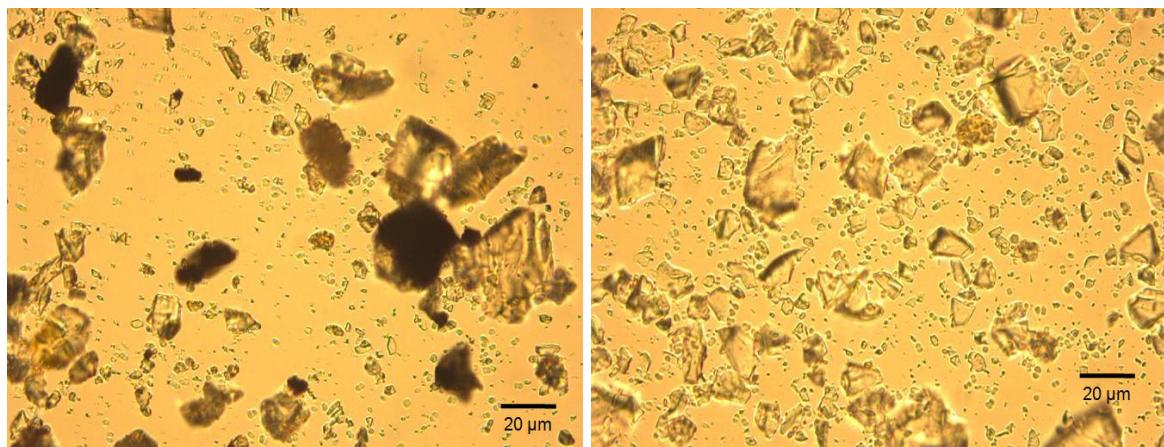


Figura 8. Micrografias ópticas de células de *D. radiodurans* misturadas com grãos de basalto (esquerda) e arenito (direita).

3.7.2. Porta amostras

Os procedimentos de irradiação na linha de luz B16 do Laboratório Síncrotron Diamond (Oxford, Reino Unido) demandaram novamente a construção de um porta-amostras específico, com o apoio da equipe técnica do Diamond e da Open University, com o intuito de adaptar a metodologia microbiológica às exigências técnicas do experimento. Para isso, foram utilizadas duas peças retangulares de cobre com dimensões de 55mm x 60mm x 1mm. Folhas de kapton foram montadas entre as 2 telas de cobre. As amostras foram então depositadas sobre a folha de kapton ($1\mu\text{l}/\text{amostra}$) em triplicata, conforme mostrado na figura 9. O conjunto foi mantido por 30 horas em dessecador e o material foi então transportado em ambiente hermeticamente fechado até a estação de trabalho da linha de luz B16.



Figura 9. Visão geral do porta amostras carregado com 72 amostras.

3.7.3. Planejamento experimental

Os experimentos foram divididos em 3 categorias:

- (i) Curvas de sobrevivência ao feixe branco de raios-X ($>1\text{keV}$), atenuado com diferentes filtros;
- (ii) Curvas de sobrevivência ao feixe monocromado (10keV) não atenuado;
- (iii) Resposta à taxa de dose para células livres desidratadas usando o feixe monocromado (10keV) atenuado 0,1 e 0,01x, aumentando os tempos de exposição em 10 e 100 vezes respectivamente para atingir a mesma fluência total.

3.7.4. Câmara de irradiação

Uma câmara de vácuo (12cm x 20cm x 30cm) composta por 4 janelas cilíndricas foi equipada com um porta amostra montado sobre um sistema de resfriamento com água corrente para evitar superaquecimento das amostras durante as irradiações. O sistema de resfriamento foi construído usando uma peça de cobre (1cm x 8cm x 3cm) com tubulações para circulação de água. A conexão com a aparelhagem externa foi feita através de tubos fixos acoplados à flange superior. Um sensor de temperatura foi colocado no porta amostra para monitorar eventuais alterações de temperatura durante as irradiações. Uma folha de kapton com $25\mu\text{m}$ de espessura foi utilizada na flange frontal para manter um vácuo de 200Pa dentro da câmara e ao mesmo tempo permitir a transmissão de praticamente 100% do feixe de raios-X diretamente para as amostras (Figuras 10 e 11).

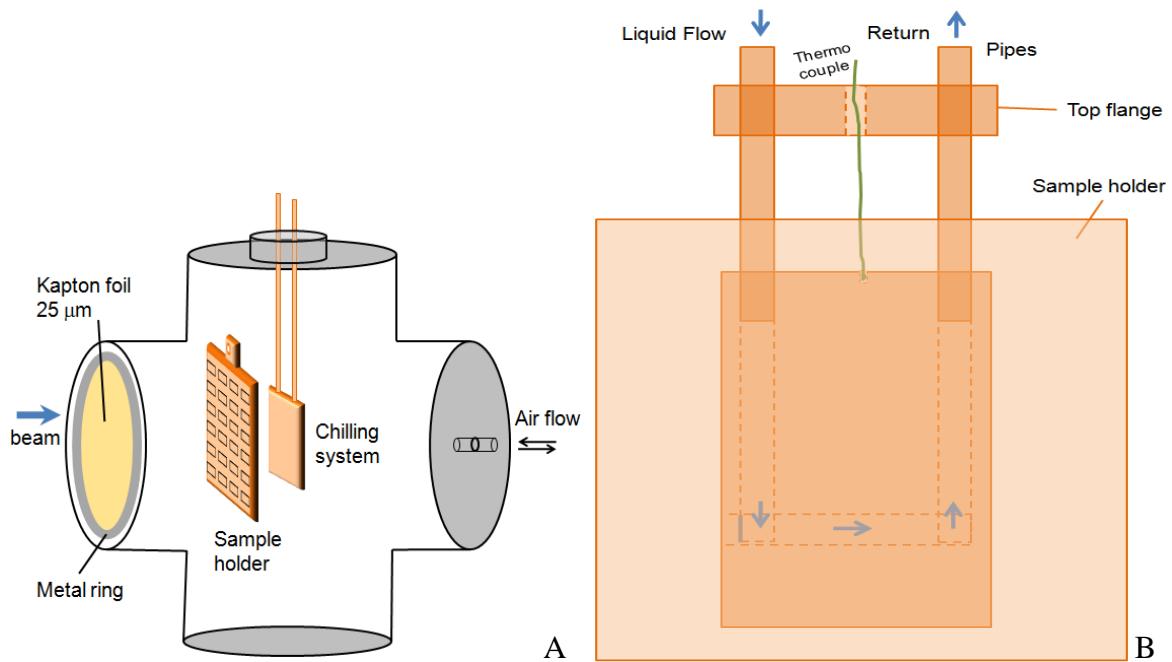


Figura 10. **A**, Esquema da câmara mostrando o anel de metal utilizado para prender a folha de kapton, a folha de kapton utilizada para vedar a câmara, o porta amostra e o sistema de resfriamento. O porta amostra foi montado sobre o sistema de resfriamento previamente afixado na flange superior. **B**, Detalhe do sistema de resfriamento mostrando as tubulações de entrada e saída de água.

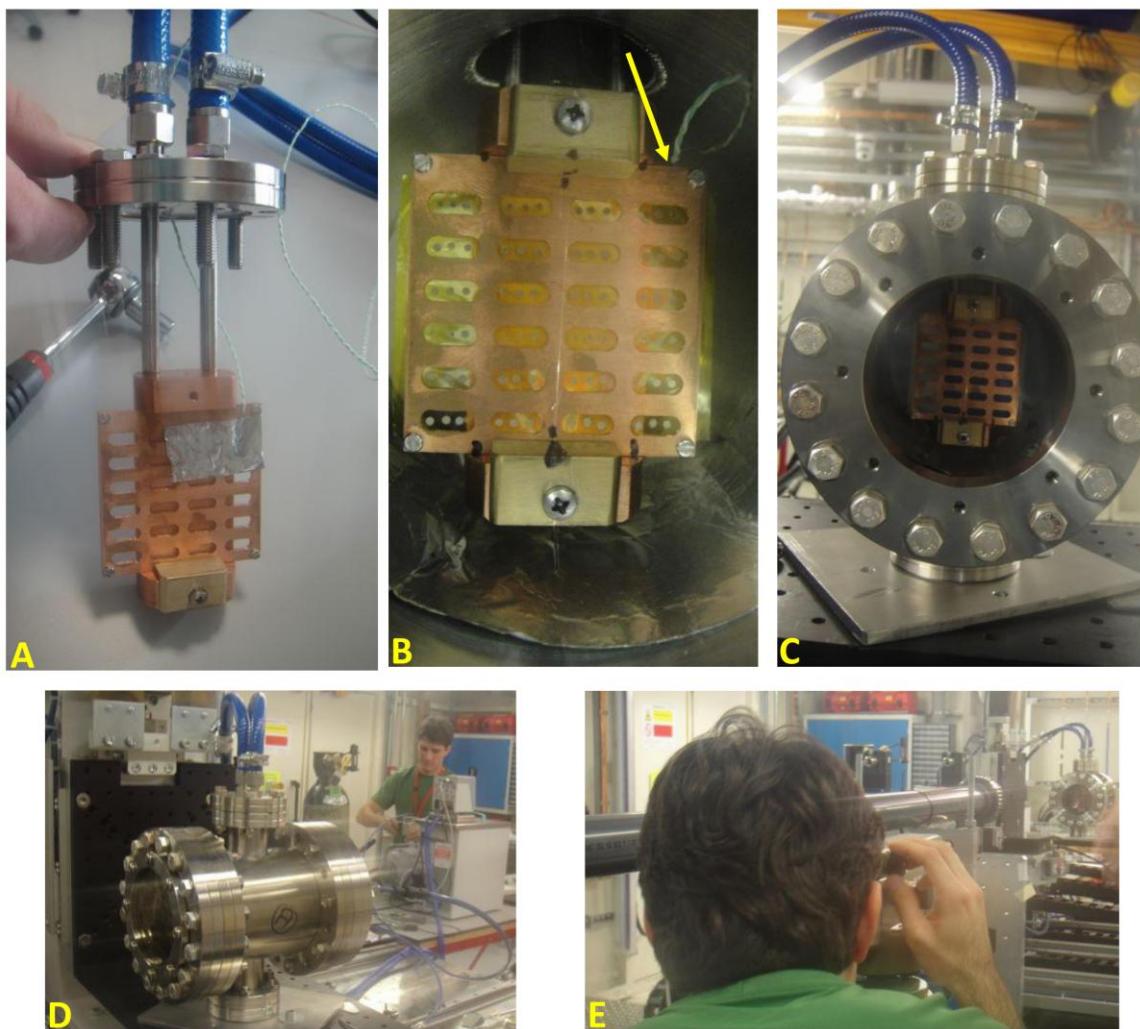


Figura 11. **A**, Montagem do porta amostra sobre o sistema de resfriamento com os tubos conectados às mangueiras com água corrente. **B**, Conjunto do porta amostra e sistema de resfriamento dentro da câmara de irradiação. A seta mostra o sensor de temperatura fixado sobre o porta amostra para monitorar a eventual variação de temperatura através de um multímetro digital. **C**, Câmara de irradiação posicionada sobre a plataforma. **D**, O sistema de resfriamento conectado à câmara manteve a temperatura a 20°C. **E**, Alinhamento do porta amostra com o uso de um altímetro a laser.

3.7.5. Irradiações

As amostras foram inicialmente expostas ao feixe branco de raios-X ($>1\text{keV}$) sem nenhuma atenuação, em pressão levemente positiva de gás nitrogênio, sendo observados resultados apenas para *Chroococcidiopsis* sp. após 2 meses de incubação. Numa segunda bateria de experimentos, os procedimentos de irradiação foram realizados apenas para *D. radiodurans*. Nesta segunda bateria de experimentos todas as amostras foram irradiadas em vácuo (200Pa).

O delineamento experimental para o segundo conjunto de experimentos está mostrado na Tabela 10. Foram utilizados 4 porta-amostras, sendo que as amostras carregadas no porta-amostra 1 e 2 foram expostas ao feixe durante os tempos de exposição 0s, 3s, 10s e 30s (total de 43s por experimento). As amostras carregadas no porta-amostra 3 foram irradiadas por 0s e 1s, 3s, 10s, 30s, 100s, 300s e 1000s (total de 24min 4s por experimento). Com o objetivo de verificar se diferentes taxas de dose de radiação levariam a diferentes taxas de sobrevivência, as amostras do porta-amostra 4 foram irradiadas utilizando feixe monocromado (10 keV) com três diferentes fluxos, alterando-se os tempos de exposição para atingir as mesmas doses finais: (i) sem atenuação, (ii) atenuado para 0,1x com folha de carbono de $100\mu\text{m}$ + folha de ouro de $10\mu\text{m}$ e (iii) atenuado para 0,01x usando folha de carbono de 1mm. Os tempos de exposição foram então aumentados em 1x, 10x e 100x respectivamente. Entretanto, as doses finais utilizadas nestes experimentos não foram suficientes para gerar valores significativos de inativação celular.

Os espectros do feixe branco atenuado com diferentes atenuadores ou filtros são apresentados na Figura 12.

Após as irradiações, as amostras foram recuperadas e submetidas aos procedimentos descritos nas seções 3.3 e 3.5.

Tabela 10. Desenho experimental para irradiação de *D. radiodurans* com feixe branco de raios-X da linha de luz B-16 do sincrotron Diamond, Reino Unido.

Experimento	Amostra	Atenuador	Porta-amostra
1	NC	2mm Al	1
2	B	2mm Al	1
3	SST	2mm Al	1
4	NC	50µm Mo	1
5	B	50µm Mo	1
6	SST	50µm Mo	1
7	NC	100µm C + 10µm Au	2
8	B	100µm C + 10µm Au	2
9	SST	100µm C + 10µm Au	2
10	NC	1mm C	2
11	B	1mm C	2
12	SST	1mm C	2
13	NC	-	3
14	B	-	3
15	SST	-	3
16	NC	-	4
17	NC	-	4
18	NC	-	4

NC, Células livres. B, Células misturadas com basalto. SST, Células misturadas com arenito.

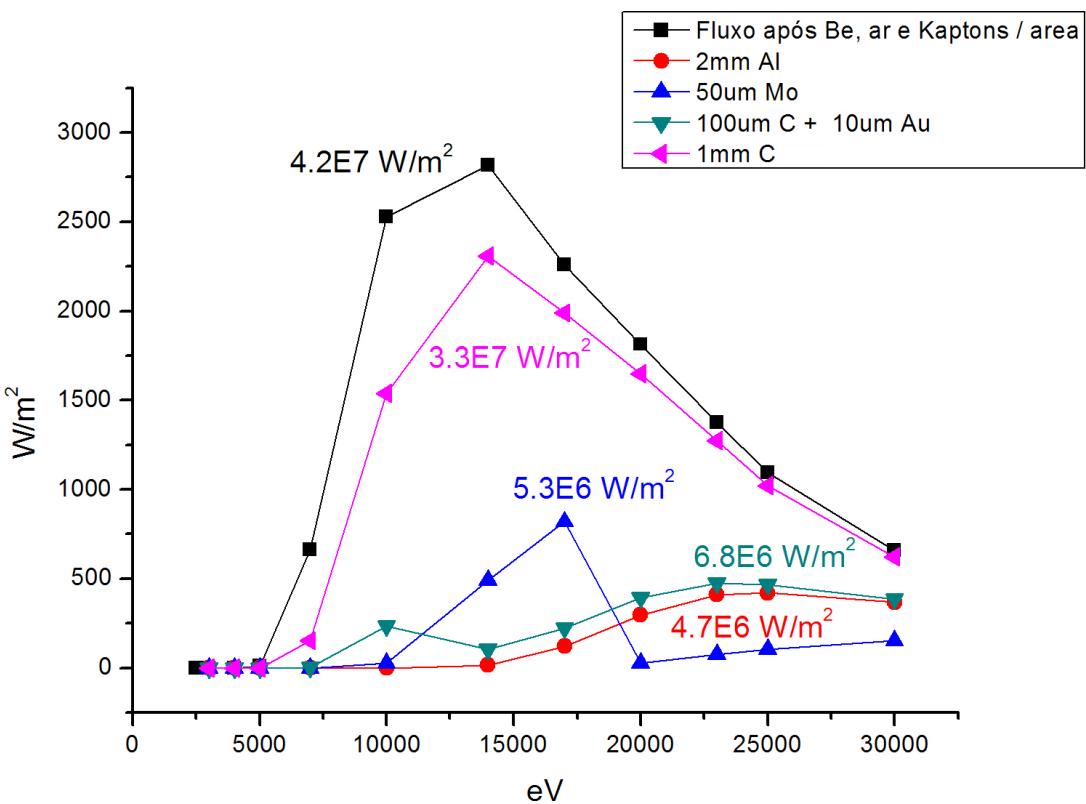


Figura 12. Espectros do feixe branco atenuado com folhas de alumínio, molibdênio, ouro e carbono. Note que a presença de uma fina folha de carbono junto com o ouro tem somente a função de proteger a folha de ouro contra a radiação intensa. As fluências integradas (W) estão mostradas por cm^2 .

3.8. IRRADIAÇÃO COM PARTÍCULAS CARREGADAS

As amostras foram preparadas conforme descrito no item 3.7.1, ou seja, contendo $12,5\mu\text{g}$ de grãos de basalto ou arenito e 2×10^5 células de *D. radiodurans* em cada amostra.

3.8.1. Elétrons

Os experimentos de irradiação com feixe de elétrons foram realizados utilizando as instalações do Laboratório de Física Molecular do Departamento de Física e Astronomia da Open University, Milton Keynes, Inglaterra, Reino Unido. Uma câmara de vácuo capaz de

manter um regime da ordem de 10^{-4} a 10^{-6} Pa foi acoplada a um canhão de elétrons da marca Kimball model ELG-2/EGPS-1022, capaz de emitir um feixe de elétrons de 2keV com fluxo e energia controlados. Após desidratação por pelo menos 15 horas em ambiente livre de contaminantes (fluxo laminar), as amostras depositadas sobre filtros Millipore foram coladas num porta amostra metálico utilizando uma fita dupla-face de carbono e o conjunto foi colocado dentro da câmara e posicionado contra o feixe utilizando um manipulador rotatório. O desenho experimental para os dois conjuntos experimentais é mostrado na Tabela 11. As irradiações foram feitas conforme descrito na Tabela 12.

Tabela 11. Desenho experimental para irradiação de microrganismos com feixe de elétrons de 2keV.

Experiment		Sample
1	NC	<i>Chroococcidiopsis</i> sp.
2	SST	<i>Chroococcidiopsis</i> sp.
3	B	<i>Chroococcidiopsis</i> sp.
4	NC	<i>Deinococcus radiodurans</i>
5	SST	<i>Deinococcus radiodurans</i>
6	B	<i>Deinococcus radiodurans</i>

Tabela 12. Detalhamento das irradiações com feixe de elétrons de 2keV.

Dose ($\times 10^{14}$ elétrons.cm $^{-2}$)	Tempo de exposição		Replicatas	Tempo final estimado
	(s)	(min)		
0 (Controle)	0	0	3	0
8,61	5	0,08	3	15s
25,82	15	0,25	3	45s
77,45	45	0,75	3	2min 15s
232,34	135	2,25	3	6min 45s
697,00	405	6,75	3	20min 15s
TOTAL	605	10,083	18	30min 15s

3.8.2. Prótons

Os experimentos de irradiação com feixe de prótons foram realizados nas instalações do Laboratório de Física Experimental do Observatório de Catania, Sicília, Itália. Uma câmara de vácuo capaz de manter um regime da ordem de 10^{-4} Pa foi acoplada a um sistema de geração de prótons com energia final de 200 keV. As amostras depositadas sobre filtros Millipore foram coladas num porta amostra metálico utilizando uma fita dupla-face de carbono e o conjunto foi colocado dentro da câmara e posicionado contra o feixe. As irradiações estão detalhadas nas Tabelas 13 a 15.

Tabela 13. Detalhamento das irradiações com feixe de prótons de 200keV em células de *D. radiodurans*.

Amostra	Carga (nC)	Prótons (cm ⁻²)	Prótons (amostra ⁻¹)	Prótons (célula ⁻¹)	Dose (Gy)*	Replicatas
NC	0**	0	0	0	0	3
NC	0,04	2,77x10 ⁸	4,33x10 ⁶	6,15	32,35	2
NC	0,44	2,77x10 ⁹	4,33x10 ⁷	61,46	323,52	3
NC	4,44	2,77x10 ¹⁰	4,33x10 ⁸	6,15x10 ²	3,24x10 ³	3
NC	44,40	2,77x10 ¹¹	4,33x10 ⁹	6,15x10 ³	3,24x10 ⁴	2
NC	4,44x10 ³	2,77x10 ¹²	4,33x10 ¹⁰	6,15x10 ⁴	3,24x10 ⁵	2
NC	4,44x10 ⁴	2,77x10 ¹³	4,33x10 ¹¹	6,15x10 ⁵	3,24x10 ⁶	2
NC	4,44x10 ⁵	2,77x10 ¹⁴	4,33x10 ¹²	6,15x10 ⁶	3,24x10 ⁷	2

* Calculada através do software SRIM 2010, assumindo densidade de 1,0g.cm⁻³, e composição elementar média do material biológico como sendo 50% de Carbono, 30% de Nitrogênio, 10% de Hidrogênio e 10% de Oxigênio.

** Controles internos, submetidos a todos os tratamentos exceto às irradiações. NC = células livres.

Tabela 14. Detalhamento das irradiações com feixe de prótons de 200keV em células de *D. radiodurans* misturadas com grãos de arenito.

Amostra	Carga (nC)	Prótons (cm ⁻²)	Prótons (amostra ⁻¹)	Prótons (célula ⁻¹)	Dose (Gy)*	Replicatas
SST	0	0	0	0	0	3
SST	22,20	1,39x10 ¹¹	2,17x10 ⁹	3,07x10 ³	1,38x10 ⁴	2
SST	4,44x10 ⁴	2,77x10 ¹³	4,33x10 ¹¹	6,15x10 ⁵	2,75x10 ⁶	2

* Calculada através do software SRIM 2010, assumindo densidade de 1,0g.cm⁻³, e composição elementar média do material biológico como sendo 50% de Carbono, 30% de Nitrogênio, 10% de Hidrogênio e 10% de Oxigênio.

** Controles internos, submetidos a todos os tratamentos exceto às irradiações. SST = células misturadas com grãos de arenito.

Tabela 15. Detalhamento das irradiações com feixe de prótons de 200keV em células de *D. radiodurans* misturadas com grãos de basalto.

Amostra	Carga (nC)	Prótons (cm ⁻²)	Prótons (amostra ⁻¹)	Prótons (célula ⁻¹)	Dose (Gy)*	Replicatas
B	0	0	0	0	0	3
B	22,20	$1,39 \times 10^{11}$	$2,17 \times 10^9$	$3,07 \times 10^3$	$1,38 \times 10^4$	2
B	$4,44 \times 10^4$	$2,77 \times 10^{13}$	$4,33 \times 10^{11}$	$6,15 \times 10^5$	$2,75 \times 10^6$	2

* Calculada através do software SRIM 2010, assumindo densidade de 1,0g.cm⁻³, e composição elementar média do material biológico como sendo 50% de Carbono, 30% de Nitrogênio, 10% de Hidrogênio e 10% de Oxigênio.

** Controles internos, submetidos a todos os tratamentos exceto às irradiações. B = células misturadas com grãos de basalto.

Num experimento piloto, amostras de *D. radiodurans* foram também depositadas sobre substratos análogos a poeira cósmica (CDAs). Forsterita amorfa (Mg_2SiO_4) e fayalita amorfa e cristalina (Fe_2SiO_4), foram testadas com o intuito de se verificar se existe alguma influência do tipo de substrato na inativação celular. Esses minerais são considerados bons análogos de poeira interestelar devido a sua estrutura, morfologia e composição molecular. Após as irradiações, as células de *D. radiodurans* foram recuperadas dos substratos e submetidas a diluição seriada e plaqueamento. As colônias foram contadas após um período máximo de 72 horas de incubação a 29°C. Os substratos contendo células de *Chroococcidiopsis* sp. foram imersos em meio de cultura BG-11 dividido em alíquotas de 2ml depositadas em placas de 12 poços. A incubação foi feita a temperatura ambiente sob ciclos naturais de iluminação artificial com luz fluorescente a 40cm de distância da fonte de luz.

3.8.3. Carbono

Os experimentos de irradiação com feixe de íons de carbono foram realizados utilizando as instalações do Laboratório de Física Experimental do Departamento de Física da Queens University Belfast, na Irlanda do Norte, Reino Unido. Foi utilizada uma câmara de vácuo (10^{-5} Pa) capaz de manter um sistema de geração de íons com energia final de 4keV. As amostras depositadas sobre filtros Millipore foram coladas num porta amostra metálico utilizando uma fita dupla-face de carbono e o conjunto foi colocado dentro da câmara e posicionado contra o feixe utilizando um porta amostra rotatório. Células livres ou misturadas com grãos de basalto ou arenito foram expostas em triplicata ao feixe de íons de acordo com a Tabela 16.

Tabela 16. Detalhamento das irradiações com íons de carbono de 4keV.

Dose ($\times 10^{13}$ íons.cm $^{-2}$)	Tempo de exposição (s)	Tempo de exposição (min)	Replicatas	Tempo final
0 (Controle)	0	0	3	0
3	45	0,75	3	9s
10	150	2,50	3	30s
33	500	8,33	3	1min 39s
100	1665	27,75	3	6min 45s
333	5545	92,42	3	7min 6s
TOTAL	7905	131,75	18	6h35min15s

3.9. EXPOSIÇÃO PROLONGADA DE *Deinococcus radiodurans* AO ALTO VÁCUO

As amostras foram preparadas conforme descrito no item IV.4 e expostas por 4 semanas em câmara de vácuo (10^{-5} Pa), sendo retiradas da câmara nos tempos 1, 4, 7, 21 e 28 dias. Paralelamente, amostras controles referentes a cada variação experimental foram mantidas pelo mesmo período de tempo em condições ambientais (temperatura ~22°C, pressão 10^5 Pa), sendo recuperadas as amostras correspondentes aos tratamentos nos mesmos intervalos de tempo. As amostras foram então analisadas conforme descrito nas seções 3.3. e 3.5.

3.10. ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS RESISTENTES ÀS CONDIÇÕES MARCIANAS

Foram utilizados dois parâmetros independentes para o isolamento de microrganismos resistentes: (i) a radiação UV-C incidente na superfície marciana e (ii) a composição atmosférica sob pressão marciana.

3.10.1. Radiação ultravioleta

As amostras de solo provenientes de 5 regiões diferentes do deserto do Atacama foram submetidas a diluição seriada em solução salina (NaCl 0,9%) e plaqueamento (Figura 13), para estimativa do número de microrganismos totais cultiváveis em 3 meios de cultura diferentes: LB, TGY e Marine Agar 2216 (Difco). Para isso, 1g de cada tipo de solo foi diluído em 10ml de solução salina contendo pérolas de vidro previamente autoclavadas e o material foi deixado em frascos de vidro do tipo Erlenmeyer de 250ml sob agitação de 100rpm por 3 horas à temperatura ambiente. Em seguida 5ml foram transferidos para placas de Petri de vidro, com posterior irradiação utilizando lâmpada germicida (UVC). Para o cálculo da dose irradiada, foi utilizada uma fotocélula do tipo CX-254 (Vilber Loumat). Os

valores medidos em $\text{mW}\cdot\text{cm}^{-2}$ foram convertidos para $\text{J}\cdot\text{m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ e os tratamentos foram feitos através de exposição do material em tempos equivalentes a uma dose de $300 \text{ J}\cdot\text{m}^{-2}$.



Figura 13. Etapas da pesquisa mostrando a localização geográfica do deserto do Atacama, no Chile, as amostras sendo coletadas no campo e uma ilustração sobre o procedimento experimental utilizado para determinar o número total de microrganismos cultiváveis antes e depois da irradiação UV (diluição seriada e plaqueamento em meio de cultura).

As colônias pigmentadas foram isoladas e inoculadas nos 3 diferentes tipos de meio de cultura. Em seguida, cada isolado pigmentado foi testado quanto a sua capacidade de proliferação nos meios de cultura líquidos correspondentes. Aqueles com capacidade de se proliferar nos meios líquidos foram submetidos a uma nova etapa de irradiação com lâmpada germicida UVC. Os isolados mais resistentes foram submetidos à identificação molecular através de amplificação parcial do gene 16S RNAr.

Paralelamente, as amostras de solo foram submetidas a extração de DNA e as seqüências de 16S RNAr foram amplificadas por PCR e separadas por Eletroforese em Gel com Gradiente de Desnaturação (DGGE), gerando padrões de bandas representativos da estrutura das comunidades microbianas.

3.10.2. Atmosfera marciana

Amostras do biofilme preto provenientes da região de La Portada, Chile (seção 3.4) foram divididas em aliquotas de 10mg e colocadas em tubos de microcentrífuga, em triplicata, sendo posteriormente colocadas em uma câmara de vácuo com controle de temperatura (-28°C) e de pressão (6 a 8 Pa), mantendo uma atmosfera interna composta de CO₂ (95,3%), N₂ (2,7%), Ar (1,7%), O₂ (0,2%) e H₂O (0,03%). As amostras foram retiradas destas condições após 1, 4, 7, 21 e 28 dias de exposição, e inoculadas em meios de cultura oligotrófico (Extrato de levedura 0,1% ou Tripton 0,1%).

4. RESULTADOS

Os resultados dos experimentos de irradiação foram agrupados de acordo com diferentes contextos astronômicos do ponto de vista da hipótese da Panspermia, ou seja, considerando as radiações presentes no espaço.

Primeiramente, são apresentados os efeitos das radiações não-ionizantes (ultravioleta) em modelos biológicos, utilizando seis diferentes fontes de radiação, em duas condições diferentes (presença ou ausência de material orgânico nas amostras). Além disso, em alguns experimentos foram avaliados também os efeitos da proteção conferida por dois tipos de grãos de poeira (arenito ou basalto) contra as radiações ultravioleta.

Em seguida são apresentados os efeitos de radiações ionizantes, tanto eletromagnéticas como partículas carregadas, em modelos biológicos associados ou não com os grãos de poeira (arenito ou basalto).

Por último, são apresentados os resultados do isolamento de microrganismos presentes em amostras de solo de diferentes regiões do deserto do Atacama, no Chile, utilizando separadamente, tanto a radiação ultravioleta como a atmosfera marciana.

4.1. EFEITOS DA RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA EXTRATERRESTRE

As células foram irradiadas em 4 condições diferentes: (i) células em soluções aquosas, (ii) células desidratadas, (iii) células desidratadas misturadas com material orgânico proveniente do meio de cultura, e (iv) células desidratadas misturadas com grãos de poeira (arenito ou basalto). Para uma melhor comparação dos efeitos da radiação ultravioleta extraterrestre sobre *Deinococcus radiodurans*, os resultados foram agrupados nessas quatro categorias. As barras de erro das curvas de sobrevivência representam desvios-padrão em relação à média de 3 experimentos distintos. Pontos sem barras representam uma única amostra analisada.

4.1.1. Células em soluções aquosas

Os experimentos de irradiação UV em solução aquosa foram realizados para verificar os efeitos produzidos em presença ou ausência de moléculas orgânicas do meio de cultura na sobrevivência das células hidratadas. Inicialmente foram feitos vários ensaios de inativação celular com o Simulador Solar Oriel utilizando diferentes filtros, de acordo com a Tabela 17. Os espectros após cada um dos filtros são diferentes, sendo que a diferença mais notável é em relação ao UV-C, cuja irradiância fica drasticamente reduzida com o uso de qualquer um dos filtros utilizados.

Tabela 17. Irradiação de *D. radiodurans* em solução salina com o Simulador Solar utilizando diferentes filtros, resultando em diferentes espectros.

Espectros	Filtro	Irradiância ($\text{J} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)			%		
		UV-A	UV-B	UV-C	UV-A	UV-B	UV-C
A	-	980,00	170,00	3,80	84,94	14,73	0,33
B	AM0+81051	624,10	81,00	0,01	88,51	11,49	0,00
C	AM0+81050	624,10	60,00	0,01	91,23	8,77	0,00
D	AM0+87066	380,00	10,40	0,01	97,33	2,66	0,00

Filtros: AM0, bloqueia o excesso de radiação infravermelha. 81051, bloqueia UV-C. 81050, bloqueia UV-B e UV-C. 87066, bloqueia radiação infravermelha e luz visível.

Conforme pode ser observado na Figura 14, os efeitos produzidos pelas radiações com espectros correspondentes ao uso de filtros, são bastante semelhantes, sendo que a inativação correspondente a radiação sem o uso de filtros é muito mais eficiente.

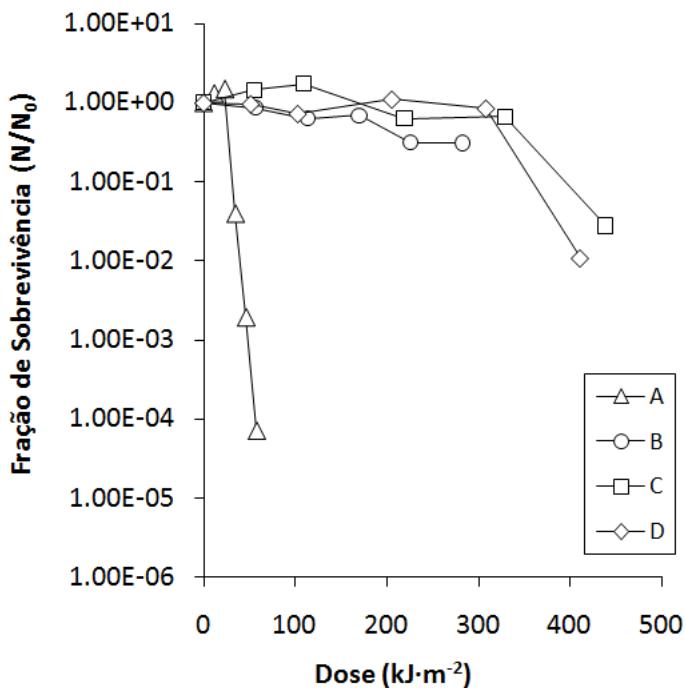


Figura 14. Comparação dos efeitos da irradiação UV ($\lambda > 200\text{nm}$) sobre *D. radiodurans* em solução salina (NaCl 0,9%) utilizando diferentes filtros, conforme descrito na Tabela 17.

Quando as irradiações sem filtro são feitas em células na presença de meio de cultura, que contém muitas moléculas orgânicas, o perfil de sobrevivência é maior (Figura 15). Curiosamente, se os mesmos valores de sobrevivência forem plotados em gráficos com doses referentes apenas à porção UV-C do espectro, o perfil de sobrevivência de *D. radiodurans* se torna muito semelhante à sobrevivência da linhagem AB1157 de *Escherichia coli* ao UV-C (Figura 16). Na Figura 16, os valores correspondentes às amostras irradiadas em solução salina estão marcados em branco enquanto que os correspondentes às amostras irradiadas em meio de cultura estão marcados em preto. Os valores referentes às células irradiadas com o simulador solar estão marcados com círculos pretos, e os referentes às células de *E. coli* estão marcadas com triângulos brancos. Células de *D. radiodurans* irradiadas em solução salina (NaCl 0,9%) com lâmpada de mercúrio ($\lambda = 254\text{nm}$) confirmaram seu perfil de alta resistência à radiação UV-C (BATTISTA, 1997).

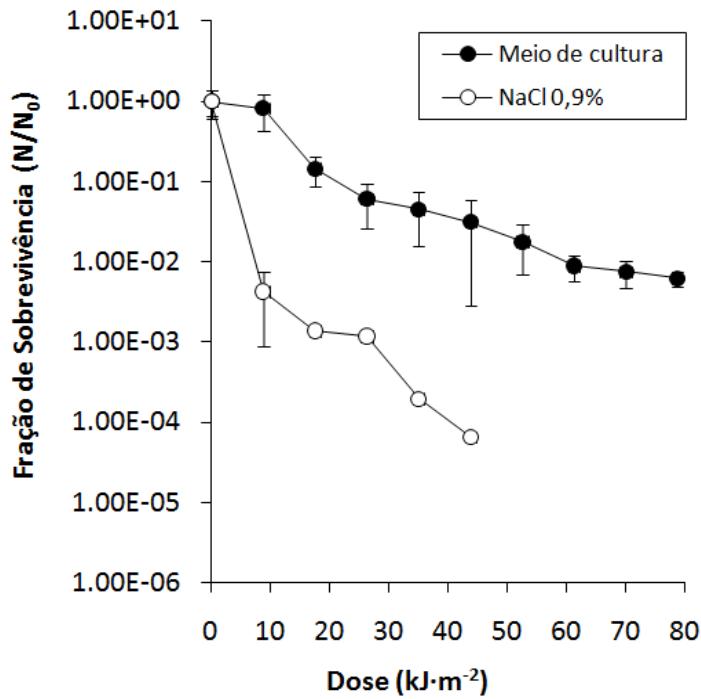


Figura 15. Comparação dos efeitos da irradiação com o simulador solar ($\lambda > 200\text{nm}$) sem filtro sobre *D. radiodurans* em solução salina (NaCl 0,9%) ou em meio de cultura.

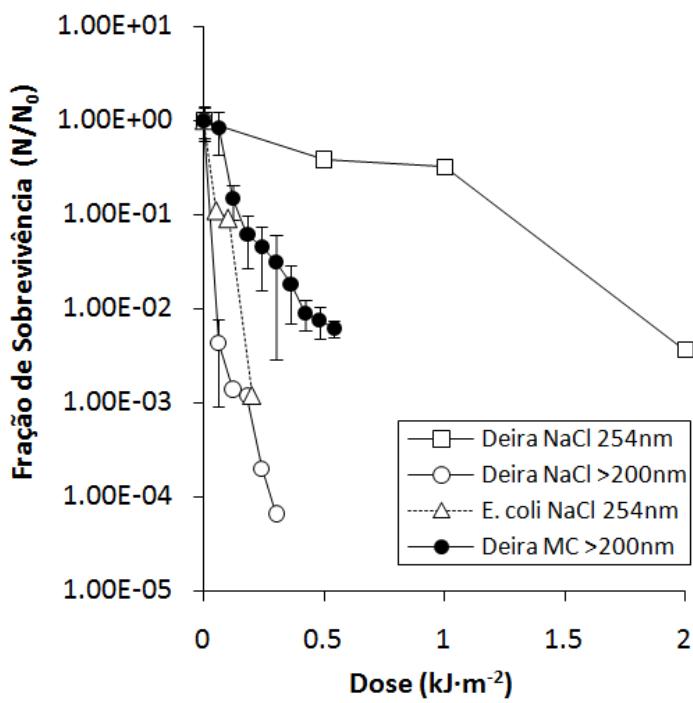


Figura 16. Comparação dos efeitos da irradiação com o simulador solar ($\lambda > 200\text{nm}$) e com a lâmpada de mercúrio ($\lambda = 254\text{nm}$), sobre *D. radiodurans* em solução salina (NaCl 0,9%) ou meio de cultura (MC), em comparação com células de *E. coli* irradiadas com lâmpada de mercúrio.

4.1.2. Células desidratadas

As amostras desidratadas foram preparadas depositando-se as células microbianas sobre dois tipos de substratos carbonáceos: (i) um substrato de policarbonato (filtro Millipore de porosidade 0,45 µm) com superfície lisa e um substrato de carbono (Shinto Paint Co.), com superfície rugosa (Figura 17). Com isso, foi possível verificar a influência do tipo de substrato na sobrevivência microbiana. Análises feitas ao microscópio eletrônico revelaram a formação de monocamada de células no filtro Millipore (Figura 17-A), empilhamento de células (Figura 17-B) e uma proteção adicional conferida pelo meio de cultura cristalizado após desidratação (Figura 17-C). Através de análises por perfilometria, verificou-se que a rugosidade preponderante da fita de carbono varia de 2 µm a 8 µm (Figura 17-D).

No filtro Millipore as amostras inevitavelmente se tornavam livres do material orgânico, pois o líquido contendo o material orgânico era drenado para a fita de carbono, sempre presente embaixo do filtro Millipore (Figura 17-A). Já as amostras depositadas sobre a fita de carbono acabavam acumulando meio de cultura (Figura 17-B). Após a desidratação havia a formação de uma matriz cristalizada de substâncias orgânicas que funcionavam como um escudo físico contra as radiações. As condições testadas na maioria dos experimentos correspondem à Figura 17-A (sem meio de cultura) e Figura 17-C (células misturadas com material orgânico). Uma condição análoga à ilustrada na Figura 17-B, ou seja, com uma etapa de remoção do meio de cultura antes da deposição das amostras em substrato não-poroso, foi testada apenas com o Simulador Solar Oriel, sendo que o substrato utilizado foi uma folha de kapton lisa com 15 µm de espessura.

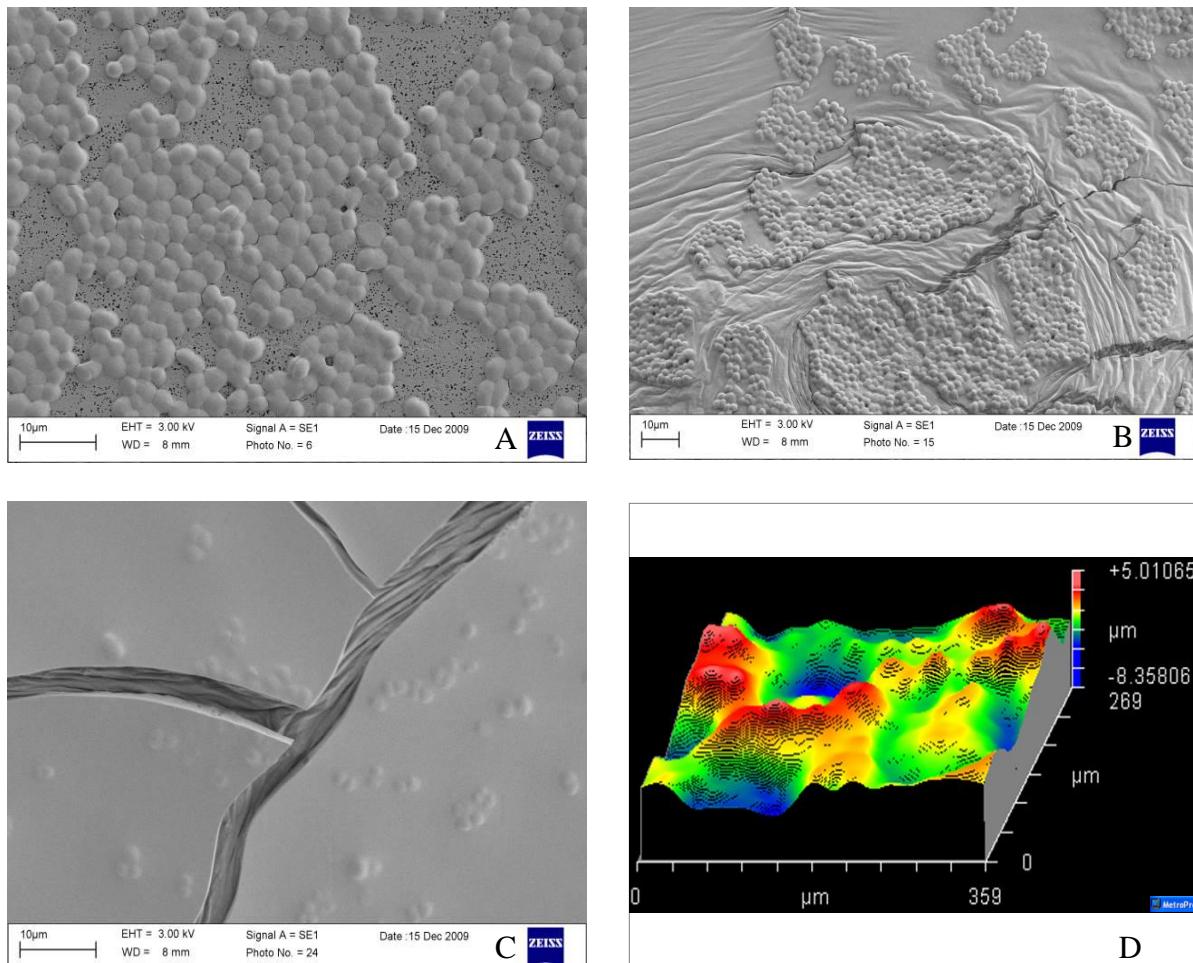


Figura 17. Amostras depositadas em 2 tipos de substratos, mostrando 3 situações distintas: **A**, monocamada de células formada sobre filtro Millipore. **B**, superfície da fita de carbono mostrando regiões de empilhamento de células. **C**, células embebidas na matriz formada através da cristalização do meio de cultura após desidratação. Uma análise computadorizada da superfície da fita de carbono é mostrada em **D**.

Conforme mostrado na Figura 17, a presença de material orgânico juntamente com as células depositadas na fita de carbono têm papel mais relevante na proteção celular do que o próprio relevo da superfície do substrato. Isso também é demonstrado pelas curvas de sobrevivência apresentadas a seguir. Deste modo, as amostras depositadas em Filtro Millipore foram denominadas simplesmente de “células desidratadas” e as amostras depositadas na fita de carbono foram denominadas “células desidratadas misturadas com material orgânico”. Os

pontos dos gráficos não estão ligados por linhas porque as análises são correspondentes a amostras distintas irradiadas com diferentes doses.

De acordo com a Figura 18, células desidratadas de *D. radiodurans* irradiadas com lâmpada de hidrogênio ($\lambda = 121$ nm) ou com o Simulador Solar ($\lambda > 200$ nm), apresentam perfis de inativação semelhantes.

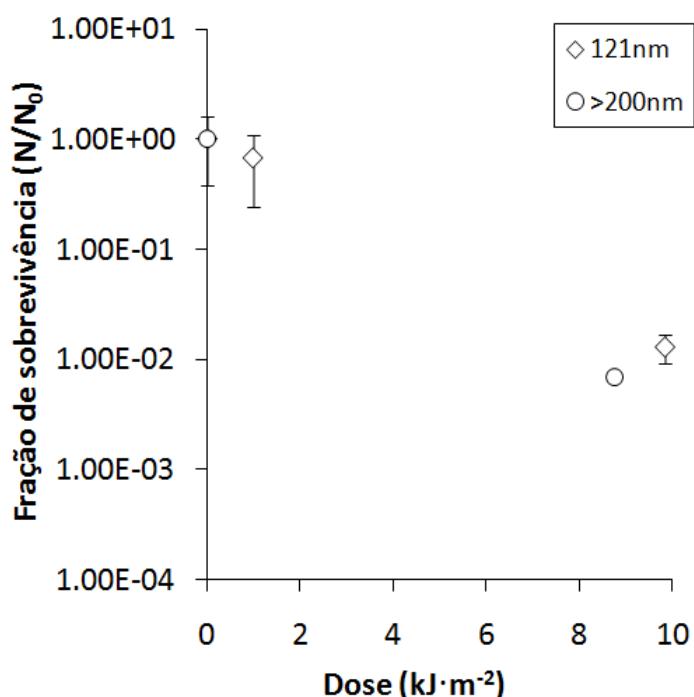


Figura 18. Comparação dos efeitos da irradiação com a lâmpada de hidrogênio ($\lambda = 121$ nm) e com o simulador solar ($\lambda > 200$ nm) sobre células desidratadas de *D. radiodurans*.

A sobrevivência de células de *D. radiodurans* irradiadas com lâmpada de xenônio ($\lambda = 145\text{nm}$), corresponde a valores superiores a 50% mesmo para as maiores doses testadas ($100 \text{ J}\cdot\text{m}^{-2}$) (Figura 19).

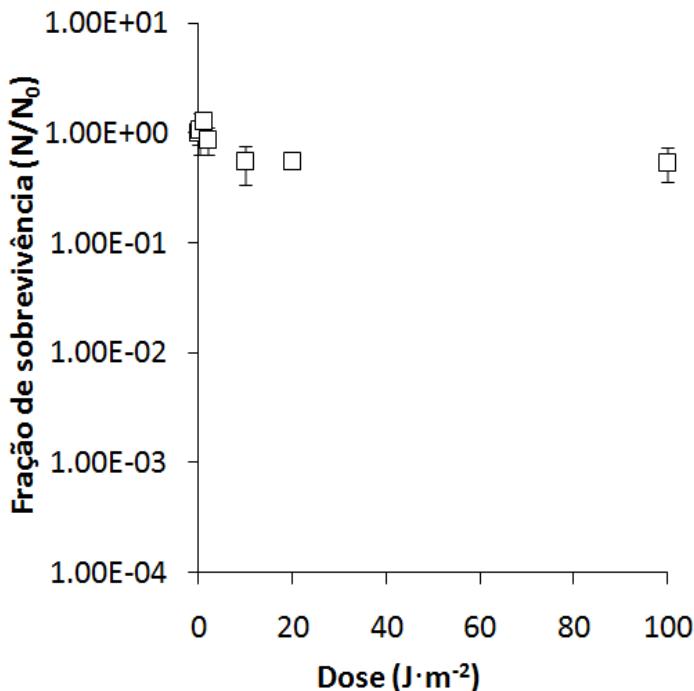


Figura 19. Efeitos da irradiação com a lâmpada de xenônio ($\lambda = 145$ nm) sobre células desidratadas de *D. radiodurans*. A barra de erro de um dos pontos é inferior ao tamanho da marca.

Comparando os efeitos da irradiação UV com feixe monocromático ($\lambda = 254$ nm) da linha de luz CD1 do Laboratório Síncrotron Astrid (Dinamarca) com os efeitos do feixe branco ($\lambda > 57,47$ nm) da linha de luz TGM do LNLS (Figura 20), é possível perceber que apesar da diferença na energia dos fótons, os perfis de inativação foram muito parecidos. A inativação com feixe monocromático ($\lambda = 254$ nm) em células desidratadas foi muito mais eficiente do que a irradiação com lâmpada de mercúrio com pico de emissão de 254 nm (Figura 16).

Comparando os efeitos das duas fontes de radiação UV de amplo espectro: o Simulador Solar Oriel ($\lambda > 200$ nm) e a linha de luz TGM ($\lambda > 57,47$ nm), é possível observar que a taxa de inativação provocada pelo feixe da linha de luz TGM foi muito maior do que a taxa de inativação provocada pelo simulador solar (Figura 21).

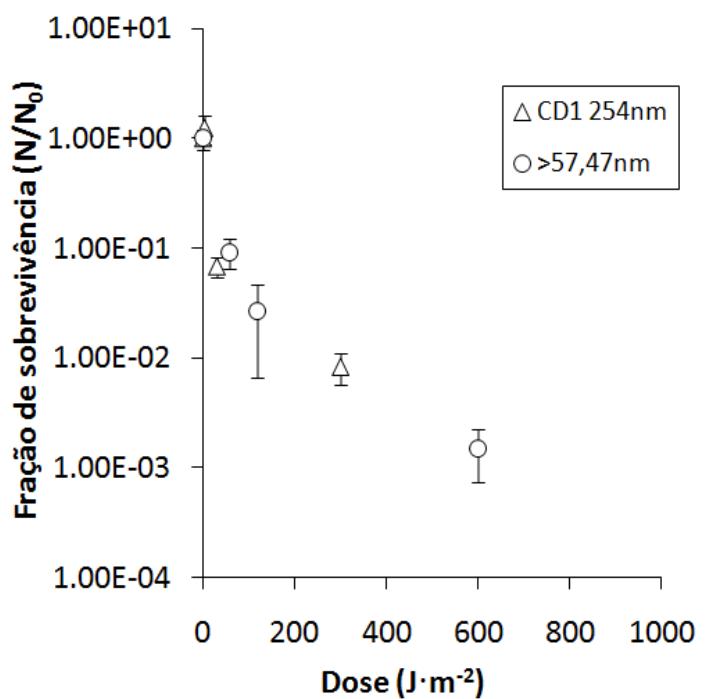


Figura 20. Comparação dos efeitos da irradiação na linha de luz CD1 do Laboratório Síncrotron Astrid ($\lambda = 254\text{nm}$) e na linha de luz TGM do LNLS ($\lambda > 57,47\text{ nm}$) sobre células desidratadas de *D. radiodurans*.

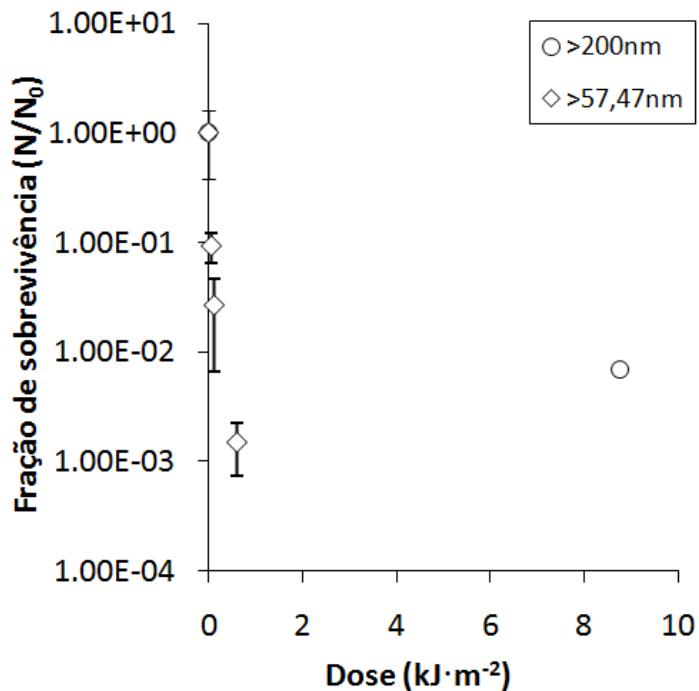


Figura 21. Comparação dos efeitos da irradiação com o Simulador Solar ($\lambda > 200\text{nm}$) e com a linha de luz TGM do LNLS ($\lambda > 57,47\text{nm}$) sobre células desidratadas de *D. radiodurans*.

4.1.3. Células desidratadas misturadas com material orgânico

Para verificar eventuais efeitos protetores conferidos por material orgânico nas células irradiadas com as diferentes fontes de radiação, as amostras foram desidratadas na presença de meio de cultura. Células de *D. radiodurans* desidratadas na presença de meio de cultura e irradiadas com o Simulador Solar ($\lambda > 200\text{nm}$) são inativadas muito mais eficientemente do que as células irradiadas com lâmpada de hidrogênio ($\lambda = 121\text{nm}$) (Figura 22). Entretanto, uma tendência assintótica é facilmente perceptível na curva correspondente à irradiação com lâmpada de hidrogênio ($\lambda = 121\text{nm}$), sendo que para as doses menores, o perfil de inativação é semelhante para as duas fontes de radiação.

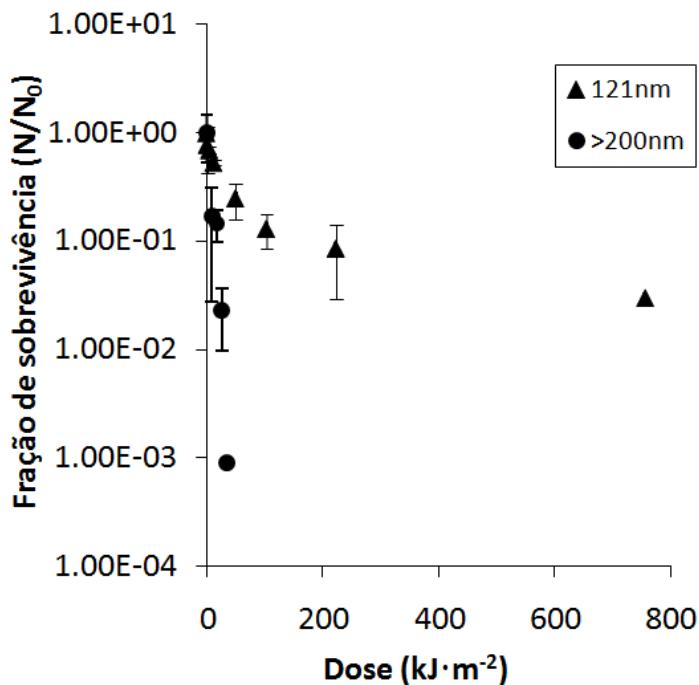


Figura 22. Comparação dos efeitos da irradiação com a lâmpada de hidrogênio ($\lambda = 121$ nm) e com o simulador solar ($\lambda > 200$ nm) sobre células desidratadas de *D. radiodurans*, na presença de meio de cultura.

Quando as células desidratadas e misturadas com o meio de cultura, são expostas ao feixe monocromático com fôtons de comprimento de onda 254 nm, a porcentagem de sobrevivência é superior a 20%, mesmo para a maior dose testada ($300 \text{ J}\cdot\text{m}^{-2}$) (Figura 23). As células irradiadas com lâmpada de xenônio ($\lambda = 145$ nm) apresentaram valores de sobrevivência que oscilaram em torno de 100% (Figura 23).

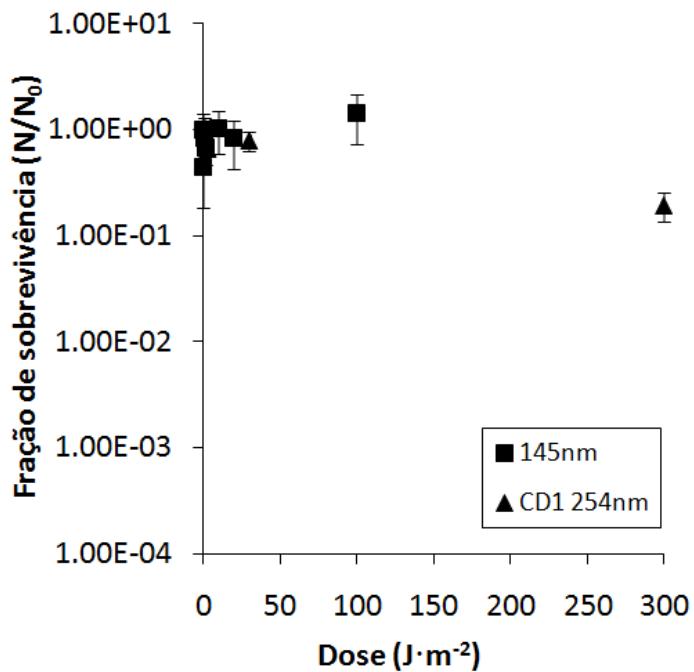


Figura 23. Comparação dos efeitos da irradiação com a lâmpada de xenônio ($\lambda = 145\text{nm}$) e com a linha de luz CD1 do Laboratório Síncrotron Astrid ($\lambda = 254\text{nm}$) sobre células desidratadas de *D. radiodurans*, na presença de meio de cultura.

A Figura 24 é análoga à Figura 21, ou seja, também é feita uma comparação dos efeitos das duas fontes de radiação UV de amplo espectro: o Simulador Solar Oriel ($\lambda > 200\text{nm}$) e a linha de luz TGM ($\lambda > 57,47\text{nm}$). Entretanto, para células desidratadas e misturadas com o material orgânico do meio de cultura, a inativação celular causada pela irradiação na linha de luz TGM é maior do que a inativação causada pela irradiação com o simulador solar apenas para as maiores doses testadas. Além disso, é possível observar uma tendência fortemente assintótica para a curva de sobrevivência resultante da irradiação na linha de luz TGM.

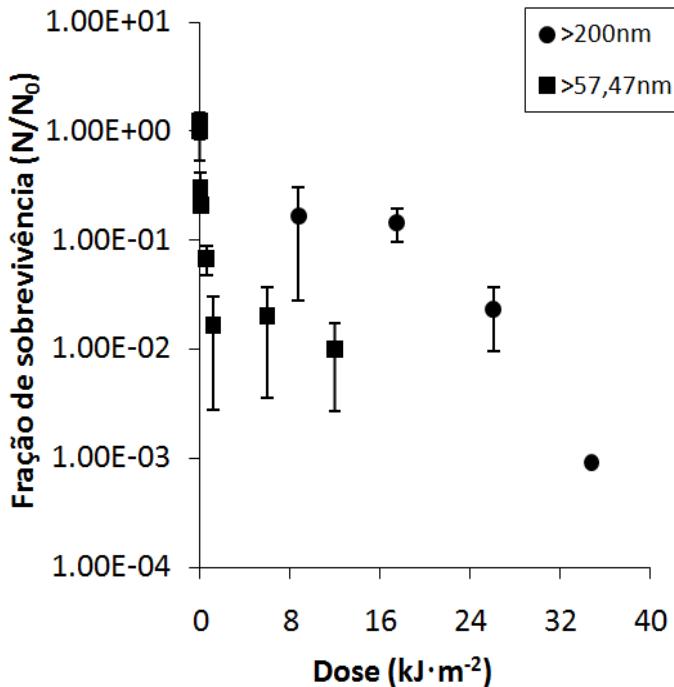


Figura 24. Comparação dos efeitos da irradiação com o Simulador Solar ($\lambda > 200$ nm) e na linha de luz TGM do LNLS ($\lambda > 57,47$ nm) sobre células desidratadas de *D. radiodurans*, na presença de meio de cultura.

Os efeitos conferidos pelo empilhamento de células nas amostras também foram verificados utilizando o feixe branco da linha de luz TGM ($\lambda > 57,47$ nm). Para isso, amostras contendo entre 10^4 e 10^7 células em uma área de 20mm^2 foram preparadas e irradiadas com uma dose fixa de $600 \text{ J}\cdot\text{m}^{-2}$. Foi observado um aumento na sobrevivência para as amostras contendo mais do que 10^6 células (Figura 25), mostrando que células inativadas na superfície da amostra são capazes de proteger as camadas inferiores contra o feixe branco ($\lambda > 57,47$ nm).

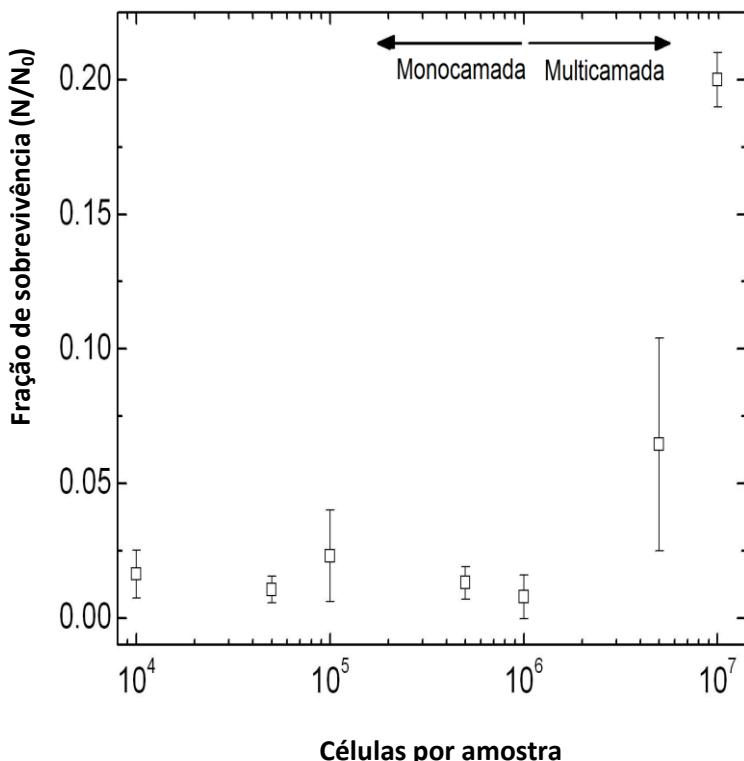


Figura 25. Influência da concentração de células na fração de sobrevivência a $600 \text{ J} \cdot \text{m}^{-2}$ de radiação UV na linha de luz TGM do LNLS ($\lambda > 57,47 \text{ nm}$). Amostras contendo 10^4 , 5×10^4 , 10^5 , 5×10^5 , 10^6 , 5×10^6 e 10^7 células foram irradiadas com a luz sincrotron. O empilhamento de células ($> 5 \times 10^6$ células / amostra) foi suficiente para aumentar a sobrevivência celular.

Os efeitos conferidos pela presença de material orgânico nas amostras também foram verificados para o mutante *recA* de *D. radiodurans*, deficiente na produção da proteína *recA*. Esta proteína está envolvida no reparo de quebra dupla no DNA sendo que o mutante defectivo na produção desta proteína é extremamente sensível a estresses como desidratação e radiação.

Para melhor comparação dos resultados, os experimentos foram agrupados de acordo com a fonte de radiação utilizada. Nos experimentos de irradiação com a lâmpada de xenônio ($\lambda = 145 \text{ nm}$), a sobrevivência celular foi praticamente 100%, mesmo para a maior dose testada ($300 \text{ J} \cdot \text{m}^{-2}$), independente da presença ou ausência de meio de cultura (Figura 26).

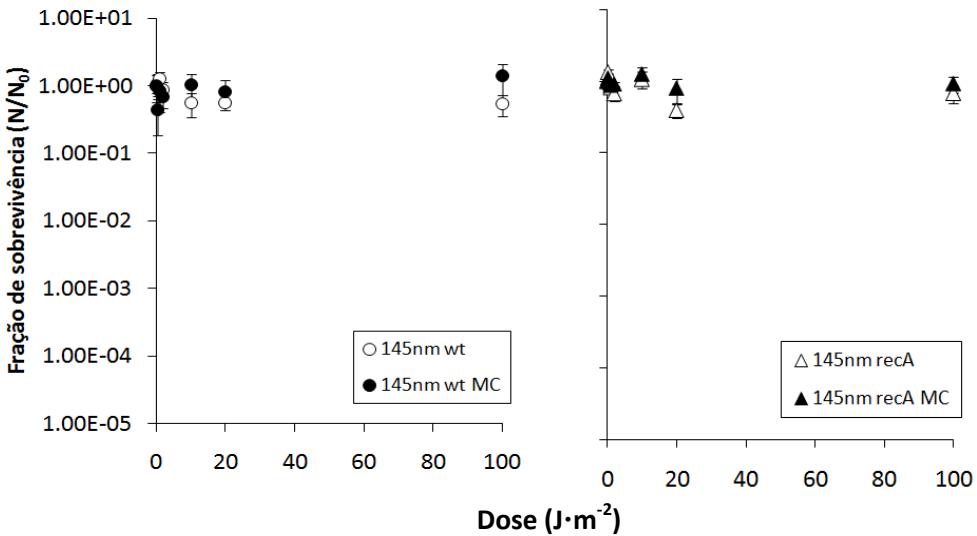


Figura 26. Efeitos da irradiação com lâmpada de xenônio ($\lambda = 145\text{nm}$) nas cepas selvagem (esquerda) e mutante *recA* (direita) de *D. radiodurans* na presença (MC) ou ausência de meio de cultura.

Na Figura 27 é possível observar um mesmo padrão de resultados tanto para a cepa selvagem (wt) como para a cepa mutante (*recA*). A presença de material orgânico contribui para uma melhor sobrevivência das células desidratadas.

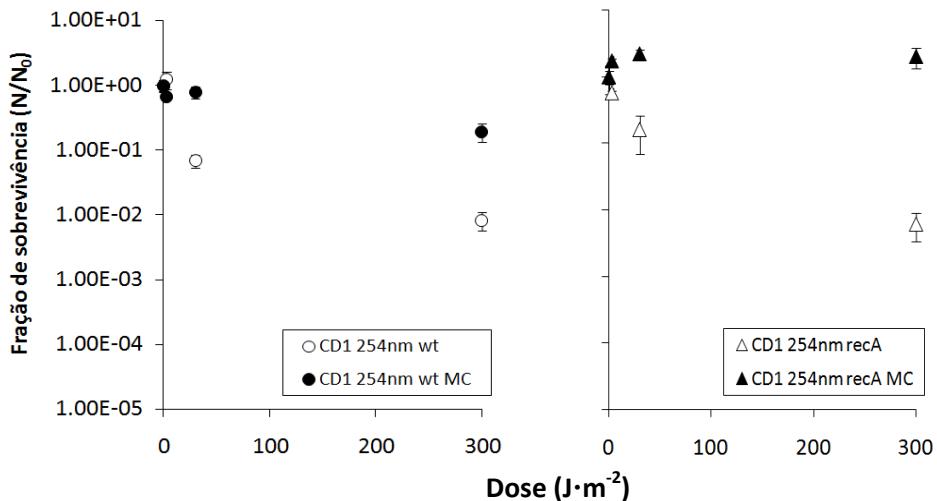


Figura 27. Efeitos da irradiação na linha de luz CD1 do Laboratório Síncrotron Astrid ($\lambda = 254$ nm) nas cepas selvagem (esquerda) e mutante *recA* (direita) de *D. radiodurans* na presença (MC) ou ausência de meio de cultura.

Uma comparação dos efeitos da irradiação na linha de luz TGM do LNLS ($\lambda > 57,47$ nm) entre as cepas selvagem e mutante *recA* de *D. radiodurans* é mostrada na Figura 28. É possível observar uma tendência assintótica em todas as curvas, sendo mais pronunciada nas curvas obtidas com amostras na presença de meio de cultura. O mutante *recA* na presença de material orgânico foi mais resistente à irradiação do que a cepa selvagem (wt) na ausência de moléculas orgânicas, demonstrando a influência desse tipo de material na sobrevivência celular.

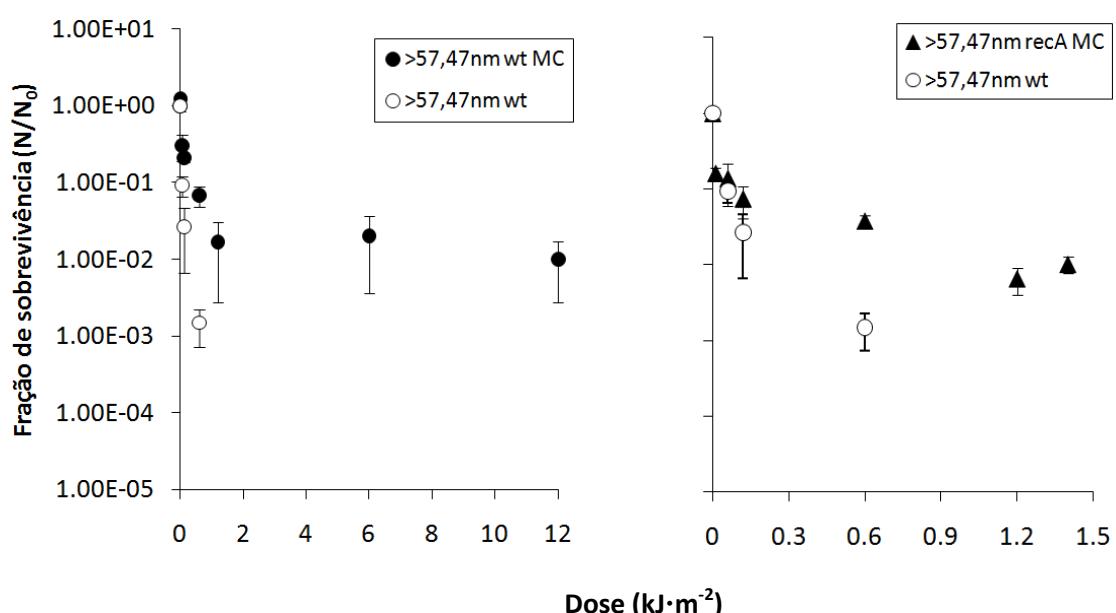


Figura 28. Efeitos da irradiação na linha de luz TGM do LNLS ($\lambda > 57,47$ nm) nas cepas selvagem (esquerda) e mutante *recA* (direita) de *D. radiodurans* na presença (MC) ou ausência de meio de cultura. No gráfico da direita, a curva de sobrevivência do mutante *recA* está comparada com a da cepa selvagem, uma vez que as amostras *recA* não resistiram aos procedimentos experimentais na ausência de material orgânico.

4.1.4. Células desidratadas misturadas com grãos de poeira (arenito ou basalto)

Os experimentos de irradiação UV em amostras da cepa selvagem de *D. radiodurans* misturadas com grãos de poeira foram feitos apenas com o Simulador Solar Oriel. As

condições da irradiação corresponderam ao espectro sem filtros (Tabela 17), com a lâmpada ajustada na sua potência máxima (1000 W).

Em relação às células livres, foi observado que as células irradiadas apenas na presença de material orgânico proveniente do meio de cultura, apresentaram um perfil de sobrevivência maior do que as amostras irradiadas na condição de células livres (Figura 29).

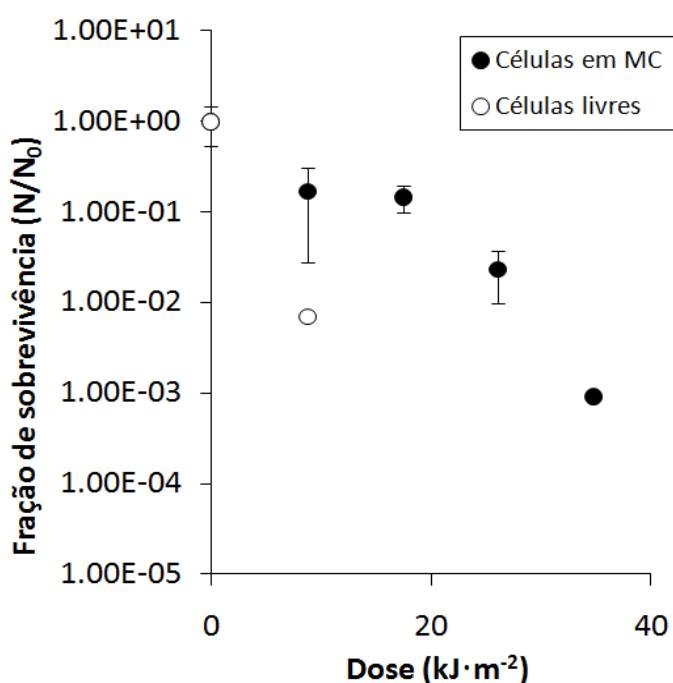


Figura 29. Influência da presença de material orgânico proveniente do meio de cultura na sobrevivência de células irradiadas com o simulador solar ($\lambda > 200 \text{ nm}$).

Células misturadas com grãos de arenito na presença ou ausência de material orgânico apresentaram perfis de inativação bastante semelhantes, com taxas de sobrevivência maiores do que as células livres, porém menores do que células misturadas apenas com meio de cultura. É possível observar ainda que, para as doses menores, as células são mais protegidas pelo material orgânico isoladamente do que pelo material orgânico misturado com grãos de

arenito na presença ou ausência de material orgânico. Já para as doses maiores a proteção conferida pelo material orgânico isoladamente apresenta uma queda acentuada (Figura 30).

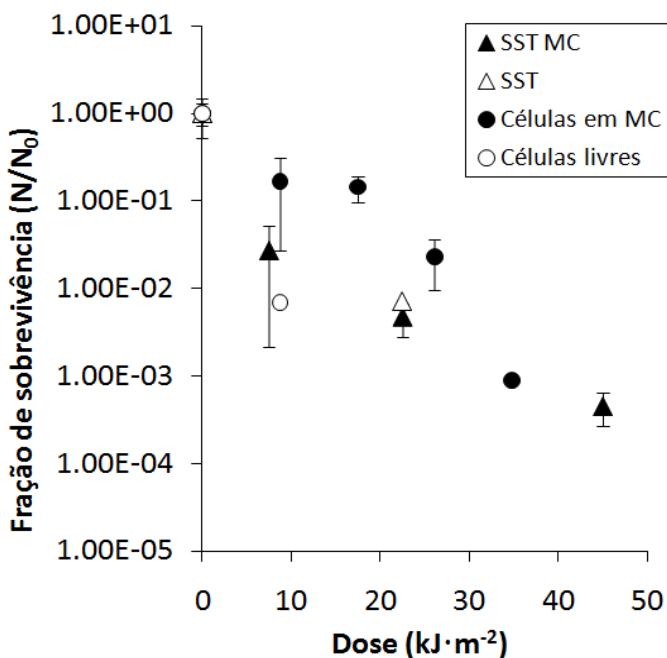


Figura 30. Influência da presença de grãos de arenito misturados (SST MC) ou não (SST) com material orgânico nas amostras irradiadas com o simulador solar ($\lambda > 200$ nm).

Células misturadas apenas com grãos de basalto (B) foram inativadas muito eficientemente, já que as taxas de sobrevivência foram reduzidas para valores inferiores a 10^{-5} (limite de detecção do método), mesmo nas doses mais baixas testadas (Figura 31). Já as células misturadas com grãos de basalto na presença de material orgânico (B + MC) apresentaram perfil de inativação semelhante às células misturadas apenas com material orgânico nas doses mais baixas testadas. Já para as doses maiores, a tendência assintótica da curva ficou evidente e a taxa de sobrevivência das amostras B+MC ficou estabilizada na faixa de 0,1%.

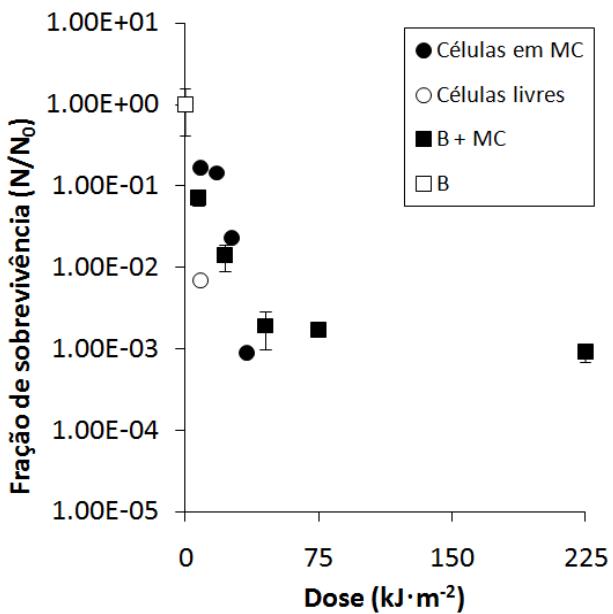


Figura 31. Influência da presença de grãos de basalto misturados (B + MC) ou não (B) com material orgânico nas amostras irradiadas com o simulador solar ($\lambda > 200$ nm).

4.1.5. Células de *Chroococcidiopsis* sp.

As medidas de inativação das amostras de *Chroococcidiopsis* sp. foram obtidas através da verificação do tempo de início de crescimento após as irradiações. De acordo com a Tabela 18, as células depositadas sobre o filtro Millipore apresentaram um perfil característico de inativação. Quanto maior a dose administrada, maior o tempo necessário para que a proliferação celular seja detectável, o que reflete um menor número de células viáveis remanescentes. Já as células depositadas sobre a fita de carbono não puderam ser recuperadas, nem mesmo dos controles não irradiados. Uma análise preliminar da composição química da fita de carbono revelou a presença de metais pesados, como ouro e cobre, que podem ter contribuído para a diminuição da viabilidade celular através de efeitos tóxicos letais para esta cianobactéria.

Tabela 18. Tempo mínimo necessário (dias) para detecção da proliferação celular ao microscópio da cianobactéria *Chroococcidiopsis* sp. após irradiações com doses crescentes de luz ultravioleta ($\lambda = 254$ nm) no laboratório síncrotron Astrid, Dinamarca. A incubação foi feita a temperatura ambiente (~22°C) utilizando ciclos naturais de presença e ausência de luz.

Amostras	Doses (J.m^{-2})						
	0 (control)	1	3	10	30	100	300
Filtro Millipore	26	26	26	27	28	38 ^a	46 ^a
Fita de carbono	*-	-	-	-	-	-	-

*- Nenhum crescimento observado.

^a Resultados observados em duas das três replicatas.

4.1.6. Comunidade microbiana epilítica

Em relação ao biofilme preto proveniente da região de La Portada, no Chile, infelizmente nenhum crescimento foi observado após todo o período de incubação, mesmo nos controles não-submetidos aos tratamentos. Vários testes de crescimento utilizando outros microrganismos fototróficos com o mesmo tipo de meio de cultura foram realizados. Provavelmente a quantidade de amostras utilizada (10mg), juntamente com as condições de transporte das amostras do Chile ao Reino Unido, podem ter contribuído para a obtenção dos resultados observados. Além disso, os microrganismos fototróficos observados ao microscópio podem ser representantes do grupo de microrganismos conhecidos como viáveis mas não cultiváveis, inviabilizando os experimentos que envolvem cultivo celular.

4.2. EFEITOS DE SURTOS DE RADIAÇÕES IONIZANTES

Os experimentos foram divididos em 3 categorias: (i) sobrevivência ao feixe branco de raios-X ($\lambda > 0.04$ nm) atenuado com diferentes filtros, (ii) sobrevivência ao feixe monocromático (10 keV), e (iii) resposta a taxa de dose para células desidratadas. As células misturadas apenas com meio de cultura foram denominadas “NC”, células misturadas com

meio de cultura e com grãos de arenito foram denominadas “SST” e as células misturadas com meio de cultura e com grãos de basalto foram denominadas simplesmente de “B”. As barras de erro das curvas de sobrevivência representam desvios-padrão em relação à média de 3 experimentos distintos. Pontos sem barras representam uma única amostra analisada.

4.2.1. Recuperação celular dos controles

Os controles obtidos após a desidratação foram recuperados e analisados da mesma maneira que as amostras expostas aos tratamentos. Estes controles foram denominados controles externos. Já os controles submetidos a todos os procedimentos exceto as irradiações foram denominados controles internos (Tabela 19 e Figura 32), sendo então usados como referência para as estimativas das taxas de sobrevivência.

Tabela 19. Viabilidade dos controles externos e internos. Os valores de desvio-padrão (DP) representam 24 replicatas para as amostras denominadas células livres e 15 replicatas para as amostras correspondentes as células misturadas com grãos de basalto ou arenito.

Amostras	Controles externos			Controles internos		
	^a UFC.ml ⁻¹	^b Viabilidade (%)	DP	UFC.ml ⁻¹	^c Viabilidade (%)	DP
NC	$1,64 \times 10^8$	58	0,11	$3,9 \times 10^7$	24	0,09
SST	$1,12 \times 10^8$	39	0,27	$5,6 \times 10^7$	50	0,30
B	$1,12 \times 10^8$	39	0,27	$6,9 \times 10^7$	62	0,32

a – Unidades formadoras de colônias

b – Comparado com a contagem de células ao microscópio ($2,84 \times 10^8$ CFU.ml⁻¹).

c – Comparado com os controles externos.

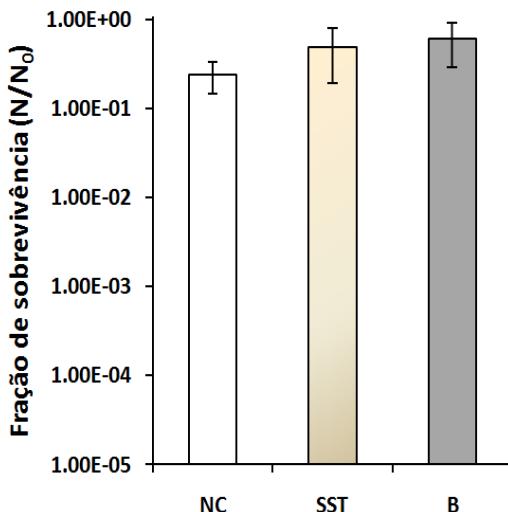


Figura 32. Sobrevida das células misturadas com os 3 tipos de grãos. Os dados foram obtidos dividindo-se os valores de recuperação dos controles externos pelos valores de recuperação dos controles internos.

Os controles internos foram expostos a todos os procedimentos exceto as irradiações, enquanto que os controles externos foram obtidos logo após a mistura das células com os grãos. As barras de erro representam os desvios-padrão de 24 replicatas para células livres e 15 replicatas para células misturadas com grãos de basalto ou arenito.

4.2.2. Sobrevida ao feixe branco de raios-X (> 1 keV)

As curvas de sobrevida foram obtidas apenas com os feixes mais atenuados, correspondentes ao uso de folha de: (i) 2 mm de alumínio, (ii) 50 μ m de molibdênio, e (iii) 100 μ m de carbono + 10 μ m de ouro (Figura 33). As taxas de sobrevida dos experimentos utilizando atenuação fraca, ou seja, os feixes com mais intensidade, correspondentes ao uso de folha de carbono de 1 mm, foram abaixo do limite de detecção do método microbiológico utilizado ($< 10^{-5}$), não sendo possível gerar curvas de sobrevida que pudessem ser plotadas em gráfico.

Todas as curvas de sobrevida apresentaram o mesmo padrão geral. Células misturadas com grãos de basalto são inativadas mais eficientemente do que células misturadas

com grãos de arenito ou células livres. Este fenômeno é claramente demonstrado pela curva de sobrevivência à irradiação correspondente ao espectro após 2 mm de alumínio, cujo feixe utilizado foi o mais atenuado (menos intenso).

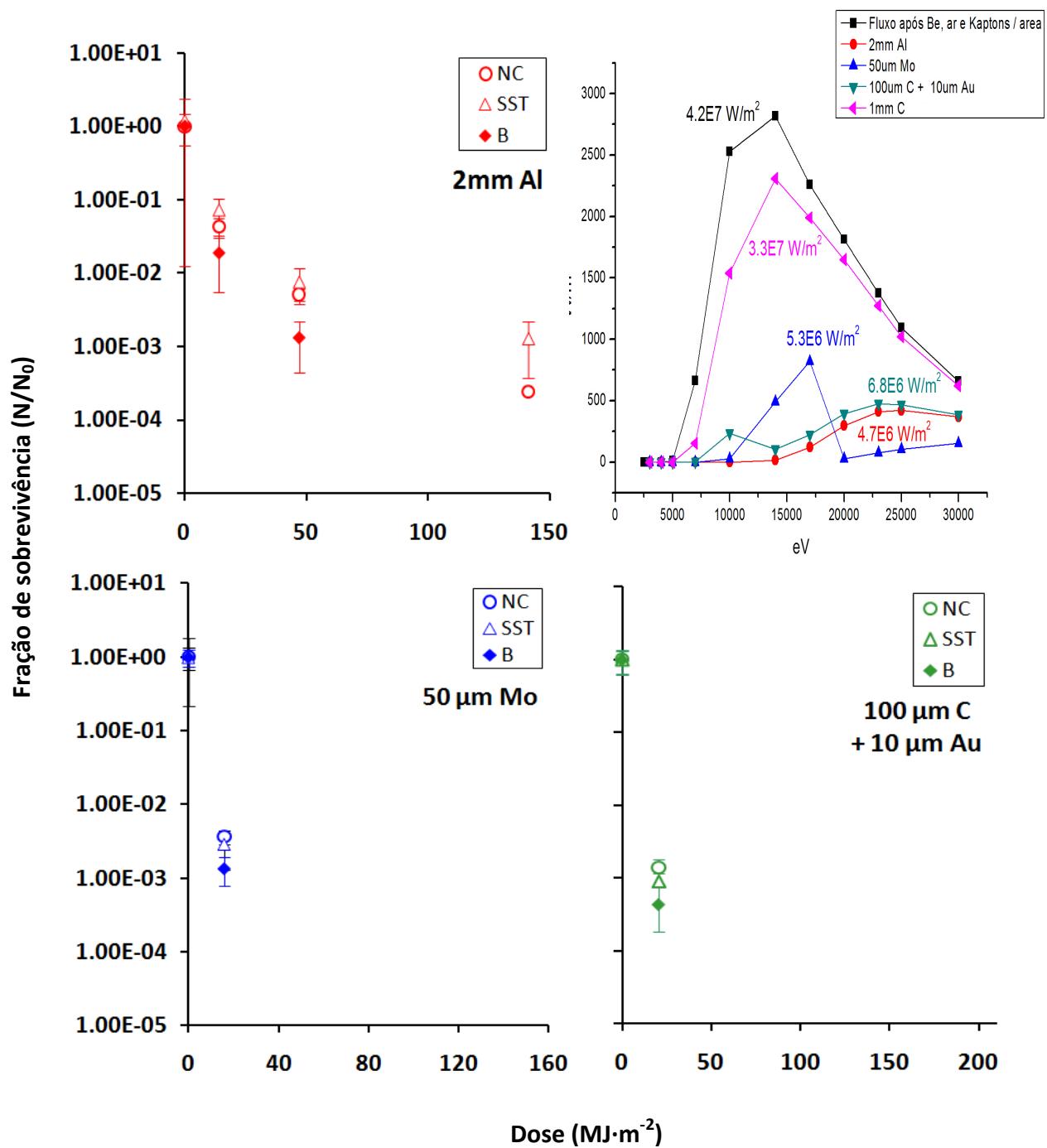


Figura 33. Curvas de sobrevivência de *D. radiodurans*, misturadas ou não com grãos de basalto ou arenito, ao feixe branco de raios-X (> 1 keV) atenuado com os seguintes atenuadores e filtros: 2 mm de alumínio, 50 μm de molibdênio e 100 μm de carbono + 10 μm de ouro. O valor mínimo do eixo vertical representa o máximo valor de inativação detectável pelo método utilizado (10^{-5}). O gráfico superior à direita mostra as fluências utilizadas.

4.2.3. Curvas de sobrevivência para feixe monocromático de raios-X (10 keV)

Curvas de sobrevivência foram obtidas para todos os tipos de amostras, sendo observado o mesmo padrão de inativação celular: células misturadas com grãos de basalto são inativadas mais rapidamente do que células misturadas com arenito ou células livres (Figura 34). Novamente todas as curvas de sobrevivência parecem apresentar uma tendência assintótica. Os pontos iniciais de cada curva estão aglutinados devido à baixa taxa de inativação para fluências pequenas.

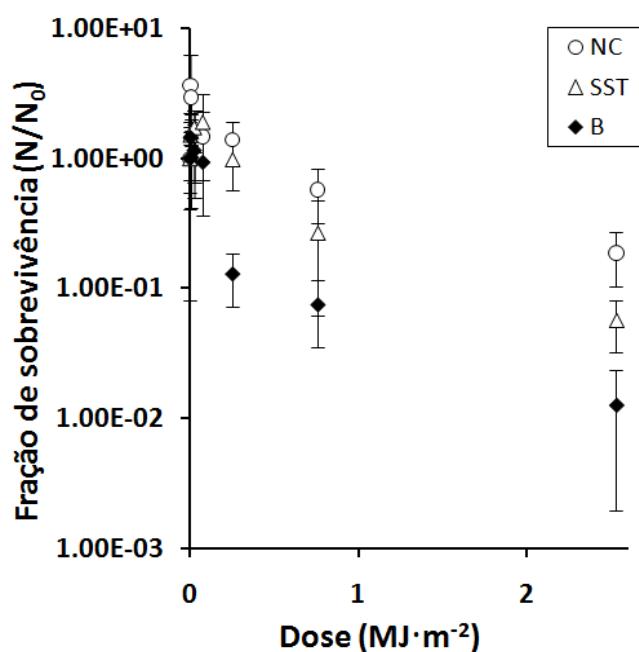


Figura 34. Curvas de sobrevivência de *D. radiodurans*, na presença ou ausência de grãos de basalto ou arenito, ao feixe de 10keV, com irradiância de $2,53 \times 10^3 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$.

4.2.4. Resposta a taxa de dose

Numa tentativa de verificar se há diferenças nas respostas à taxa de dose para as células desidratadas, foram realizados experimentos com o feixe monocromático (10 keV) com 3 diferentes fluxos, aumentando-se o tempo de exposição proporcionalmente para a se atingir as mesmas fluências totais: (i) sem atenuação, (ii) atenuado 0,1x com folha de carbono de 100 µm + folha de ouro 10 µm, e (iii) atenuado 0,01x com folha de carbono de 1 mm. Os

tempos de exposição foram aumentados 1x, 10x e 100x respectivamente. Entretanto, as fluências utilizadas não foram suficientes para observar qualquer diferença na taxa de inativação. Estes resultados estão ilustrados na Figura 35.

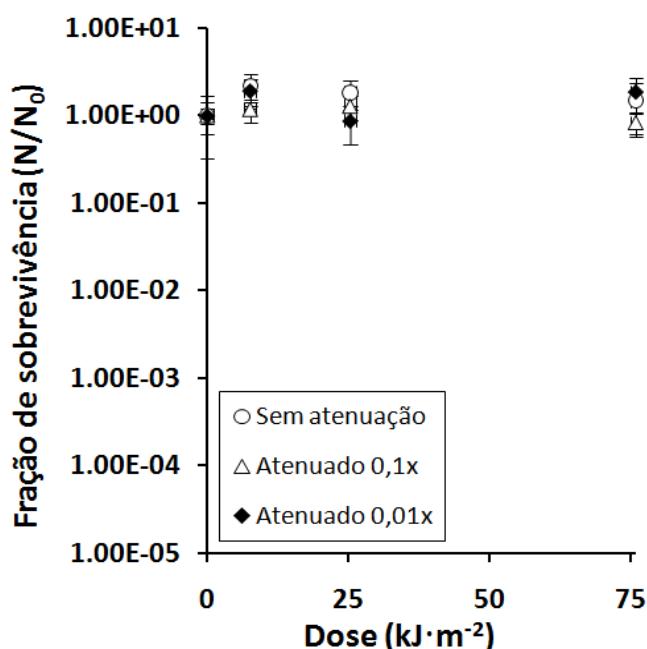


Figura 35. Curvas de sobrevivência de células livres de *D. radiodurans*, ao feixe monocromado de raios-X (10 keV), atenuado com diferentes atenuadores e filtros para atingir as mesmas doses após diferentes tempos de exposição. Os valores no eixo horizontal (abscissa) correspondem aos experimentos realizados com o feixe mais atenuado (maiores tempos de exposição).

4.2.5. *Chroococcidiopsis* sp.

Para verificar a influência do tamanho dos grãos na proteção contra a radiação, as células de *Chroococcidiopsis* sp. foram misturadas ou não com grãos de basalto ou arenito em 3 faixas de tamanho: (i) até 90 µm, (ii) até 63 µm e (iii) até 38 µm. As quantidades finais de células e de grãos em cada amostra foram respectivamente de 2×10^4 e 12,5 µg. Os

procedimentos de irradiação foram idênticos aos descritos nas seções anteriores e os resultados estão apresentados na Tabela 20.

Tabela 20. Crescimento observado de *Chroococcidiopsis* sp. após irradiação com feixe branco de raios-X ($> 1\text{keV}$). Os valores representam o tempo mínimo necessário (dias) para observar algum crescimento.

Dose ($\times 10^8 \text{ J.m}^{-2}$)	NC	Amostras									
		B			B/SST			SST			
		90	63	38	90	63	38	90	63	38	
0	*-	-	-	-	41 ^a	41 ^a	41	41 ^a	41 ^b	41 ^b	
1,26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	51 ^b	51 ^b
4,20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12,60	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

*- Sem crescimento. a. Resultados observados em apenas duas das três replicatas. b. Resultados observados em apenas uma das três replicatas. Todos os outros resultados foram observados nas três replicatas. NC= Células livres, B= Células misturadas com basalto, SST = Células misturadas com arenito, B/SST= Células adicionadas a uma mistura 1:1 de basalto e arenito. Os números nos códigos das amostras representam o limite superior de tamanho dos grãos (μm).

4.3. EFEITOS DE PARTÍCULAS DO VENTO SOLAR

As células foram irradiadas em 3 condições diferentes: (i) células desidratadas (NC), (ii) células desidratadas misturadas com grãos de arenito (SST), e (iii) células desidratadas misturadas com grãos basalto (B). As barras de erro das curvas de sobrevivência representam desvios-padrão em relação à média de 3 experimentos distintos. Pontos sem barras representam uma única amostra analisada.

4.3.1. Irradiação com elétrons de 2 keV

Levando-se em consideração a composição química dos principais elementos que constituem o material biológico, é possível estimar a porcentagem atômica, sendo, 31% carbono, 49% hidrogênio, 13% oxigênio e 7% nitrogênio (SALTON, 1964; HIRAGI, 1972). Esses valores foram utilizados para o cálculo da transferência linear de energia (LET) dos elétrons de 2 keV no alvo (monocamada de células de 2 μm de diâmetro, com densidade de $0,9392 \text{ g.cm}^{-3}$), através do *software* CASINO v2.42, sendo $20 \text{ keV}\cdot\mu\text{m}^{-1}$. O poder de penetração dessas partículas foi estimado em torno de 100 nm (Figura 36).

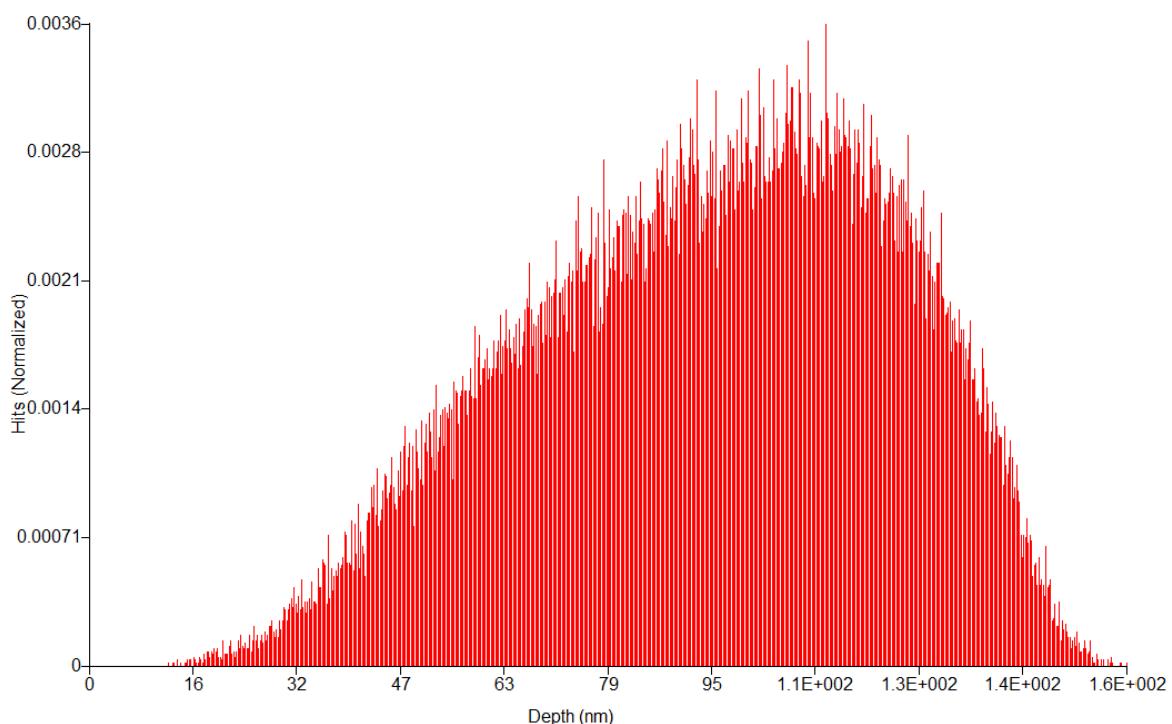


Figura 36. Simulação da penetração de elétrons de 2 keV, com um feixe de 10 nm de diâmetro, em células de *D. radiodurans*, após 6 min 45 s de exposição, totalizando 7×10^4 elétrons. A simulação foi feita através do *software* CASINO v2.42.

Com o valor de LET é possível estimar a dose absorvida após um período de exposição ao feixe com fluxo determinado. Para isso, as doses são inicialmente computadas

em unidades de energia liberada (eV) por pequenas moléculas (16 amu), a partir do conhecimento sobre o número das partículas incidentes sobre a amostra ($\text{elétrons}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), e a energia das partículas (eV) (BARATTA *et al.*, 2003). A unidade utilizada é $\text{eV}\cdot16 \text{ amu}^{-1}$ porque esta é uma maneira conveniente de comparar os resultados dos experimentos realizados com substâncias e misturas de diferentes pesos moleculares (BARATTA et al., 2003). A unidade de massa atômica (amu) é definida como sendo 1/12 da massa do isótopo mais estável do carbono 12. Ela é útil porque um átomo de hidrogênio tem uma massa de aproximadamente 1 amu, e geralmente os átomos ou moléculas que contém n prótons e nêutrons têm uma massa aproximadamente igual a n amu.

Para saber a quantidade de energia depositada por cada partícula em 16 amu, é necessário converter o valor de LET, de $\text{keV}\cdot\mu\text{m}^{-1}$ para $\text{eV}\cdot\text{\AA}^{-1}$, sendo portanto $2 \text{ eV}\cdot\text{\AA}^{-1}$. A quantidade de 16 amu presente em 1 g de qualquer material é $3,77 \times 10^{22}$. Considerando que o material tem densidade de 1 g.cm^{-3} , o número de 16 amu presente em 1 cm^2 é $3,77 \times 10^{22}$. Portanto, o número de $\text{eV}\cdot16 \text{ amu}^{-1}$ depositados por cada íon. cm^{-2} é $5,31 \times 10^{15} \text{ eV}\cdot16\text{amu}\cdot\text{cm}^{-2}$. A corrente elétrica, coletada por um *Faraday-cup*, com 1cm^2 de área, posicionado imediatamente após a fonte de elétrons, reflete o fluxo das partículas, já que a carga do elétron é $1,602 \times 10^{-19}\text{C}$ e a corrente elétrica é medida em Amperes (A), que significa C.s^{-1} . Deste modo, para saber o fluxo de elétrons, basta dividir a corrente elétrica, cujo valor medido foi de $1,754 \times 10^{-5} \text{ A}$, pela carga do elétron, resultando em $10^{14} \text{ elétrons.cm}^{-2}$.

A unidade de dose absorvida definida pelo Sistema Internacional de Unidades (SI) é o Gray (Gy), sendo que $1 \text{ Gy} = 1 \text{ J}\cdot\text{kg}^{-1}$. Logo, 10 kGy , que é a DL_{10} , de *D. radiodurans* para raios gama é igual a $10 \text{ kJ}\cdot\text{kg}^{-1}$. Sabendo-se que $1\text{eV} = 1,602 \times 10^{-19}\text{J}$, ou seja, $1 \text{ J} = 6,25 \times 10^{18}\text{eV}$, logo, $10 \text{ kJ} = 6,25 \times 10^{22}\text{eV}$. Sabendo-se também que $3,77 \times 10^{22}\cdot16\text{amu}^{-1}\cdot\text{g}^{-1} = 3,7710^{25}\cdot16 \text{ amu}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$, para saber a quantidade de energia necessária para atingir essa dose, basta dividir $6,25 \times 10^{22} \text{ eV}$ por $3,7710^{25}\cdot16 \text{ amu}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$, resultando no valor de $1,66 \times 10^{-3}$

$\text{eV} \cdot 16 \text{ amu}^{-1}$. Para saber o número de elétrons de 2 keV necessários para atingir esse valor, basta dividí-lo pelo número de $\text{eV} \cdot 16 \text{ amu}^{-1}$ depositados por cada elétron· cm^{-2} ($5,31 \times 10^{15} \text{ eV} \cdot 16 \text{ amu} \cdot \text{cm}^{-2}$), resultando numa dose de $3,13 \times 10^{11} \text{ elétrons} \cdot \text{cm}^{-2}$.

Entretanto, não foi observada inativação celular mesmo para doses 100 mil vezes superiores a este valor calculado (Figura 37). Todas as curvas de sobrevivência apresentaram baixos valores de inativação celular. Aparentemente, células livres são inativadas mais rapidamente do que células misturadas com grãos, embora este efeito só tenha sido observado para as doses mais altas. Isso se deve ao baixo poder de penetração dos elétrons de 2 keV, cuja trajetória é interrompida na parede celular, onde 90% da energia é depositada até uma profundidade em torno de 20 nm (Figura 38). Não há diferenças significativas na proteção contra a radiação conferida por um ou outro tipo de grão.

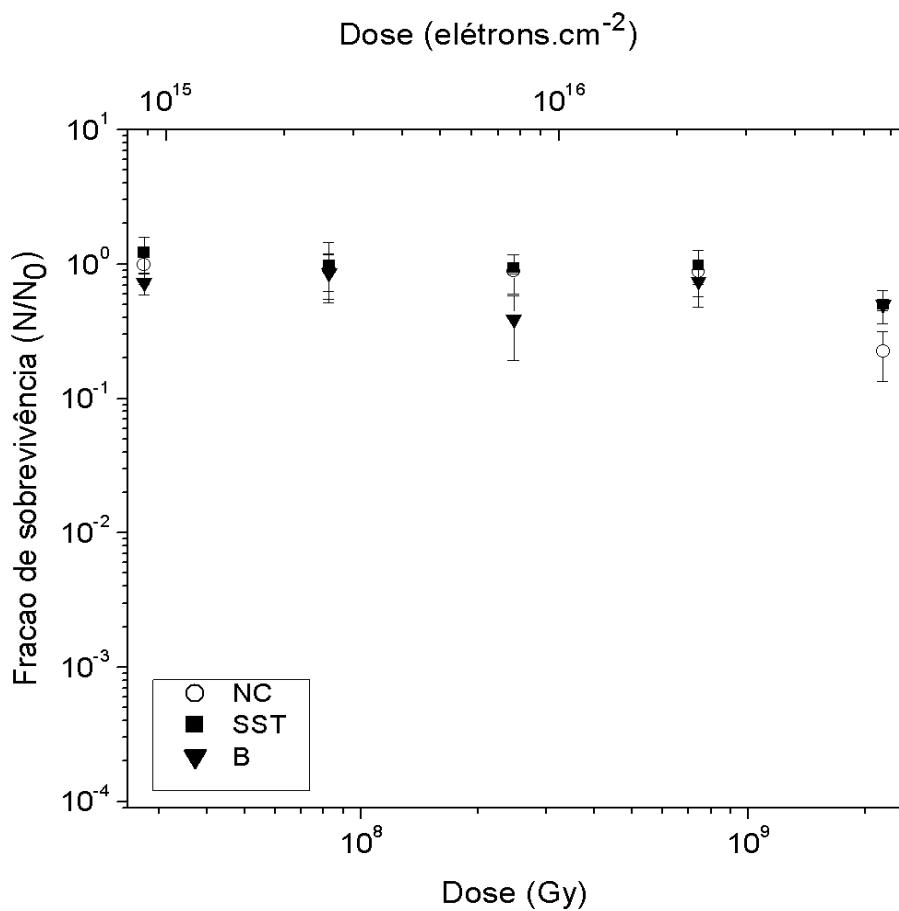


Figura 37. Curvas de sobrevivência de *D. radiodurans* na ausência (NC) ou presença de grãos de arenito ou basalto (SST ou B) irradiadas com feixe de elétrons de 2 keV.

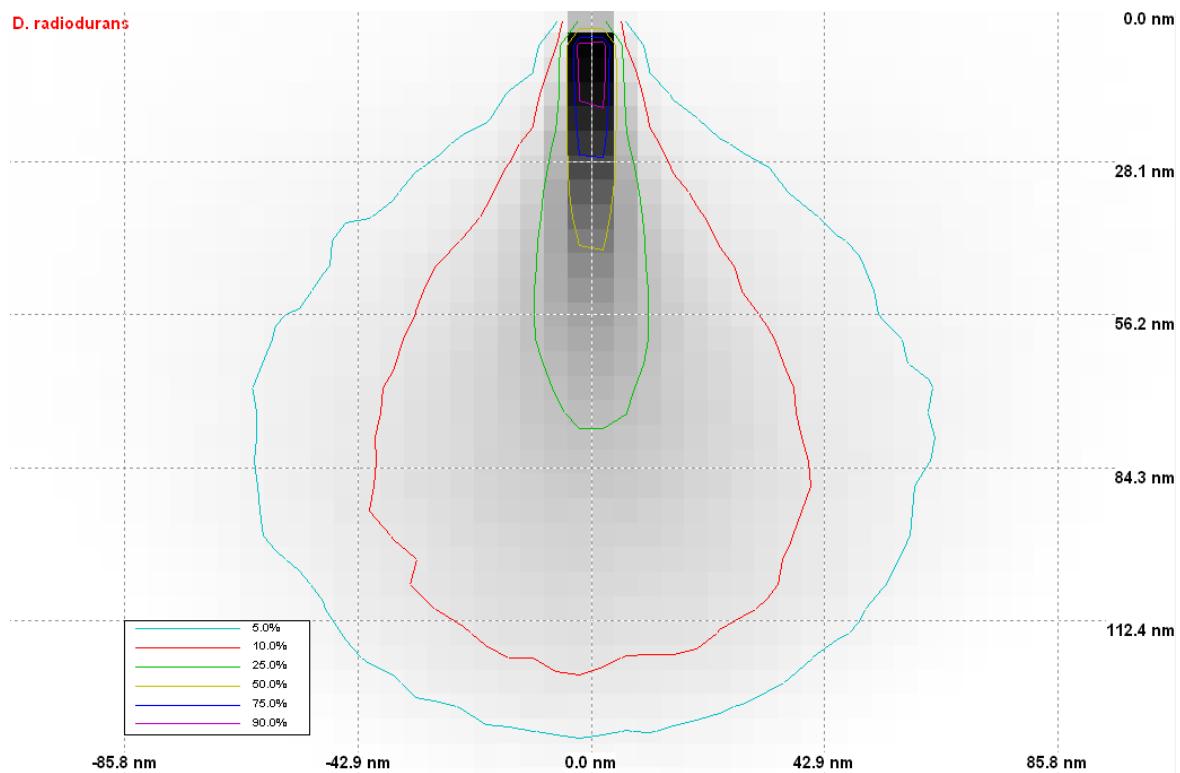


Figura 38. Simulação da energia depositada por um feixe de elétrons de 2 keV, com 10 nm de diâmetro, em células de *D. radiodurans*, após 6 min 45 s de exposição, totalizando 7×10^4 elétrons. A simulação foi feita através do software CASINO v2.42.

Infelizmente as amostras de *Chroococcidiopsis* sp. não resistiram aos procedimentos experimentais, já que não foi possível observar nenhuma proliferação celular dos controles, provavelmente devido ao procedimento de desidratação ter sido realizado muito rapidamente. Mesmo em condições ideais, células de *Chroococcidiopsis* sp. necessitam de pelo menos 3 dias de desidratação lenta para manter a viabilidade celular durante anidrobiose prolongada (COCKELL et al., 2005).

4.3.2. Irradiação com prótons de 200 keV

A transferência linear de energia (LET) dos prótons de 200 keV no alvo (monocamada de células de 2 μm de diâmetro, com densidade de $0,9392 \text{ g.cm}^{-3}$) foi calculada através do

software SRIM 2010, conforme descrito no item 4.3.1., sendo $67,8 \text{ keV}\cdot\mu\text{m}^{-1}$, e o poder de penetração dessas partículas foi estimado em $2,83 \mu\text{m}$ (Figura 39). Com esses valores, a dose estimada para inativar 90% da população de células livres (DL_{10}) foi de 1 kGy, o que corresponde a $10^{10} \text{ ions.cm}^{-2}$ (Figura 40). Essa DL_{10} obtida para irradiação com prótons é 10 vezes menor do que a irradiação com raios gama (10 kGy), que interage com a matéria apenas via ionizações e excitações. Já os prótons, além das ionizações e excitações, também interagem com a matéria via transferência de massa e de momento, o que resulta numa maior LET, causando maiores danos celulares.

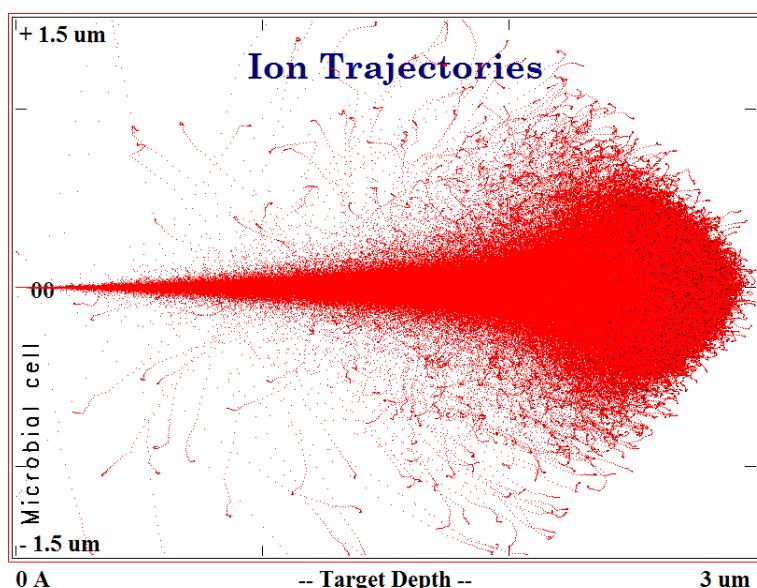


Figura 39. Simulação da trajetória de 10^5 prótons de 200 keV em uma célula microbiana utilizando o software SRIM. Note que o poder de penetração das partículas ($2,83 \mu\text{m}$) é maior do que o diâmetro da célula de *D. radiodurans* ($\sim 2 \mu\text{m}$).

Em relação às células misturadas com grãos, algumas delas eventualmente ficaram protegidas pela cobertura física conferida pelos grãos e por isso sobreviveram as maiores doses (Figura 40). Além disso, não houve diferença detectável na proteção conferida por um

ou outro tipo de grão, sendo que as taxas de sobrevivência das células na presença dos grãos foram ordens de grandeza maiores do que para células livres.

No caso das células depositadas sobre CDAs, a taxa de sobrevivência das células depositadas em forsterita amorfa (Mg_2SiO_4) foi muito semelhante às taxas de sobrevivência das células livres (NC) depositadas sobre filtro de policarbonato (Figura 40). Já as células depositadas em fayalitas amorfa e cristalina (Fe_2SiO_4) não puderam ser recuperadas, indicando que a taxa de sobrevivência foi inferior ao limite de detecção do método ($<10^{-5}$) (Figura 40). Considerando que a única diferença entre forsterita e fayalita é a substituição do magnésio na forsterita pelo ferro na fayalita, é possível que o ferro contribua de alguma maneira para a inativação celular quando irradiado com prótons de 200 keV.

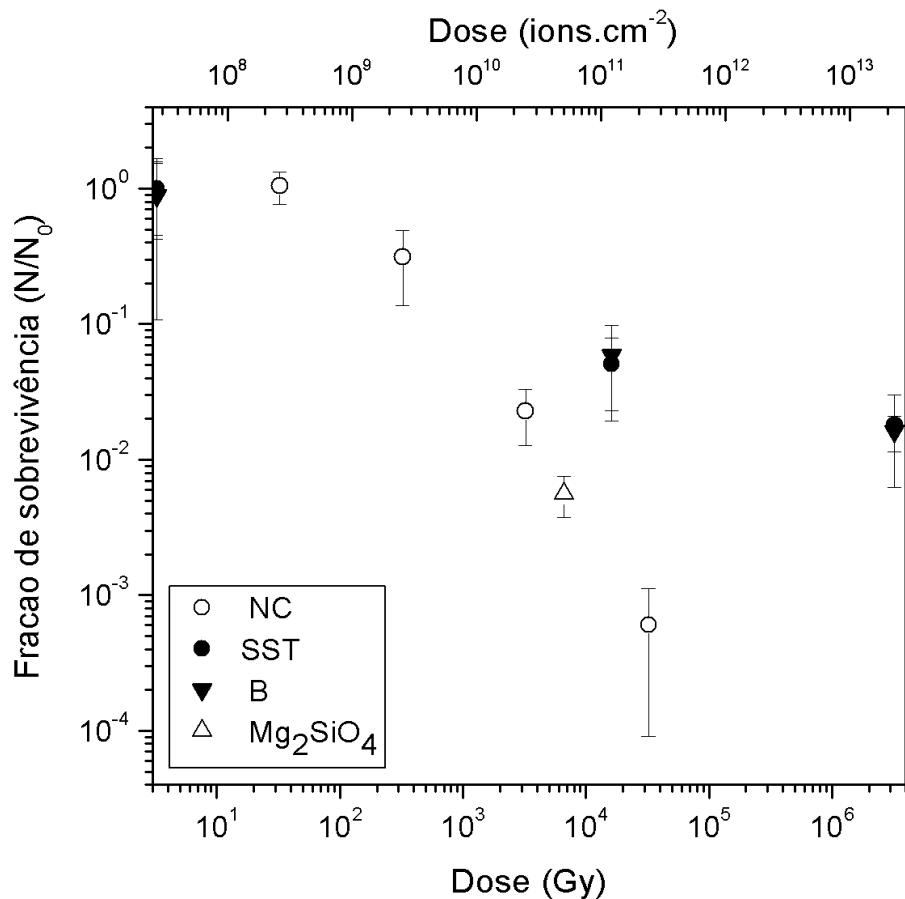


Figura 40. Curvas de sobrevivência de *D. radiodurans* na ausência (NC) ou presença de grãos de arenito ou basalto (SST ou B) irradiadas com feixe de prótons de 200 keV.

Imagens de microscopia eletrônica (SEM) foram produzidas para os controles não irradiados e para as amostras de *D. radiodurans* (Figura 41) e *Chroococcidiopsis* sp. (Figura 42), irradiadas com a dose máxima. Não houve diferença detectável entre os controles e as amostras irradiadas, com relação aos aspectos morfológicos da superfície celular, mesmo para as células livres irradiadas com a dose máxima. Apesar do alto poder de penetração de prótons de 200 keV nas células microbianas, não foram observados nenhum dano físico na superfície celular, independente do tipo de grão presente nas amostras.

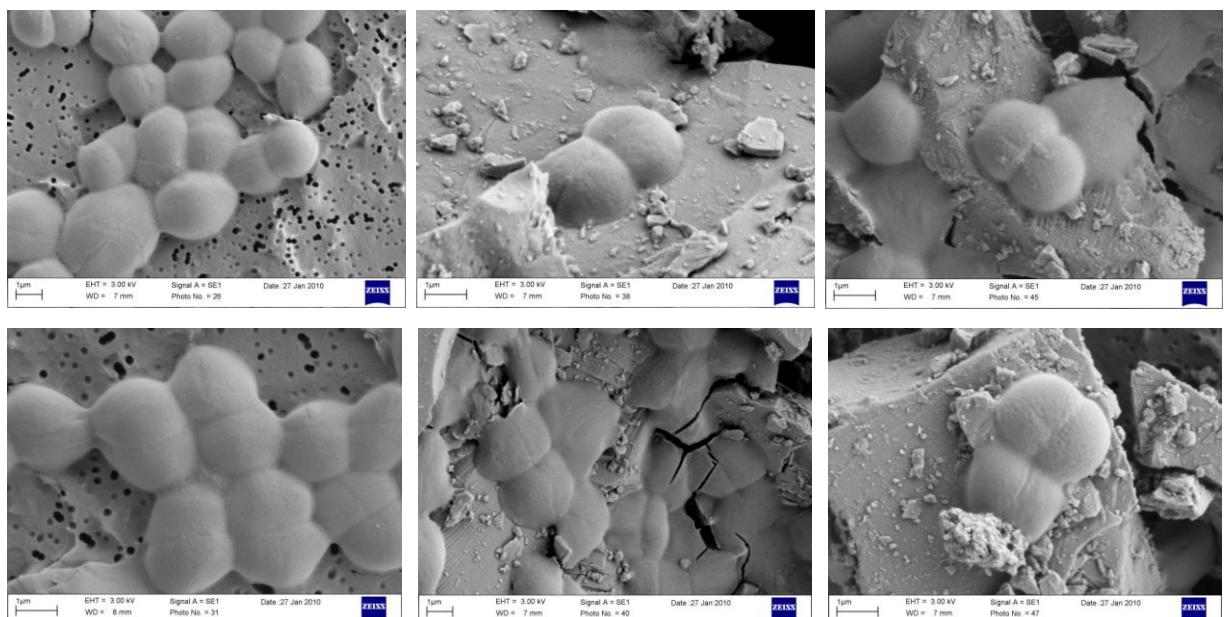


Figura 41. Imagens de microscopia eletrônica (SEM) de células de *D. radiodurans* irradiadas (embaixo) ou não (em cima) com 10^{13} prótons·cm $^{-2}$. Células livres (esquerda) e células misturadas com grãos de arenito (centro) e basalto (direita) são mostradas.

4.3.2.1. *Chroococcidiopsis* sp.

Infelizmente as amostras de *Chroococcidiopsis* sp. não resistiram aos procedimentos experimentais, já que não foi possível observar nenhuma proliferação celular dos controles, provavelmente devido ao pequeno tempo de desidratação. Mesmo em condições normais de

temperatura e pressão, células de *Chroococcidiopsis* sp. necessitam de pelo menos 3 dias de desidratação lenta para manter a viabilidade celular após anidrobiose prolongada (COCKELL et al., 2005).

Novamente não foi observada nenhuma diferença morfológica entre os controles não irradiados e as amostras irradiadas com as maiores doses testadas. Entretanto, alguns aspectos provavelmente resultantes de agressões físicas às células foram observados tanto nos controles quanto nas amostras irradiadas (Figura 42).

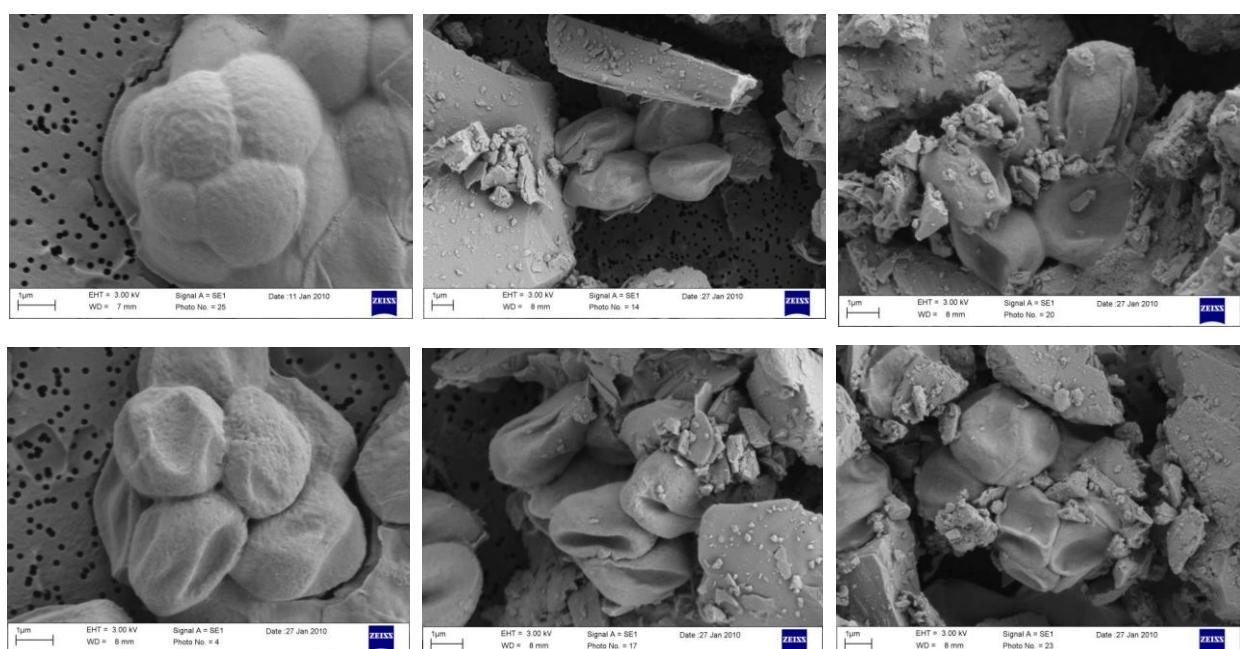


Figura 42. Imagens de microscopia eletrônica (SEM) de células de *Chroococcidiopsis* sp. irradiadas (embaixo) ou não (em cima) com 10^{13} prótons·cm $^{-2}$. Células livres (esquerda) e células misturadas com grãos de arenito (centro) e basalto (direita) são mostradas.

4.3.3. Irradiação com íons carbono de 4 keV

A transferência linear de energia (LET) dos íons de carbono de 4 keV no alvo (monocamada celular de 2 μm de espessura, com densidade de $1 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$) foi calculada através do software SRIM, conforme descrito no item 4.3.1., sendo $35,7 \text{ keV}\cdot\mu\text{m}^{-1}$, e o poder de

penetração dessas partículas foi estimado em 30 nm, conforme ilustrado na Figura 43. Com esses valores, a dose estimada para inativar 90% da população de células livres (DL_{10}) foi correspondente a $2,65 \times 10^{11}$ ions.cm⁻². Entretanto, não foi observada inativação celular mesmo para doses 10 mil vezes superiores a este valor calculado (Figura 44). Isso se deve ao baixo poder de penetração dos íons de carbono de 4 keV, cuja trajetória é interrompida na parede celular. Não há diferenças significativas na proteção contra a radiação conferida por um ou outro tipo de grão.

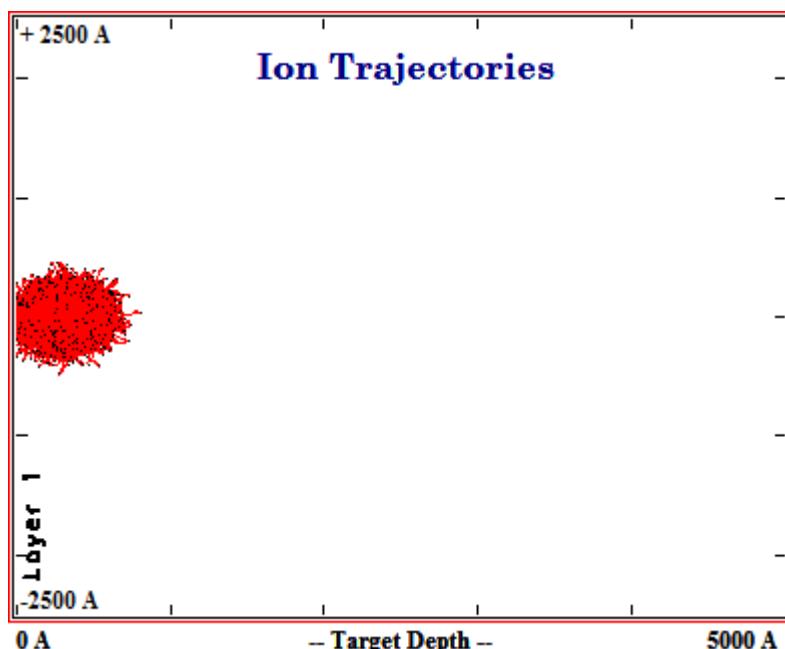


Figura 43. Simulação da trajetória de 10^5 íons de carbono com energia de 4keV na parede celular de uma célula microbiana. A profundidade do alvo, no eixo x, é dada em Angstrons (Å).

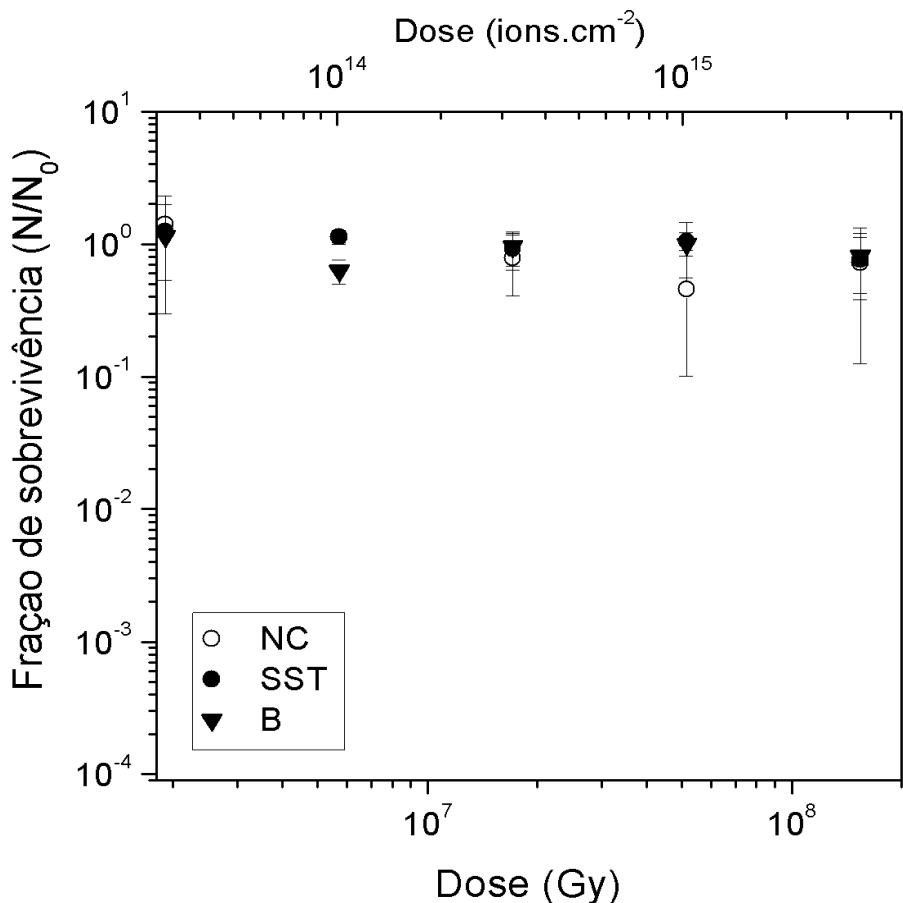


Figura 44. Curvas de sobrevivência de *D. radiodurans* na ausência (NC) ou presença de grãos de arenito ou basalto (SST ou B) irradiadas com feixe de íons de carbono de 4keV.

4.4. EXPOSIÇÃO PROLONGADA DE *D. radiodurans* AO ALTO VÁCUO

Todas as amostras misturadas com meio de cultura apresentaram taxa significativamente maior de recuperação e de sobrevivência, principalmente nos tempos mais longos (Figura 45). Os controles experimentais sofreram perda espontânea da viabilidade ao longo do experimento, sendo este evento mais evidente para células sem meio de cultura. A sobrevivência ao alto vácuo é muito mais dependente da presença de material orgânico na amostra (meio de cultura) do que do tipo de grão misturado com as células. Células na

ausência de material orgânico apresentaram fração de sobrevivência inferior 10^{-5} após 21 dias de exposição ao alto vácuo.

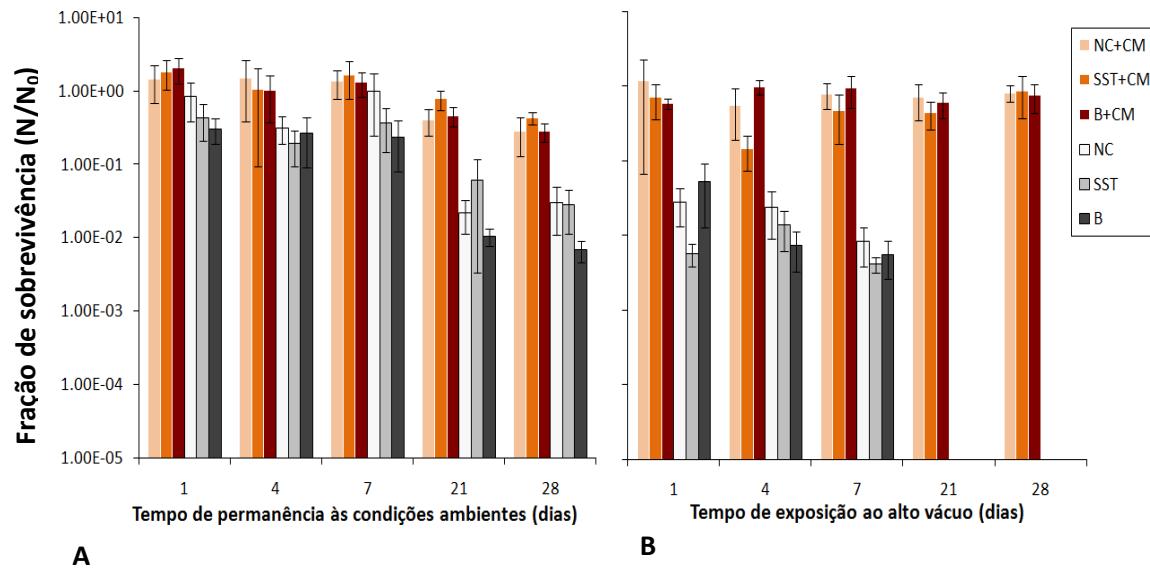


Figura 45. **A**, Taxa de recuperação dos controles mantidos durante tempos crescentes em condições ambientes (temperatura $\sim 22^{\circ}\text{C}$, pressão $\sim 1\text{ atm}$). **B**, Taxa de sobrevivência em relação aos controles após diferentes tempos de exposição ao alto vácuo (10^{-5} Pa). NC+CM, células misturadas com meio de cultura; SST+CM, células misturadas com meio de cultura e grãos de arenito; B+CM, células misturadas com meio de cultura e grãos de basalto; NC, células livres; SST, células misturadas apenas com grãos de arenito; B, células misturadas apenas com grãos de basalto.

4.5. ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS RESISTENTES ÀS CONDIÇÕES MARCIANAS

O isolamento de microrganismos resistentes às condições marcianas foi feito utilizando-se dois parâmetros físico-químicos independentes: (i) a radiação UV-C incidente na superfície marciana e (ii) a composição atmosférica sob pressão marciana.

4.5.1. Radiação ultravioleta

A enumeração de microrganismos totais presentes nas amostras correspondentes às 5 diferentes localidades do deserto do Atacama, no Chile, revelou uma grande quantidade de microrganismos totais cultiváveis (Figura 46), após até 1 semana de incubação. Após os procedimentos de irradiação com uma dose única de $300 \text{ J}\cdot\text{m}^{-2}$ de radiação UV-C com lâmpada germicida, o número de microrganismos sobreviventes foi bastante variável entre as amostras e também entre os diferentes meios de cultura utilizados (Figura 47), sendo observados muitos microrganismos pigmentados. A presença de pigmentos coloridos favorece a resistência às radiações por absorverem grande parte dos fótons de luz ultravioleta, funcionando como uma proteção passiva contra esse tipo de estresse (JACOBS et al., 2005). Por isso, microrganismos pigmentados foram isolados de todas as amostras, conforme ilustrado na Figura 48.

Um número muito grande de microrganismos pigmentados foi observado nas amostras do solo 4 após a irradiação. Por isso, amostras do solo 4 passaram por uma nova etapa de irradiação, desta vez com doses fracionadas, até $400 \text{ J}\cdot\text{m}^{-2}$ (Figura 49). Este procedimento resultou num grande número de microrganismos pigmentados crescidos nos diferentes meios de cultura.

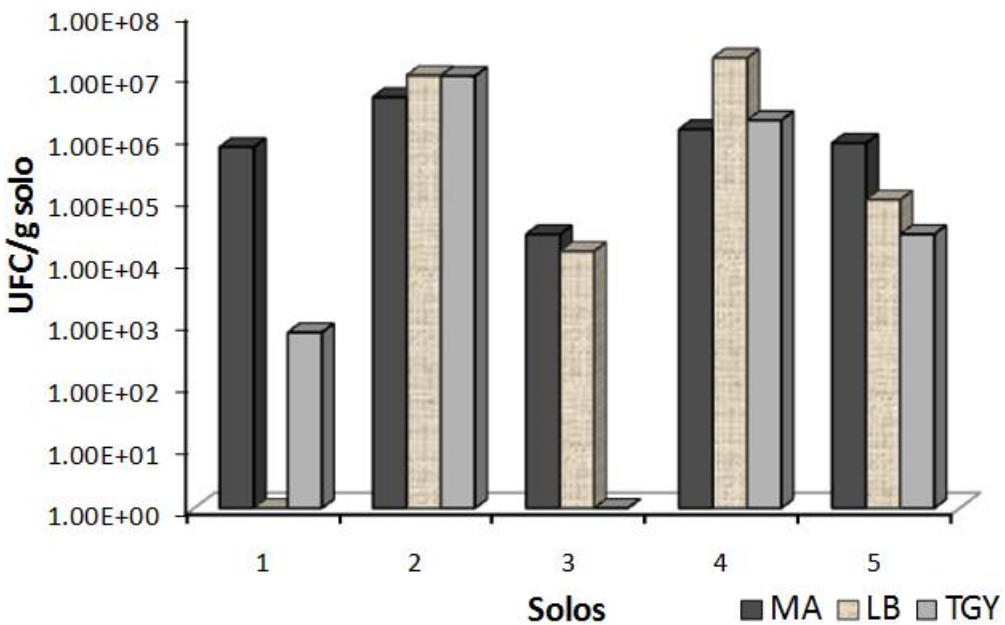


Figura 46. Abundância de microrganismos totais presentes em amostras de 5 diferentes localidades do deserto do Atacama (Chile), cultivados em 3 tipos de meio de cultura: (i) Agar Marinho (MA), (ii) Lysogeny Broth (LB) e (iii) TGY.

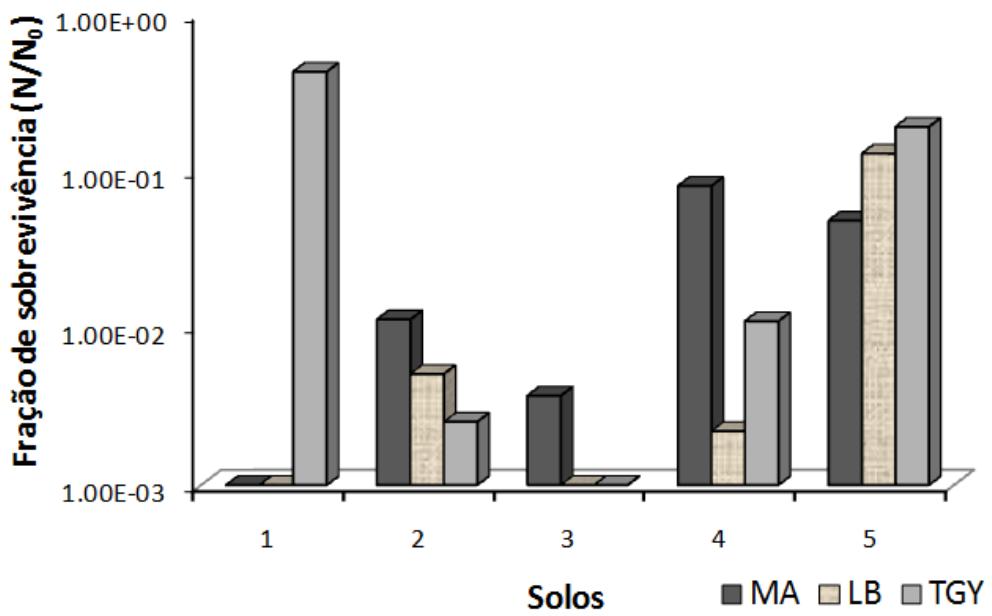


Figura 47. Fração de sobrevivência (N/N_0) a UV-C ($300 \text{ J} \cdot \text{m}^{-2}$) dos microrganismos totais presentes em cada tipo de solo diluídos em solução salina (1 g/10ml), após incubação nos 3 tipos de meio de cultura: (i) Agar Marinho (MA), (ii) Lysogeny Broth (LB) e (iii) TGY.

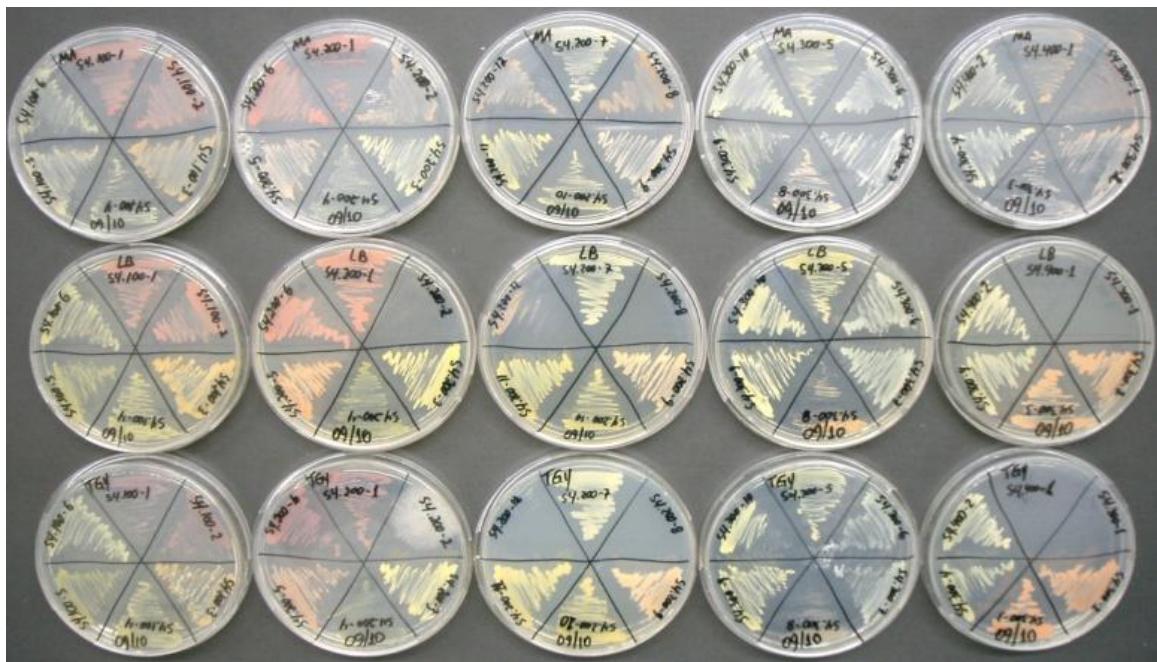


Figura 48. Isolamento de morfotipos pigmentados, com coloração variando entre amarela e vermelha, e incubação nos 3 tipos de meio de cultura: (i) Agar Marinho (MA), (ii) Lysogeny Broth (LB) e (iii) TGY.

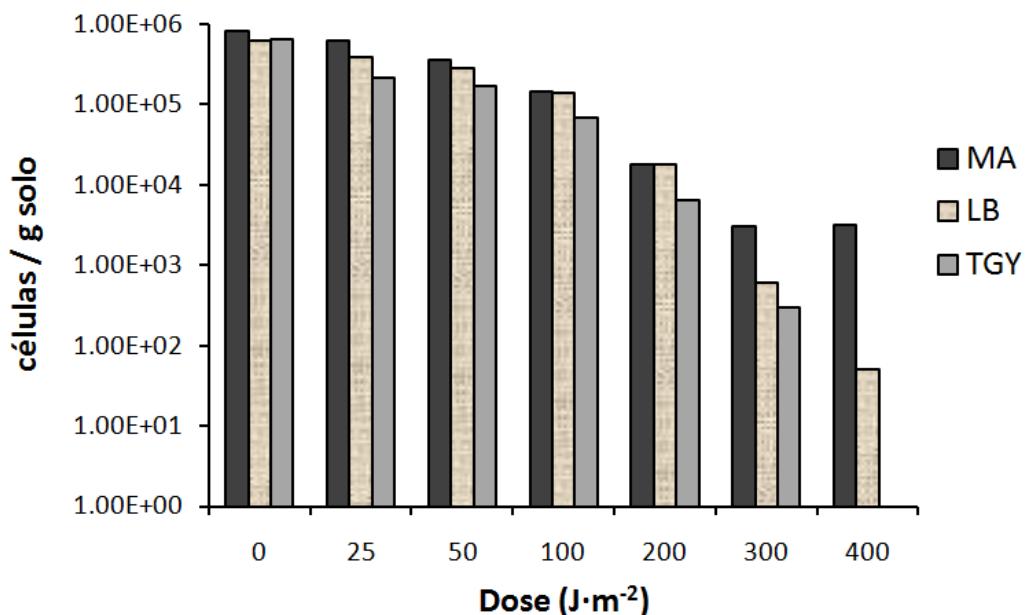


Figura 49. Inativação dos microrganismos presentes no solo 4 (Sitio 2 Gypsum) após irradiação com diferentes doses de UV-C ($\lambda = 254\text{nm}$).

Os isolados foram então testados quanto a sua capacidade de crescer em meio de cultura líquido sob agitação de 150 rpm a 28 °C para serem submetidos a uma nova etapa de irradiação com $300 \text{ J} \cdot \text{m}^{-2}$ de irradiação UV-C, desta vez em condições otimizadas, ou seja, em solução salina (NaCl 0,9%) sem a interferência do material particulado proveniente das amostras de solo. Um total de 40 isolados pigmentados foram capazes de crescer em meio de cultura líquido. Dentre estes 40 isolados pigmentados, 27 foram provenientes do solo 4, representando 67,5% do total de isolados. Estes resultados são mostrados nas Figuras 50 e 51.

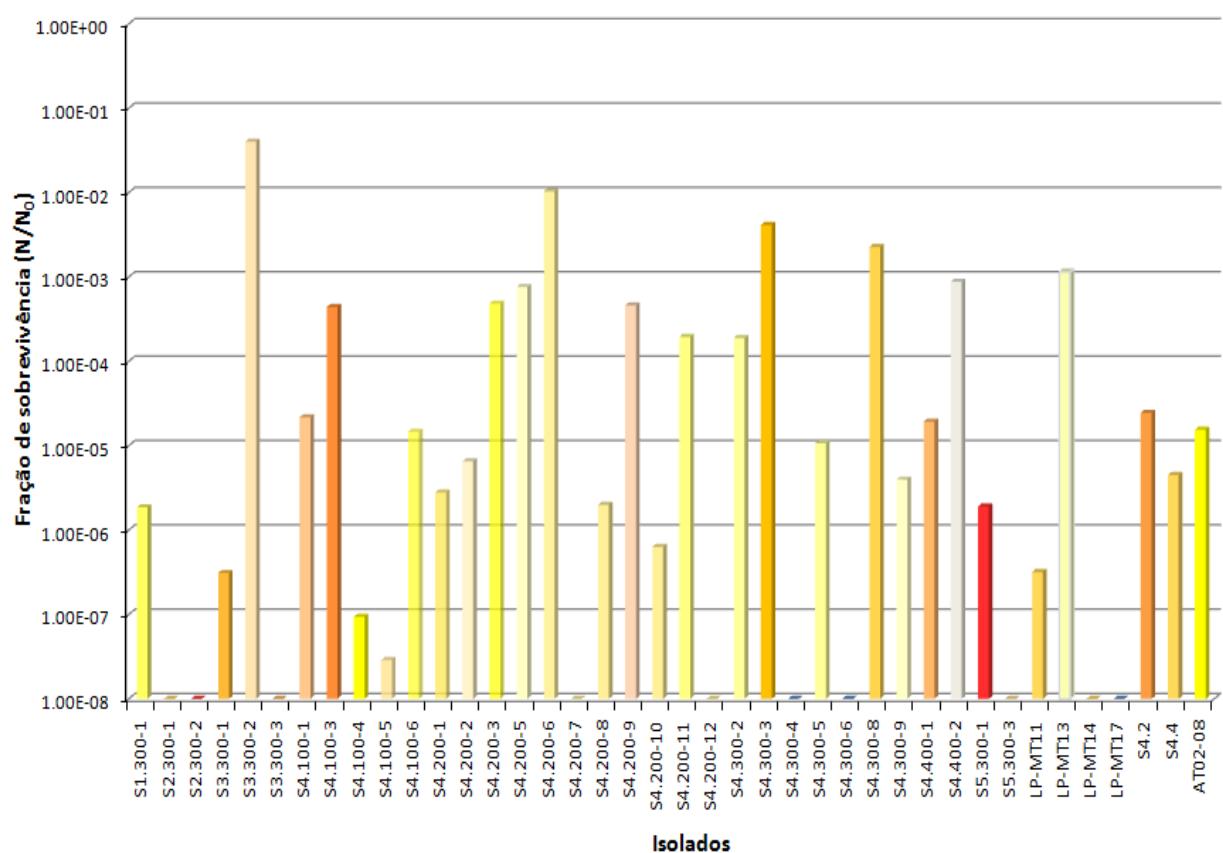


Figura 50. Resistência a UV-C de 40 isolados provenientes de 5 solos diferentes do deserto do Atacama. As barras foram coloridas de acordo com a pigmentação dos isolados.

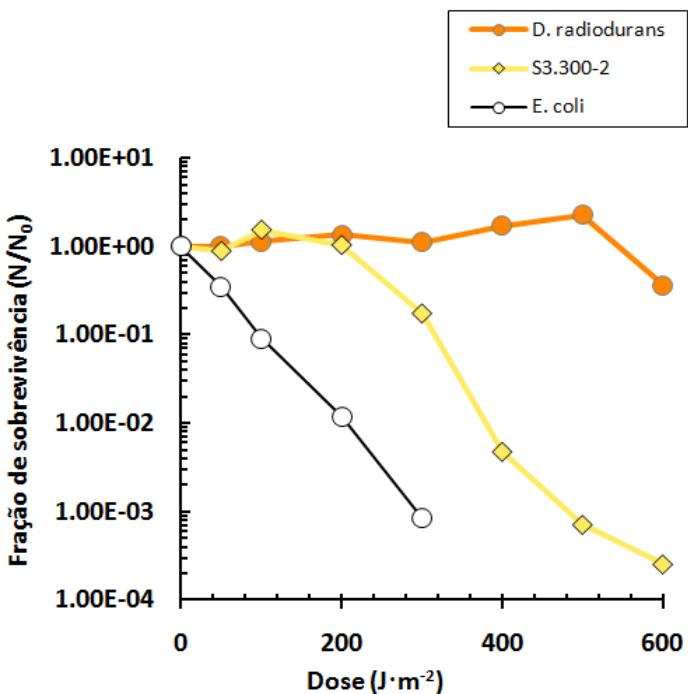


Figura 51. Curva de sobrevivência do isolado S3.300-2 ao UV-C, em comparação com as curvas obtidas com a linhagem AB1157 de *Escherichia coli* e a linhagem selvagem de *D. radiodurans*.

Os 14 isolados mais resistentes foram submetidos à identificação molecular através de amplificação parcial do gene 16S RNAr e sequenciamento seguido de comparação das sequências com o banco de dados do NCBI. A maioria dos isolados apresentou alta similaridade com as espécies *Bacillus cereus* ou *Bacillus thuringiensis*. Um dos isolados foi identificado como *Pseudomonas stutzeri* e o mais resistente foi identificado como *Bacillus* sp. Estes resultados são mostrados na Tabela 21.

Tabela 21. Identificação molecular dos 14 isolados mais resistentes à radiação UV-C.

Código	Espécies	Origem
S3-300-2	<i>Bacillus. sp</i>	Capa negra La Portada
S4.300-3	<i>Bacillus cereus/thuringiensis</i>	Sitio 2 Gypsum
S4.300-8	<i>Bacillus cereus/thuringiensis</i>	Sitio 2 Gypsum
LP-MT13	<i>Bacillus cereus/thuringiensis</i>	La Portada cave
S4.400-2	<i>Bacillus cereus</i>	Sitio 2 Gypsum
S4.200-5	<i>Bacillus cereus/thuringiensis</i>	Sitio 2 Gypsum
S4.200-3	<i>Bacillus cereus/thuringiensis</i>	Sitio 2 Gypsum
S4.200-9	<i>Bacillus cereus/thuringiensis</i>	Sitio 2 Gypsum
S4.100-3	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Sitio 2 Gypsum
S4.100-11	<i>Bacillus cereus/thuringiensis</i>	Sitio 2 Gypsum
S4.300-2	<i>Bacillus cereus/thuringiensis</i>	Sitio 2 Gypsum
S4.2	<i>Bacillus cereus/thuringiensis</i>	Sitio 2 Gypsum
S4.400-1	<i>Bacillus cereus/thuringiensis</i>	Sitio 2 Gypsum
AT02-08	<i>Bacillus cereus/thuringiensis</i>	Sitio cuarzos

Seqüências de RNAr 16S das amostras foram amplificadas por PCR e separadas por Eletroforese em Gel com Gradiente de Desnaturação (DGGE), gerando padrões de bandas representativos da estrutura das comunidades. Esta análise revelou a presença de comunidades microbianas complexas em todas as amostras. Além disso, mostrou diferenças interessantes entre os locais onde os solos foram coletados, evidenciados por perfis distintos do gene 16S RNAr para cada amostra (Figura 52).

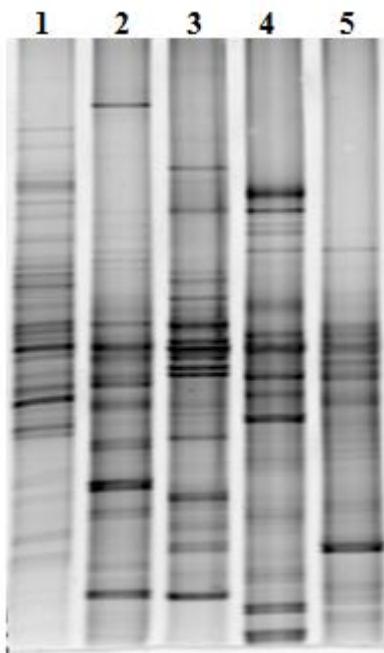


Figura 52. Eletroforese em Gel com Gradiente de Desnaturação (DGGE) das sequências 16S rRNA mostrando comunidades microbianas complexas em todas as amostras. 1-Laguna Llamara, 2-Sitio Cuarzos B2, 3-Capa Negra La Portada, 4-Gypsum, 5-Sitio 3 S4.

4.5.2. Atmosfera marciana

Após 1 semana de incubação à temperatura ambiente, uma amostra correspondente ao tempo de exposição de 4 dias revelou a presença de 1 colônia com pigmentação avermelhada que foi denominada LPMARS-1. Esta colônia foi submetida à amplificação parcial do gene 16S rDNA através de PCR e a sequência obtida (Figura 53) apresentou 98% de similaridade com *Modestobacter* sp. uma actinobactéria tipicamente oligotrófica.

```
GGGCGTAAGAGCTCGTAGGCGGTCTGTCGCGTCGGCTGTGAATCCGAGGCTCAA
CCTCGGGTCTGCAGTCGATAACGGCAAACACTAGAGTACTGCAGGGAGACTGGAA
TTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAG
GCGGGTCTCTGGGCAGTAACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAA
GGATTAGATAACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGTTGGGCCTAGGTGTGGGGC
CATTCCACGGTCTCCGTGCCGAGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCCTGGGAGCTA
CGGNCGCAAGGCTAAAACCNAGGAATTGACGG
```

Figura 53. Sequência parcial do gene 16S rDNA do isolado LPMARS-1.

Tabela 22. Comparação da sequência parcial do gene 16S rDNA do isolado LPMARS-1 com as sequências depositadas no banco de dados NCBI mostrando os alinhamentos com maior índice de similaridade.

Accession	Description	Max	Total	Query	E value	Max
		score	score	coverage		ident
FJ966173.1	<i>Modestobacter</i> sp. BMG5755 16S rRNA gene, partial sequence Uncultured bacterium clone	632	632	100%	$3e^{-178}$	98%
FJ213487.1	TSPB_32 16S rRNA gene, partial sequence	632	632	100%	$3e^{-178}$	98%
EU181225.1	<i>Modestobacter</i> sp. 42H12-1 16S rRNA gene, partial sequence	632	632	100%	$3e^{-178}$	98%
DQ448774.1	<i>Modestobacter</i> sp. CNJ794 PL04 16S rRNA gene, partial sequence	632	632	100%	$3e^{-178}$	98%
DQ448698.1	<i>Modestobacter</i> sp. CNJ793 PL04 16S rRNA gene, partial sequence Uncultured actinobacterium clone	632	632	100%	$3e^{-178}$	98%
EF522200.1	EPLS011 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	628	628	100%	$4e^{-177}$	97%
GQ329478.1	Uncultured <i>Modestobacter</i> sp. clone P8s-342 16S rRNA gene, partial sequence	627	627	100%	$2e^{-176}$	97%

Após a análise destes resultados foi iniciado um levantamento bibliográfico sobre os microrganismos com maior índice de similaridade com LPMARS-1, bem como o planejamento de novos experimentos de caracterização do perfil de sobrevivência deste isolado à diferentes fontes de radiação UV para se determinar a possibilidade de sobrevivência deste microrganismo na superfície marciana.

5. DISCUSSÃO

As radiações originárias de fontes astrofísicas constituem o fator mais agressivo para modelos biológicos no ambiente espacial (NICHOLSON et al., 2005). Porém, inúmeros experimentos utilizando tanto instalações que simulam as condições do espaço, bem como instalações em órbita inseridas no próprio ambiente espacial, têm demonstrado a capacidade de sobrevivência de diferentes modelos biológicos e a estabilidade de biomoléculas a essas condições inóspitas (HORNECK et al., 2010; OLSSON-FRANCIS e COCKELL, 2010).

Nos experimentos apresentados nesta tese, determinamos a capacidade de sobrevivênciade *Deinococcus radiodurans* a diferentes parâmetros físico-químicos, tais como radiação, vácuo e atmosfera marciana, atuando juntos ou separadamente. Outros modelos biológicos provenientes do deserto do Atacama, no Chile, também foram testados, como a cianobactéria *Chroococcidiopsis* sp. e novos isolados microbianos resultantes deste trabalho.

Todos os experimentos foram realizados à temperatura ambiente, já que os efeitos deletérios de baixas temperaturas em microrganismos são até mesmo preservantes. Na verdade, a ocorrência de temperaturas extremamente baixas e as condições de desidratação no espaço interplanetário favorece a preservação da integridade celular por prevenir a formação de radicais livres provenientes das moléculas de água. Notavelmente, microrganismos tais como a *D. radiodurans* e *B. subtilis* apresentam sobrevivência a irradiação UV se irradiados sob temperaturas baixas, em comparação com irradiações feitas a temperatura ambiente (ASHWOODS et al., 1968; WEBER e GREENBERG, 1985). Os resultados de Weber e Greenberg (1985), mostrando aumento da sobrevivência a irradiação UV-VUV de esporos de *Bacillus subtilis* em baixa temperatura e vácuo suportam estas conclusões.

A discussão dos resultados está dividida em 4 partes, sendo: (i) radiações ultravioleta, (ii) raios-X, (ii) partículas carregadas, e (iv) isolamento de microrganismos resistentes às condições marcianas.

5.1. RADIAÇÕES ULTRAVIOLETA

Os ensaios de irradiação feitos em solução aquosa, utilizando diferentes espectros do Simulador Solar Oriel (Tabela 17) demonstraram a importância de se utilizar fontes de radiação em condições semelhantes às encontradas na natureza para uma melhor compreensão da interação dos fenômenos naturais com materiais biológicos. *D. radiodurans* é um dos microrganismos mais resistentes às radiações. Para as radiações correspondentes ao ultravioleta-C (UV-C), a dose necessária para inativar 63% de uma população de *D. radiodurans* (D_{37}) é $550\text{-}600 \text{ J}\cdot\text{m}^{-2}$ (BATTISTA, 1997), conforme observado na Figura 16. Entretanto, se a irradiação com UV-C for feita com uma fonte de radiação que contém também fótons com comprimentos de onda mais longos (UV-A e UV-B), numa proporção comparável ao espectro solar, os efeitos são devastadores (Figura 14). Nessas condições, a D_{37} referente ao UV-C diminui para valores inferiores a $10 \text{ J}\cdot\text{m}^{-2}$. Provavelmente um número muito pequeno de quebras de fita dupla no DNA (DSB), resultantes da interação com fótons de UV-C, já é suficiente para inativar células de *D. radiodurans* irradiadas simultaneamente com UV-A e UV-B. É importante ressaltar que o mecanismo de reparo de DSB descrito para *D. radiodurans* é muito eficiente, podendo restaurar até milhares de DSB (ZAHRADKA et al., 2006). Entretanto, se a maquinaria molecular envolvida neste processo for inativada por oxidação, a célula se torna muito mais sensível aos danos (DALY et al., 2007).

A presença de moléculas orgânicas nas soluções aquosas é capaz de aumentar a sobrevivência celular, pois acabam absorvendo fótons potencialmente capazes de gerar danos no DNA. A D_{10} , ou seja, a dose necessária para inativar 90% de uma população de células de *D. radiodurans* foi 3x maior para células na presença de moléculas orgânicas do que para células na ausência de moléculas orgânicas (Figura 15).

Este fenômeno também foi observado para células desidratadas (Figura 17). Na ausência de moléculas orgânicas, os efeitos da irradiação aguda com lâmpada de hidrogênio ($\lambda = 121\text{nm}$) são bastante semelhantes à irradiação UV de amplo espectro com o simulador solar (Figura 18). Isto significa que mesmo com uma seção de choque muito alta (ITO *et al.*, 1980), os fótons de luz ultravioleta de vácuo (UVV) são capazes de atingir o DNA das células levando à rápida inativação. Entretanto, se as amostras desidratadas estiverem na presença de material orgânico, a alta seção de choque dos fótons com $\lambda = 121\text{nm}$ dificulta sua interação com o DNA. Já os fótons com $\lambda > 200\text{nm}$, como a seção de choque é menor, seu acesso ao DNA é maior e a inativação é eficiente mesmo para células desidratadas misturadas com moléculas orgânicas. Com isso, os perfis de inativação celular para essas duas fontes de radiação são bastante diferentes (Figura 22). Vale lembrar que a metodologia utilizada para o preparo dessas amostras foi diferente. No caso do simulador solar, o empilhamento de células juntamente com o material orgânico foi mais limitado do que no caso da lâmpada de hidrogênio, onde um pó constituído por células e matéria orgânica liofilizada foi distribuídos sobre o substrato. O preparo das amostras para irradiação com o simulador solar também não envolveu uma etapa de liofilização, resultando portanto em amostras “menos desidratadas” do que as amostras submetidas à irradiação com lâmpada de hidrogênio.

As doses utilizadas com a lâmpada de xenônio foram comparáveis à emissão solar na banda de 145 nm, com uma taxa de dose parecida com a encontrada na região da órbita terrestre. Entretanto, o fluxo solar nessa faixa de energia é baixo (WOODS, 2002) e não foi suficiente para causar nenhuma inativação celular detectável, mesmo para as maiores doses testadas (Figura 19).

Os efeitos da radiação monocromática com fótons de $\lambda = 254\text{nm}$ na linha de luz CD1 do laboratório síncrotron Astrid foram bastante semelhantes aos efeitos produzidos pela irradiação com feixe branco na linha de luz TGM do LNLS (Figura 20). Os fótons de 254 nm

apresentam alta eficiência biológica, já que a máxima absorção de radiação ultravioleta pelo DNA ocorre na faixa de 260 nm. Entretanto, diferentemente das amostras utilizadas no sincrotron Astrid, que foram desidratadas espontaneamente, as amostras utilizadas no LNLS foram previamente liofilizadas e irradiadas sob alto vácuo (10^{-5} Pa). Novamente isto pode ter resultado em amostras “menos desidratadas” para o sincrotron Astrid do que para o LNLS, limitando a acurácia da comparação. Entretanto, se comparados os efeitos da irradiação com os dois feixes de amplo espectro, ou seja, o simulador solar e a linha de luz TGM do LNLS, com amostras desidratadas espontaneamente para o simulador solar e amostras irradiadas em vácuo na TGM, a inativação foi mais intensa com a TGM do que com o simulador solar, demonstrando a importância da radiação UVV na inativação celular (Figura 21).

Células desidratadas espontaneamente, misturadas com moléculas orgânicas, irradiadas tanto com a lâmpada de xenônio como com a fonte na linha de luz CD1 do sincrotron Astrid não apresentaram nenhuma inativação celular detectável, mesmo para as maiores doses testadas (Figura 23). A proteção conferida pela presença de material orgânico nas amostras desidratadas foi evidente para as irradiações realizadas não apenas no sincrotron Astrid, mas também no LNLS (Figura 24), com a lâmpada de hidrogênio (Figura 22), e com o simulador solar (Figura 29).

Comparando novamente os efeitos da irradiação com os dois feixes de amplo espectro (simulador solar e TGM), desta vez com as amostras misturadas ao material orgânico, embora a inativação seja mais eficiente na TGM para as doses menores, essa eficiência se estabiliza na faixa de 2% de inativação para doses superiores a $1 \text{ kJ}\cdot\text{m}^{-2}$, gerando uma curva de sobrevivência assintótica. Isso significa que apenas as camadas superficiais das amostras são sensibilizadas radiação. Para doses maiores, os efeitos causados pela irradiação com o simulador solar passam a ser mais intensos do que aqueles causados pela TGM (Figura 24).

A influência do empilhamento de células na sobrevivência foi evidenciada através de experimentos onde amostras contendo diferentes concentrações de células foram irradiadas com uma dose fixa de $600 \text{ J}\cdot\text{m}^{-2}$. Concentrações de células superiores a 10^6 células por amostra depositada em uma área de 20 mm^2 aumentaram muito a sobrevivência celular (Figura 25). Estes resultados confirmaram as previsões teóricas baseadas na razão entre a área de confinamento das amostras e o tamanho da célula de *D. radiodurans* ($2 \mu\text{m}$).

Numa outra abordagem experimental foram utilizadas células do mutante *recA* de *D. radiodurans*, deficiente na produção da proteína *recA* que é a mediadora do reparo de DSB por recombinação homóloga. Esse mutante é extremamente sensível às radiações. Mesmo assim, a proteção conferida pelas moléculas orgânicas foi evidenciada para diferentes fontes de radiação (Figuras 26 a 27).

Numa situação mais semelhante ao que seria esperado na natureza, células microbianas estariam associadas não só ao material orgânico do ambiente, mas também a detritos inorgânicos provenientes de substratos rochosos. Portanto, a proteção conferida por grãos de poeira (arenito ou basalto) foi investigada. É importante ressaltar que estes dois tipos de rochas compreendem dois extremos em termos de classificação geológica. A grande maioria dos meteoritos rochosos terá composição química entre esses dois extremos (Tabelas 8 e 9).

Células associadas a grãos de arenito, quando irradiadas com o simulador solar, são beneficiadas pela proteção física conferida pelos grãos tanto na presença como na ausência de moléculas orgânicas de maneira semelhante. Porém essa proteção é menor do que a proteção conferida apenas pelas moléculas orgânicas do meio de cultura (Figura 30). Os grãos de arenito são compostos por 93,72% de SiO_2 . Verificou-se que os grãos micrométricos são praticamente transparentes à luz visível. Segundo Cockell et al. (2003), a transmitância de UV-A e UV-B em camadas de rocha do tipo gneisse de $500 \mu\text{m}$ é superior a 80%. Certamente

os grãos de arenito menores que 20 μm utilizados nos nossos experimentos apresentam maiores níveis de transparência ao ultravioleta. Provavelmente, a associação das células com esse tipo de material favorece uma maior exposição à radiação do que as células misturadas apenas com meio de cultura.

Já as células misturadas com grãos de basalto, quando irradiadas com o simulador solar, são beneficiadas apenas quando associadas também com o material orgânico do meio de cultura, já que não foi possível recuperar nenhum sobrevivente associado apenas com os grãos de basalto irradiados com a menor dose testada (Figura 31). Curiosamente, nas menores doses, as células se beneficiam da proteção conferida pelos grãos de basalto associados ao meio de cultura, que é menor do que a proteção conferida apenas pelo meio de cultura. Mas para as doses maiores, grãos de basalto associados ao meio de cultura conferem um perfil assintótico para a curva de sobrevivência, estabilizando a inativação celular em torno de 0,1% até doses bem mais elevadas ($225 \text{ kJ}\cdot\text{m}^{-2}$), equivalentes a 30 minutos de exposição ao espectro solar real na órbita terrestre, referentes aos comprimentos de onda entre 200 nm e 400 nm Schuerger et al. (2003). Vale lembrar que, como a intensidade da radiação solar diminui de maneira proporcional ao quadrado da distância, na região da órbita de Marte por exemplo, uma dose de $225 \text{ kJ}\cdot\text{m}^{-2}$ seria equivalente a 1 h e 15 min de exposição ao espectro solar ($\lambda = 200\text{-}400 \text{ nm}$), obtendo-se valores de tempo de exposição cada vez maiores para órbitas mais distantes.

A sobrevivência da cianobactéria *Chroococcidiopsis* sp. à radiação ultravioleta foi investigada apenas utilizando a radiação monocromática com $\lambda = 254 \text{ nm}$ na linha de luz CD1 do Laboratório Síncrotron Astrid, na Dinamarca. As medidas de inativação das amostras de *Chroococcidiopsis* sp. foram obtidas através da verificação do tempo de início de crescimento após as irradiações. Entretanto, os dados obtidos são qualitativos, ou seja, refletem apenas a habilidade ou não de crescimento após diferentes períodos de incubação.

Quanto maior a dose administrada, maior o tempo necessário para que a proliferação celular seja detectável, o que reflete um menor número de células viáveis remanescentes. As amostras depositadas sobre fita de carbono não foram capazes de se proliferar, mesmo após 3 meses de incubação. Provavelmente, a presença de metais pesados contribuiu com efeitos citotóxicos. Como o inóculo dessa bactéria em meio de cultura BG-11 solidificado já representa um estresse adicional devido às impurezas contidas no Agar, é necessário utilizar técnicas mais laboriosas para a determinação da taxa de sobrevivência, como por exemplo o acompanhamento ao microscópio da proliferação celular através de contagem de células após cada dose administrada. De maneira complementar, outras técnicas associadas a análises ao microscópio também podem ser utilizadas, tais como a autofluorescência, a coloração do DNA com DAPI, etc (COCKELL et al., 2005).

Em relação ao biofilme preto proveniente da região de La Portada, no Chile, existem 3 explicações possíveis para os resultados observados: (i) a quantidade de amostras (10 mg) foi insuficiente para a detecção de microrganismos fototróficos viáveis provenientes de um ambiente tão hostil como o penhasco de La Portada, que recebe alta insolação e está sujeito a condições severas de dessecação; (ii) as condições de transporte das amostras do Chile ao Reino Unido, podem ter contribuído para diminuir a viabilidade dos microrganismos presentes nas amostras; (iii) os microrganismos fototróficos previamente observados ao microscópio fazem parte do grupo de microrganismos conhecidos como viáveis mas não cultiváveis. Desta forma, técnicas alternativas ao cultivo, tais como as análises ao microscópio podem ser utilizadas para a avaliação da sobrevivência deste tipo de amostras no futuro.

Os experimentos com o simulador solar e com a feixe da linha de luz B16 foram realizados à pressão ambiente e sob baixo vácuo, respectivamente. Portanto, um estudo para verificar os efeitos do vácuo encontrado na baixa órbita terrestre (LEO) foi realizado utilizando amostras de células livres ou associadas a grãos de arenito ou basalto e também

células misturadas com material orgânico do meio de cultura na presença ou ausência de grãos de arenito ou basalto (Figura 41). Verificou-se que a presença de moléculas orgânicas provenientes do meio de cultura é muito mais importante do que a associação das moléculas com os grãos. Na presença de moléculas orgânicas as células mantêm 100% de viabilidade até o maior tempo de exposição testado (28 dias), independentemente da presença de qualquer um dos grãos. Açúcares e polialcoois são conhecidos por ajudar a estabilizar a estrutura de macromoléculas celulares durante o vácuo induzido por desidratação (HORNECK et al., 2003), o que pode ter contribuído para as altas taxas de sobrevivência observadas nesses experimentos.

5.2. RAIOS-X

Grande parte da literatura sobre resistência à radiação ionizante de micróbios é baseada em sua exposição aos raios gama provenientes de radionuclídeos (LIU et al., 2003). O radionuclídeo mais acessível é o Co⁶⁰, que emite fótons de energias acima de MeV (1,17 e 1.33 MeV) em seu decaimento para Ni⁶⁰, seu isótopo estável. Atualmente, as instalações síncrotron são capazes de produzir feixes de raio X com alta luminosidade com energias de até algumas centenas de keV, sendo portanto uma ferramenta ideal para o estudo da sobrevivência de microrganismos ao feixe com essa faixa de energia. O uso de câmaras de vácuo acoplada às fontes de radiação síncrotron permite a investigação dos efeitos das radiações em pressões extremamente baixas, simulando o vácuo espacial.

Os resultados dos nossos experimentos com radiação síncrotron na linha de luz B16 do síncrotron Diamond, demandaram a adaptação de uma metodologia microbiológica clássica (diluição seriada e contagem de UFC em placas) às exigências técnicas impostas pela instrumentação disponível. As células foram depositadas sobre folhas de kapton, um material com alto nível de transparência a raios-X. Nessa situação, praticamente não há nenhuma

interação com o substrato. É como se as células estivessem flutuando no espaço, sofrendo apenas os efeitos da radiação e da interação da radiação com os grãos.

Inicialmente, os efeitos da interação dos grãos de arenito e basalto com as células microbianas, bem como a eficiência do desprendimento celular do substrato (folha de kapton) foram avaliados. A Tabela 19 e Figura 32 demonstram que os controles não submetidos à irradiação não sofrem nenhuma ação citotóxica pelos grãos e que as células são recuperadas do substrato de maneira muito eficiente. Os valores mais altos de recuperação celular para as células misturadas com os grãos são resultantes da heterogeneidade das amostras. Os grãos acabam carregando células associadas durante a pipetagem, resultando num leve aumento no número esperado de células viáveis.

Os experimentos foram divididos em 3 categorias, sendo: (i) irradiação com feixe branco (> 1 keV), (ii) irradiação com feixe monocromático (10 keV), (iii) investigação dos efeitos da taxa de dose para células desidratadas utilizando o feixe monocromático (10 keV).

Os resultados obtidos com o feixe branco mostraram que célula associadas a grãos de basalto são inativadas mais eficientemente do que células associadas a grãos de arenito ou células livres (Figura 33). Este padrão de resultado foi observado em todos os experimentos de irradiação, sendo ainda mais evidente para o feixe monocromático (Figura 34). A análise da composição molecular dos dois tipos de grãos revelou a presença de uma quantidade maior de elementos pesados nos grãos de basalto do que nos grãos de arenito (Tabelas 8 e 9). Provavelmente a interação de fôtons energéticos na faixa de raios-X duros com os grãos de basalto acaba levando a produção de foto-elétrons que contribuem para a inativação celular. Outra característica observada em todas as curvas de sobrevivência obtidas é novamente a tendência assintótica. Isso significa que para doses maiores, a eficiência de inativação seria menor.

As fluências utilizadas em nossos experimentos são comparáveis a fenômenos astronômicos conhecidos como *Soft Gamma Repeaters* – SGR (GALANTE e HORVATH, 2007). Essas fontes astrofísicas emitem pulsos regulares em raios-X, estando normalmente associadas a estrelas de nêutrons fortemente magnetizadas em rotação (magnetares) (Galante, 2009). No entanto, essas fontes apresentaram atividade esporádica muito mais intensa que a emissão regular, em eventos conhecidos como *flares* ou *giant flares*. A duração do evento de pico é de cerca de 0,2 s, com uma fase de decaimento de cerca de 400 s, modulada com periodicidade de cerca de 1 s, associada à rotação da estrela de nêutrons. A emissão durante o pico é muito mais dura que na fase de decaimento, chegando a 175 keV, em comparação com 10 keV da cauda (GALANTE, 2009).

Segundo Galante et al. (2009), a D_{10} de radiação ionizante para *D. radiodurans* é de $5,5 \text{ MJ m}^{-2}$. Entretanto, esses valores são obtidos com células em soluções aquosas. Em nossos experimentos, uma análise gráfica das curvas apresentadas na Figura 33 revelou que os valores de D_{10} para o feixe branco de raios-X ($> 1\text{keV}$) foram ligeiramente superiores, sendo 10 MJ m^{-2} para células livres, $12,34 \text{ MJ m}^{-2}$ para célula associadas a grãos de arenito e $7,8 \text{ MJ m}^{-2}$ para células associadas a grãos de basalto. Já para o feixe monocromático (10 keV) os valores de D_{10} foram 7 MJ m^{-2} para células livres, $1,8 \text{ MJ m}^{-2}$ para células associadas a grãos de arenito e $0,7 \text{ MJ m}^{-2}$ para células associadas a grãos de basalto. Essa diferença nos valores de D_{10} para as células associadas ou não com arenito ou basalto, irradiadas com o mesmo tipo de feixe, provavelmente são resultantes da produção diferencial de fotoelétrons pelos grãos. Já a diferença nos valores de D_{10} observada entre os dois tipos de feixe (branco e monocromático) pode ser causada por dois motivos: (i) a taxa de dose para a irradiação com feixe monocromático foi menor, maximizando a interação dos fótons com as amostras e levando a um maior nível de inativação celular. (ii) o feixe com fótons de 10 keV inativa o

material biológico de maneira mais eficiente do que o feixe contendo fótons também com outras energias. Essas duas hipóteses podem também ser complementares.

Numa tentativa de investigar a influência da taxa de dose na sobrevivência celular, foi realizada uma bateria de experimentos atenuando-se o feixe para 10% e 1%, e aumentando-se o tempo de irradiação em 10 e 100x para atingir um mesmo valor final de dose (Figura 35). Entretanto, comparando-se as Figuras 34 e 35, verificamos que as fluências utilizadas no experimentos sobre a taxa de dose foram mais de 100 vezes inferiores ao feixe monocromático. Como não houve inativação detectável, não foi possível investigar os efeitos da taxa de dose.

Os experimentos realizados com *Chroococcidiopsis* sp. foram ligeiramente diferentes (Tabela 20). As amostras foram irradiadas em pressão levemente positiva de N₂ para minimizar a quantidade de umidade presente no interior da câmara. Além disso as amostras foram misturadas com os grãos divididos em 3 faixas de tamanho para cada um dos dois tipos de grãos mais uma mistura 1:1 entre eles. As fluências utilizadas com *Chroococcidiopsis* sp. foram maiores porque não foi utilizado nenhum atenuador. Mesmo assim, as células foram capazes de apresentar proliferação celular após 51 dias de incubação nas amostras misturadas com os menores grãos de arenito (Tabela 20). Com relação ao tamanho, grãos menores favorecem a sobrevivência à desidratação devido a formação de microambientes preservantes. Com relação ao tipo, grãos de arenito provavelmente produzem menos foto-elétrons do que grãos de basalto. Entretanto, novos experimentos devem ser realizados para obter respostas mais conclusivas.

5.3 PARTICULAS CARREGADAS

Estudos sobre a irradiação de partículas carregadas de baixa energia em plantas e microrganismos, especialmente com energias no intervalo entre 1 e centenas de keV tem

despertado grande interesse (YANG et al., 1991; YU , 1998). Ao utilizar essa radiação de baixa energia, é mais fácil desenvolver traços biotecnológicos importantes (HUANG e YU, 2007). A irradiação com partículas carregadas de baixa energia também vem sendo investigada para possível aplicação no tratamento do câncer (MATSUSHITA et al., 2006; KAMADA et al., 2002) e procedimentos de esterilização de materiais na indústria médica (RABALLAND et al., 2008). Além de sua aplicação em biotecnologia, a irradiação com íons de baixa energia é útil para estudar os efeitos da radiação espacial em microrganismos extremófilos, utilizando instalações de simulação espacial.

A população de íons de baixa energia dos raios cósmicos no meio interplanetário é essencialmente devido ao vento solar e partículas aceleradas por energia magnética lançado em explosões solares (STRAZZULLA et al., 1995). Íons do vento solar são produzidos por uma expansão de plasma e atingem velocidades supersônicas a uma distância de poucos raios solares, cerca de $400 \text{ km}\cdot\text{sec}^{-1}$ (ie, íons com energias de 1 keV/amu são lançados). A 150 milhões de km (1 unidade astronômica - U.A.) a densidade do vento é da ordem de $5 \text{ prótons}\cdot\text{cm}^{-3}$, correspondente a um fluxo de aproximadamente 2×10^8 . Com a queda do fluxo inversamente proporcional ao quadrado da distância, um fluxo de $10^{17} \text{ prótons}\cdot\text{cm}^{-2}$ pode alcançar a superfície de um asteróide hipotético em apenas 100 anos (STRAZZULLA et al., 1995).

Em nossos experimentos de irradiação com prótons de 200 keV, verificamos que células de *D. radiodurans* começam a ser inativadas com doses acima de $10^9 \text{ prótons}\cdot\text{cm}^{-2}$ (Figura 40). Além disso, grãos micrométricos são capazes de proteger as células contra esse tipo de radiação, já que o poder de penetração das partículas foi estimado em 2,83 μm (Figura 39). Através de análise gráfica da Figura 40 é possível observar que a D_{10} para células livres (NC) é de $10^{10} \text{ prótons}\cdot\text{cm}^{-2}$, correspondente a pouco mais de 1 kGy. Apesar de não haver diferença na proteção conferida por qualquer um dos tipos de grãos utilizados, a

sobrevivência celular foi diferente dependendo do tipo de substrato análogo a poeira cósmica (CDA) sobre os quais as células foram depositadas. Provavelmente a presença do elemento ferro na fayalita contribuiu para a inativação celular.

Ao contrário da inativação observada com feixe de prótons de 200 keV, os experimentos de irradiação tanto com feixe de elétrons de 2 keV como com feixe de íons carbono de 4 keV mostraram que células livres ou misturadas com qualquer um dos dois tipos de grãos testados não são inativadas, mesmo para doses superiores a 10^{16} elétrons·cm $^{-2}$ sec $^{-1}$ e 10^{15} íons·cm $^{-2}$ sec $^{-1}$ (Figuras 36 e 41).

Os efeitos de partículas de baixa energia sobre microrganismos não foram completamente investigadas sob condições simuladas do espaço. Em condições de laboratório, tem sido demonstrado que radiações particuladas resulta em menos morte de células do que o observado para outras formas de radiação, mesmo que à custa do aumento das taxas de mutação (YU, 1993). Aparentemente, o risco biológico de tais radiações está relacionado à sua deposição de energia, altamente localizada. A inativação se restringe às células localizadas na trajetória das partículas (HORNECK et al., 1994), e a intensidade do dano depende da Transferência Linear de Energia (LET) (KOZUBEK et al., 1995). Por outro lado, eventos mutagênicos podem ser causados se ocorrerem danos nas proximidades do material genético. Elétrons de baixa energia parecem interagir com sítios específicos no DNA por mecanismos de ressonância (WINSTEAD e MCKOY, 2008), e o sistema de reparo por junção de terminações não homólogas (NHEJ) foi demonstrado por (MOELLER et al., 2008) ser o principal mecanismo no reparo de quebras no DNA induzidas pelo bombardeamento de partículas em *Bacillus subtilis*.

Os efeitos de partículas com energias mais elevadas tem sido estudados em uma variedade de experimentos tanto no ambiente espacial, como em aceleradores de partículas (HORNECK et al., 2010). Esporos de *B. subtilis* são bastante utilizados desde a década de

1970 como dosímetros biológicos em escala micrométrica para determinar a eficiência biológica radial ao longo da trajetória individual de partículas carregadas altamente energéticas (HZE). Com este propósito, foi desenvolvido o Biostack, que consiste em um sanduíche de monocamadas de esporos bacterianos montado sobre folhas de nitrato de celulose como detectores visuais da trajetória das partículas (HORNECK, 1993; BUCKER e HORNECK, 1975). Nos experimentos espaciais, após o retorno do espaço (Apollo Soyuz Test Project e uma missão no Spacelab), a viabilidade de cada esporo nos arredores da trajetória de uma partícula HZE foi analisada separadamente por microscopia, micromanipulação dos esporos em agar nutriente seguido de incubação. A fluênciaria diária de 0,3-0,7 partículas HZE·cm⁻², com uma transferência linear de energia (LET) $\geq 130 \text{ keV}\cdot\mu\text{m}^{-1}$, foi medida pela contagem das marcas nos detectores (HORNECK et al., 2010).

Os resultados destes experimentos sugerem dois efeitos complementares para a inativação de esporos por partículas HZE: um efeito de curto alcance a uma distância radial de 0,2 μm da trajetória da partícula HZE que pode ser atribuído aos efeitos de elétrons secundários (raios gama), e um efeito de longo alcance, que se estende a uma distância de 3,8 μm , para o qual outros mecanismos, tais como ondas de choque ou eventos termofísicos têm sido sugeridos (HORNECK, 1993, 2007; NICHOLSON et al., 2000). Note-se que no efeito de longo alcance, os esporos, com cerca de 1 μm de diâmetro cada um, não são diretamente atingidos pelas partículas HZE. Tal fenômeno, que é um efeito biológico induzido em células que não são diretamente atravessadas por uma partícula carregada, mas estão em estreita proximidade com as células atingidas, conhecido como efeito *bystander*, já foi associado a uma variedade de consequências biológicas, tais como a inativação, mutagênese e aberrações cromossômicas em células de mamíferos utilizando micro-feixes estreitos de radiação particulada (MORGAN, 2003). Recentemente, efeitos *bystander* também foram observados *in vivo* em ratos parcialmente expostos a raios-X (MANCUSO et al., 2008). Desta forma, os

efeitos bystander podem acarretar severas consequências para a saúde dos astronautas, porque podem aumentar o risco de indução de câncer (MOTHERSILL e SEYMOUR, 2004; PERSAUD et al., 2005).

Em relação ao aumento da mutagênese, estudos feitos com esporos de *B. subtilis* expostos a feixes de íons pesados altamente energéticos têm mostrado um aumento da frequência de mutação, com base na resistência a diversos agentes químicos, por exemplo, a azida de sódio e o ácido nalidíxico, aumentando com a dose aplicada e com o aumento da LET (BALTSCHUKAT et al., 1986; BALTSCHUKAT e HORNECK, 1991; HORNECK et al., 1994; MUNAKATA et al., 1997). Relatos de mutações em *gyrA*, gene que codifica a subunidade A da DNA girase, resultando em resistência ao ácido nalidíxico, corresponde à indução de uma única troca de base em um alelo particular de *gyrA* (*GyrA12*; 5'-CA para 5'-TT), após irradiação com UV, UVV, radiação gama e raios-X moles (MUNAKATA et al., 1997). Moeller et al. (2010) estudaram a mutagenicidade do gene *rpoB* após a exposição de *B. subtilis* a raios-X e íons pesados de alta energia. Mutações no gene *rpoB* têm efeitos dramáticos na fisiologia geral microbiana, mas correspondem a eventos não-letais. No entanto, vale ressaltar que mutações letais são muito comuns após a exposição a raios-X e irradiação com partículas HZE. Este tipo de mutação leva à inativação do esporos irradiados. Uma das mutações mais investigadas em *B. subtilis* é a perda da capacidade de esporulação individual, a chamada mutação para esporulação defeituosa (*Spo⁻*), conforme detalhada por FAJARDO-CAVAZOS et al., 2005. Embora a detecção de mutantes *Spo⁻* por inspeção visual da morfologia e pigmentação da colônia seja bastante simples, as informações sobre a natureza e o tipo de mutações em células *Spo⁻* não estão disponíveis. Mesmo sabendo-se que a perda da esporulação é uma mudança drástica no ciclo de vida das células de *B. subtilis*, continua a necessidade de se investigar se, e em que medida, os mutantes defectivos em esporulação são induzidos por irradiação com raios-X e partículas HZE. Deve ser notado que

em *B. subtilis*, os genes envolvidos na esporulação representam quase 5% do genoma (MAUGHAN et al., 2004).

Além do aspecto da indução de mutações letais, deve notar-se que mutações benéficas também podem ser induzidas (RAINEY, 1999; PERFEITO et al., 2007). Mutações benéficas são conhecidas por aumentar o valor adaptativo de microrganismos, tais como uma maior adaptação ao ambiente extremo (por exemplo, temperatura, salinidade, pressão), resistência específica a produtos químicos (por exemplo, antibióticos), e novas vias metabólicas (HALL e ZUZEL, 1980; BENNETT et al., 1992; PAPADOPoulos et al., 1999; IMHOFF e SCHLÖTTERER, 2001). Deste modo, as mutações benéficas têm um profundo impacto sobre as implicações para o transporte de microrganismos terrestres por impactos naturais (litopanspermia) ou pela exploração planetária através de missões tripuladas ou robóticas (proteção planetária).

5.4. ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS RESISTENTES ÀS CONDIÇÕES MARCIANAS

A busca *in situ* por vida no planeta Marte requer uma compreensão dos possíveis habitats disponíveis e os tipos de microrganismos possíveis de serem encontrados nesses ambientes (KUHLMAN et al., 2005). O deserto do Atacama, no Chile, é considerado um ambiente análogo ao planeta Marte devido a parâmetros como umidade extremamente baixa e intensa radiação UV solar (NAVARRO-GONZALEZ et al., 2003; CONNON et al., 2007).

Sua localização compreende a parte hiper-árida do deserto Peru-Chile, sendo que a parte chilena se estende entre 1°N e 37°S, incorporando o arco peruano, o norte do Chile e parte da cordilheira ocidental (HARTLEY et al., 2005). A desertificação na parte ocidental da América do Sul é induzida principalmente por fenômenos atmosféricos subtropicais anticiclônicos.

Isso é reforçado pela presença da corrente fria de Humboldt ao longo da costa oeste da América do Sul, que evita precipitação nas regiões costeiras. Um outro fator regulador é a presença da Cordilheira dos Andes, que aumenta a precipitação no lado leste e diminui no lado oeste. Ainda, a extensão da área continental impede que os ventos úmidos avancem no interior do continente.

A ausência de nuvens contribui para a ocorrência de altos níveis de insolação em toda a extensão do Atacama. Eventuais microrganismos presentes na superfície Marciana estão sujeitos à exposição constante a grandes fluxos de luz UV altamente deletérios (COCKELL, 2001). Na superfície marciana, altos níveis de radiação UV-C atingem a superfície (SCHUERGER et al., 2003), ao contrário do que ocorre na Terra, onde o espectro solar correspondente a comprimentos de onda inferiores a 300 nm é attenuado pela atmosfera, particularmente pela camada de ozônio.

As amostras utilizadas neste estudo foram coletadas em regiões distintas do deserto do Atacama (Figura 1). Laguna Llamara (amostra 1) é um depósito de sal localizado no norte do Chile, onde é possível encontrar tapetes microbianos compostos por cianobactérias presentes abaixo das camadas de sal (DEMERCASSO et al., 2003). O depósito de quartzo (amostra 2) é bem próximo ao depósito de gipsita (amostra 4), numa região montanhosa ao sul de Antofagasta. O sítio correspondente à amostra 3 se localiza ao norte de Antofagasta, onde existe um penhasco recoberto por um biofilme preto numa região conhecida como La Portada. O sítio 3 S4, correspondente à amostra 5 é provavelmente a região mais árida do planeta, atingindo valores nulos de umidade relativa (NAVARRO-GONZALEZ et al., 2003).

Apesar das condições inóspitas desses ambientes, nossos dados revelaram uma abundância surpreendente de microrganismos cultiváveis em todas as amostras (Figura 46). Além disso, a análise da diversidade microbiana por amplificação do gene 16S RNAr e

Eletroforese em Gel com Gradiente de Desnaturação (DGGE) revelou a presença de comunidades microbianas complexas e bem distintas entre as amostras (Figura 52).

A irradiação das amostras de solo com $300 \text{ J}\cdot\text{m}^{-2}$ de UV-C revelou a presença de um grande número de microrganismos fotoresistentes (Figuras 47 e 49). Muitos deles apresentaram pigmentação variando do amarelo ao alaranjado (Figura 48). Estes foram isolados, cultivados e submetidos a uma nova etapa de irradiação em solução salina (NaCl 0,9%) sem a interferência de partículas do solo. Dos 40 isolados pigmentados capazes de crescer em meio líquido, 14 foram submetidos a identificação molecular (Tabela 21). A predominância de espécies do gênero *Bacillus* e *Pseudomonas* é compreensível, já que a própria metodologia de isolamento favorece a seleção de microrganismos formadores de esporos. Entretanto, todos os ambientes em que as amostras foram coletadas também favorece a ocorrência de um grande número de microrganismos esporulantes. Para acessar o número de esporos presentes na amostra inicial, é necessário submetê-las a um tratamento por 10 min a 80°C seguido de plaqueamento, contagem de colônias e comparação com as amostras não tratadas. Apenas os esporos resistirão a este tratamento.

O isolado S3.300-2, identificado como *Bacillus* sp., o mais resistente dentre os isolados neste estudo, apresentou um perfil intermediário de resistência ao UV-C (Figura 51). Mesmo assim, o valor de D_{10} ($318 \text{ J}\cdot\text{m}^{-2}$) foi dez vezes superior ao de *E. coli* ($30 \text{ J}\cdot\text{m}^{-2}$). Vale ressaltar que não foi utilizado nenhum pré-tratamento para induzir esporulação. Portanto, esse microrganismo foi irradiado na sua forma vegetativa. Novos testes são necessários para acessar seu perfil de resistência ao UV-C na sua forma esporulada.

Em relação ao isolamento de microrganismos resistentes à atmosfera marciana, apenas a amostra 3 (Capa Negra La Portada) foi utilizada. Trata-se de um biofilme epilítico (que cresce sobre rochas) com cobertura notavelmente negra. Vários procedimentos de incubação em diferentes meios de cultura e até mesmo em soluções contendo o próprio substrato

rochoso em diferentes concentrações foram realizados em tentativas frustradas de recuperar tanto microrganismos fototróficos como heterotróficos.

Curiosamente, uma colônia com pigmentação avermelhada foi isolada apenas em uma amostra exposta à atmosfera, pressão e temperatura marcianas por 4 dias. As amostras controle não revelaram nenhuma colônia pigmentada. A incubação foi feita em condições ambientais em meio oligotrófico contendo apenas triptona 0,1% ou extrato de levedura 0,1%. A colônia pigmentada surgiu após 1 semana de incubação apenas no meio contendo extrato de levedura. Através de análise molecular, este isolado foi identificado como *Modestobacter* sp., uma actinobactéria tipicamente oligotrófica (Figura 53 e Tabela 22).

O isolamento de microrganismos a partir de amostras naturais, contendo comunidades microbianas, através de exposição a parâmetros físico-químicos combinados de ambientes extraterrestres, constitui ferramenta fundamental para o isolamento de novos microrganismos com diferentes aplicações (OLSSON-FRANCIS e COCKELL, 2010). Na exploração espacial por exemplo, o conhecimento da sobrevivência microbiana em ambientes extraterrestres pode ser aplicado no desenvolvimento de sistemas autoreguladores de manutenção biológica, controle de partículas em suspensão no ar, produção de biocombustível, e desenvolvimento de instrumentos capazes de detectar vida em outros planetas. Além disso, esses estudos tem contribuído para o desenvolvimento de normas internacionais de proteção planetária. (OLSSON-FRANCIS e COCKELL, 2010).

6. CONCLUSÕES

Apesar das dificuldades técnicas enfrentadas em boa parte dos experimentos, os resultados obtidos demonstram o sucesso do projeto, uma vez que todos os objetivos propostos foram alcançados. Os principais resultados obtidos demandaram inovações nas abordagens experimentais, integrando técnicas de física experimental e biologia de microrganismos. As novas técnicas desenvolvidas permitem uma série de novos estudos a respeito da sobrevivência microbiana em condições que simulam longos períodos em ambientes extraterrestres. As principais conclusões do projeto foram:

- 1- Células microbianas protegidas por partículas micrométricas ou por uma camada micrométrica de moléculas orgânicas contra a radiação ultravioleta (UV) e ultravioleta de vácuo (UVV), se beneficiam da proteção e permanecem viáveis por longos períodos de tempo.
- 2- Em relação a sobrevivência à desidratação e ao vácuo (10^{-5} Pa), a presença de compostos orgânicos nas amostras evita a perda de viabilidade celular por várias semanas, e é mais importante do que eventuais microambientes preservados em grãos micrométricos.
- 3- Grãos com dimensões micrométricas afetam a sobrevivência microbiana após irradiação aguda com feixe de raios-X em condições de baixo vácuo (200 Pa). Provavelmente este efeito é devido a produção de fotoelétrons pela interação da radiação com os grãos, já que este fenômeno foi mais evidente para os grãos de basalto, que apresentam muito mais elementos pesados em sua composição.

4- Ao contrário do que ocorre com a irradiação eletromagnética ionizante, os grãos micrométricos são capazes de proteger células microbianas contra a irradiação com feixe de partículas carregadas (elétrons, prótons e íons de carbono) com energias comparáveis às do vento solar, independentemente do tipo dos grãos.

5- A inativação microbiana por irradiação com partículas carregadas é muito mais dependente da energia do que do fluxo das partículas, sendo que partículas de baixa energia, comparáveis às do vento solar, não são capazes de inativar células de *D. radiodurans*, mesmo com fluências equivalentes a centenas de anos de exposição.

6- Células depositadas em substrato contendo o elemento ferro na sua composição molecular são inativadas mais eficientemente do que aquelas depositadas em substrato contendo magnésio no lugar do ferro. Este resultado parece corroborar a hipótese de que elementos pesados podem contribuir para a inativação celular via produção de elétrons secundários após tratamento com radiação ionizante.

7- A utilização de instalações que simulam ambientes extraterrestres para o isolamento de novos microrganismos se mostrou eficiente, e representa uma boa ferramenta para a utilização de recursos biológicos com possíveis aplicações em diferentes setores.

8- O conjunto de dados experimentais é favorável a uma versão da hipótese da Panspermia, em que formas microscópicas de sistemas biológicos minimamente protegidos em grãos de poeira, são capazes de permanecer viáveis em diferentes regiões da galáxia até serem interceptados por corpos com ambientes favoráveis à sua proliferação, contribuindo para uma transferência horizontal de genes em nível galáctico.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSON, A. W; NORDAN, H. C.; CAIN, R. F.; PARRISH, G.; DUGGAN, D. Studies on a radio-resistant micrococcus. I. isolation, morphology, cultural characteristics, and resistance to gamma radiation. *Food Technology*, 10, 575-578, 1956.
- ARRHENIUS, S. Die Verbreitung des Lebens im Weltenraum. *Umschau*, v. 7, p. 481–485, 1903.
- ASHWOODS, M. J.; COPELAND, J.; WILCOCKS, J. Response of bacterial spores and *Micrococcus radiodurans* to ultraviolet irradiation at low temperatures. *Nature*, 217(5126), 337-338, 1968.
- BAGLIONE, P. SABBATINI, M., HORNECK, G. Astrobiology experiments in Low Earth Orbit: Facilities, Instrumentation, and Results. In: HORNECK, G. e RETTBERG, P. (eds.), Complete Course in Astrobiology. Wiley, VCH, Weinheim, pp. 273-319, 2007.
- BALTSCHUKAT, K.; HORNECK, G. Responses to accelerated heavy-ions od spores of *Bacillus subtilis* of different repair capacity. *Radiation and Environmental Biophysics*, 30(2), 87-103, 1991.
- BALTSCHUKAT, K.; HORNECK, G.; BUCKER, H.; FACIUS, R.; SCHAFER, M. Mutation-induction in spores of *Bacillus subtilis* by accelerated very heavy-ions. *Radiation and Environmental Biophysics*, 25(3), 183-187, 1986.
- BARATTA, G. A.; DOMINGO, M.; FERINI, G.; LETO, G.; PALUMBO, M. E.; SATORRE, M. A.; STRAZZULLA, G. Ion irradiation of CH₄-containing icy mixtures. *Nuclear Instruments & Methods in Physics Research Section B-Beam Interactions with Materials and Atoms*, 209, 283-287, 2003.
- BATTISTA, J. R. Against all odds: The survival strategies of *Deinococcus radiodurans*. *Annual Review of Microbiology*, 51, 203-224, 1997.
- BATTISTA, J. R.; PARK, M. J.; MCLEMORE, A. E. Inactivation of two homologues of proteins presumed to be involved in the desiccation tolerance of plants sensitizes *Deinococcus radiodurans* R1 to desiccation. *Cryobiology*, 43(2), 133-139, 2001.
- BENNETT, A. F.; LENSKI, R. E.; MITTLER, J. E. Evolutionary adaptation to temperature 1. Fitness of *Escherichia coli* to changes in its thermal environment. *Evolution*, 46(1), 16-30, 1992.
- BERTALAN, I.; ESPOSITO, D.; TORZILLO, G.; FARALONI, C.; JOHANNINGMEIER, U.; GIARDI, M. T. Photosystem II stress tolerance in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii* under space conditions. *Microgravity Science and Technology*, 19(5-6), 122-127, 2007.
- BROCK, T. D.; FREEZE, H. *Thermus aquaticus* sp. n. and gen. n. a non-sporulating extreme thermophile. *Journal of Bacteriology*, 98(1), 289-287, 1969.

BUCKER, H.; G. HORNECK. Studies on the effects of cosmic HZE particles in different biological systems in the Biostack experiments I and II, flown on board of Apollo 16 and 17, p. 1138–1151. In O. F. Nygaard, H. I. Adler, and W. K. Sinclair (ed.), Radiation research. Academic Press, New York, NY, 1975.

BURCHELL, M. J.; MANN, J. R.; BUNCH, A. W. Survival of bacteria and spores under extreme shock pressures. *Monthly Notices of The Royal Astronomical Society*, 352(4), 1273-1278, 2004.

COCKELL, C. S. The Martian and extraterrestrial UV radiation environment Part II: further considerations on materials and desiccation. Criteria for artificial ecosystems. *Acta Astronautica*, 49(11), 631-640, 2001.

COCKELL, C. S.; BRACK, A.; WYNN-WILLIAMS, D. D.; BAGLIONI, P.; BRANDSTATTER, F.; DEMETS, R.; EDWARDS, H. G. M.; GRONSTAL, A. L.; KURAT, G.; LEE, P.; OSINSKI, G. R.; PEARCE, D. A.; PILLINGER, J. M.; ROTEN, C. A.; SANCISI-FREY, S. Interplanetary transfer of photosynthesis: an experimental demonstration of a selective dispersal filter in planetary island biogeography. *Astrobiology*, 7(1), 1-9, 2007.

COCKELL, C. S.; RETTBERG, P.; HORNECK, G.; SCHERER, K.; STOKES, M. D. Measurements of microbial protection from ultraviolet radiation in polar terrestrial Microhabitats. *Polar Biology*, 26(1), 62-69, 2003.

COCKELL, C. S.; SCHUERGER, A. C.; BILLI, D.; FRIEDMANN, E. I.; PANITZ, C. Effects Of a simulated martian UV flux on the Cyanobacterium, *Chroococcidiopsis* Sp 029. *Astrobiology*, 5(2), 127-140, 2005.

CONNON, S. A.; LESTER, E. D.; SHAFAAT, H. S.; OBENHUBER, D. C.; PONCE, A. Bacterial diversity in hyperarid Atacama Desert Soils. *Journal of Geophysical Research-Biogeosciences*, 112, G4, 2007.

COX, M. M.; BATTISTA, J. R. *Deinococcus radiodurans* - The Consummate Survivor. *Nature Reviews Microbiology*, 3(11), 882-892, 2005.

D'HONDT, S.; JORGENSEN, B. B.; MILLER, D. J.; BATZKE, A.; BLAKE, R.; CRAGG, B. A.; CYPIONKA, H.; DICKENS, G. R.; FERDELMAN, T.; HINRICHES, K. U.; HOLM, N. G.; MITTERER, R.; SPIVACK, A.; WANG, G. Z.; BEKINS, B.; ENGELEN, B.; FORD, K.; GETTEMY, G.; RUTHERFORD, S.; D. SASS, H.; SKILBECK, C. G.; AIELLO, I. W.; GUERIN, G.; HOUSE, C. H.; INAGAKI, F.; MEISTER, P.; NAEHR, T.; NIITSUMA, S.; PARKES, R. J.; SCHIPPERS, A.; SMITH, D. C.; TESKE, A.; WIEGEL, J.; PADILLA, C. N.; ACOSTA, J. L. S. Distributions of microbial activities in deep subseafloor sediments. *Science*, 306(5705), 2216-2221, 2004.

DALY, M. J.; GAIDAMAKOVA, E. K.; MATROSOVA, V. Y.; VASILENKO, A.; ZHAI, M.; LEAPMAN, R. D.; LAI, B.; RAVEL, B.; LI, S. M. W.; KEMNER, K. M.; FREDRICKSON, J. K. Protein oxidation implicated as the primary determinant of bacterial radioresistance. *Plos Biology*, 5(4), 769-779, 2007.

DALY, M. J. Engineering radiation-resistant bacteria for environmental biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, 11(3), 280-285, 2000.

DALY, M. J. GAIDAMAKOVA, E. K. MATROSOVA, V. Y. VASILENKO, A. ZHAI, M. VENKATESWARAN, A. HESS, M. OMELCHENKO, M. V. KOSTANDARITHES, H. M. MAKAROVA, K. S. WACKETT, L. P. FREDRICKSON, J. K. GHOSAL, D. Accumulation Of Mn(II) In, *Deinococcus radiodurans* facilitates gamma-radiation resistance. *Science*, 306(5698), 1025-1028, 2004.

DALY, M. J. LING, O. Y. FUCHS, P. MINTON, K. W. In-vivo damage and RecA-Dependent Repair of plasmid and chromosomal DNA in the radiation-resistant bacterium *Deinococcus radiodurans*. *Journal of Bacteriology*, 176(12), 3508-3517, Jun 1994.

DE LA TORRE, R.; SANCHO, L. G.; HORNECK, G.; RETTBERG, P.; ASCASO, C.; DE LOS RIOS, A.; WIERZCHOS, J.; DE VERA, J. P.; OTT, S.; COCKELL, C.; OLSSON, K.; FRIAS, J. M. DEMETS, R. Testing the Lithopanspermia theory in the Foton-M3 mission: Simulation of Interplanetary Transfer and re-entry process of epi- and endolithic microbial communities with the Lithopanspermia experiment. *Origins of Life and Evolution of the Biosphere*, 39(3-4), 356-357, 2009.

DEMERICASSO, C., CHONG, G., GALLEGUILLOS, P., ESCUDERO, L., MARTÍNEZ-ALONSO, M., ESTEVE, I. Tapetes Microbianos Del Salar De Llamará, Norte De Chile. *Revista Chilena De Historia Natural*, 76, 485-499, 2003.

DOSE, K. BIEGERDOSE, A. DILMANN, R. GILL, M. KERZ, O. KLEIN, A. MEINERT, H. NAWROTH, T. RISI, S. STRIDDE, C. Era-Experiment Space Biochemistry. *Eureka Scientific Results*, 16(8), 119-129, 1995.

DOSE, K.; BIEGERDOSE, A.; DILMANN, R.; GILL, M.; KERZ, O.; KLEIN, A.; STRIDDE, C. UV Photobiochemistry under space conditions. *Life Sciences: Space and Mars recent results*, 18(12), 51-60, 1996.

DREIBUS, G.; WANKE, H. Mars, A Volatile-Rich Planet. *Meteoritics*, 20(2), 367-381, 1985.

FAJARDO-CAVAZOS, P.; LINK, L.; MELOSH, H. J.; NICHOLSON, W. L. *Bacillus subtilis* spores on artificial meteorites survive hypervelocity atmospheric entry: Implications for lithopanspermia. *Astrobiology*, 5(6), 726-736, 2005.

FAJARDO-CAVAZOS, P.; LANGENHORST, F.; MELOSH, H. J.; NICHOLSON, W. L. Bacterial spores in granite survive hypervelocity launch by spallation: Implications for Lithopanspermia. *Astrobiology*, 9(7), 647-657, 2009.

FOUCHER, F.; WESTALL, F.; BRANDSTATTER, F.; DEMETS, R.; PARRELL, J.; COCKELL, C. S.; EDWARDS, H. G. M.; BENY, J. M.; BRACK, A. Testing the survival of microfossils in artificial martian sedimentary meteorites during entry into Earth's atmosphere: The STONE 6 experiment. *Icarus*, 207(2), 616-630, 2010.

FRITZ, J.; ARTEMIEVA, N.; GRESHAKE, A. Ejection of Martian meteorites. *Meteoritics & Planetary Science*, 40(9-10), 1393-1411, 2005.

GALANTE, D. Efeitos Astrofísicos e Astrobiológicos de *Gama-Ray Bursts*. Tese de Doutorado. Instituto de Astronomia, Geofísica e Ciências Atmosféricas, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2009.

GALANTE D., HORVATH, J. E. Biological effects of *Gamma-Ray Bursts*: distances for severe damage on biota. *International Journal Of Astrobiology*, 6(1), 19-26, 2007.

GHOSAL, D.; OMELCHENKO, M. V.; GAIDAMAKOVA, E. K.; MATROSOVA, V. Y.; VASILENKO, A.; VENKATESWARAN, A.; ZHAI, M.; KOSTANDARITHES, H. M.; BRIM, H.; MAKAROVA, K. S.; WACKETT, L. P.; FREDRICKSON, J. K.; DALY, M. J. How radiation kills cells: Survival of *Deinococcus radiodurans* and *Shewanella oneidensis* under oxidative stress. *FEMS Microbiology Reviews*, 29(2), 361-375, 2005.

HALL, B. G.; ZUZEL, T. Evolution of a new enzymatic function by recombination within a gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences*, 77(6), 3529-3533, 1980.

HARTLEY, A. J.; CHONG, G.; HOUSTON, J.; MATHER, A. E. 150 Million years of climatic stability: evidence from the Atacama Desert, Northern Chile. *Journal of the Geological Society*, 162, 421-424, 2005.

HE, Y. High cell density production of *Deinococcus radiodurans* under optimized conditions. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 36(4), 539-546, 2009.

HIRAGI, Y. Physical, chemical and morphological studies of spore coat of *Bacillus subtilis*. *Journal of General Microbiology*, 72, 87, 1972.

HORNECK, G. European activities in exobiology in earth orbit: results and perspectives. *Life Sciences: Exobiology*, v. 23, n. 2, p. 381-386, 1999.

HORNECK, G.; MILEIKOWSKY, C.; MELOSH, H.J.; WILSON, J.W.; CUCCINOTA, F.A.; GLADMAN, B., Viable transfer of microorganisms in the solar system and beyond. In: HORNECK, G., BAUMSTARK-KHAN, C. (Eds.), *Astrobiology: The quest for the conditions of life*. Springer, New York, Pp. 57-76, 2003.

HORNECK, G.; KLAUS, D. M.; MANCINELLI, R. L. Space Microbiology. *Microbiology and Molecular Biology Review*, 74(1), 121-156, 2010.

HORNECK, G.; BUCKER, H.; REITZ, G. Long-term survival of bacterial spores in space. *Life Sciences and Space Research*, 14(10) 41-45, 1994a.

HORNECK, G.; KRASAVIN, E. A.; KOZUBEK, S. Mutagenic effects of heavy-ions in bacteria. *Life Sciences and Space Research*, 14(10), 315-329, 1994b.

HORNECK, G. RETTBERG, P. REITZ, G. WEHNER, J. ESCHWEILER, U. STRAUCH, K. PANITZ, C. STARKE, V. BAUMSTARK-KHAN, C. Protection of bacterial spores in space, a contribution to the discussion on Panspermia. *Origins of Life and Evolution of the Biosphere*, 31(6), 527-547, 2001a.

HORNECK, G.; STOFFLER, D.; ESCHWEILER, U.; HORNEMANN, U. Bacterial spores survive simulated meteorite impact. *Icarus*, 149(1), 285-290, 2001b.

HORNECK, G.; STOFFLER, D.; OTT, S.; HORNEMANN, U.; COCKELL, C. S.; MOELLER, R.; MEYER, C.; DE VERA, J. P.; FRITZ, J.; SCHADE, S.; ARTEMIEVA, N. A. Microbial rock inhabitants survive hypervelocity impacts on Mars-like host planets: First phase of Lithopanspermia experimentally tested. *Astrobiology*, 8(1), 17-44, 2008.

HORNECK, G. Space radiation biology, p. 243–273. In E. Brinckmann (ed.), *Biology in space and life on Earth*. Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 2007.

HORNECK, G. The Biostack concept and its application in space and at accelerators: studies in *Bacillus subtilis* spores, p. 99–115. In C. E. Swenberg, G. Horneck, and E. G. Stassinopoulos (ed.), *Biological effects and physics of solar and galactic cosmic radiation*, part A. Plenum Press, New York, NY, 1993.

HUANG, W. D.; YU, Z. L. A dose-survival model for low energy ion irradiation. *International Journal of Radiation Biology*, 83(2), 133-139, 2007.

IMHOF, M.; SCHLÖTTERER, C. Fitness effects of advantageous mutations in evolving *Escherichia coli* populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(3), 1113-1117, 2001.

ITO, T.; KOBAYASHI, K.; ITO A. Effects of broad-band Vacuum-UV synchrotron radiation on wet yeast-cells. *Radiation Research*, 82(2), 364-373, 1980.

JACOBS, J. L.; CARROLL, T. L.; SUNDIN, G. W. The role of pigmentation, ultraviolet radiation tolerance, and leaf colonization strategies in the epiphytic survival of phyllosphere bacteria. *Microbial Ecology*, 49(1), 104-113, 2005.

KAMADA, T.; TSUJII, H.; TSUJI, H.; YANAGI, T.; MIZOE, J.; MIYAMOTO, T.; KATO, H.; YAMADA, S.; MORITA, S.; YOSHIKAWA, K.; KANDATSU, S.; TATEISHI, A. Efficacy and safety of carbon ion radiotherapy in bone and soft tissue sarcomas. *Journal of Clinical Oncology*, 20(22) 4466-4471, 2002.

KIMURA, H.; ASADA, R.; MASTA, A.; NAGANUMA, T. Distribution of microorganisms in the subsurface of the manus basin hydrothermal vent field in Papua new guinea. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(1), 644-648, 2003.

KOPYLOV, V. M.; BONCHOSMOLOVSKAYA, E. A.; SVETLICHNYI, V. A.; MIROSHNICHENKO, M. L.; SKOBKIN, V. S. Gamma-irradiation resistance and UV-sensitivity of extremely thermophilic archebacteria and eubacteria. *Microbiology*, 62(1), 63-67, 1993.

KOZUBEK, S.; HORNECK, G.; KRASAVIN, E. A.; RYZNAR, L. Interpretation of mutation-induction by accelerated heavy-ions in bacteria. *Radiation Research*, 141(2), 199-207, 1995.

KUHLMAN, K. R.; ALLENBACH, L. B.; BALL, C. L.; FUSCO, W. G.; LA DUC, M. T.; KUHLMAN, G. M.; ANDERSON, R. C.; STUECKER, T.; ERICKSON, I. K.; BENARDINI,

J.; CRAWFORD, R. L. Enumeration, isolation, and characterization of Ultraviolet (UV-C) resistant bacteria from rock varnish in the whipple mountains, California. *Icarus*, 174(2), 585-595, 2005.

LIN, L. H. WANG, P. L. RUMBLE, D. LIPPmann-PIPKE, J. BOICE, E. PRATT, L. M. LOLLAR, B. S. BRODIE, E. L. HAZEN, T. C. ANDERSEN, G. L. DESANTIS, T. Z. MOSER, D. P. KERSHAW, D. ONSTOTT, T. C. Long-term sustainability of a high-energy, low-diversity crustal biome. *Science*, 314(5798), 479-482, 2006.

LIU, Y. Q.; ZHOU, J. Z.; OMELCHENKO, M. V.; BELIAEV, A. S.; VENKATESWARAN, A.; STAIR, J.; WU, L. Y.; THOMPSON, D. K.; XU, D.; ROGOZIN, I. B.; GAIDAMAKOVA, E. K.; ZHAI, M. MAKAROVA, K. S.; KOONIN, E. V.; DALY, M. J. Transcriptome dynamics of *Deinococcus radiodurans* recovering from ionizing radiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(7), 4191-4196, 2003.

MAKAROVA, K. S.; ARAVIND, L.; WOLF, Y. I.; TATUSOV, R. L.; MINTON, K. W.; KOONIN, E. V.; DALY, M. J. Genome of the extremely radiation-resistant bacterium *Deinococcus radiodurans* viewed from the perspective of comparative genomics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65(1), 44-79, 2001.

MAKAROVA, K. S.; OMELCHENKO, M. V.; GAIDAMAKOVA, E. K.; MATROSOVA, V. Y.; VASILENKO, A.; ZHAI, M.; LAPIDUS, A.; COPELAND, A.; KIM, E.; LAND, M.; MAVROMATIS, K.; PITLUCK, S.; RICHARDSON, P. M.; DETTER, C.; BRETTIN, T.; SAUNDERS, E.; LAI, B.; RAVEL, B.; KEMNER, K. M.; WOLF, Y. I.; SOROKIN, A.; GERASIMOVA, A. V.; GELFAND, M. S.; FREDRICKSON, J. K.; KOONIN, E. V.; DALY, M. J. *Deinococcus geothermalis*: The pool of extreme radiation resistance genes shrinks. *Plos One*, 2(9), 2007.

MANCINELLI, R. L. WHITE, M. R. ROTHSCHILD, L. J. Biopan-survival I: Exposure of the osmophiles *Synechococcus* sp. (Nageli) and *Haloarcula* sp. to the space environment. *Life Sciences: Exobiology*, 22(3), 327-334, 1998.

MANCUSO, M.; PASQUALI, E.; LEONARDI, S.; TANORI, M.; REBESSI, S.; DI MAJO, V.; PAZZAGLIA, S.; TONI, M. P.; PIMPINELLA, M.; COVELLI, V.; SARAN, A. Oncogenic bystander radiation effects in Patched heterozygous mouse cerebellum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [S.I.], v. 105, n. 34, p. 12445-12450, 2008.

MATSUSHITA, K.; OCHIAI, T.; SHIMADA, H.; KATO, S.; OHNO, T.; NIKAIDO, T.; YAMADA, S.; OKAZUMI, S.; MATSUBARA, H.; TAKAYAMA, W.; ISHIKURA, H.; TSUJII, H. The effects of carbon ion irradiation revealed by excised perforated intestines as a late morbidity for uterine cancer treatment. *Surgery Today*, 36(8), 692-700, 2006.

MATTIMORE, V.; BATTISTA, J. R. Radioresistance of *Deinococcus radiodurans*: Functions necessary to survive ionizing radiation are also necessary to survive prolonged desiccation. *Journal of Bacteriology*, 178(3), 633-637, 1996.

MAUGHAN, H.; GALEANO, B.; NICHOLSON, W. L. Novel *rpoB* mutations conferring rifampin resistance on *Bacillus subtilis*: Global effects on growth, competence, sporulation, and germination. *Journal of Bacteriology*, 186(8), 2481-2486, 2004.

MELOSH, H. J. Exchange of meteorites (and life?) between stellar systems. *Astrobiology*, 3(1), 207-215, 2003.

MILEIKOWSKY, C.; CUCINOTTA, F. A.; WILSON, J. W.; GLADMAN, B.; HORNECK, G.; LINDEGREN, L.; MELOSH, J.; RICKMAN, H.; VALTONEN, M.; ZHENG, J. Q. L. Natural transfer of viable microbes in space - 1. From Mars to Earth and Earth to Mars. *Icarus*, 145(2), 391-427, 2000.

MILLER, J.H. In: A Short Course in Bacterial Genetics. A Laboratory Manual and Handbook for *Escherichia coli* and Related Bacteria. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York - USA, 1992.

MOELLER, R.; REITZ, G.; BERGER, T.; OKAYASU, R.; NICHOLSON, W. L.; HORNECK G. Astrobiological aspects of the mutagenesis of cosmic radiation on bacterial spores. *Astrobiology*, 10(5), 509-521, 2010.

MOELLER, R.; HORNECK, G.; RABBOW, E.; REITZ, G.; MEYER, C.; HORNEMANN, U.; STOFFLER, D. Role of DNA Protection and Repair in Resistance of *Bacillus subtilis* Spores to Ultrahigh Shock Pressures Simulating Hypervelocity Impacts. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(21), 6682-6689, 2008a.

MOELLER, R.; SETLOW, P.; HORNECK, G.; BERGER, T.; REITZ, G.; RETTBERG, P.; DOHERTY, A. J.; OKAYASU, R.; NICHOLSON, W. L. Roles of the major, small, acid-soluble spore proteins and spore-specific and universal DNA repair mechanisms in resistance of *Bacillus subtilis* spores to ionizing radiation from x rays and high-energy charged-particle bombardment. *Journal of Bacteriology*, 190(3), 1134-1140, 2008b.

MORGAN, W. F. Non-targeted and delayed effects of exposure to ionizing radiation: I. Radiation-induced genomic instability and bystander effects in vitro. *Radiation Research*, v. 159(5), 567-580, 2003.

MOTHERSILL, C.; SEYMOUR, C. B. Radiation-induced bystander effects - implications for cancer. *Nature Reviews Cancer*, 4(2), 158-164, 2004.

MUNAKATA, N.; HIEDA, K.; KOBAYASHI, K.; ITO, A.; ITO, T. Induction of unique tandem-base change mutations in bacterial spores exposed to extreme dryness. *Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 390(1-2), 189-195, 1997.

MURRAY, R. G. E. Genus 1. *Deinococcus*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, ed. PHA Sneath, NS Mair, ME Sharpe, JG Holt, 2:1035-43. Baltimore: Williams & Wilkins, 1986.

MURRAY, R.G.E. The family *Deinococcaceae*. In *The Prokaryotes*, ed. A Ballows, HG Truper, M Dworkin, W Harder, KH Schleifer 4:3732-44. New York: Springer-Verlag, 1992.

NAVARRO-GONZALEZ, R.; RAINY, F. A.; MOLINA, P.; BAGALEY, D. R.; HOLLEN, B. J.; DE LA ROSA, J.; SMALL, A. M.; QUINN, R. C.; GRUNTHANER, F. J.; CACERES, L.; GOMEZ-SILVA, B.; MCKAY, C. P. Mars-like soils in the Atacama Desert, Chile, and the dry limit of Microbial Life. *Science*, 302(5647), 1018-1021, 2003.

NICHOLSON, W. L. Ancient Micronauts: Interplanetary transport of microbes by cosmic impacts. *Trends in Microbiology*, 17(6), 243-250, 2009.

NICHOLSON, W. L.; MUNAKATA, N.; HORNECK, G.; MELOSH, H. J.; SETLOW, P. Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64, 548-572, 2000.

NICHOLSON, W. L.; SCHUERGER, A. C.; SETLOW, P. The solar UV environment and bacterial spore UV resistance: considerations for Earth-to-Mars transport by natural processes and human spaceflight. *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 571(1-2), 249-264, 2005.

OKEEFE, J. D.; AHRENS, T. J. Oblique Impact - A process for obtaining meteorite samples from other planets. *Science*, 234(4774), 346-349, 1986.

OLSSON-FRANCIS, K.; COCKELL, C. S. Experimental methods for studying microbial survival in extraterrestrial environments. *Journal of Microbiological Methods*, 80(1), 1-13, 2010.

OLSSON-FRANCIS, K.; DE LA TORRE, R.; TOWNER, M. C.; COCKELL, C. S. Survival of Akinetes (Resting-State Cells of Cyanobacteria) in Low Earth Orbit and Simulated Extraterrestrial Conditions. *Origins of Life and Evolution of Biospheres*, 39(6), 565-579, 2009.

PAPADOPOULOS, D.; SCHNEIDER, D.; MEIER-EISS, J.; ARBER, W.; LENSKI, R. E.; BLOT, M. Genomic evolution during a 10,000-generation experiment with bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(7), 3807-3812, 1999.

PERFEITO, L.; FERNANDES, L.; MOTA, C.; GORDO, I. Adaptive mutations in bacteria: High rate and small effects. *Science*, 317(5839), 813-815, 2007.

PERSAUD, R. ZHOU, H. N. BAKER, S. E. HEI, T. K. HALL, E. J. Assessment of low linear energy transfer radiation-induced bystander mutagenesis in a three-dimensional culture model. *Cancer Research*, 65(21), 9876-9882, 2005.

RABALLAND, V.; BENEDIKT, J.; WUNDERLICH, J.; VON KEUDELL, A. Inactivation of *Bacillus anthracis* and *Aspergillus niger* using beams of argon ions, of oxygen molecules and of oxygen atoms. *Journal of Physics D-Applied Physics*, 41(11), 2008.

RAINEY, P. B. Evolutionary genetics: The economics of mutation. *Current Biology*, 9(10), R371-R373, 1999.

RETTBERG, P.; RABBOW, E.; PANITZ, C.; HORNECK, G. Biological space experiments for the simulation of Martian conditions: UV radiation and Martian soil analogues. *Space Life*

Sciences: Search for Signatures of Life, and Space Flight Environmental Effects on the Nervous System, 33(8), 1294-1301, 2004.

RIPPKA, R.; DERUELLES, J.; WATERBURY, J. B.; HERDMAN, M.; STANIER, R. Y. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of *Cyanobacteria*. *Journal of General Microbiology*, 111(3), 1-61, 1979.

ROTHSCHILD, L. J.; MANCINELLI, R. L. Life in extreme environments. *Nature*, 409(6823), 1092-1101, 2001.

SAFFARY, R.; NANDAKUMAR, R.; SPENCER, D.; ROBB, F. T.; DAVILA, J. M.; SWARTZ, M.; OFMAN, L.; Thomas, R. J.; DiRuggiero, J. Microbial survival of space vacuum and extreme ultraviolet irradiation: strain isolation and analysis during a rocket flight. *FEMS Microbiology Letters*, 215(1), 163-168, 2002.

SALTON, M. R. J., *The Bacterial Cell Wall* (Elsevier, Amsterdam) 1964.

SANCHO, L. G.; DE LA TORRE, R.; HORNECK, G.; ASCASO, C.; DE LOS RIOS, A.; PINTADO, A.; WIERZCHOS, J.; SCHUSTER, M. Lichens survive in space: Results from the 2005 LICHENS experiment. *Astrobiology*, 7(3), 443-454, 2007.

SCHUERGER, A. C.; MANCINELLI, R. L.; KERN, R. G.; ROTHSCHILD, L. J.; MCKAY, C. P. Survival of endospores of *Bacillus subtilis* on spacecraft surfaces under simulated Martian environments: Implications for the forward contamination of Mars. *Icarus*, 165(2), 253-276, 2003.

SCHULTE, W. *et al.* Automated payload and instruments for astrobiology research developed and studied by German medium-sized space industry in cooperation with European academia. *Acta Astronautica* [S.I.], v. 60, n. 12, p. 966-973, 2007.

SGHAIER, H.; NARUMI, I.; SATOH, K.; OHBA, H.; MITOMO, H. Problems with the current deinococcal hypothesis: An alternative theory. *Theory in Biosciences*, 126, 43-45, 2007.

SHUSTER, D. L.; WEISS, B. P. Martian surface paleotemperatures from thermochronology of meteorites. *Science*, 309(5734), 594-597, 2005.

STOFFLER, D.; HORNECK, G.; OTT, S.; HORNEMANN, U.; COCKELL, C. S.; MOELLER, R.; MEYER, C.; DE VERA, J. P.; FRITZ, J.; ARTEMIEVA, N. A. Experimental evidence for the potential impact ejection of viable microorganisms from Mars and Mars-like planets. *Icarus*, 186(2), 585-588, 2007.

STRAZZULLA, G.; BRUCATO, J. R.; CIMINO, G.; LETO, G.; SPINELLA, F. Interaction of solar-wind ions with planetary surfaces. *Laboratory Planetology*, 15(10), 13-17, 1995.

WEBER, P.; GREENBERG, J. M. Can spores survive in interstellar space?. *Nature*, 316(6027), 403-407, 1985.

WOODS, T. Solar vacuum ultraviolet irradiance measurements and models for solar cycle 23. Full paper presented at Proceedings of SOHO 11 Symposium, Davos, Switzerland, 11-15, March, 2002.

WICKRAMASINGHE, C. Panspermia according to Hoyle. *Astrophysics and Space Science*, 285(2), 535-538, 2003.

WINSTEAD, C.; MCKOY, V. Resonant interactions of slow electrons with DNA constituents. *Radiation Physics and Chemistry*, 77(10-12), p. 1258-1264, 2008.

YANG, Z., Gan, B., Lin, J. The mutagenic effect on plant growth by ion implantation on wheat. *Anhui Agriculture University Acta* 18:282- 288, 1991.

YU, Z.L. Introduction To Ion Beam Technology. Hefei: Anhui Science And Technology Publishing Company, 1998.

YU, Z.L. Studying of ion implantation effect on biology in china. China Nuclear Scienc And Technology Report (Chinese), Cnic-00746, China Nuclear Information Centre, 1993.

ZAHRADKA, K.; SLADE, D.; BAILONE, A.; SOMMER, S.; AVERBECK, D.; PETRANOVIC, M.; LINDNER, A. B.; RADMAN, M. Reassembly of shattered chromosomes in *Deinococcus radiodurans*. *Nature* [S.I.], v. 443, n. 7111, p. 569-573, 2006.

APÊNDICE 1 – ENGLISH REPORT

ENGLISH REPORT

Thesis Title: Survival of extremophile microorganisms in simulated extraterrestrial conditions

Awardee: MSc. Ivan Gláucio Paulino-Lima (Lab Molecular Radiobiology, IBCCF/UFRJ)

Advisor: Prof. Claudia de Alencar Santos Lage (Lab Molecular Radiobiology, IBCCF/UFRJ)

Overseas Supervisor: PhD Nigel John Mason (CEPSAR, Open University, United Kingdom)

I – Summary:

The experimental platform developed during the execution of this project was designed to generate experience in techniques for simulation and verification of extraterrestrial environments effects on extremophilic microorganisms. Classical microbiology methods, such as serial dilution and counting of colonies grown on plates were adapted to the requirements and technical limitations of the experiments to determine cell inactivation data plotted in survival curves. Physical-chemical parameters such as pressure, temperature, the Martian atmosphere and interplanetary radiation were tested alone or in specific combinations according to the simulated environment. The results contribute to a better understanding about the possibility of survival of microorganisms to the harsh conditions of space, including the possibility of natural movement of living beings between different bodies of planetary systems.

II – Scientific background:

Extremophile microorganisms are living beings capable to survive and proliferate under environments with extreme physical and chemical parameters (Rothschild and Mancinelli, 2001). Most extremophile microorganisms are prokaryotes, from both domains Archaea and Bacteria. *Deinococcus radiodurans* is one of the most radiation resistant organisms ever discovered, surviving acute doses of ionizing radiation exceeding 15kGy (Daly *et al.*, 1994). The molecular mechanisms underlying such resistance is still under debate (Makarova *et al.*, 2001; Cox and Battista, 2005). Two main cellular mechanisms contribute to high radiation resistance, *i.e.*, high carotenoids contents acting as a passive shielding against non-ionizing radiation (UV), and active DNA repair machinery (Ghosal *et al.*, 2005). The last one comprises at least two categories (Makarova *et al.*, 2001; Cox and Battista, 2005; Makarova *et al.*, 2007) (i) a subset of proteins of unknown functions that can greatly increase the efficiency of DNA repair mechanisms, and (ii) non-enzymatic complexes of manganese (Mn) protect enzymes from oxidation during irradiation (Daly *et al.*, 2007), mainly the DNA repair ones (He, 2009). These two categories apparently share components: the strong positive correlation between resistance to ionizing radiation and desiccation tolerance (Sghaier *et al.*, 2007). In fact, inactivation of locus DRB0118, a constitutively expressed one, sensitizes *D. radiodurans* to desiccation, but not to ionizing radiation (Battista *et al.*, 2001). Moreover, the hypothesis of adaptation to desiccation (Matiimore e Battista, 1996) does not explain the extreme resistance to ionizing radiation observed in several members of the Archaea domain (Kopylov *et al.*, 1993). One alternative hypothesis takes into account that most radiation-resistant species accumulate about 300-fold more manganese (Mn) than sensitive ones (Daly *et al.*, 2004). Interestingly, the Ocean Drilling Program (ODP) has conducted a survey on a wide variety of marine sediments (D'Hondt *et al.*, 2004), and it revealed the presence of enriched Mn sites with high levels of gamma radiation to be commonly found in deep sediments (Sghaier *et al.*, 2007).

D. radiodurans has already been tested under several laboratory conditions and also assessed in space conditions when the Exobiology and Radiation Assembly (ERA) flew on the ESA's Eureca mission. Dose *et al.* (1995) reported that although survival could not be scored due to storage conditions before and after the mission, the amount of DNA double strand breaks (DSB) per

chromosome could be determined. If exposed to solar light ($>170\text{nm}$; $4 \times 10^8 \text{J} \cdot \text{m}^{-2}$ ranging from 175 to 340nm) in layers of about 1.5mm, only the upper tenths mm on top of a 1mm layer were affected, with more than 12 DSB were found in comparison to 8 DSB for the dark control. Control experiments have shown that *D. radiodurans* survives relatively well (15-35% survival rates) if kept in dry argon for 17 months, but survival in humid argon (above 20% relative humidity) is less than 0.01% in the same period of time. Survival can be improved by up to 100% if cells are dried in the presence of organics (Tryptone-Yeast Extract medium).

Other microorganisms have also been tested in space. According to Dose *et al.* (1996), monolayer of spores, fungal conidia or vegetative cells (*D. radiodurans*) are extremely sensitive to space conditions (vacuum and solar radiation). Multi-layered cells or macroscopic clusters, however, may resist for months or years, even if exposed to full solar light. Although the top cell layers become inactivated, they kept protecting interior cells from UV damage and also partially from dehydration.

Saffary *et al.* (2002) exposed cells of *Bacillus* sp. and *D. radiodurans* to extreme ultraviolet (EUV) radiation ($\lambda=30.4\text{nm}$) during a rocket flight. The exposition to EUV radiation decreased the survival of both organisms by an extra order of magnitude below their desiccation tolerance. Similar results were reported for the first time using a halophilic model, represented by a new isolate of the genus *Haloarcula* exposed to space conditions for 15 days in Biopan-1 (Mancinelli *et al.*, 1998). This isolate was obtained from crystals of salt (NaCl) and shows high resistance to dehydration. Since this type of radiation strongly interacts with biological targets, the authors attributed such inactivation to rely on superficial cellular damages other than DNA, most likely on membrane and surface proteins. On the other side, lichens were capable to fully restore their colonization ability and photosynthetic activity after an uninterrupted 16-day exposure to real outer space conditions in the Biopan-5 facility (Sancho *et al.*, 2007).

Shielding from deleterious ionizing radiation has been expected to provide viability of viruses, bacterial and fungal dried spores, thus alleviating radiation-imposed constraints to any putative interplanetary transfer step. Calculations by Mileikowsky *et al.* (2000) have predicted that microorganisms such as *D. radiodurans* and *Bacillus* sp should be shielded against space radiation whenever inside rocks of the order of at least 0.33m in size, to keep a viable minimal population during time ranges suitable to afford Mars-Earth interplanetary travel (~1 million years). Those authors also consider that more than 1 billion fragments with temperatures below 100°C were ejected from Mars and landed on Earth within the last 4 billion years. Early Earth has witnessed the infall of about 10-fold more extraterrestrial matter during the “heavy bombardment” period. Indeed the ~40 Martian meteorites discovered so far on Earth represent a tiny fraction of those imported from Mars during Earth’s history (Fritz *et al.*, 2005).

The discovery of Martian meteorites on Earth (Dreibus e Wanke, 1985) implies that rock fragments can escape from planetary bodies and that interplanetary transfer of matter is possible to occur in the solar system (Okeefe and Ahrens, 1986). At least five out of about 40 known Martian meteorites, might not have experienced sterilizing temperatures during ejection from Mars and re-entry into the Earth’s atmosphere (Shuster and Weiss, 2005). However, it is still an open question whether living beings could be transported between planets by means of such fragments, notwithstanding the harsh in-between environment. It is tempting to think of the biological features of microbial extremophilic species (Rothschild and Mancinelli, 2001) as those necessary to cope with extraordinary environments as those found in the interplanetary space.

The hypothesis predicting that living organisms may stand viable and be transferred from one planet to another by means of natural processes (panspermia) is still a matter of debate (Nicholson, 2009). The lithopanspermia version is currently thought to be a process by which any living form, most probably microbial in nature, survives the following three steps: (i) the escape step, *i.e.* ejection of contaminated planetary material towards space, normally caused by a large impact on the parent planet; (ii) the journey in space through time scales comparable with those experienced by the Martian meteorites (estimated as 1-15 million years); and (iii) the landing process in a manner to afford non-destructive deposition of the biological material on a recipient planet (Horneck *et al.*, 2003).

Escape and re-entry steps of this process are critical due to the high amounts of energy to which organisms may be exposed within a short period of time so recent studies have focused on these steps (Burchell *et al.*, 2004; Cockell *et al.*, 2007; Stöffler *et al.*, 2007; Horneck *et al.*, 2008; Moeller *et al.*, 2008a; de La Torre *et al.*, 2009; Fajardo-Cavazos *et al.*, 2009). Various types of microorganisms, such as bacterial or fungal spores and viruses, as well as biomolecules, such as DNA, amino acids and liposomes, have been exposed to selected and combined space conditions outside Earth's magnetic field (Apollo 16) or in low Earth orbit onboard missions Spacelab 1, Spacelab D2, ERA on EURECA, LDEF, BIOPAN on FOTON and EXPOSE on the International Space Station (Olsson-Francis and Cockell, 2010). Extraterrestrial parameters, such as high vacuum, intense solar ultraviolet radiation, different components of the cosmic radiation field and temperature extremes affected the genetic stability of the organisms in space, leading to increased mutation rates, DNA damage and inactivation (Horneck, 1999). Extraterrestrial solar ultraviolet (UV) radiation was shown to be the most lethal factor to naked samples. When shielded against the influx of solar UV, spores of *B. subtilis* survived for more than 5 years in space (Horneck *et al.*, 1994a; Horneck *et al.*, 2010).

Recently, Horneck *et al.* (2008) have tested the first step of the panspermia hypothesis by exposing spores of *Bacillus subtilis*, cells of *Chroococcidiopsis*, and thalli and ascocarps of the lichen *Xanthoria elegans* to shock pressures in the range 5 to ~40 Giga Pascals. Their results support the hypothesis that biological material could be successfully ejected from planets in a way that seeding of early Earth might have ensued.

In view of the surprisingly positive results reported above in support to the concept of panspermia, the critical re-entry step of the process was solely addressed by the results of the ESA's STONE experiment (Cockell *et al.*, 2007). These authors demonstrated that the endolithic photosynthetic organism *Chroococcidiopsis* sp. inoculated in a gneissic rock sample did not resist the speedy re-entrance into the Earth atmosphere since extreme heating reached down to ~5mm depth of the rock. This study focused on the effects of hostile environments may require viable extremophile microorganisms during migration times along the assumptions of interplanetary panspermia hypothesis. The survival of *D. radiodurans* to conditions similar to those present in interplanetary space was investigated on several workstations in Brazil and Europe, including sources of UV, vacuum UV and X-rays synchrotron radiations, and particulate radiation.

This work was done in collaboration with Chilean researchers using bacterial isolates from soil samples from the Atacama Desert, considered an environment similar to some places on Mars surface. The goal was to isolate microorganisms resistant to ultraviolet radiation for testing in a new simulation chamber under construction in São Paulo. Experiments to check for limits of life on simulated conditions of interplanetary space, besides serving for future programs of planetary protection, has added new data to the centenary debate on the hypothesis of panspermia, adding evidence that primitive life might have been brought to Earth by comets or meteoritic bodies.

III. Main objectives in the original project:

Main Objective

To investigate the survival of different model organisms subjected to extraterrestrial-simulated extreme environments aiming at broaden our understanding on physico-chemical limits for the existence of life "as we know it", and the possibility of cross contamination processes between bodies of the solar system.

Specific Objectives

- Evaluate resistance of extremophilic microorganisms isolates from soil samples of the Atacama desert (Chile) using selective pressure as stress factors such as ultraviolet radiation, desiccation, low pressure and low temperature;
- Characterize the survival profile of these microorganisms under conditions of the interplanetary space and the planets the solar system;

- Develop methodologies for the experimental use of these microorganisms in laboratory simulations looking for future launching in real-flight experiments; and
- Examine ways by which cross contamination processes might occur between planets of the solar system and interstellar contamination.

III - Key steps performed during the period in the achievement of goals:

- 1 - Extended exposure (up to 4 weeks) of epilithic microbial biofilms (inhabitants of rocky substrates) from a cliff in the Atacama Desert (Chile) to stress factors such as different temperatures and desiccation (isolation in a desiccator).
- 2 - Exposure of epilithic microbial biofilms, strains of *Deinococcus radiodurans* and a bacterial isolate from the soil of the Atacama desert (Chile), to different sources of ultraviolet (UV) and vacuum ultraviolet (VUV).
- 3 - Extended exposure (up to 4 weeks) of epilithic biofilm from the Atacama to combined conditions of the Martian environment (atmospheric composition, pressure and temperature) and isolation of organisms resistant to these conditions.
- 4 - Experimental simulation of high levels of radiation from astrophysical sources and their effects on wild type strain of *D. radiodurans* and on *Chroococcidiopsis* sp. isolated from the Atacama Desert, using the Diamond synchrotron laboratory at Oxfordshire, UK, as a source of X-rays.
- 5 - Extended exposure (up to 4 weeks) of *D. radiodurans* to various experimental conditions at low pressure in a vacuum chamber (10^{-5} Pa).
- 6 - Experimental simulation of charged particles from the solar wind and verification of the effects on wild-type strain of *D. radiodurans* and *Chroococcidiopsis* sp. from the Atacama Desert, using specialized laboratories in Italy and UK.

IV - Presentation and brief discussion of the main results obtained, making it clear what the theoretical, experimental or practical outcomes were obtained by the survey:

1- RESISTANCE OF PHOTOTROPHIC EPILITHIC BIOFILMS FROM CHILE TO PROLONGED EXPOSURE (UP TO 4 WEEKS) IN DIFFERENT TEMPERATURES INSIDE A DESICCATION CHAMBER.

Samples from a black biofilm from a cliff on the beach of La Portada, near Antofagasta, Chile were divided into aliquots of 10mg and placed in microcentrifuge tubes, where they were subjected to treatments in triplicate, as shown in Table 1.

Table 1. Experimental design showing the number of samples used in each experiment with their respective exposure times.

Conditions	Exposure time (days)					Totals
	1	4	7	21	28	
Control*	3**	3	3	3	3	15
Desiccation	3	3	3	3	3	15
-80°C	3	3	3	3	3	15
-20°C	3	3	3	3	3	15
+70°C	3	3	3	3	3	15
Totals	15	15	15	15	15	75

* Controls were kept at room conditions, covered with aluminium foil on the bench

** Samples were exposed in triplicate to all experimental conditions

After each exposure time, the content of each tube was placed in 12-well plates containing growth medium BG-11 for the growth of phototrophs. Along a period of six months of incubation at room temperature (~22°C) under natural light cycles, 10µl aliquots were removed from plates and placed on glass slides for observation under an optical microscope for any change in cellular morphology and increased total number of cells.

Unfortunately no growth was observed after the whole incubation period, even in non-treated controls. Several tests using other growth phototrophs with the same type of culture medium support some possible explanations for the observed results: (i) the amount of samples (10mg) was insufficient for the detection of viable phototrophs from an environment as hostile as the cliff of La Portada, of high solar radiation and severe conditions of desiccation, (ii) transport conditions of samples from Chile to the United Kingdom may have contributed to decrease the viability of the microorganisms present in the samples, (iii) the phototrophs previously observed under the microscope are among the group of uncurable microorganisms.

2- RESISTANCE OF PHOTOTROPHIC EPILITHIC BIOFILMS, WILD-TYPE STRAIN OF *D. RADIODURANS* AND A MICROBIAL ISOLATE FROM SOIL OF THE ATACAMA DESERT (CHILE), TO DIFFERENT SOURCES OF ULTRAVIOLET RADIATION (UV) AND VACUUM ULTRAVIOLET RADIATION (VUV).

2.1. Exposure of samples to Vacuum UV light (VUV)

Samples of the black biofilm from Chile were divided into aliquots of 10mg, diluted in 1ml of BG-11 culture medium and filtered through polycarbonate membranes (Millipore) 25mm in diameter and 0.2µm porosity to produce a thin layer of biological material on the membranes. As the filtration cylinder was 16mm in diameter, the membranes containing the biological material were cut to remove exceeding edges. The resulting material was dried for at least 3 hours at room temperature on the workbench, and stuck on metal sample discs using a double-sided carbon tape (Agar Scientific, UK). The sample-holder containing up to six samples was placed inside the vacuum chamber (10^{-5} Pa). A xenon lamp emitting VUV (Resonance, Canada) was coupled to the chamber in a suitable position for the irradiation experiments, as illustrated in Figure 1.

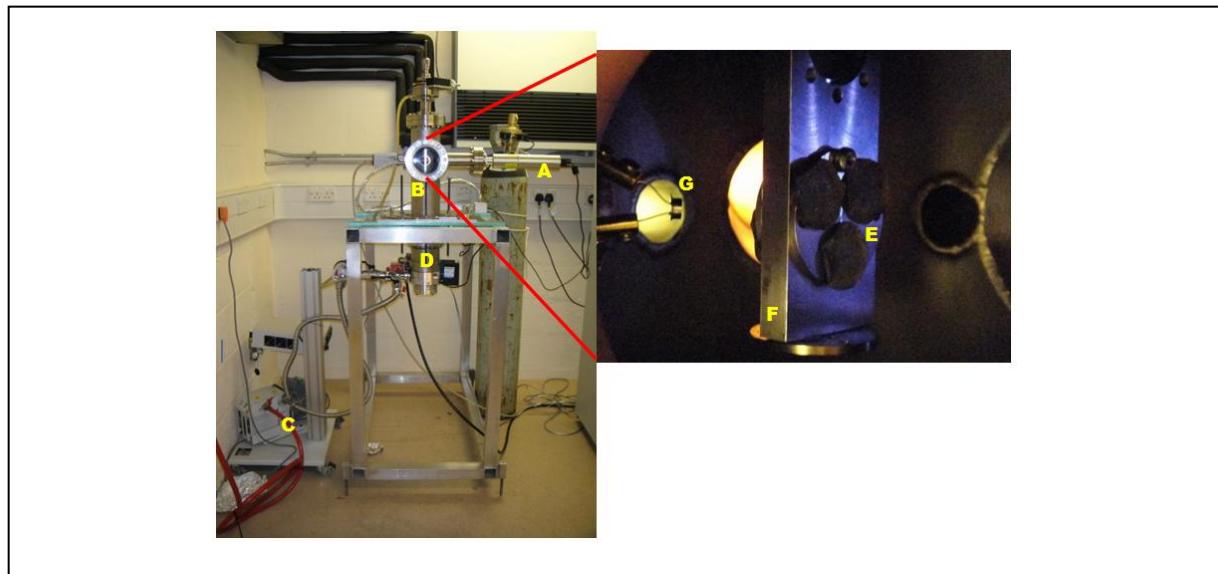


Figure 1. Apparatus for irradiation with ultraviolet light in vacuum. **A**, xenon lamp; **B**, vacuum chamber (10^{-5} Pa); **C**, vacuum pump; **D**, turbo pump; **F**, sample holder; **G**, photodiode.

Rock samples from a cliff at Beer, Devon, UK, were cut into cubes about 1cm³. The cubes were stuck to the sample holder using metal discs of double-sided carbon tape. Samples of *D. radiodurans* (wild-type and mutant strain deficient in RecA-dependent DNA repair by homologous recombination) were diluted in 1ml aliquots and prepared the same way as for the black biofilm. Additionally, samples of *D. radiodurans* were also irradiated directly on the double-sided carbon tape to investigate the influence of substrate on bacterial survival after irradiation. For this purpose, 1ml

of culture was deposited directly on the carbon tape, dried for at least 3 hours at room temperature on the workbench, and placed on the sample holder.

The positioning of the samples directly at the VUV beam was made possible by a rotating handle on the top of the irradiation system. All samples (artificial biofilm, rock cubes and monolayers of cells) were irradiated in accordance with the scheme presented in Table 2:

Table 2. Experimental design for VUV irradiation of epilithic biofilms and strains of extremophilic microorganisms.

Dose ($\text{J}\cdot\text{m}^{-2}$)*	Irradiation time			Samples
	(s)	(min)	(h)	
0	0	0	0	3
0.2	60	1	0.02	3
1.0	300	5	0.08	3
2.0	600	10	0.17	3
10.0	3000	50	0.83	3
20.0	6000	100	1.67	3
100.0	30000	500	8.33	3
TOTALS	39960	666	11.1	21

*Estimated for the lamp peak emission ($\lambda=145\text{nm}$)

Despite the fact that the brightness of the lamp appear quite low, the flow of photons is more than 3.0 times the photon flux from the Sun at Earth orbit for the wavelength of 145nm, which represents the emission peak of the lamp, as seen in Table 3. The photon flux of the lamp was determined by direct measurements using a photodiode, taking into account its quantum efficiency, according supplier info (Roithner LaserTechnik, Austria).

Table 3. Irradiance of the xenon lamp and the photon flux from the Sun at Earth orbit.

Parameter	Xenon lamp	Solar VUV ($\lambda=145\text{nm}$)
Maximum flux (λ)	145nm	N/A
Photon flux	$10^{10}\text{cm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ($10^{14}\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)	$3 \times 10^9\text{cm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ($3 \times 10^{13}\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)*
Irradiance	$1.4 \times 10^{-4}\text{W}\cdot\text{m}^{-2}$	$4 \times 10^{-5}\text{W}\cdot\text{m}^{-2}$

* Based on Woods, 2002.

After treatments, samples of the black biofilm and rock cubes were placed in 6-wells plates containing 5ml BG-11 culture medium and incubated at room temperature ($\sim 22^\circ\text{C}$) under natural light cycles. During the subsequent weeks, 10 μl aliquots were removed from wells and observed under an optical microscope for any change in cellular morphology and total number of cells. After treatments, samples of *D. radiodurans* were diluted in TGY culture medium (1% tryptone, 0.6% yeast extract and 0.2% glucose), subjected to serial dilution using saline solution (0.9% NaCl), and subsequently plated on TGY solidified with 1.5% agar. After incubation at 30°C for 72 hours, the colonies grown on culture medium were counted and the survival rates were plotted on semi-log graphs.

Again, after 6-months incubation, no growth was observed for samples of the black biofilm, even in controls not subjected to irradiation, and possibly the same reasons presented in Section IV.1 apply to explain these results.

Samples of epilithic biofilm from Beer, Devon (UK) grew from 12 to 15 days of incubation under the conditions mentioned above. Restults can be seen in Figure 2.

It can be seen that irradiation with VUV ($\lambda = 145\text{nm}$) had no detectable effect on cell proliferation of epilithic biofilm from Beer, Devon (UK), since the non-irradiated controls showed similar characteristics to samples irradiated with the highest dose ($100\text{J}\cdot\text{m}^{-2}$), both in terms of growth time after treatment and in terms of the observed microbial diversity. Perhaps the relief of the biofilm had contributed to cell survival. In addition, all samples were resistant to the 10^{-5} Pa vacuum,

equivalent to values found in low earth orbit (LEO), since no differences were observed between the non-irradiated control and those kept at room temperature.

To check the influence of substrate on survival of *D. radiodurans*, the strains wild type (wt) and *recA* DNA repair deficient mutant were deposited on two different substrates in relation to the roughness and surface relief: (i) carbon tape, with average roughness of 7 μm and (ii) Millipore filter, with average roughness of 0.7 micrometers. As shown in Figure 3, both strains of *D. radiodurans* showed no significant inactivation, regardless the substrate, even when irradiated at 100J·m⁻².

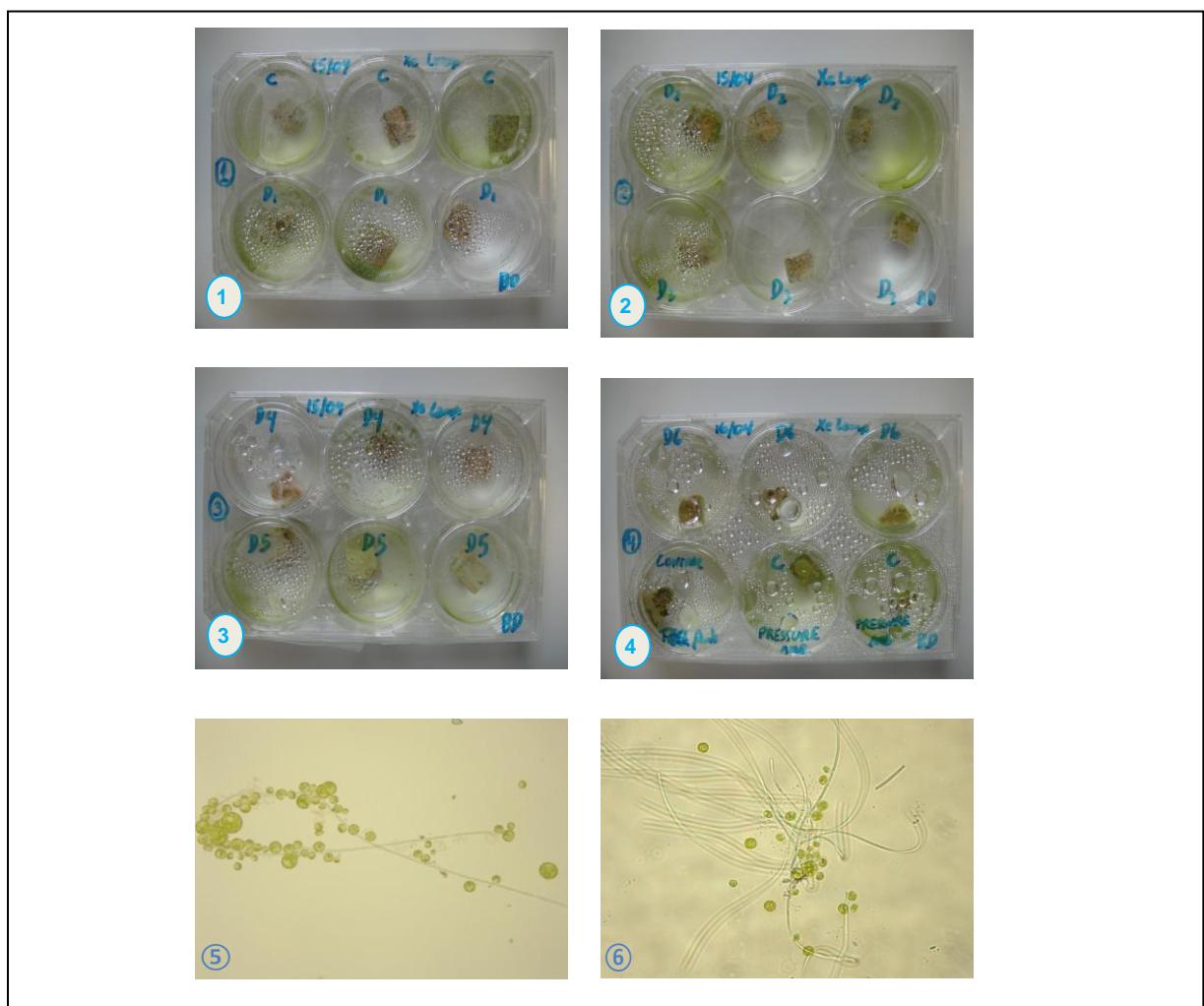


Figure 2. Increased biomass related to a community of phototrophs from Beer, Devon (UK) after 12-15 days of incubation at room temperature ($\sim 22^\circ\text{C}$) under natural light cycles. **1.** C = non-irradiated control, or samples subjected to all conditions, except irradiation. D1=0.2J·m⁻², **2.** D2 = 1.0J·m⁻². D3 = 2.0J·m⁻², **3.** D4 = 10.0J·m⁻². D5 = 20.0J·m⁻², **4.** D6 = 100.0J·m⁻². Amb = Pressure control samples kept at ambient pressure **5.** Non-irradiated control (exposed only to high vacuum), **6.** Phototrophs exposed to maximum dose tested (100.0J·m⁻²).

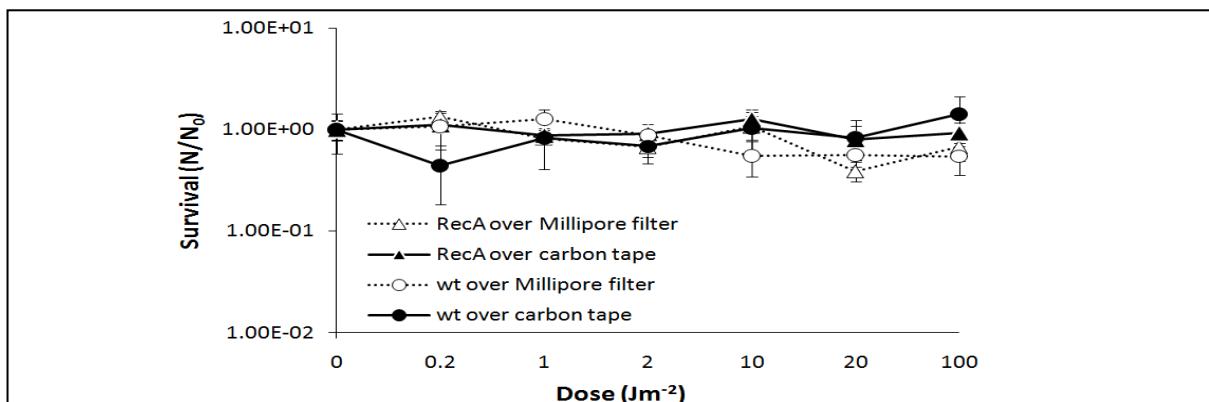


Figure 3. Survival curves to VUV irradiation ($\lambda = 145\text{nm}$) of two strains of *D. radiodurans* (wt and *recA*) deposited on two substrates.

These results can be explained on the basis of two aspects: low UV doses, and/or any absorbing effect of the substrates. For comparison, the UV-C dose ($\lambda = 254\text{nm}$) necessary to inactivate 90% of a *D. radiodurans* population (LD_{10}) is $600\text{J}\cdot\text{m}^{-2}$. Regarding the VUV peak at $\lambda = 121\text{nm}$, a dose of $1000\text{J}\cdot\text{m}^{-2}$ is necessary to reduce the viability of *D. radiodurans* to 67% [3].

2.2. Exposure of samples to ultraviolet light monochromator ($\lambda = 254\text{nm}$) in the laboratory synchrotron Astrid, Aarhus, Denmark

Samples of the black biofilm from Chile were divided into aliquots of 10mg, diluted in 1ml of BG-11 medium and filtered through polycarbonate membranes (Millipore), 25mm in diameter and $0.2\mu\text{m}$ porosity to produce a thin layered biological material on the membranes. As the filtration cylinder was 16mm in diameter, membranes containing the biological material were cut to remove exceeding edges. The resulting material was dried for at least 3 hours at room temperature on the workbench, and stuck on disks of double sided carbon tape (Agar Scientific, UK). Subsequently, the set was cut into pieces using a 2mm^2 grid strip built specifically for this purpose. Then the pieces were stuck to 2mm^2 metallic screws on a sample holder. The irradiation system was assembled on the workstation line of synchrotron light CD1 Astrid, Aarhus, Denmark, as shown in Figure 4.

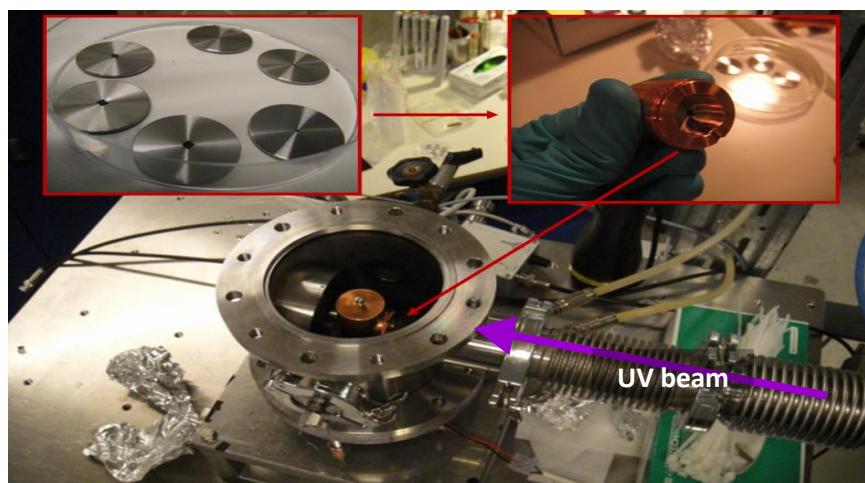


Figure 4. Irradiation system with UV light ($\lambda = 254\text{nm}$) at the CD1 beamline of the Synchrotron Laboratory Astrid, Aarhus, Denmark. Left inset, samples placed on metal discs. Right inset, the irradiation system to be positioned normal to the beam.

Rock samples from the cliffs at Beer, Devon, UK, were cut into approximately 8mm³ cubes. The cubes were stuck to the sample holder using metal discs of double-sided carbon tape. Samples of *D. radiodurans* (wild-type and mutant strains), plus a UV resistant reddish-pigmented isolate DS3.4 from Atacama Desert, and cyanobacteria *Chroococcidiopsis* sp., also isolated from Atacama Desert, were diluted in 1ml saline solution and prepared the same way as for the black biofilm to irradiation with the CD1 line. Additionally, samples of *D. radiodurans* were also irradiated on the double-sided carbon tape to investigate the influence of the substrate on bacterial survival after irradiation. For this purpose, 1ml of culture was applied directly on the carbon tape, followed by dehydration for at least 3 hours at room temperature in the workbench. Then the samples were cut into 2mm² pieces using the blade grid and stuck on the metallic sample holder. The irradiation procedure was carried out according to parameters listed in Table 4.

Table 4. Experimental design for UV irradiation of each biological material at the CD1 beamline of the Synchrotron Laboratory Astrid, Aarhus, Denmark.

Dose (J·m ⁻²)*	Irradiation time (s)	Irradiation time (min)	Irradiation time (h)	Number of samples	Total time
0 (Control)	0	0	0	3	0
3	60	1	0.02	1min	3
30	600	10	0.17	10min	3
300	6000	100	1.67	1h 40min	3
TOTALS	6660	111	1.86	1h 51min	12
					5h 33min

* For a photon flux of up to 10¹⁷ m⁻²·s⁻¹

After treatments, samples corresponding to the black biofilm from Atacama (Chile), epilithic biofilm from Beer, Devon (UK), and the cyanobacteria *Chroococcidiopsis* sp., were placed in 12-well plates containing 1ml BG-11 culture medium on each well and incubated at room temperature (~22°C) under natural light cycles. Samples of *D. radiodurans* (wild-type and *recA* mutant strains), and the Atacama isolate DS3.4, were diluted in TGY and subjected to serial dilution using saline solution, and then plated on TGY solidified culture medium. After incubation at 30°C for 72 hours, the colonies grown on culture medium were scored and survival rates were plotted on semi-log graphs.

Microbial communities from both Chile and the UK did not withstand the experimental procedures, since no growth was seen even in the non-irradiated controls, even after long periods of incubation under appropriate conditions. The general pattern of the results of these experiments was similar to results obtained with the xenon lamp. The isolate DS3.4 and both strains of *D. radiodurans* showed similar profiles of cell inactivation according to the type of substrate used. Data seen in Figure 5 represent the results obtained with these organisms.

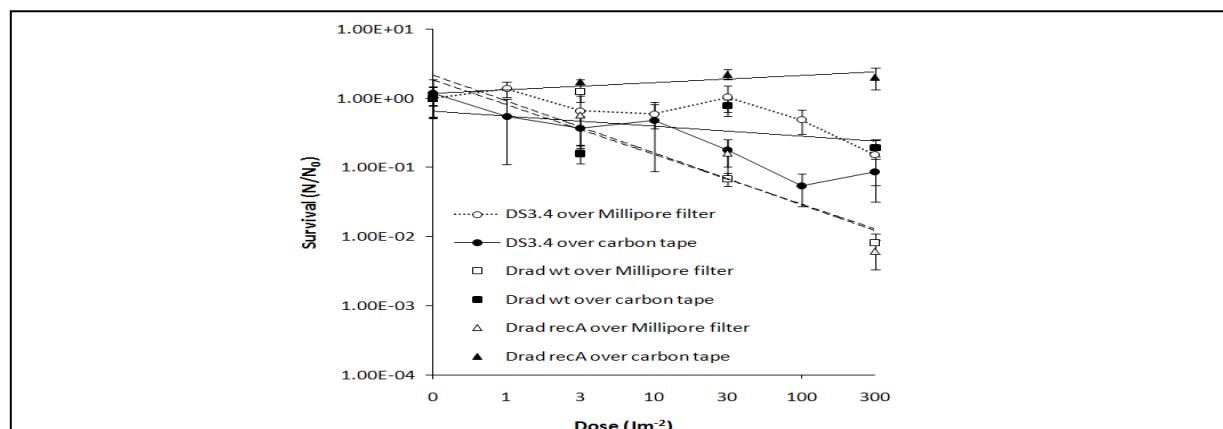


Figure 5. Survival curves corresponding to the *recA* and wild type strains of *D. radiodurans* and the isolate DS3.4 deposited on two different substrates.

Results shown in Figure 5 indicate that *D. radiodurans* cells deposited on Millipore filter are inactivated faster than cells on carbon tape. This is more evident for the *recA* mutant strain. The isolate DS3.4 behaves at an apparently distinct profile. Higher doses are needed to determine the inactivation profile for this isolate deposited on the different substrates.

Inactivation of *Chroococcidiopsis* sp. samples were obtained as the time of required for initiation of growth after irradiation. According to Table 5, cells deposited on Millipore filter showed a characteristic profile of inactivation. The higher the dose, the greater the time required for cell proliferation, reflecting a lower number of viable cells remaining in the samples. Cells deposited on carbon tape could not be retrieved, even the non-irradiated controls. A preliminary analysis of the chemical composition of carbon tape revealed the presence of heavy metals such as gold and copper, which may have contributed to the decrease in cell viability by means of lethal toxic effects for this cyanobacterium.

Table 5. Minimum time (days) for detection of cellular proliferation of cyanobacteria *Chroococcidiopsis* sp. after irradiation with increasing doses of ultraviolet light ($\lambda = 254\text{nm}$) at the Synchrotron Laboratory Astrid, Denmark. Incubation was performed at room temperature ($\sim 22^\circ\text{C}$) under natural light cycles.

Samples	Doses ($\text{J}\cdot\text{m}^{-2}$)						
	0 (control)	1	3	10	30	100	300
Millipore filter	26	26	26	27	28	38 ^a	46 ^a
Carbon tape	*-	-	-	-	-	-	-

*- No growth

a- Results observed in only two out of three replicates

2.3. SURVIVAL TO POLYCHROMATIC UV FROM SOLAR SIMULATED SOURCE

Cells of *Deinococcus radiodurans* were prepared in order to create 3 different situations: (i) cells in aqueous solution (0.9% NaCl or culture medium), (ii) dehydrated cells mixed or not with culture media and (iii) dehydrated cells in the presence or absence of grains of basalt or sandstone, mixed or not with the culture medium.

2.3.1. Cells in aqueous solution

For irradiation of cells in aqueous solution, after the incubation period, part of the culture was centrifuged at 4°C , 8000 rpm for 10 minutes. Then, the supernatant was discarded and the cell pellet was resuspended in the same volume of saline solution (0.9% NaCl) by vortexing. Subsequently, cell suspension was subjected to further centrifugation under the same conditions. The pellet was resuspended again in the same volume of saline and cell suspension was placed in a previously sterilized glass Petri dish. The remaining culture was deposited in another Petri dish corresponding to cells mixed with culture medium. Before starting the exposure of cells to different doses of irradiation, a volume of 100 μl was removed from each of the experiments for serial dilution and subsequent inoculation into plastic Petri dishes containing solidified TGY. Colonies grown on these plates were used as reference (control) to calculate the percentage survival of cells irradiated in aqueous solution. The irradiation parameters are described in Table 6.

Table 6 Experimental design for irradiation of cells in aqueous solution with the Oriel Solar Simulator.

UV-A	Dose (kJ.m ⁻²)	UV-B	UV-C	Exposure Time (s)	Replicates	Final time
				(min)		
0	0	0	0	0	3	0
7.5	1.2	0.06	15	0.250	3	15s
15	2.4	0.12	15	0.250	3	30s
22.5	3.6	0.18	15	0.250	3	45s
30	4.8	0.24	15	0.250	3	1min
37.5	6.0	0.30	15	0.250	3	1min15s
45	7.2	0.36	15	0.250	3	1min30s
52.5	8.4	0.42	15	0.250	3	1min45s
60	9.6	0.48	15	0.250	3	2min
67.5	10.8	0.54	15	0.250	3	2min15s
75	12.0	0.60	15	0.250	3	2min30s
TOTAL			150	2.500	33	7min30s

2.3.2. Dehydrated cells

For irradiation of dehydrated cells with or without culture medium, after incubation, the culture was divided into two parts. One of them underwent removal of culture medium (centrifugation and resuspension in saline solution using vortex) and the other part was used fresh, *i.e.*, containing culture medium. After this preparation, volumes of 1µl of this mixture were distributed in the appropriate positions in the sample holder, resulting in samples containing ~10⁵ cells mixed or not with culture medium, which were then deposited on kapton foil. All samples were then dried at room temperature for at least 24 hours. The irradiation parameters for dehydrated cells are described in Table 7.

Table 7. Experimental design for irradiation of dried cells, whether or not blended with the culture medium in the presence or absence of grains of sandstone or basalt.

UV-A	Dose (kJ.m ⁻²)	UV-B	UV-C	Time (s) (ad)	Time (s) (final)	Replicates	Final time
0	0	0	0	0	0	3	0
7.5	1.2	0.06	15	15	3	15s	
22.5	3.6	0.18	30	45	3	45s	
45	7.2	0.36	45	90	3	1min30s	
75	12.0	0.6	60	150	3	2min30s	
225	36.0	1.8	300	450	3	7min30s	
450	72.0	3.6	450	900	3	15min	
750	120.0	6.0	600	1500	3	25min	
TOTAL			1500	1500	24	25min	

2.3.3. Cells mixed with grains

For irradiation of cells dehydrated in the presence or absence of basalt or sandstone grains, mixed or not with culture medium, the culture was divided into two parts after incubation with grains. One of them underwent removal of culture medium as described earlier and the other part was used fresh, *i.e.*, containing culture medium. After this preparation, cells in the presence or absence of culture medium were mixed with basalt (B) or sandstone (TSS) grains to verify the influence of elemental composition of two distinct types of grains in the protection against UV. The grains were divided into aliquots of 1.25mg per microcentrifuge tube and autoclaved. Cultures in early stationary phase were then mixed with the grains in enough volume to obtain a mixture with final concentration of grains of 1.25%. After homogenization, volumes of 1µl of this mixture were distributed in the appropriate spaces in the sample holder, resulting in samples containing ~ 10⁵ cells

mixed with 12.5 μ g of basalt or sandstone grains, in the presence or absence of culture medium. All samples were then dried at room temperature for at least 24 hours. Irradiation of these samples was performed according to parameters described in Table 7.

After each irradiation dose, cells were recovered and submitted to serial dilution and plating in solidified TGY. After 48-72h incubation, colonies were scored and data were plotted as survival curves.

2.3.4. Solar Simulator

The Solar Simulator Model 91192-1000 (Newport Inc.) consists of a xenon lamp coupled to an ellipsoidal mirror that reflects the radiation to the primary flat mirror, which in turn directs the radiation to a series of corrective optical devices and filters (Figure 6). The rectangular irradiated area has about 100cm² and the radiation includes wavelengths greater than 200nm (Figure 7).

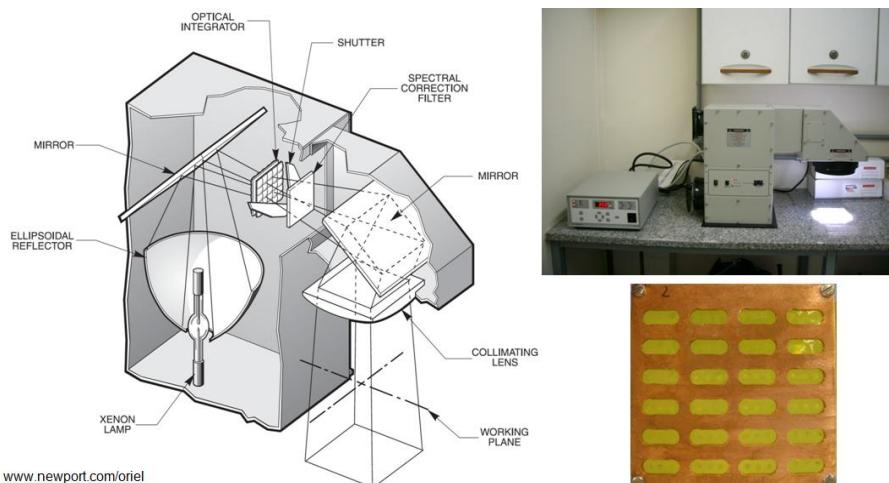


Figure 6. Schematic layout and photo of the Oriel Solar Simulator Model 91192-100 (Newport), with a photo of the sample holder used for irradiation shown at the right bottom.

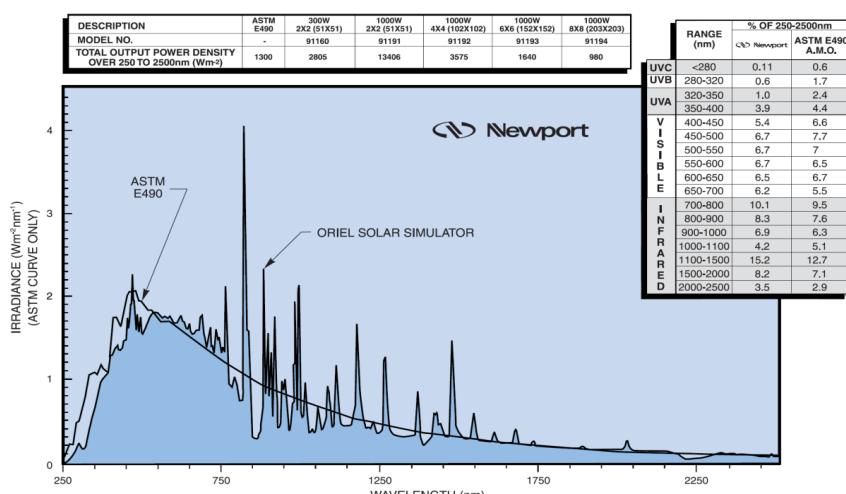


Figure 7. Emission spectrum of the solar simulator in comparison with the solar spectrum at Earth orbit (ASTM E490).

2.3.5. Results

2.3.5.1. Cells in aqueous solutions

The experiments of UV irradiation in aqueous solution were performed to verify the effects of either the presence or absence of organic molecules from the culture medium on the survival of hydrated cells. Initially, several measurements were made using the Solar Simulator Oriel Solar using different filters, according to Table 8. The spectra after each of the filters are different, being the

most notable difference regarding UV-C, whose irradiance is drastically reduced with the use of any of the filters.

Table 8. Irradiation *D. radiodurans* in saline with the Solar Simulator using different filters, resulting in different spectra.

Spectra	Filter	Irradiance ($\text{J} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)			%		
		UV-A	UV-B	UV-C	UV-A	UV-B	UV-C
A	-	980,000	170,000	3,800	84.937	14.734	0.329
B	AM0+81051	624,100	81,000	0,012	88.511	11.487	0.002
C	AM0+81050	624,100	60,000	0,008	91.228	8.771	0.001
D	AM0+87066	380,000	10,400	0,012	97.333	2.664	0.003

Filters: AM0, blocks excess of infrared radiation. 81051, blocks UV-C. 81050, blocks UV-B and UV-C. 87066, blocks infrared radiation and visible light.

The effects produced by radiation with spectra corresponding to different filters are quite similar, whereas inactivation corresponding to irradiation without the use of any filters is much more efficient (Figure 8).

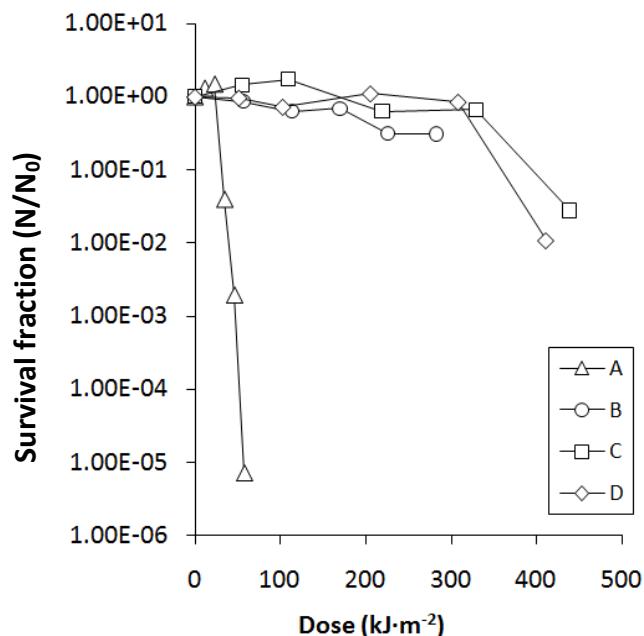


Figure 8. Comparison of the effects of UV irradiation ($\lambda > 200\text{nm}$) on *D. radiodurans* in saline solution (0.9% NaCl) using different filters, as described in Table 3.

When unfiltered irradiation is given to cells in the presence of culture medium, which contains many organic molecules, the survival profile is greater (Figure 9). Curiously, when the same values of survival are plotted on graphs with doses referring only to the UV-C portion of spectrum, the survival profile of *D. radiodurans* becomes very similar to the survival of AB1157 strain of *Escherichia coli* to UV-C (Figure 10). In Figure 10, the values corresponding to samples irradiated in saline solution are marked in white, while those corresponding to samples irradiated in culture medium are marked in black. The values for the cells irradiated with the solar simulator are marked with black circles and those pertaining to *E. coli* cells are marked with white triangles. *D. radiodurans* cells irradiated in saline solution with mercury lamp ($\lambda = 254\text{nm}$) confirmed its high resistance to UV-C radiation.

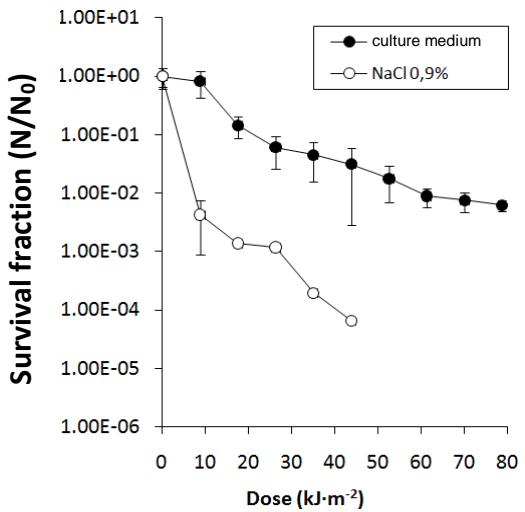


Figure 9. Comparison between the effects of solar simulator irradiation ($\lambda > 200\text{nm}$) on of *D. radiodurans* cells embedded in saline solution (0.9% NaCl) or in culture medium.

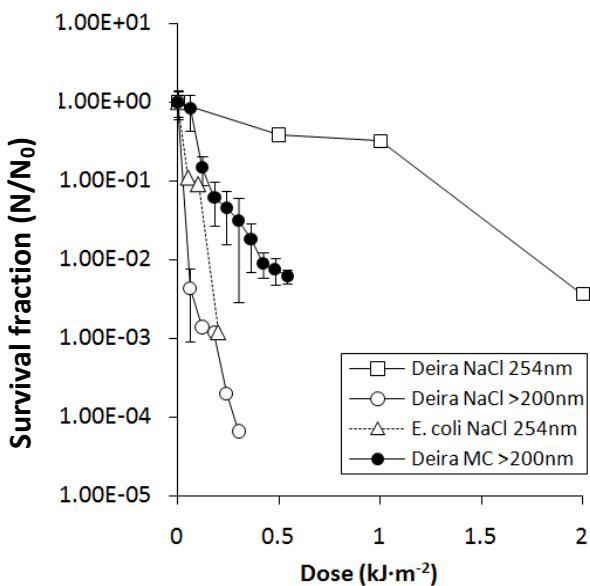


Figure 10. Comparison between the effects of solar simulator irradiation ($\lambda > 200\text{nm}$) and irradiation with mercury lamp ($\lambda = 254\text{nm}$) on *D. radiodurans* (Deira) in saline solution (0.9% NaCl) or culture medium (MC) compared with cells irradiated with mercury lamp.

2.3.5.2. Dehydrated cells

Dehydrated samples were prepared depositing the microbial cells on two types of carbonaceous substrates: (i) polycarbonate substrate ($0.45\mu\text{m}$ Millipore filter) with smooth surface and a carbon tape substrate (Shinto Paint Co.) with rough surface (Figure 11). It is possible to verify the influence of substrate on microbial survival. Analyses made by electron microscopy revealed the formation of cell monolayer in Millipore filter (Figure 11a), cell stacking (Figure 11b) and an additional protection afforded by the culture medium crystallized after dehydration (Figure 11c). Through analysis by profilometry, it was found that the roughness of the carbon tape varies from $2\mu\text{m}$ to $8\mu\text{m}$ (Fig. 11d).

Samples on Millipore filter inevitably became free of organic material because the liquid containing the organic material was drained towards the carbon tape, always present beneath the Millipore filter (Figure 11a). However, samples deposited on carbon tape ended up accumulating

culture medium (Figure 11b). After dehydration, the culture medium became crystallized, forming a complex matrix of organic substances that functioned as a physical shield against radiation. The conditions used in most experiments are shown in Figure 11a (without culture medium) and Figure 11-C (cells mixed with organic material). Cells deposited on kapton foil were analog to the situation shown in Figure 11b, *i.e.*, with a step of removing the culture medium before the deposition of samples in non-porous substrate. This condition was only tested with the Solar Simulator Oriel. However, the substrate was a smooth sheet of kapton with 15 μm thickness.

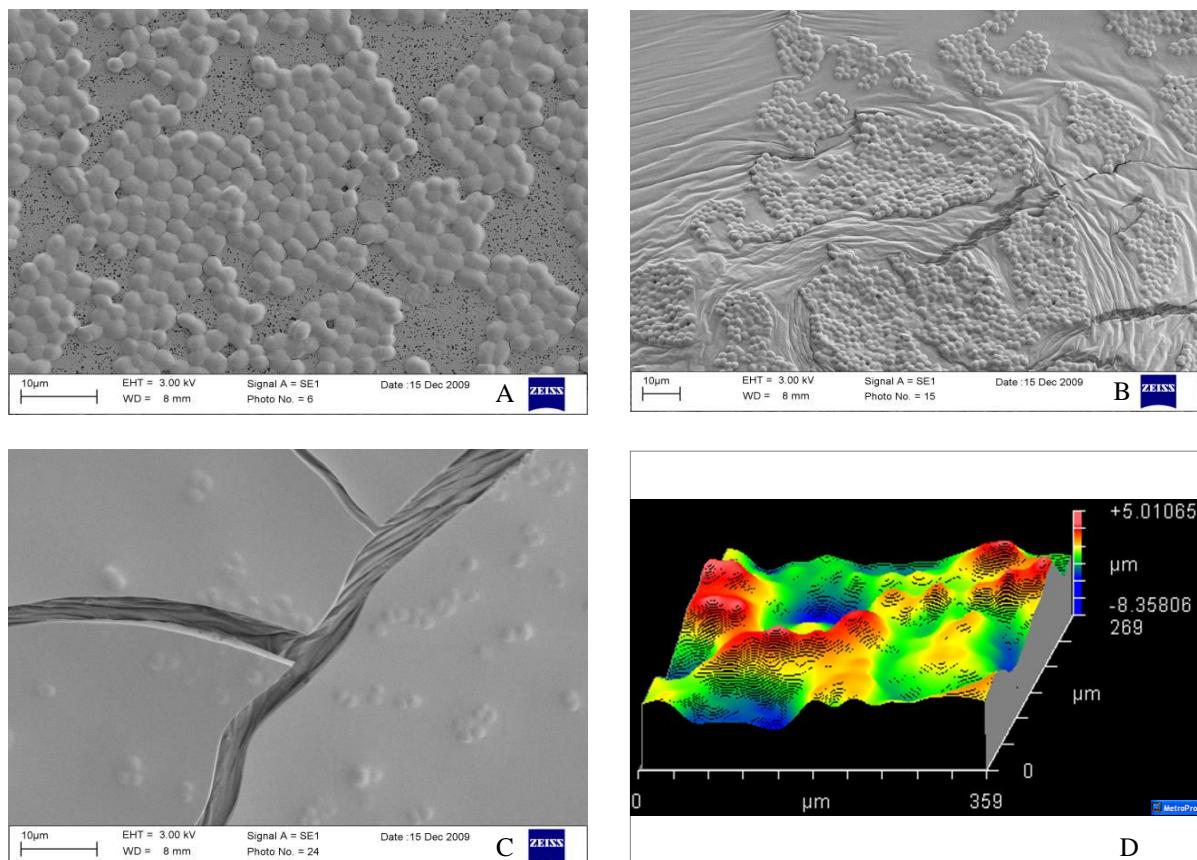


Figure 11. Samples deposited on two substrates, showing three different situations: **A**, cell monolayer formed on Millipore filter. **B**, carbon tape surface showing regions with cell stacking. **C**, cells embedded in the matrix formed by crystallization of the culture medium after dehydration. **D**, computer analysis of the carbon tape surface.

The presence of organic material together with the cells deposited on carbon tape have greater role in cellular protection than the actual topography of the surface of the substrate (Figure 11). This is also demonstrated by the survival curves presented in Figures 12-14.

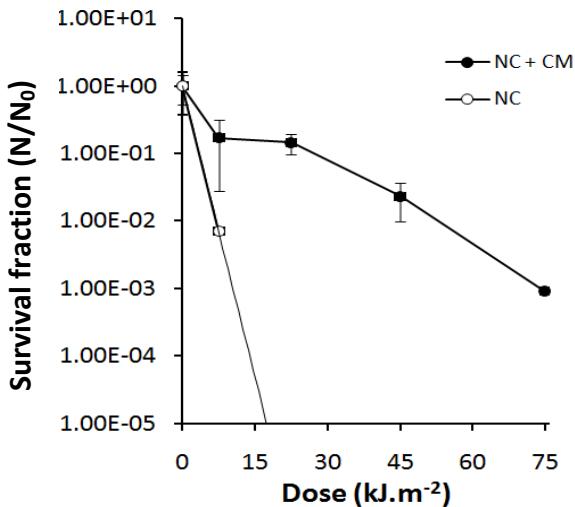


Figure 12. Protective effects caused by organic material present in the culture medium on *D. radiodurans* cells irradiated with the Solar Simulator.

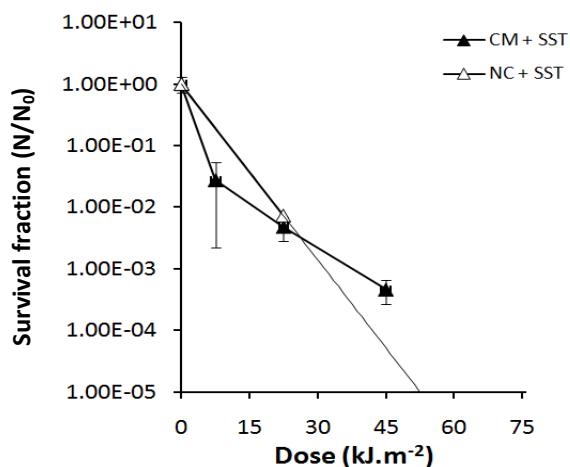


Figure 13. Comparison between the effects of solar simulator irradiation on *D. radiodurans* cells mixed with sandstone grains in the presence (CM + SST) or absence of culture medium (NC + SST).

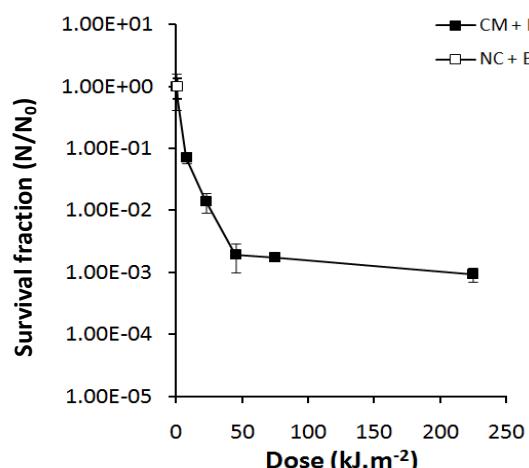


Figure 14. Effects of solar simulator irradiation on *D. radiodurans* cells mixed with basalt grains in the presence (CM + B) or absence of culture medium (NC + B). Note that the lowest dose used was enough to inactivate more than 10^5 cells, if mixed only with basalt grains.

3- EXTENDED EXPOSURE (UP TO 4 WEEKS) OF EPILITHIC BIOFILM FROM THE ATACAMA TO COMBINED CONDITIONS OF THE MARTIAN ENVIRONMENT (ATMOSPHERIC COMPOSITION, PRESSURE AND TEMPERATURE) AND ISOLATION OF ORGANISMS RESISTANT TO THESE SELECTED MARTIAN CONDITIONS.

Samples from five different locations in the Atacama desert (Chile), an environment considered as a good Martian analog an environment similar to Mars (Navarro-Gonzalez *et al.*, 2003), were collected by our Chilean collaborators in July 2008 and shipped in airtight plastic bottles (15ml or 50ml falcon tubes), to the Laboratory of Molecular Radiobiology IBCCF-UFRJ, Rio de Janeiro, Brazil. The material was numbered and labeled as shown in Figure 15.

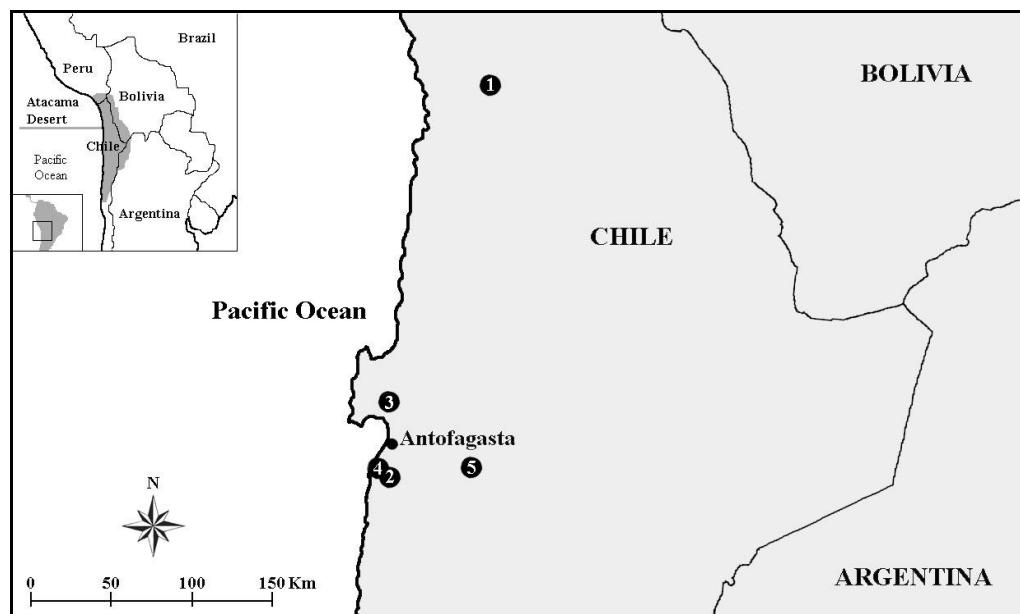


Figure 15. Collection sites at the Atacama Desert, northern Chile. **1.** Laguna Llamara ($21^{\circ}16'07.54''S$, $69^{\circ}37'03.90''W$. Altitude: 751m); **2.** Sitio Cuarzos B2 ($23^{\circ}48'59.15''S$, $70^{\circ}29'25.59''W$. Altitude: 538m); **3.** Capa Negra La Portada ($23^{\circ}29' 58.61''S$, $70^{\circ}25'42.10''W$. Altitude: 27m); **4.** Gypsum ($23^{\circ}49'01.14''S$, $70^{\circ}29'22.98''W$. Altitude: 531m); **5.** Sitio 3 S4 ($23^{\circ}49' 10.76''S$, $70^{\circ}28'36.77''W$. Altitude: 736m).

Two independent parameters were used: (i) UV-C irradiation, which reaches the Martian surface but not Earth's surface, and (ii) atmospheric composition in combination to pressure and temperature found on Mars.

3.1. Ultraviolet irradiation

Aliquots (1g) of each sample were diluted in 10ml saline solution (0.9% NaCl), and mixed through shaking (100rpm) for 3h at room temperature ($\sim 22^{\circ}C$). The mixtures were submitted to serial dilution and plating on three different culture media: LB, TGY and Marine Agar 2216 (Difco) for microbial enumeration of total microorganisms (Figure 16). In parallel, 5ml from each original mixture were placed in glass Petri dishes and exposed to $300\text{J}\cdot\text{m}^{-2}$ of UV-C ($\lambda = 254\text{nm}$), followed by serial dilution and plating on three different culture media: LB, TGY and Marine Agar 2216 (Difco) for microbial enumeration of survivors (Figure 17).

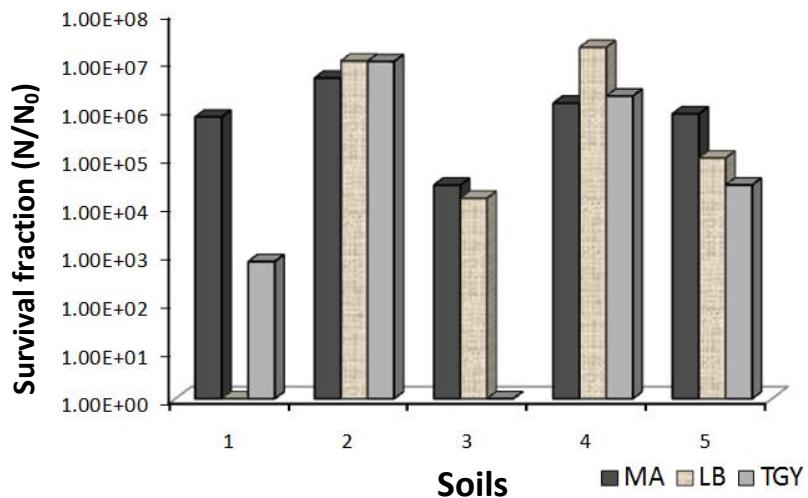


Figure 16. Non-irradiated controls showing total number of colony formin units (cfu) grown on 3 types of culture media.

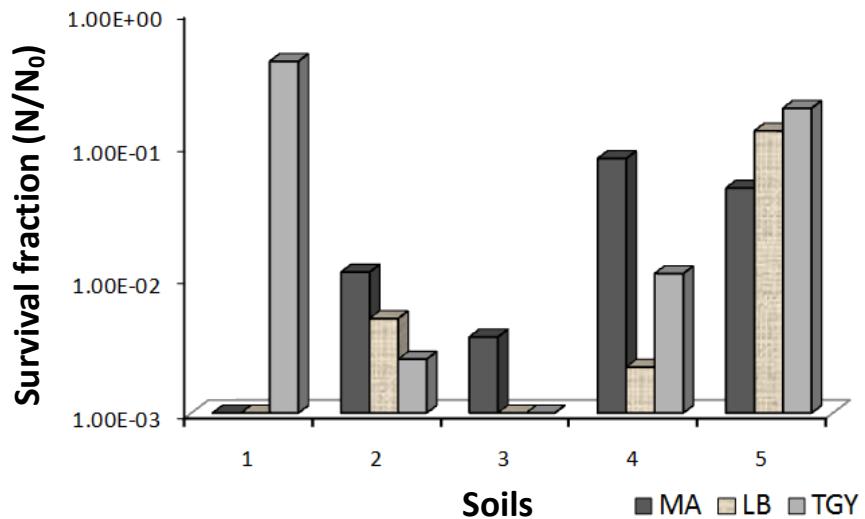


Figure 17. Survival fraction (N/N_0) of microbial cells from each soil type diluted in saline solution (1g/10ml) after $300\text{J}\cdot\text{m}^{-2}$ UV-C ($\lambda=254\text{nm}$) irradiation and incubation in 3 types of culture media.

Many pigmented microorganisms were isolated from all samples. The presence of colored pigments promotes resistance to radiation by absorbing most of the UV photons, acting as a passive protectant against this type of stress (Jacobs *et al.*, 2005). Therefore, pigmented microorganisms were isolated from all samples as illustrated in Figure 18.

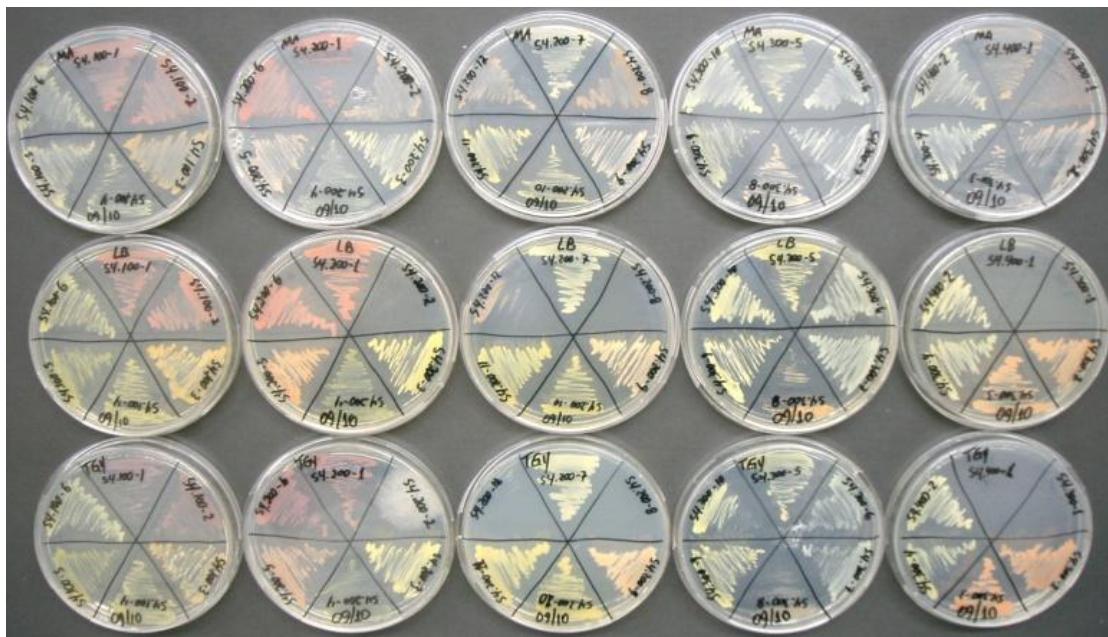


Figure 18. Isolation and growth of several pigmented morphotypes from Atacama Desert in MA, LB and TGY.

A large number of pigmented microorganisms was observed in soil sample number 4 (Sítio 2 Gypsum). Therefore, this sample was subjected to a new step of irradiation, this time with fractionated doses, up to $400\text{J}\cdot\text{m}^{-2}$ (Figure 19). This procedure resulted in a large number of pigmented microorganisms grown in different culture media.

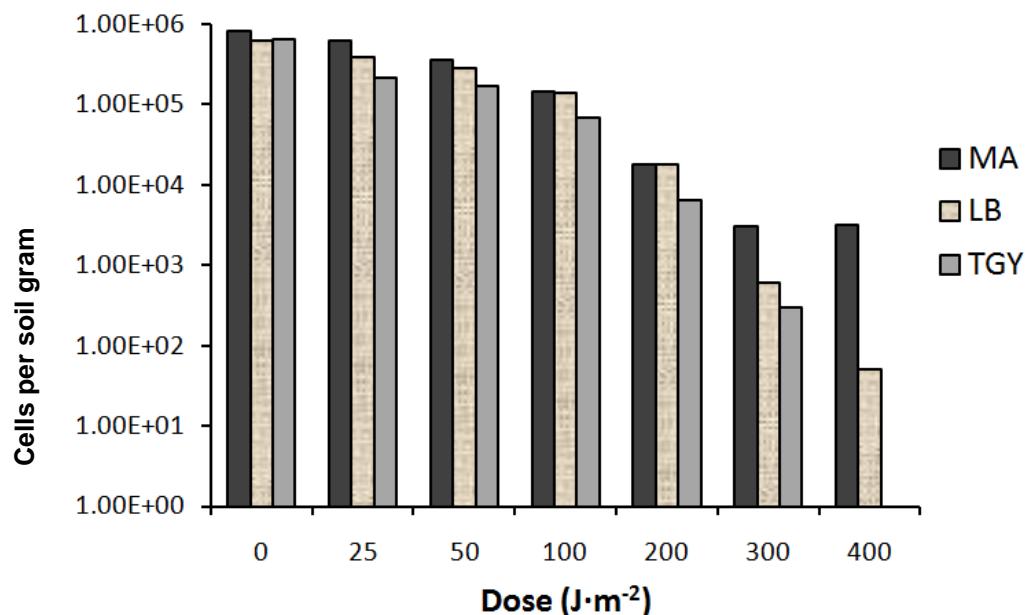


Figure 19. Decrease of microbial abundance following UV-C irradiation treatments of soil 4 (Sítio 2 Gypsum).

The isolates were then tested for their ability to grow in liquid culture medium under shaking at 150rpm, 28°C, to undergo a new step of irradiation with $300\text{J}\cdot\text{m}^{-2}$ UV-C irradiation, this time under optimal condition, *i.e.*, in saline solution (0.9% NaCl) without the interference of the particulate material from the soil samples. A total of 40 pigmented isolates were able to grow in liquid culture

medium. Among these, 27 were representative of soil 4 (Sitio 2 Gypsum), corresponding to 67.5% of all isolates. These results are shown in Figures 20 and 21.

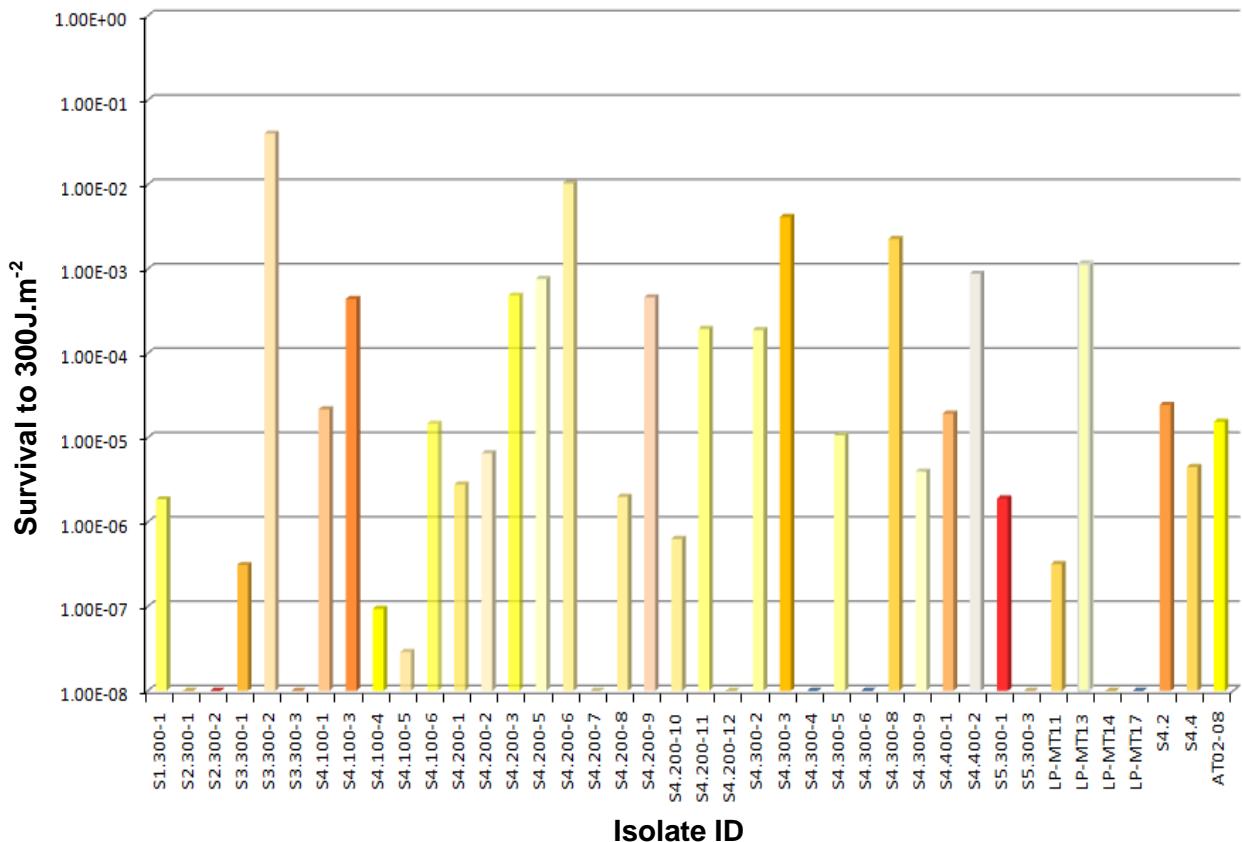


Figure 20. UV-C resistance profiles of 40 isolates from 5 soils of Atacama Desert. Columns were coloured according to their pigmentation.

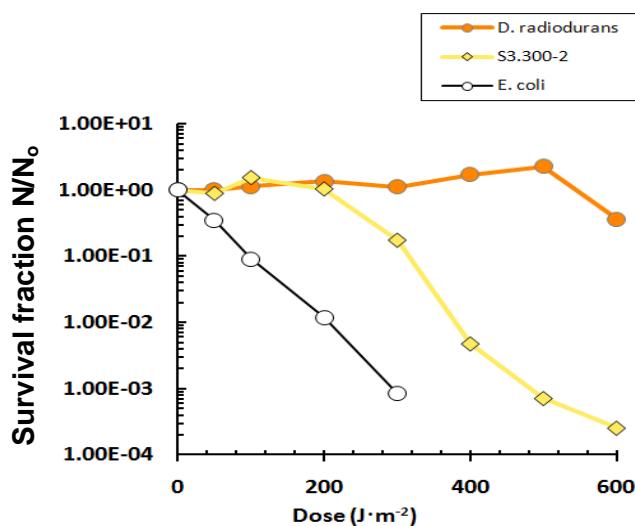


Figure 21. Survival curve of the top UVC-resistant isolate S3.300-2 in comparison to survival curves of *E. coli* wild-type strain K12, and wild-type strain R1 of *D. radiodurans*.

The 14 most resistant isolates were subjected to molecular identification by partial amplification of 16S rRNA followed by sequencing and comparison to NCBI database. Most isolates showed high similarity to the species *Bacillus cereus* and *B. Thuringiensis*, and the most resistant one was also a *Bacillus* species. One isolates was identified as *Pseudomonas stutzeri*. These results are shown in Table 8.

Table 9. Molecular assignments of the 14 isolates most resistant to UV-C irradiation.

Code	Espécies	Origin
S3-300-2	<i>Bacillus. sp</i>	Capa negra La Portada
S4.300-3	<i>Bacillus cereus/thuringiensis</i>	Sitio 2 Gypsum
S4.300-8	<i>Bacillus cereus/thuringiensis</i>	Sitio 2 Gypsum
LP-MT13	<i>Bacillus cereus/thuringiensis</i>	La Portada cave
S4.400-2	<i>Bacillus cereus</i>	Sitio 2 Gypsum
S4.200-5	<i>Bacillus cereus/thuringiensis</i>	Sitio 2 Gypsum
S4.200-3	<i>Bacillus cereus/thuringiensis</i>	Sitio 2 Gypsum
S4.200-9	<i>Bacillus cereus/thuringiensis</i>	Sitio 2 Gypsum
S4.100-3	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Sitio 2 Gypsum
S4.100-11	<i>Bacillus cereus/thuringiensis</i>	Sitio 2 Gypsum
S4.300-2	<i>Bacillus cereus/thuringiensis</i>	Sitio 2 Gypsum
S4.2	<i>Bacillus cereus/thuringiensis</i>	Sitio 2 Gypsum
S4.400-1	<i>Bacillus cereus/thuringiensis</i>	Sitio 2 Gypsum
AT02-08	<i>Bacillus cereus/thuringiensis</i>	Sitio cuarzos

Microbial diversity was also assessed by molecular analysis. 16S rRNA sequences from total DNA extracted from the samples were amplified by PCR and separated by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE), generating banding patterns representative of the microbial communities. This analysis revealed the presence of complex microbial communities in all samples. Additionally, interesting differences were revealed between the sites where soils were collected, as evidenced by distinct profiles of 16S rRNA for each specimen (Figure 22).

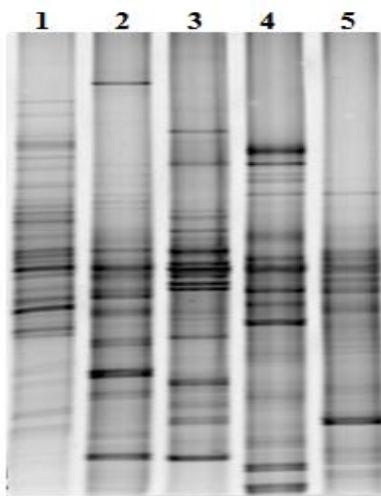


Figure 22. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) of 16S rRNA sequences showing complex microbial communities in all samples. 1- Laguna Llamara, 2- Sitio Cuarzo B2, 3-Capa Negra La Portada, 4-Gypsum, 5-Sitio 3 S4.

3.2. Martian atmosphere

Samples of the black biofilm from Chile were divided into 10mg aliquots and placed in microcentrifuge tubes in triplicate, then placed inside a vacuum chamber with controlled temperature (-28°C) and pressure (6-8Pa) maintaining an internal atmosphere composed of CO₂ (95.3%), N₂ (2.7%), air (1.7%), O₂ (0.2%) and H₂O (0.03%). Samples were taken from these conditions after 1, 4, 7, 21 and 28 days of exposure, and inoculated onto oligotrophic culture media (0.1% yeast

extract or 0.1% tryptone). After 1 week incubation at room temperature, one sample corresponding to the exposure time of 4 days revealed the presence of a colony with red pigmentation that has been termed LPMARS-1. This colony was subjected to partial PCR amplification of the 16S rRNA gene and the sequence obtained (Figure 23) aligned with 98% similarity to *Modestobacter* sp., a typically oligotrophic actinobacteria (Figure 24).

```
GGGCGTAAGAGCTCGTAGGCGGTCTGTCGCGTCGGCTGTGAATCCGAGGCTAACCTCGGGCTGCAGTCGA
TACGGGCAAACTAGAGTACTGCAGGGGAGACTGGAATTCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGA
GGAACACCGGTGGCGAAGGGGGCTCTGGGCAGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGAGCGAAC
AGGATTAGATAACCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGTTGGCGCTAGGTGTGGGGCATTCCACGGCTCCGT
GCCGAGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCCTGGGAGTACGGNCGAAGGCTAAACTCNAGGAATTGACGG
```

Figure 23. Partial sequence of 16S rRNA gene from isolate LPMARS-1.

Table 10. Comparison of 16S rDNA sequences of the isolate LPMARS-1 with sequences deposited in NCBI database showing the alignments with higher similarity.

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
FJ966173.1	<i>Modestobacter</i> sp. BMG5755 16S rRNA gene, partial sequence	632	632	100%	$3e^{-178}$	98%
FJ213487.1	Uncultured bacterium clone TSPB_32 16S rRNA gene, partial sequence	632	632	100%	$3e^{-178}$	98%
EU181225.1	<i>Modestobacter</i> sp. 42H12-1 16S rRNA gene, partial sequence	632	632	100%	$3e^{-178}$	98%
DQ448774.1	<i>Modestobacter</i> sp. CNJ794 PL04 16S rRNA gene, partial sequence	632	632	100%	$3e^{-178}$	98%
DQ448698.1	<i>Modestobacter</i> sp. CNJ793 PL04 16S rRNA gene, partial sequence	632	632	100%	$3e^{-178}$	98%
EF522200.1	Uncultured actinobacterium clone EPLS011 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	628	628	100%	$4e^{-177}$	97%
GQ329478.1	Uncultured <i>Modestobacter</i> sp. clone P8s-342 16S rRNA gene, partial sequence	627	627	100%	$2e^{-176}$	97%

After analysis of these results a literature review on these microorganisms was started and new experiments are being planned to characterize the survival profile of this isolate to selected parameters of the Martian environment as well as different sources of UV radiation for its photobiological characterization.

4- EXPERIMENTAL SIMULATION OF HIGH LEVELS OF RADIATION FROM ASTROPHYSICAL SOURCES AND THE EFFECTS ON SURVIVAL OF *D. RADIODURANS* AND *CHROOCOCCIDIOPSIS* SP., USING FACILITIES OF DIAMOND SYNCHROTRON LABORATORY AT OXFORDSHIRE, UK.

4.1. Sample preparation

Cells of the wild-type strain of *D. radiodurans* (wt) and the cyanobacterium *Chroococcidiopsis* sp. isolated from the Atacama desert (Chile) were mixed with basalt (B) or sandstone (TSS) grains to verify the influence of elemental composition of two distinct types of grains in the protection against ionizing radiation. Grains were obtained by breaking and crushing 500g of rock, followed by screening with sieves of 90µm, 63µm and 38µm. The grains were divided into 1.25mg aliquots per microcentrifuge tube and autoclaved. Cultures in early stationary phase were then mixed with the grains (Figure 23).

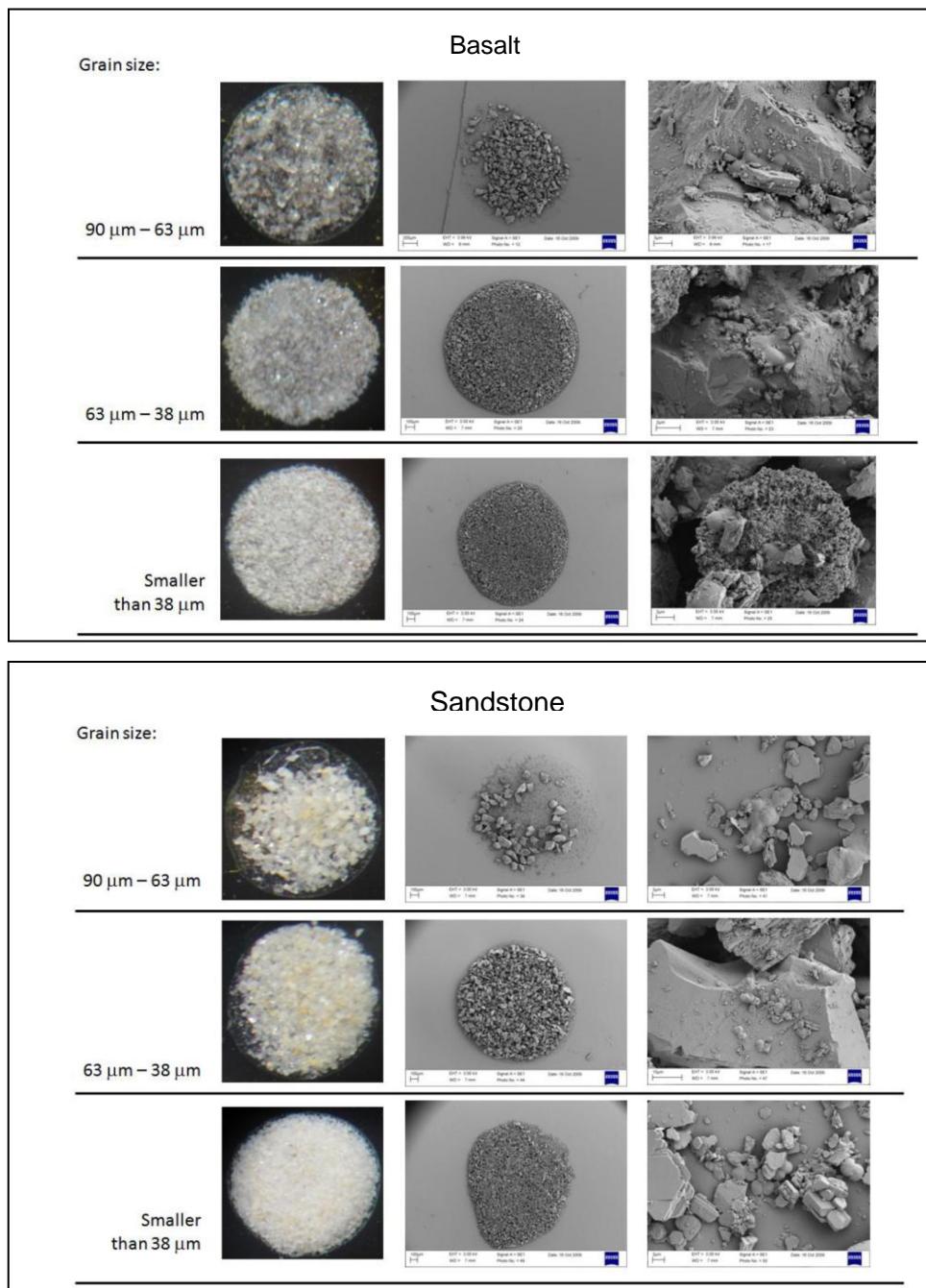


Figure 23. Optical micrographs on the left (40x) and electron micrographs at the center and right of the two panels showing differences in size, color and texture of the grains of basalt (upper panel) and sandstone (lower panel) as well as cells of *D. radiodurans* mixed with grains.

Grains less than 38µm dimensions were selected and subjected to a new stage of grinding in ultratriturador, resulting in a powder with many fragments and amorphous nanometric and some micrometric fragments with average size around 10µm (Figure 24).

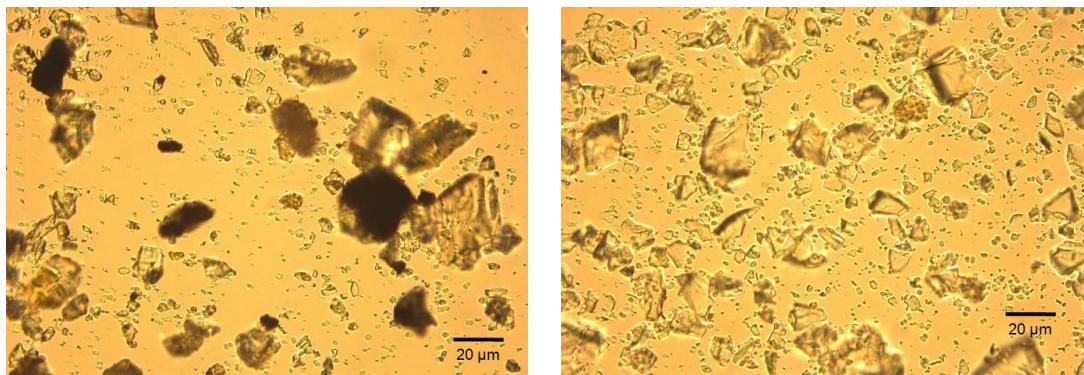


Figure 24. Optical micrographs of *D. radiodurans* cells mixed with basalt (left) or sandstone (right) grains.

The chemical composition of the grains was determined by X-ray fluorescence (XRF), showing the presence of many heavy elements in basalt grains and 93.72% SiO₂ in sandstone grains (Tables 11 and 12).

Table 11. Trace elements in grains

Element	Basalt	1:1 mix	Sandstone	Limit
Rb	56	46	35	2
Sr	849	478	117	2
Y	28.8	15.6	3.7	2.0
Zr	308	179	55	2
Nb	69.4	34.8	1.1	1.5
Ba	568	558	494	12
Pb	8	7	10	5
Th	11	7	0	4
U	3	2	0	3
Sc	22	11	1	5
V	288	139	6	5
Cr	77	39	4	4
Co	29	14	1	2
Ni	31	15	3	3
Cu	53	29	2	3
Zn	78	40	3	3
Ga	20	11	4	3
Mo	3	1	1	2
As	0	0	0	5
S	4	99	180	50
TiO ₂ %	2.74	1.46	0.05	
Fe ₂ O ₃ %	10.16	4.79	0.63	

Table 12. Molecular composition of grains

wt. %	Basalt	1:1 Mix	Sandstone
SiO₂	47.24	71.06	93.72
TiO₂	2.96	1.54	0.05
Al₂O₃	16.51	10.21	3.88
Fe₂O₃	11.19	5.77	0.21
MnO	0.17	0.08	0.004
MgO	5.82	2.79	0.03
CaO	10.03	5.16	0.03
Na₂O	3.51	2.10	0.64
K₂O	2.23	2.01	1.77
P₂O₅	0.58	0.30	0.02
LOI	0.32	0.34	0.31

The cell density of cultures was determined by counting cells under an optical microscope, being $2.84 \times 10^8 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$ for *D. radiodurans* and $2 \times 10^7 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$ for *Chroococcidiopsis* sp. The cells were mixed with the grains in a volume sufficient to obtain a mixture with final concentration of grains at 1.25%. After homogenization, volumes of 1 μl of this mixture were distributed in the appropriate spaces on the sample holder, resulting in samples containing 10^4 - 10^5 cells homogenized with 1.25mg grains. All samples were then dried at room temperature for at least 24 hours.

4.2. Sample holder

Kapton sheets were mounted between two layers of a copper screen of approximately 1mm thick. The samples were then deposited on the sheet of kapton (1 $\mu\text{l}/\text{sample}$) in triplicate, according to Figure 25. The set was kept for 30 hours in desiccator.



Figure 25. Overview of the sample holder loaded with 72 samples.

4.3. Experimental design

The experiments were divided into three categories:

- (I) Survival to white beam X-ray (>1 keV), attenuated with different filters;
- (II) Survival to non-attenuated monochromatic beam (10 keV);
- (III) Addressing the dose rate effects for dehydrated free cells using monochromatic beam (10keV) attenuated 1x, 0.1x and 0.01x, increasing the exposure times by 1x, 10x and 100x respectively to achieve the same fluency.

4.4. Irradiation chamber

A vacuum chamber (12cm x 20cm x 30cm) consisting of four cylindric windows was equipped with a sample holder assembled on a water-fed cooling system to prevent overheating of samples during irradiation (Figure 26-A). The cooling system was constructed using a piece of copper (1cm x 8cm x 3cm) with piping to the entry and exit of water, as shown in Figure 26-B. The connection to external cooling apparatus was made through tubes attached to the fixed top flange. A temperature sensor (thermopar) was placed on the sample holder to monitor any temperature changes during irradiation. A sheet of kapton 25 μ m thick was used in the front flange to maintain a vacuum of 200Pa in the chamber while allowing the transmission of virtually 100% of X-ray beam directly to the samples (Figure 26-B).

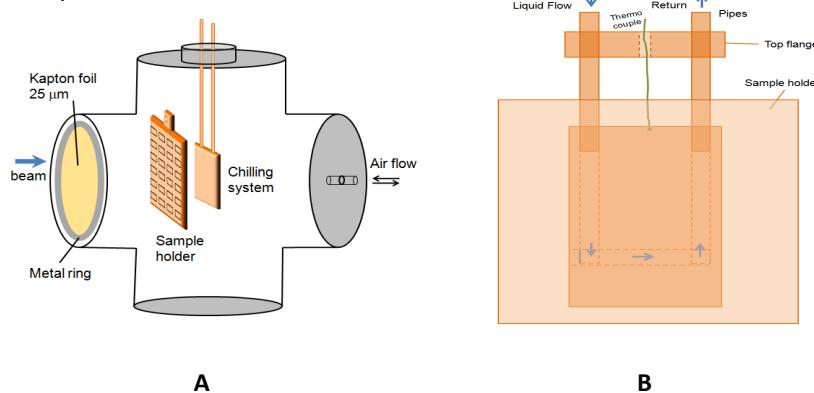


Figure 26. **A**, diagram of the chamber showing the metal ring used to hold the kapton sheet sealing the chamber, as well as the sample holder and the cooling system. The sample holder was assembled on the cooling system attached to the top flange. **B**, Detail of the cooling system showing the inlet and outlet water pipes.

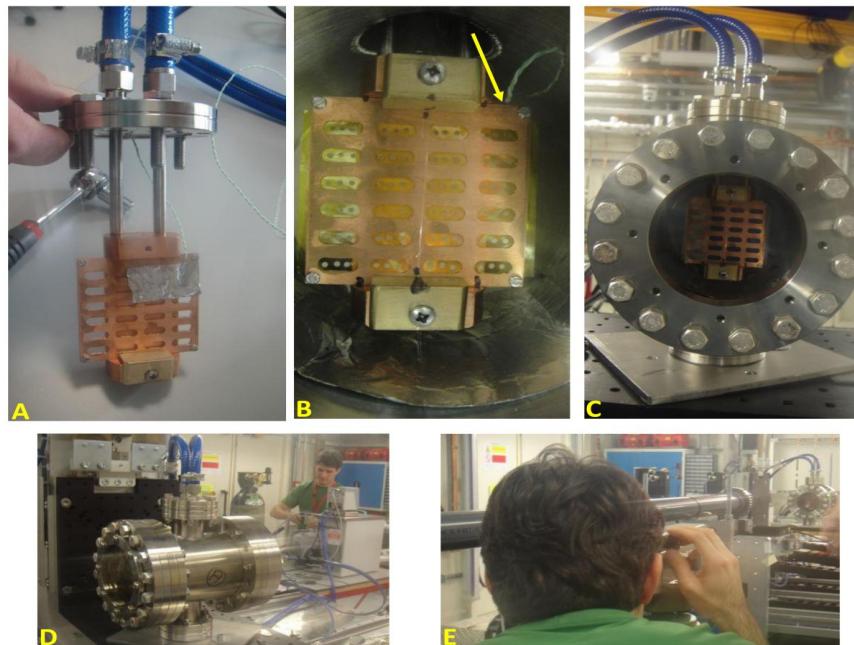


Figure 27. **A**, Assembling of the sample holder on the cooling system with tubes connected to the hose with running water. **B**, sample holder assembling and cooling system inside the irradiation chamber. The arrow shows the thermopar attached to the sample holder in order to monitor the possible temperature variation using a digital multimeter. **C**, Irradiation chamber positioned on the platform. **D**, The cooling system connected to the chamber kept the temperature at 20°C. **E**, Alignment of the sample holder using a laser altimeter.

4.5. Irradiation procedures

In a first set of experiments, samples of *D. radiodurans* and *Chroococcidiopsis* sp. were exposed to the non-attenuated white beam X-ray ($> 1\text{keV}$) under a slightly positive pressure of nitrogen gas (N_2). Results were observed only for *Chroococcidiopsis* sp. after two months of incubation. In a second set of experiments, the irradiation procedures were carried out only for *D. radiodurans*, according to parameters displayed in Table 20. In the second set of experiments all samples were irradiated in rough vacuum (200Pa), since remaining moisture of the positive pressure could eventually decrease cell survival.

In Table 13 it is shown the experimental design for the second set of experiments. Samples on holders 1 and 2 were exposed to the beam during the following exposure times: 0s, 3s, 10s and 30s (43s per experiment). Samples on holder 3 were irradiated for 0s, 1s, 3s, 10s, 30s, 100s, 300s and 1000s (24min4s per experiment).

In an attempt to determine whether there is any difference in survival rates depending on the dose rate, the samples were irradiated using monochromatic beam (10keV) at three different fluxes, changing the exposure times to achieve the same final doses: (i) without attenuation (experiment 16) for 0s, 3s, 10s and 30s, (ii) attenuated to 0.1x with 100 μm carbon sheet + 10 μm gold sheet (experiment 17) for 0s, 30s, 100s and 300s, and (iii) attenuated to 0.01x using a 1mm carbon sheet (experiment 18) for 0s, 300s, 1000s and 3000s. These increased exposure times were necessary to give the same total dose.

Table 13. Experimental design for irradiation of microorganisms with synchrotron X-rays at B16 beamline, Diamond Light Source, UK.

Experiment	Sample	Attenuation	Sample holder
1	NC	2mm Al	1
2	B	2mm Al	1
3	SST	2mm Al	1
4	NC	50 μm Mo	1
5	B	50 μm Mo	1
6	SST	50 μm Mo	1
7	NC	100 μm C + 10 μm Au	2
8	B	100 μm C + 10 μm Au	2
9	SST	100 μm C + 10 μm Au	2
10	NC	1mm C	2
11	B	1mm C	2
12	SST	1mm C	2
13	NC	-	3
14	B	-	3
15	SST	-	3
16	NC	-	4
17	NC	-	4
18	NC	-	4

NC, Naked cells. **B**, Cells mixed with basalt grains. **SST**, Cells mixed with sandstone grains.

4.6. Results

4.6.1. Recovery of cellular controls

Controls obtained after dehydration were recovered and analyzed in the same way that the samples exposed to the treatments. These controls were denominated external controls (Table 14). Controls underwent all procedures except the irradiation was called internal controls and were then used as references for estimates of actual survival rates (Figure 28).

Table 14. Viability of the samples using the values obtained through direct cell counting under microscope as reference (2.84×10^8 cells·ml $^{-1}$). Standard deviation (SD) represents variation among 24 replicates for samples named as cell suspension, and 15 replicates for samples named as cells mixed with sandstone or basalt grains.

Samples	External control			Internal control		
	^a CFU·ml $^{-1}$	^b Viability (%)	SD	CFU·ml $^{-1}$	^c Viability (%)	SD
Cell suspension	1.64×10^8	58	0.11	3.94×10^7	24	0.09
Cells + sandstone grains	1.12×10^8	39	0.27	5.6×10^7	50	0.30
Cells + basalt grains	1.12×10^8	39	0.27	6.9×10^7	62	0.32

a – Colony-forming units

b – Compared to the value obtained through direct cell counting (2.84×10^8 CFU·ml $^{-1}$)

c – Compared to the external control

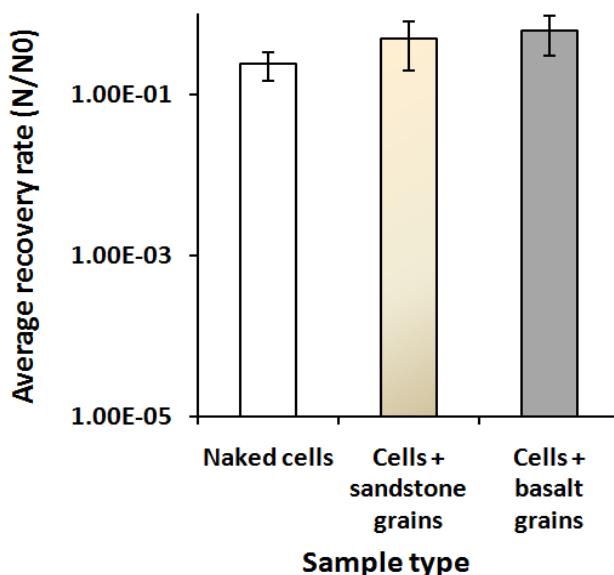


Figure 28. Average cell recovery from each of the 3 types of substrates. Rates were obtained by dividing values of internal controls, by values of the external controls. Internal controls were exposed to all procedures except the irradiation treatments, whereas external controls were samples ready to be deposited on the kapton foil, prior to treatments. Error bars represent the standard deviation for 24 replicates for naked cells and 15 replicates for cells mixed with sandstone or basalt grains.

4.6.2. Survival curves for white beam of X-rays (> 1keV) attenuated with different filters

Survival curves were obtained only with the most attenuated beams (Figure 29). Survival rates of the experiments using low attenuation, *i.e.*, beams with higher intensity, were below the detection limit of the microbiological method used ($<10^{-5}$).

All survival curves showed the same general pattern. Cells mixed with basalt grains are inactivated faster than cells mixed with sandstone grains or naked cells. This phenomenon is clearly demonstrated by observation of Figure 29-A, with the most attenuated beam (less intense). Although survival curves have been represented by exponential trend lines, the plots shown in Figure 29-A seem to represent slower inactivation curves. However, the exponential trend lines were maintained in accordance with classic models of microbial inactivation by ionizing radiation.

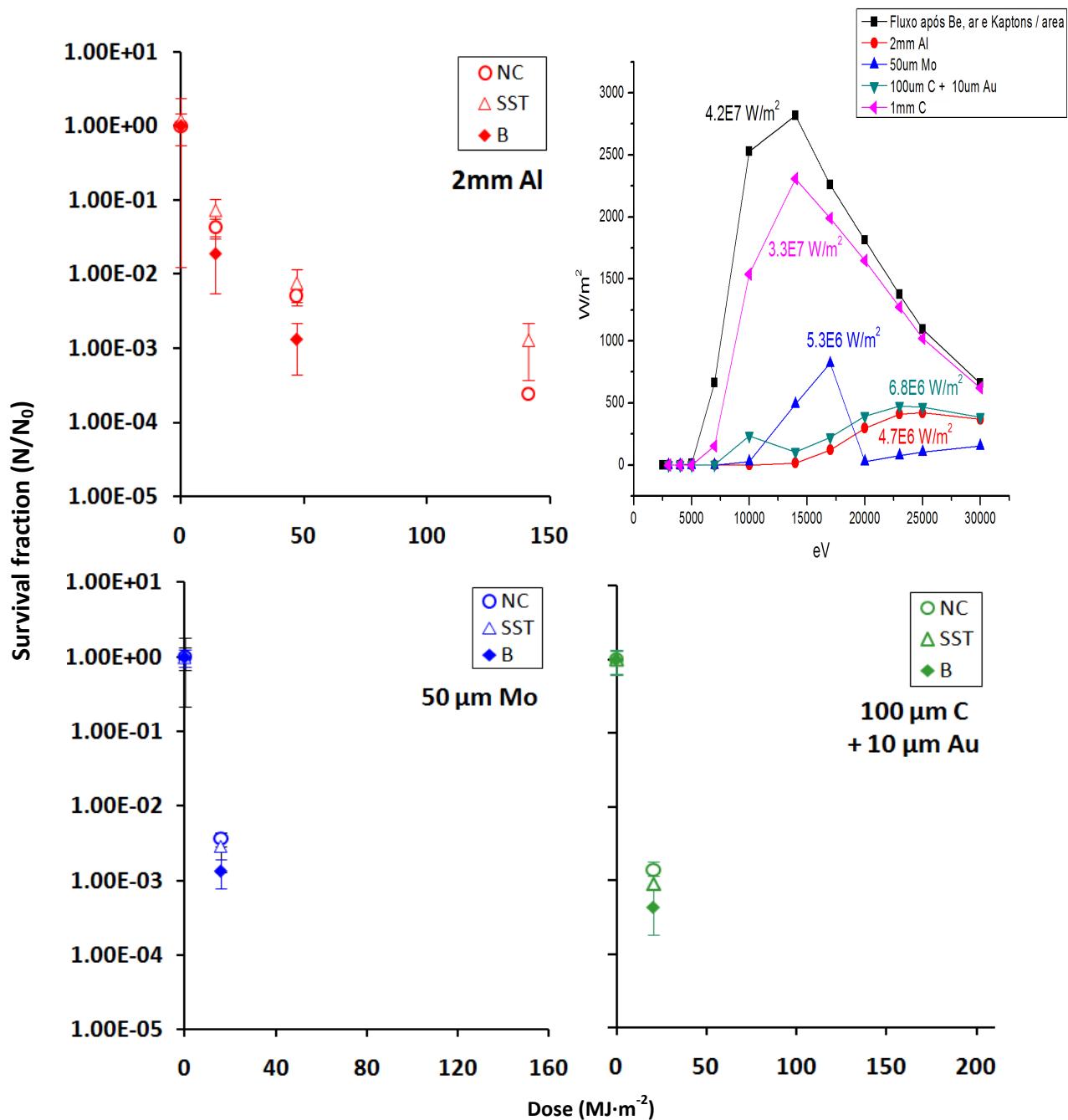


Figure 29. Survival curves of *Deinococcus radiodurans*, mixed or not with rock grains (sandstone or basalt), to X-rays white beam (1keV to 20kev) attenuated with the following filters: **A**, 2mm aluminum. **B**, 50μm molybdenum. **C**, 100μm carbon + 10μm gold. **D**, 1mm carbon. Minimum value on the Y-axis represents the maximum detectable inactivation level by our methods (10^{-5}).

4.6.3. Survival curves for monochromatic beam of X-rays (10keV)

Survival curves were obtained for all types of samples and showed the same pattern of cell inactivation. Cells mixed with basalt grains are inactivated faster than cells mixed with sandstone or free cells (Figure 30). The survival curves appear to exhibit an asymptotical trend in the case of the most attenuated flux (2mm Aluminum). The initial plots of each curve are superimposed due to the low inactivation rates for lower exposure times.

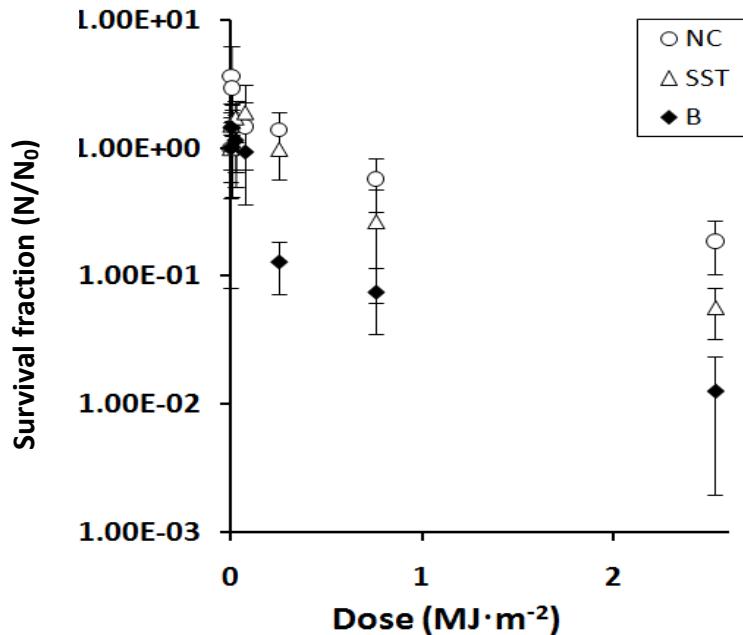


Figure 30. Survival curves of *D. radiodurans*, mixed or not with basalt or sandstone grains to monochromatic X-ray beam (10keV).

4.6.4. Dose rate response

In an attempt to determine whether there is any difference in survival rates depending on the dose rate, samples were irradiated using monochromatic beam (10keV) at three different fluxes, changing the exposure times to achieve the same final doses: (i) without attenuation, (ii) attenuated to 0.1x with 100μm carbon sheet + 10μm gold sheet, and (iii) attenuated to 0.01x using a 1mm carbon sheet. The exposure times were then increased in 1x, 10x and 100x respectively. However, the final doses were not sufficient to significantly inactivate cells (Figure 31).

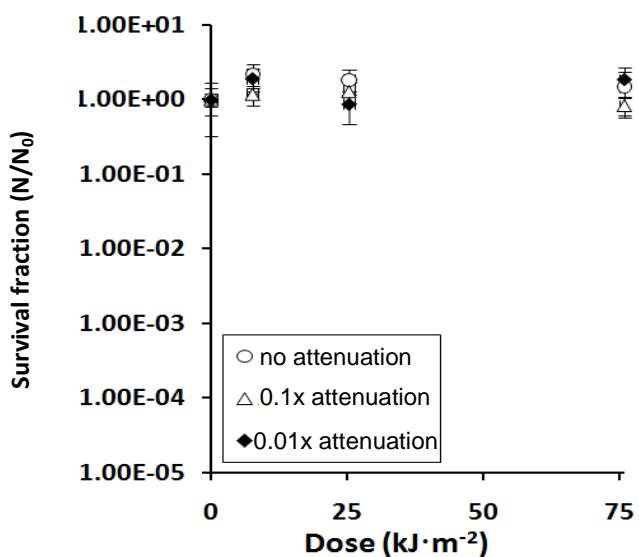


Figure 31. Survival curves of *D. radiodurans*, mixed or not with basalt or sandstone grains to monochromatic X-ray beam (10keV), attenuated with different filters to achieve the same doses after different exposure times. The values on the horizontal axis correspond to experiments performed with the most attenuated beam (higher exposure times).

4.6.5. *Chroococcidiopsis* sp.

To check the influence of grain size in protecting against radiation, cells *Chroococcidiopsis* sp. were mixed or not with basalt or sandstone grains in three size ranges: (i) up to 90 μm , (ii) up to 63 μm and (iii) up to 38 μm . The final amounts of cells and grains in each sample were respectively 2x10⁴ and 1.25mg. The irradiation procedures were identical to those described in the previous sections and the results are presented in Table 15.

Table 15 Observed growth of *Chroococcidiopsis* cells after irradiation with wide spectrum of X-rays. Values represent minimum time (in days) required to observe any growth.

Dose (x10 ⁶ J·m ⁻²)	NC	Samples ID								
		B90	B63	B38	B/SST90	B/SST63	B/SST38	SST90	SST63	SST38
0	*-	-	-	-	41 ^a	41 ^a	41	41 ^a	41 ^b	41 ^b
1.4	-	-	-	-	-	-	-	-	51 ^b	51 ^b
7.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

*- No growth, which means that the inactivation rate was higher than 10⁻⁴

a. Results observed in two of three replicates

b. Results observed in one of three replicates. All other results were observed in three replicates. NC= Naked cells, B= Basalt, SST = Sandstone, B/SST= 50% mixture of B and SST. Numbers at the sample codes represent the upper limit of grain sizes (μm)

5- EXTENDED EXPOSURE (UP TO 4 WEEKS) OF *D. radiodurans* TO DIFFERENT EXPERIMENTAL CONDITIONS TO LOW PRESSURE IN A VACUUM CHAMBER (10⁻⁵Pa)

Samples were prepared as described in Section IV.4 and exposed for 4 weeks in a vacuum chamber (10⁻⁵Pa), being removed from the chamber after day 1, 4, 7, 21 and 28. In parallel, control samples for each experimental variation were kept the same period of time under ambient conditions (temperature ~22°C, pressure = 1atm ~10⁵Pa), and recovered at the same time intervals. The samples were then diluted in TGY medium and subjected to serial dilution in saline, and then plated on agar-solidified TGY. After incubation at 30°C for 72 hours, the colonies grown on culture medium were scored and survival rates were plotted on semi-log graphs showing the rates of recovery and survival of controls to treatments, as shown in Figure 32.

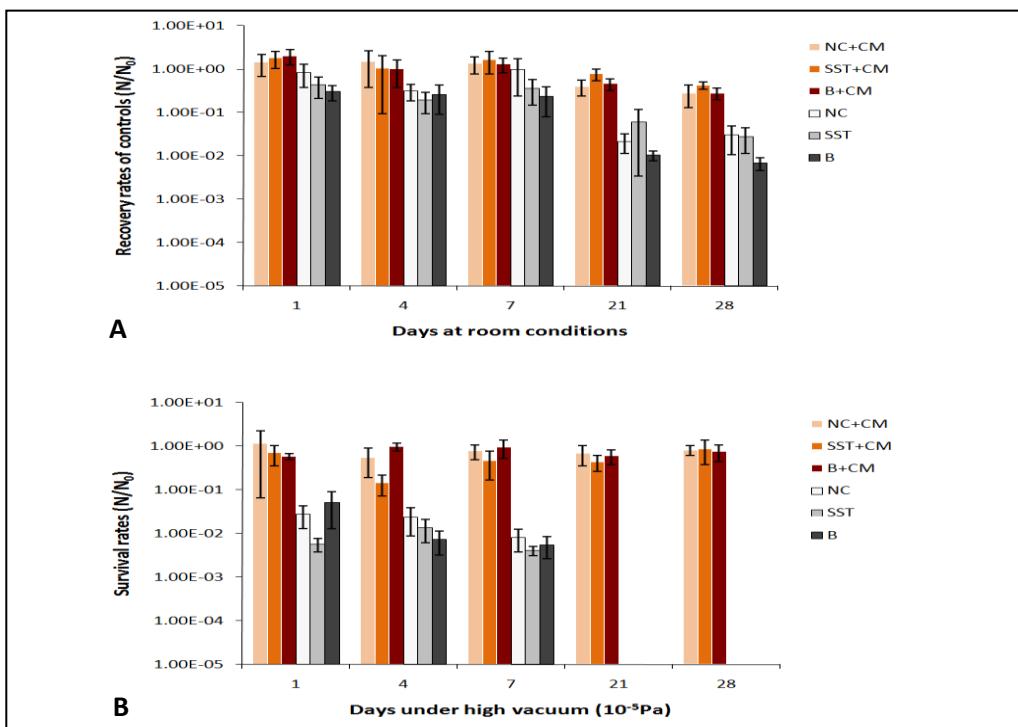


Figure 32. **A**, recovery rate of the controls during times kept growing at ambient ($\sim 22^\circ\text{C}$ temperature, $\sim 1\text{atm}$ pressure). **B**, Survival rates in relation to controls after different times of exposure to high vacuum (10^{-5} Pa). NC + CM, cells mixed with culture medium, SST+CM, cells mixed with culture medium plus sandstone grains, B+CM, cells mixed with culture medium plus basalt grains, NC, naked cells, SST, cells mixed only with sandstone grains; B, cells mixed only with basalt grains.

It can be observed in Figure 32 that all samples mixed with culture medium showed significantly higher rates of recovery and survival, especially after longer times. Control samples under the various experimental variations underwent spontaneous loss of viability throughout the experiment, what was more evident for cells without culture medium (Figure 32-A). Furthermore, survival to high vacuum is much more dependent on the presence of organic material in the sample (culture medium) than on the type of grain mixed with the cells (Figure 32-B). Samples corresponding to 21 and 28 days of exposure to high vacuum scored survival rates lower than the detection limit of the method (10^{-5}).

6- EXPERIMENTAL SIMULATION OF CHARGED PARTICLES OF THE SOLAR WIND AND VERIFICATION OF THE EFFECTS ON THE WILD-TYPE STRAIN OF *D. radiodurans* AND *Chroococcidiopsis* FROM ATACAMA DESERT

The samples were prepared as described in Section 4.1, *i.e.*, containing 1.25mg basalt or sandstone grains and 2×10^5 cells of *D. radiodurans* cells or 2×10^4 *Chroococcidiopsis* sp. in each sample.

6.1. Irradiation with electron beam (2keV)

6.1.1. Description of experiments

Irradiation with electron beam was performed using the facilities of the Molecular Physics Laboratory, Department of Physics and Astronomy, The Open University (UK). A vacuum chamber capable of maintaining the system around 10^{-4} to 10^{-6} Pa was coupled to an electron gun model ELG-2/EGPS-1022 Kimball, emitting 2keV electrons with controllable energy and flux. The samples deposited on Millipore filters were placed on a metal sample holder using a double-sided carbon tape, assembled inside the chamber and placed normal to the beam direction by means of a rotational manipulator. For each experiment, irradiations were carried out as described in Table 16. Sample conditions can be seen in Table 17.

Table 16. Exposure times for irradiation with 2keV electron beam

Dose ($\times 10^{14}$ electrons·cm $^{-2}$)	Exposure time (s)	Exposure time (min)	Replicates	Final time
0 (Control)	0	0	3	0
8.60	5	0.08	3	15s
25.82	15	0.25	3	45s
77.44	45	0.75	3	2min 15s
232.34	135	2.25	3	6min 45s
697.00	405	6.75	3	20min 15s
TOTAL	605	10.08	18	30min 15s

Table 17. Experimental design for irradiation of microbial cells with 2keV electrons

Experiment	Sample
1	<i>Chroococcidiopsis</i> sp.
2	<i>Chroococcidiopsis</i> sp.
3	<i>Chroococcidiopsis</i> sp.
4	<i>D. radiodurans</i>
5	<i>D.s radiodurans</i>
6	<i>D. radiodurans</i>

6.1.2. Results

Taking into account the composition of the main elements of the biological material, it is possible to estimate the atomic percentage as 31% carbon, 49% hydrogen, 13% oxygen and 7% nitrogen (Salton, 1964; Hiragi, 1972). These values were used to calculate the linear energy transfer (LET) of 2keV electrons on the target (single-cell 2μm in diameter, 0.9392g·cm $^{-3}$ density), by means of the software CASINO v2.42. The calculated LET was 20keV μm $^{-1}$. The penetrating depth of these particles was estimated to be around 160nm (Figure 33), with maximum energy deposited around 100nm.

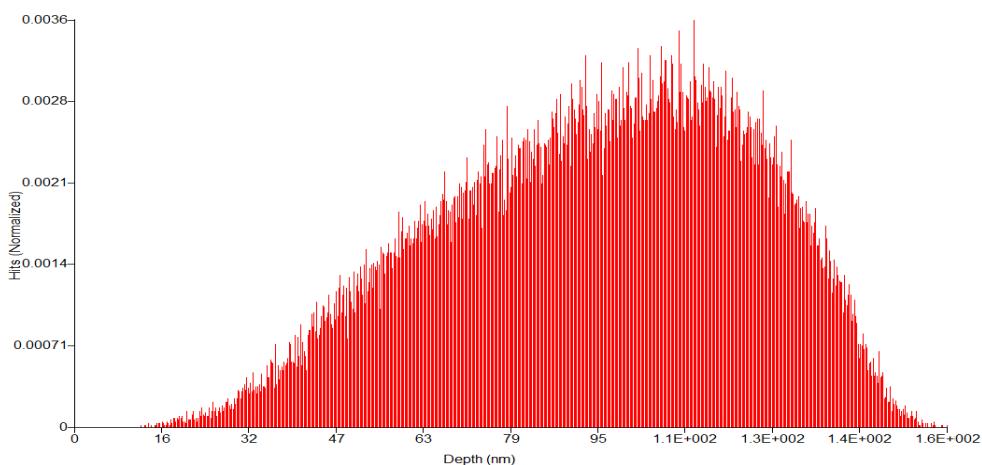


Figure 33. Simulation of the penetration depth of 2keV electrons, through a beam 10nm diameter, across a *D. radiodurans* cell after 6min 45s exposure, corresponding to 7×10^4 electrons. The simulation was performed using the software CASINO v2.42.

All survival curves to electrons showed low cell inactivation rates. Naked cells are apparently less inactivated than cells mixed with grains, although this effect was only observed for higher doses. There are no significant differences in the radiation protection afforded by either type of grain (Figure 34). This is due to the low penetration depth of 2keV electrons. Their trajectories are blocked within the cell wall, where 90% of the total energy is deposited to a maximum depth of 20nm.

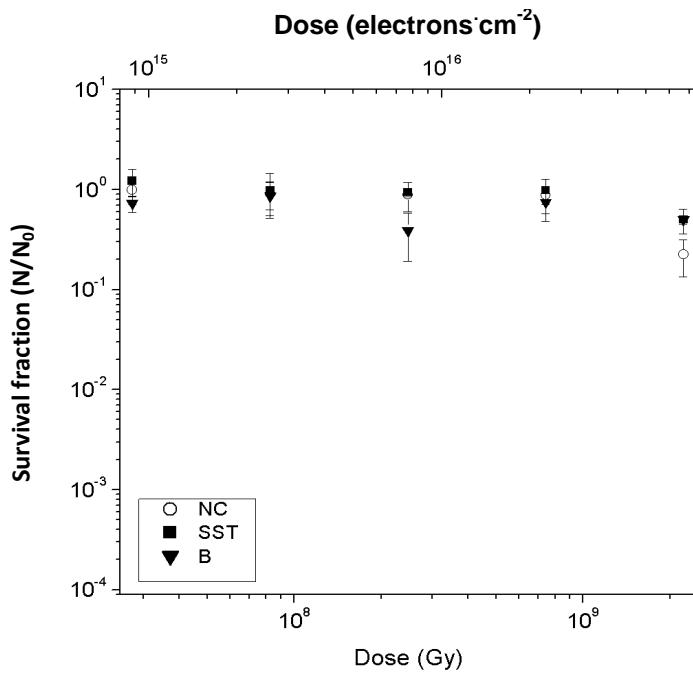


Figure 34. Survival curves of *D. radiodurans* obtained in the absence (NC) or presence of sandstone or basalt grains (SST or B) irradiated with 2keV electron beam.

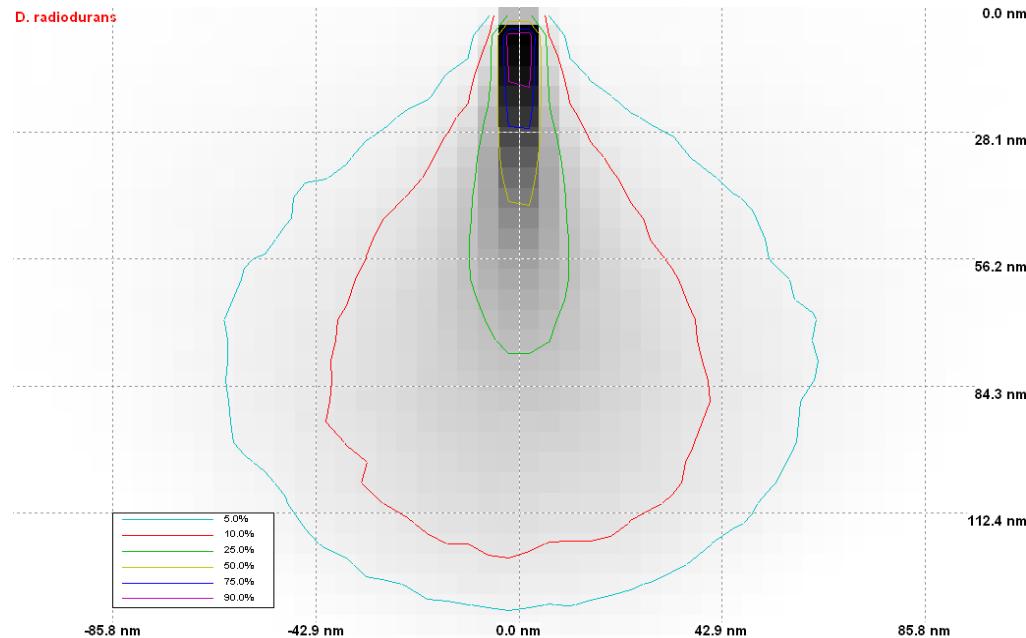


Figure 35. Simulation of total energy deposition path from a 2keV electron beam 10nm in diameter, on cells of *D. radiodurans*, after 6min 45s exposure, corresponding to 7×10^4 electrons. The simulation was performed using the software CASINO v2.42.

Unfortunately samples of *Chroococcidiopsis* sp. did not resist the experimental procedures, since it was not possible to observe any cell proliferation in the controls, probably due to the short dehydration time. Under ideal conditions, cells of *Chroococcidiopsis* sp. require at least three days of slow dehydration to maintain cell viability during extended anhydrobiosis.

6.2. Irradiation with proton beam (200keV)

The experiments with proton beam were performed using the facilities of the Laboratory of Experimental Physics of the Osservatorio di Catania, Sicily, Italy. A vacuum chamber capable of maintaining a system of the order of 10^{-4} Pa was coupled to a system for generating protons with final energy of 200keV. The samples deposited on Millipore filters were placed in a sample holder using a double-sided carbon tape and assembled inside the chamber, positioned normal to the beam. The irradiation parameters are detailed in Table 18 and 19.

Table 18. Details of irradiation of *D. radiodurans* with 200keV protons.

Sample	Charge (nC)	protons (cm^{-2})	protons (per sample)	protons (per cell)	Dose (Gy)*	Replicates
NC	0**	0	0	0	0	3
NC	0.04	2.77×10^8	4.33×10^6	6.15	32.35	2
NC	0.44	2.77×10^9	4.33×10^7	61.46	323.52	3
NC	4.44	2.77×10^{10}	4.33×10^8	6.15×10^2	3.24×10^3	3
NC	44.40	2.77×10^{11}	4.33×10^9	6.15×10^3	3.24×10^4	2
NC	4.44×10^3	2.77×10^{12}	4.33×10^{10}	6.15×10^4	3.24×10^5	2
NC	4.44×10^4	2.77×10^{13}	4.33×10^{11}	6.15×10^5	3.24×10^6	2
NC	4.44×10^5	2.77×10^{14}	4.33×10^{12}	6.15×10^6	3.24×10^7	2
SST	0	0	0	0	0	3
SST	22.20	1.39×10^{11}	2.17×10^9	3.07×10^3	1.38×10^4	2
SST	4.44×10^4	2.77×10^{13}	4.33×10^{11}	6.15×10^5	2.75×10^6	2
B	0	0	0	0	0	3
B	22.20	1.39×10^{11}	2.17×10^9	1.09×10^3	1.38×10^4	2
B	4.44×10^4	2.77×10^{13}	4.33×10^{11}	2.17×10^5	2.75×10^6	2

Table 19. Details of irradiation of *Chroococcidiopsis* sp with 200keV protons.

Sample	Charge (nC)	protons (cm^{-2})	protons (per sample)	protons (per cell)	Dose (Gy)*	Replicates
NC	0**	0**	0	0	0	3
NC	0.44	2.77×10^9	4.33×10^7	61.46	324	3
NC	44.40	2.77×10^{11}	4.33×10^9	6.15×10^3	3.24×10^4	2
NC	4.44×10^4	2.77×10^{13}	4.33×10^{11}	6.15×10^5	3.24×10^6	2
SST	0	0	0	0	0	3
SST	22.20	1.39×10^{11}	2.17×10^9	3.07×10^3	1.38×10^4	2
SST	4.44×10^4	2.77×10^{13}	4.33×10^{11}	6.15×10^5	2.75×10^6	2
B	0	0	0	0	0	3
B	22.20	1.39×10^{11}	2.17×10^9	3.07×10^3	1.38×10^4	2
B	4.44×10^4	2.77×10^{13}	4.33×10^{11}	6.15×10^5	2.75×10^6	2

* Calculated using the software SRIM 2010, assuming an average cell density of $1.0\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$, and average elemental composition of biological material to be 50% carbon, 30% nitrogen, 10% hydrogen and 10% oxygen

** Internal controls, subjected to all treatments except for irradiation

NC = naked cells, SST = cells mixed with sandstone grains, B = cells mixed with basalt grains

In a pilot experiment, samples of *D. radiodurans* were also deposited on substrates representing cosmic dust analogues. Amorphous forsterite (Mg_2SiO_4) or amorphous and crystalline fayalite (Fe_2SiO_4) were tested to check whether there could be any influence of the type of substrate on cell inactivation. These minerals are considered good analogues of interstellar material due to its morphology and molecular composition. After irradiation, cells of *D. radiodurans* were recovered from the substrates and subjected to serial dilution and plating. The colonies were scored after a maximum period of 72 hours of incubation at 29°C.

The substrates containing cells *Chroococcidiopsis* sp. were immersed in the culture medium BG-11 Divided in aliquots of 2ml deposited on 12-wells plates. Incubation was done at room

temperature under natural cycles of artificial lightining with fluorescent light at 40cm away from the light source.

6.2.1. Results

6.2.1. *Deinococcus radiodurans*

The linear energy transfer (LET) of 200keV protons on the target (single-cell 2 μm in diameter, 1g.cm $^{-3}$ density) was calculated using the software SRIM 2010, resulting in 67.8keV· μm^{-1} , and the penetration path of these particles was estimated to be 2.83 μm (Figure 36). With these values, the estimated dose to inactivate 90% of the population of free cells (LD_{10}) was 1kGy, which corresponds to 10^{10} ions· cm^{-2} . This LD_{10} obtained for irradiation with protons is 10-fold lower than the irradiation with gamma rays (10kGy), which interacts with matter only through ionizations and excitations. In the case of protons, besides ionizations and excitations, they also interact with matter via mass transfer and momentum transfer, resulting in increased LET, causing more cell damage.

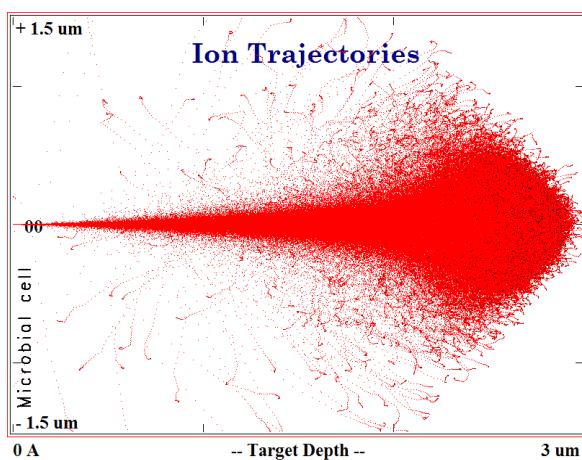


Figure 36. Simulation of the trajectory of 100 thousand 200keV protons across a microbial cell by means of the SRIM software.

In the case of cells mixed with grains, some of them were probably protected by the overlapping grains and therefore survived the highest doses. Moreover, there was no detectable difference in the protection afforded by either type of grain, and the survival rates of cells in the presence of grains were orders of magnitude greater than for naked cells.

The survival rates for cells deposited on amorphous forsterite (Mg_2SiO_4) was very similar to survival rates of naked cells deposited on a polycarbonate filter (Millipore). Cells deposited on amorphous and crystalline fayalite (Fe_2SiO_4) could not be recovered at all, indicating that cell survival was below the detection limit of the method ($<10^{-5}$). Considering that the only difference between forsterite and fayalite is the replacement of magnesium in forsterite by iron in fayalite, it is possible that iron somehow contributes to inactivate cells when irradiated with 200keV protons.

Scanning electron microscopy (SEM) images were produced for the non-irradiated controls and for samples of *D. radiodurans* and *Chroococcidiopsis* sp. irradiated at the maximum dose. There was no detectable difference between controls and irradiated samples with respect to morphological cell surface, even for the naked cells irradiated at the maximum dose (Figures 37-39).

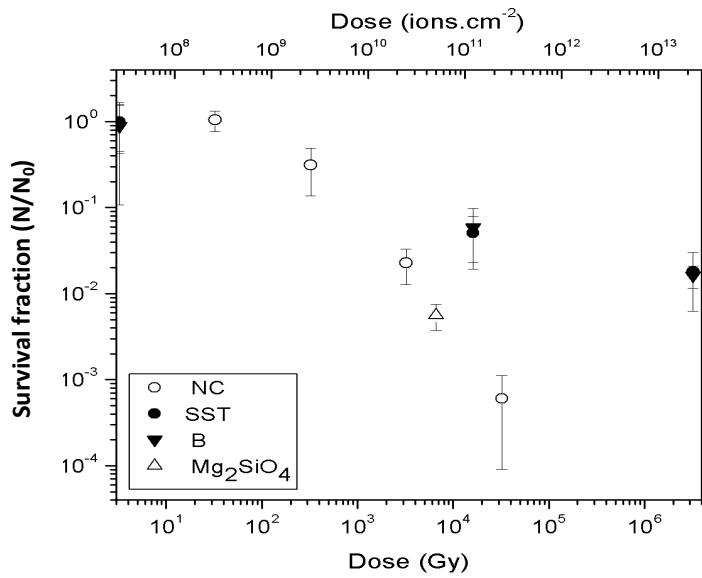


Figure 37. Survival curves of *D. radiodurans* to irradiation with 200keV proton beam. The graphs on the left and right differ only in the values of the X axis. NC = naked cells, SST = cells mixed with sandstone grains, B = cells mixed with basalt grains, SID = cells mixed with crystalline forsterite, SIL = cells mixed with amorphous forsterite.

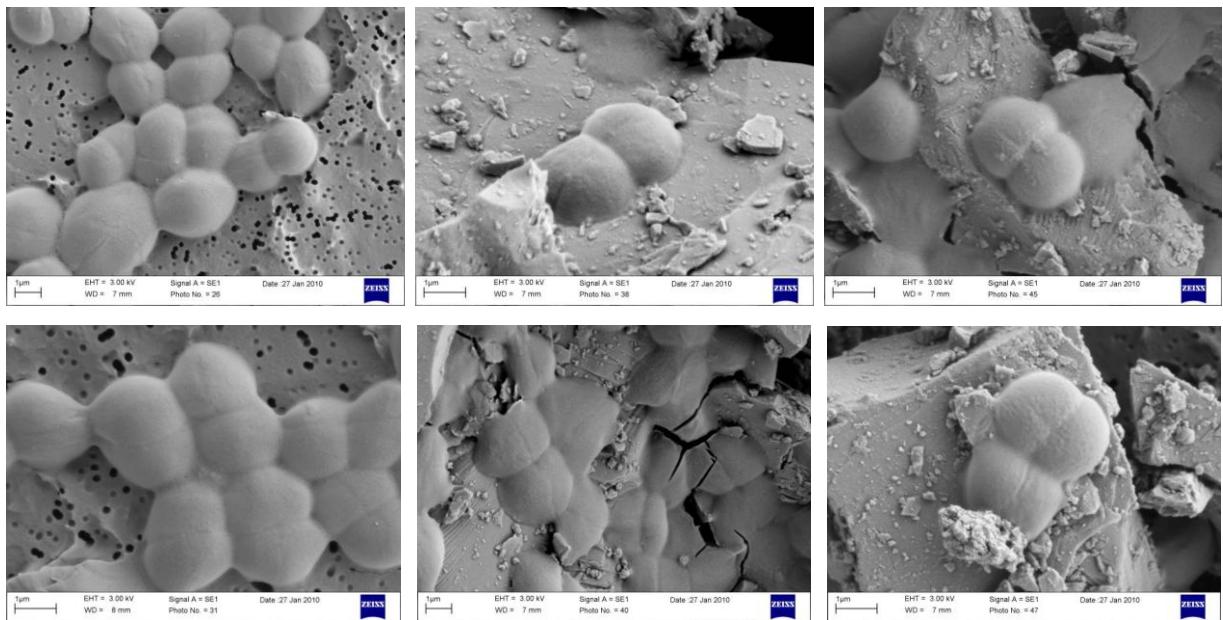


Figure 38. Images from electron microscopy (SEM) of cells of *D. radiodurans* irradiated (right) or not (left) with 200keV proton beam. Naked cells and cells mixed with sandstone and basalt grains are shown.

6.2.2. *Chroococcidiopsis* sp.

Electron microscopy images (SEM) of *Chroococcidiopsis* sp. are shown in Figure 39. Again there were no morphological difference between the unirradiated controls and samples irradiated with the highest doses tested. However, some aspects probably resulting from physical aggression were observed in controls and in the irradiated samples. Unfortunately samples *Chroococcidiopsis* sp. did not resist the experimental procedures, since it was not possible to observe any cell proliferation in the controls, probably due to the short dehydration time. Under normal temperature and pressure, cells of *Chroococcidiopsis* sp. require at least three days of slow dehydration to maintain cell viability after extended anhydrobiosis.

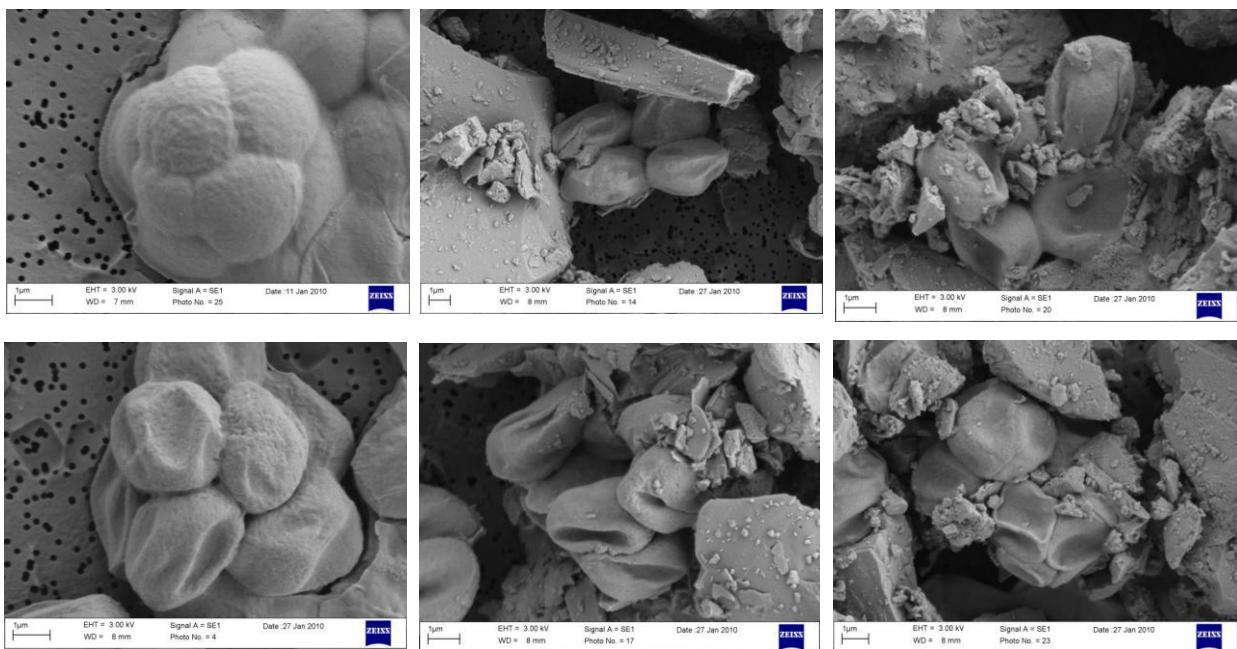


Figure 39. Electron microscopy images (SEM) of *Chroococcidiopsis* sp. irradiated (right) or not (left) with 200keV protons. Naked cells and cells mixed with sandstone and basalt grains are shown.

6.3. Irradiation of *Deinococcus radiodurans* with 4keV carbon ions

The irradiation experiments with carbon ions were performed using facilities of the Laboratory of Experimental Physics of the Physics Department of Queens University Belfast (UK). A vacuum chamber (10^{-5} Pa) capable of maintaining a system for generating ions with final energy of 4keV was used. The samples were deposited on Millipore filters and placed in a sample holder using a double-sided carbon tape, assembled inside the chamber and positioned normal to the beam by means of a rotating sample holder. Naked cells and cells mixed with sandstone or basalt grains were exposed in triplicate to the beam according to parameters displayed in Table 20.

Table 20. Details of irradiation with 4keV carbon ions.

Dose ($\times 10^{13}$ ions·cm $^{-2}$)	Exposure time		Replicates	Final time
	(s)	(min)		
0 (Control)	0	0	3	0
3	45	0.75	3	9s
10	150	2.50	3	30s
33	500	8.33	3	1min 39s
100	1665	27.75	3	6min 45s
333	5545	92.42	3	7min 6s
TOTAL	7905	131.75	18	6h35min15s

The linear energy transfer (LET) for 4keV carbon ions on the target (single-cell 2μm in diameter, 1g·cm $^{-3}$ density) was calculated using the software SRIM 2010, resulting in 3.57eV·Å $^{-1}$, and the penetration range of these particles was estimated to be 30nm (Figure 34). With these values, the estimated dose to inactivate 90% of the population of naked cells (LD₁₀) was 1kGy, which corresponds to 2.65×10^{11} ions·cm $^{-2}$. However, there was no cell inactivation even at doses 10⁴-fold above this value (Figure 35). Probably this is due to the low penetrating power of 4keV carbon ions, whose trajectory is interrupted in the cell wall. There are no significant differences in the radiation protection afforded by either type of grain (Figure 40).

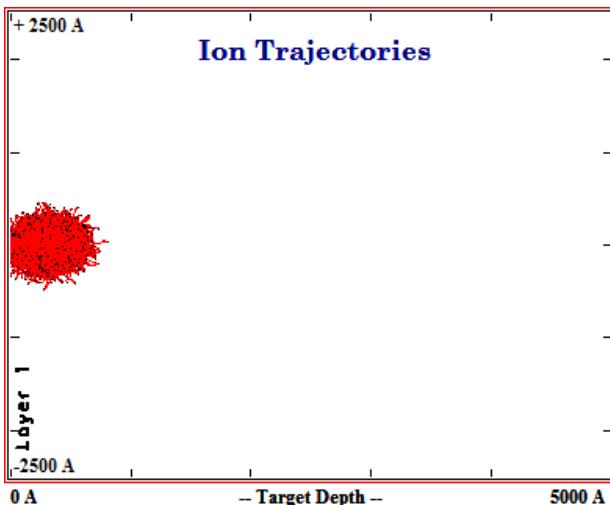


Figure 40. Simulation of the trajectory of 100,000 4keV carbon ions across a microbial cell. The depth of the target (Target Depth) in the X-axis, is given in Angstroms (\AA).

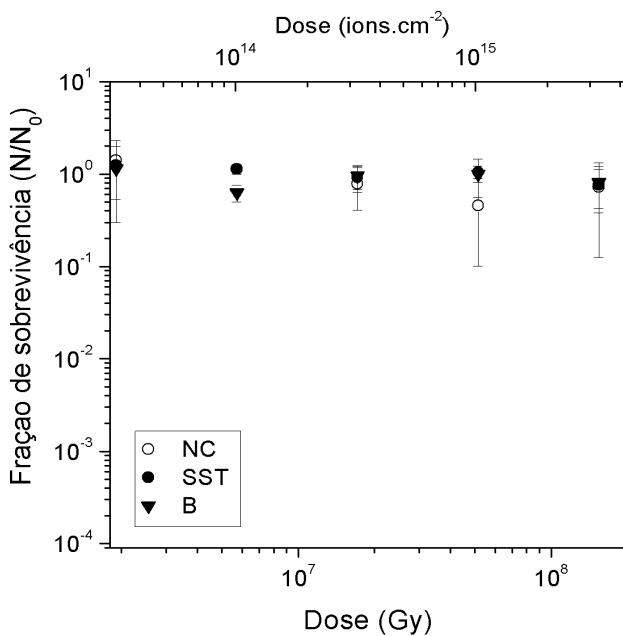


Figure 41. Survival curves of *D. radiodurans* in the absence (NC) or presence of sandstone or basalt (B or SST) grains irradiated with 4keV.

V – General Discussion:

Radiation from astrophysical sources is by far the factor of more aggressive biological models in the space environment (Nicholson *et al.*, 2005; Horneck *et al.*, 2010). A number of experiments using both facilities that simulate conditions in space, as well as experiments in real flight orbit have nevertheless demonstrated the ability of survival of different model organisms and the remarkable stability of biomolecules in these harsh conditions (Horneck *et al.*, 2010; Olsson-Francis and Cockell, 2010).

The experiments presented in this thesis succeeded in determine the survival of the extremophile species *Deinococcus radiodurans* to different simulated physical and chemical parameters, such as radiation, vacuum, and the Martian atmosphere, acting together or separately. Other novel isolates from the Atacama Desert in Chile were also tested, such as cyanobacteria *Chroococcidiopsis* sp.

All experiments were performed at room temperature, since the deleterious effects of low temperatures on organisms is minimal. Indeed, the occurrence of extremely low temperatures and dehydration conditions in interplanetary space favor the preservation of cellular integrity by preventing the formation of free radicals from water molecules. Notably, organisms such as *D. radiodurans* (Ashwoods *et al.*, 1968) and *B. subtilis* (Weber and Greenberg, 1985) have higher survival to UV/VUV if irradiated under low temperatures, compared with irradiation performed at room temperature.

Discussion of results is divided into four sections, namely: (i) UV radiation, (ii) X-rays, (ii) charged particles, and (iv) isolation of microorganism resistant to Martian conditions.

6.1. Ultraviolet radiation

The irradiation test done in aqueous solution using different spectra emitted by the Oriel Solar Simulator (Table 8) demonstrated the importance of using sources of radiation under conditions similar to those found in nature to a better understanding of the interaction of natural phenomena with biological materials. *D. radiodurans* is one of the most radiation-resistant microorganism. UV-C doses required to inactivate 63% of a *D. radiodurans* population (LD_{37}) is 550–600J·m⁻² (Battista, 1997), as shown in Figure 10. However, if irradiation with UV-C is made from a radiation source along with UV-A and UV-B solar spectrum, devastating effects occur (Figure 8). Under these conditions, the LD_{37} related to UV-C alone dropped to less than 10J·m⁻². Biological effects arising from interacting wavelengths appear to overcome intrinsic *D. radiodurans* radiation resistance mechanisms. On the other hand, the presence of organic molecules in the aqueous solution is capable of increasing cell survival, by partial absorption of DNA damaging photons. The LD_{10} , ie the dose required to inactivate 90% of a population of cells of *D. radiodurans* was increased 3-fold when cells were in the presence of organic molecules than for cells in the absence of organic molecules (Figure 9).

This phenomenon was also observed for dehydrated cells (Figure 12). In the absence of organic molecules, the effects of acute irradiation with hydrogen lamp ($\lambda = 121\text{nm}$) are quite similar to the UV light spectrum with the solar simulator (Figure 7 and appended Planetary & Space Science paper (Fig.6)). This means that even with a very high cross section with cellular environment (Ito *et al.*, 1980), VUV photons are able to reach the DNA of cells leading to its inactivation. However, if samples are dehydrated in the presence of organic material, the high cross section of photons with $\lambda = 121\text{nm}$ is restricted to that organic layer, not reaching the cell core. Photons of $\lambda > 200\text{nm}$, on their turn, impact on a smaller superficial cross section, gaining access to DNA with more efficient inactivation even for organic-dehydrated cells. Thus, the profiles of cell inactivation for these two radiation sources are quite different. Remember that the methodology used to prepare the samples was different. In the case of solar simulator, the stacking of cells with the organic material was more limited than in the case of the hydrogen lamp, where a powder consisting of lyophilized cells and organic matter was distributed on the substrate. The preparation of samples for irradiation with the solar simulator also did not involve a step of lyophilization, thus resulting in less dehydrated samples in comparison to hydrogen UV irradiated ones.

The doses used with the xenon lamp were comparable to the solar emission band at 145nm, with a dose rate similar to that found in Earth's orbit. However, the actual solar flux in this energy range is low (Woods, 2002) and was not intense enough to cause any detectable cell inactivation, even for the highest doses tested (Figure 3).

The effects of monochromatic radiation with $\lambda = 254\text{nm}$ photons of CD1 line from Astrid laboratory synchrotron light were very similar in terms of the effects produced by irradiation with white beam of light in the line of LNLS TGM (see appended Planetary & Space Science paper (Fig.4)). The 254nm photons have high absorption by biological targets, since the maximum UV absorption by DNA occurs in the 260nm range. However, unlike the samples used in Astrid synchrotron, which were dehydrated spontaneously, the samples used in the LNLS were previously irradiated and freeze-dried under high vacuum (10^{-5}Pa). Again this may have resulted in samples less dehydrated to Astrid synchrotron than for the LNLS, limiting the accuracy of the comparison. However, compared the

effects of irradiation with two beams of broad spectrum, ie the solar simulator and the line of the LNLS TGM light, with samples dehydrated spontaneously to the solar simulator and samples irradiated in vacuum in TGM, inactivation was more intense with TGM than with the solar simulator, demonstrating the importance of VUV radiation in cellular inactivation (Figure 9).

Dried cells mixed with organic molecules, both irradiated with xenon lamp as the source with the line of synchrotron light CD1 Astrid did not suffer any detectable cell inactivation, even for the highest doses tested (Figure 3). The protection afforded by the presence of organic material in the dehydrated samples was evident for the irradiations performed not only at synchrotron Astrid, but also at LNLS, with the hydrogen lamp (see Panetary & Space Science paper (Fig.6)), and the solar simulator (Figure 9).

Comparing again the effects of irradiation with two broad-spectrum beams (solar simulator and TGM), inactivation is not that pronounced for cells mixed with organic material, especially for the lower TGM doses, it is stabilized asymptotically in the range 2% for doses greater than $1\text{kJ}\cdot\text{m}^{-2}$. This means that only the surface layers of the samples are sensitized radiation. For larger doses, the effects caused by irradiation with the solar simulator become more intense than those caused by TGM (see Planetary & Space Science paper (Fig.4)).

The influence of cell stacking on the survival was evidenced by experiments where samples containing different concentrations of cells were irradiated with a single dose of $600\text{J}\cdot\text{m}^{-2}$. Cell concentrations higher than 10^6 cells per sample deposited on a 20mm^2 area greatly increased cell survival (see Planetary & Space Science paper (Fig.5)). These results confirm the theoretical predictions based on the ratio between the area of containment of samples and cell size of *D. radiodurans* ($2\mu\text{m}$).

In another experimental approach to reinforce the conclusion set out above, we used *recA* mutant cells of *D. radiodurans*, deficient in the function of RecA protein that mediates the important DSB repair by homologous recombination, an extremely radiation sensitive strain. Even so, the protection offered by organic molecules was observed for different radiation sources (see Planetary & Space Science paper (Fig.4)).

In a situation more similar to that expected in nature, microbial cells would be associated not only material's organic environment, but also the debris from inorganic substrates. Therefore, the protection offered by dust grains (sandstone or basalt) was investigated. Importantly, these two rock types comprise two extremes in terms of geological classification. Most stony meteorites have chemical composition between these two extremes (Tables 11 and 12).

When cells are associated with sandstone grains and irradiated with the solar simulator, a clear benefit from physical protection is afforded by the grains in both the presence and absence of organic molecules in a similar manner. But this protection is less than the protection afforded only by the organic molecules from the culture medium (Figures 12 and 13). Sandstone grains are composed of 93.72% SiO_2 . It appeared that the micrometric grains are virtually transparent to visible light. According Cockell *et al.* (2003), the transmittance of UV-A and UV-B in layers of $500\mu\text{m}$ thickness gneiss rock is greater than 80%. Certainly sandstone grains smaller than $20\mu\text{m}$ used in our experiments had higher levels of transparency to UV. Probably, the association of cells with this type of material favors a greater exposure to radiation compared to what should occur when cells are mixed only with culture medium.

In contrast, cells mixed with basalt grains, when irradiated with the solar simulator also benefit from protection only when associated with organic material in the culture medium, since it was not possible to recover any survivor associated only with the grains of basalt exposed in the lower dose tested (Figure 14). Interestingly, at lower doses, cells benefit from the protection offered by the basalt grains plus medium, which is smaller than the protection offered only by medium alone. For greater doses, basalt grains plus culture medium result in asymptotic curve by around 1% survival at maximal dose ($225\text{kJ}\cdot\text{m}^{-2}$ equivalent to $\sim 30\text{min}$ UV exposure at solar 1AU; Schuerger *et al.*, 2003). It should be stressed that as the intensity of solar radiation decreases proportionally to the square distance, the same dose would be equivalent to $1\text{h } 15\text{min}$ of exposure at Mars orbit and even greater exposure times at more distant orbits.

The survival of cyanobacteria *Chroococcidiopsis* sp. ultraviolet radiation was investigated using only monochromatic radiation $\lambda = 254\text{nm}$ from the CD1 line of Astrid Synchrotron Laboratory, Denmark. Measures of inactivation of samples *Chroococcidiopsis* sp. were qualitatively obtained by checking the post-irradiation time to growth start. The higher the dose the greater the time required for cell proliferation to be detectable, reflecting lower numbers of remaining viable cells. The samples deposited on carbon tape were not able to proliferate even after three months of incubation. Probably the presence of heavy metals contributed to the cytotoxic effects for this organism. As the growth of this bacterium on BG-11 solidified culture medium already represents additional stress due to toxic agar impurities, more accurate techniques to determine post-radiation survival rate need to be used, e.g., monitoring cell counting under the microscope, chlorophyll autofluorescence, DAPI DNA-staining, esterase activity (Cockell *et al.*, 2005), whenever standard techniques do not apply for unculturable organisms.

Regarding the black biofilm from the region of La Portada, Chile, there are three possible explanations for the observed results: (i) the amount of samples (10mg) was insufficient for the detection of viable phototrophs from such a hostile environment as Cliff La Portada, which receives intense solar radiation and is subject to severe conditions of desiccation, (ii) the conditions of transport of samples from Chile to the United Kingdom may have contributed to decrease the viability of the microorganisms present in the samples, (iii) the phototrophs previously observed under the microscope are among the group of microorganisms known as viable but not culturable. Alternative techniques, such as microscope analysis should also be used to evaluate survival of these unculturable samples in the future.

The experiments with the solar simulator and the B16 beamline were performed at ambient pressure and under low vacuum, respectively. Therefore, a study into the effects of vacuum found in low earth orbit (LEO, English Low Earth Orbit) was performed using samples of free cells or medium-coated cells associated or not with sandstone or basalt grains (Figure 26). It was found that the presence of organic molecules from the culture medium is much more important than the association of molecules with the grains. In the presence of organic molecules, cells maintain 100% viability up to the longest exposure tested (28 days), regardless of the presence of any of the grains. Sugars and polyhydric alcohols are known to help stabilize the cellular macromolecules during the vacuum-induced dehydration (Horneck *et al.*, 2003), which may have contributed to the high survival rates observed in these experiments.

6.2. X-Rays

Much of the literature on ionizing radiation resistance of microbes is based on their exposure to gamma rays from radionuclides (Liu *et al.*, 2003). The most accessible one is ^{60}Co , which emits photons of energies above 1MeV (1.17 and 1.33 MeV) in its decay to its stable isotope ^{60}Ni . Currently, facilities are able to produce synchrotron X-ray beams with high luminosity at energies up to several hundred keV, making it ideal tools to study survival of microorganisms to this energy range. The use of a vacuum chamber coupled to synchrotron radiation sources allows the investigation of the effects of radiation at extremely low pressures, simulating space vacuum.

The experiments with synchrotron B16 beamline in the Diamond synchrotron sought to adapt a classical microbiological method (serial dilution and counting of CFU on plates) to the technical requirements imposed by the available instrumentation. Cells were deposited on sheets of kapton foil, an inert material with high transparency to X-rays. In this situation, any interaction with the substrate is expected to occur, as if cells were floating in space, under direct radiation effects.

Initially, the effects of the interaction of sandstone and basalt grains with microbial cells and the efficiency of cell detachment from the substrate sheet (kapton) was evaluated. The data presented in Table 14 and Figure 28 show that non irradiated controls face no cytotoxic action by the grains and that cells are very efficiently retrieved from the substrate. The highest values of cell recovery for the cells mixed with the grains are the result of heterogeneity in the rate of removal of cells from these substrates.

The experiments were divided into three categories, namely: (i) irradiation with white beam ($>1\text{keV}$), (ii) irradiation with monochromatic beam (10keV), (iii) investigation of dose rate effects for cells dehydrated using the monochromatic beam (10keV).

The results obtained with white beam indicate that cells associated with basalt grains are inactivated more efficiently than cells associated with sandstone grains or free cells (Figures 29-31). This pattern of results was observed in all irradiation experiments, and is even more evident for the monochromatic beam (Figure 30). Analysis of the molecular composition of the two types of grains revealed the presence of much heavier elements basalt than in sandstone (Tables 11 and 12). Probably the interaction of photons in the hard X-rays energy range with basalt grains leads to production of secondary photoelectrons that contribute to cell inactivation. Another observed feature is the asymptotic trend for survival with irradiation at the lower dose rate.

The doses used in our experiments are comparable to astronomical phenomena known as Soft Gamma Repeaters - SGR (Galante and Horvath, 2007). These astrophysical sources emit regular X-rays pulses and are usually associated with strongly magnetized neutron rotating stars (magnetars; Galante, 2009). However, these sources have sporadic, although very intense, activity than the regular events known as star flares or giant flares. The duration of such events peak at $\sim 0.2\text{s}$, with a phase of decay of about 400s, modulated with a periodicity of about 1s associated with the rotation of the neutron star. During this short time period peak energy reaches hard X-rays, up to 175keV (Galante, 2009).

According to Galante *et al.* (2009), the LD_{10} of ionizing radiation calculated to completely sterilize a *D. radiodurans* population would be $5.5\text{MJ}\cdot\text{Jm}^{-2}$. However, these values are based on experimental data obtained with cells in aqueous solutions. In our experiments, a graphical analysis of the curves presented in Figure 29 revealed that the values of LD_{10} for white beam X-ray ($> 1\text{keV}$) were extrapolated to be slightly higher, $10\text{MJ}\cdot\text{m}^{-2}$ for free cells and $12.3\text{MJ}\cdot\text{m}^{-2}$ to sandstone-attached cells and $7.8\text{MJ}\cdot\text{m}^{-2}$ for basalt-attached cells. LD_{10} values for monochromatic beam (10keV) were $7\text{MJ}\cdot\text{m}^{-2}$ for free cells, $1.8\text{MJ}\cdot\text{m}^{-2}$ to sandstone-attached cells and $0.7\text{MJ}\cdot\text{m}^{-2}$ for basalt-attached cells (Figure 30). These dissimilar LD_{10} values regarding different substrates probably arise from differential production of photoelectrons by each material. Differences in LD_{10} values observed for the two beam types (white and monochromatic) can be caused by two reasons: (i) the dose rates were lower for the monochromatic beam, thereby maximizing the interaction of photons with the sample and leading to a higher level of cell inactivation; (ii) 10keV beam photons inactivate biological material more efficiently than the beam containing photons with other energies as well. These two hypotheses can also be complementary.

In an attempt to investigate the influence of dose rate on cell survival, we performed a battery of experiments aimed at attenuating the beam to 10% and 1% of total flow, thus increasing the irradiation time by 10 and 100x, respectively, to achieve the same final dose (Figure 31). From results seen in figures 29 and 31, the 100-fold lower fluencies used in experiments on different dose rates induced no detectable differential inactivation was not possible to investigate the effects of dose rate in comparison to the white beamline.

Experiments with *Chroococcidiopsis* sp. were performed on a slightly different manner (Table 15). Samples were irradiated at slightly positive pressure of N_2 to minimize the amount of moisture present in the chamber. In addition, samples were mixed with grains divided into three size ranges for each of the two types of grains, plus a 1:1 mixture between them. No flux attenuators were used in these experiments with *Chroococcidiopsis* sp. Even so, the cells were able to proliferate after 51 days incubation in samples mixed with smaller grains of sandstone (Table 15). With respect to size, smaller grains favor the survival of dehydration due to the formation of microenvironments preservatives. Regarding the type, sandstone grains probably produce less photoelectrons than basalt. However, further experiments should be conducted to obtain more conclusive answers.

6.3 Charged particles

Studies on the irradiation of low energy charged particles in plants and microorganisms, especially with energies ranging from 1 to hundreds of keV has aroused great interest (Yang *et al.*.

1991; Yu, 1998). By using this radiation to low energy, is easier to develop important biotechnological applications (Huang and Yu, 2007). Irradiation with low energy charged particles also being investigated for possible application in cancer treatment (Matsushita *et al.*, 2006; Kamada *et al.*, 2002) and the procedures for sterilization of materials in the medical industry (Raballand *et al.*, 2008). Besides its application in biotechnology, irradiation with low energy ions is useful for studying the effects of space radiation on extremophile microorganisms using space simulation facilities.

The population of ions of low energy cosmic rays in the interplanetary medium is essentially due to wind and solar particles accelerated by magnetic energy released in solar flares (Strazzulla *et al.*, 1995). Solar wind ions are produced by an expansion of plasma and reach supersonic speeds at a distance of few rays, about $400\text{km}\cdot\text{s}^{-1}$ (*i.e.*, ions with energies of $\sim 1\text{keV}/\text{unidad de atomic mass}$ are released). At 150 million km away from the Sun (=1 Astronomical Unit - UA) is the density of the wind around $5\text{ protons}\cdot\text{cm}^{-3}$, corresponding to a flux of about $2\times 10^8\text{ cm}^{-2}\cdot\text{ions}\cdot\text{s}^{-1}$. As the intensity of flow falls proportionally with the inverse square distance, a proton flux of 10^{17} cm^{-2} can reach the surface of an asteroid the hypothetical 3au in just 100 years (Strazzulla *et al.*, 1995).

In our experiments with proton irradiation at 200keV, we found that *D. radiodurans* cells begin to be inactivated with doses above $10^9\text{ protons}\cdot\text{cm}^{-2}$ (Figure 37). Moreover, micrometric grains are able to protect cells against this type of radiation, since the penetrating power of particles was estimated at 2.83 micrometers. Through graphical analysis of Figure 31 can be observed that the LD₁₀ for free cells (NC) is $10^{10}\text{ protons}\cdot\text{cm}^{-2}$. Although there is no difference in protection afforded by either type of grain used, cell survival was different depending on the type of substrate analogue of cosmic dust (CDA, the Cosmic Dust Analogs English) on which cells were deposited. In the case of substrates analogous to meteoritic material containing iron, such as fayalite probably the presence of this element contributed to the cellular inactivation, compared with the presence of magnesium in forsterite.

Unlike the inactivation observed with 200keV proton beam, the irradiation experiments with both electron beam 2keV as with ion beam carbon 4keV showed that free cells or mixed with any of the two types of grains tested are not inactivated even at doses greater than $10^{16}\text{ electrons}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ and $10^{15}\text{ ions}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

The effects of low energy particles on microorganisms have not been fully investigated under simulated conditions of space. Under laboratory conditions, has been demonstrated that this type of radiation results in less cell death than that observed for other forms of radiation, even at the expense of increased mutation rates (Yu, 1993). Apparently, the biological risk of such radiation is related to their energy deposition is highly localized. The inactivation can be restricted to cells located in the trajectory of the particles (Horneck *et al.*, 1994b), and the intensity of the damage depends on the Linear Energy Transfer (LET, English Linear Energy Transfer) (Kozubek *et al.*, 1995). Moreover, mutagenic events can be caused if damage in the vicinity of genetic material. Low-energy electrons appear to interact with specific sites in DNA by mechanisms resonance (Winstead and Mckoy, 2008), and repair system by joining non-homologous ends (NHEJ) was demonstrated by Moeller *et al.* (2008b) as the main mechanism to repair DNA strand breaks induced by particle bombardment in *B. subtilis*.

6.4. Isolation of microorganisms resistant to Martian conditions

The search for life *in situ* on Mars requires an understanding of the possible habitats available and the possible types of microorganisms are found in these environments (Kuhlman *et al.*, 2005). The Atacama Desert in Chile is considered an environment similar to Mars due to parameters such as extremely low humidity and intense solar UV radiation (Navarro-Gonzalez *et al.*, 2003; Connon *et al.*, 2007). Its location comprises part hyper-arid desert of Peru, Chile, and the Chilean portion extends between 1°N and 37°S, incorporating the arc Peru, northern Chile and parts of western cordillera (Hartley et al Chong ., 2005). Desertification in western South America is mainly driven by atmospheric phenomena subtropical anticyclonic. This is Eforce by the presence of cold Humboldt Current along the west coast of South America, which prevents precipitation in coastal regions. Another regulatory factor is the presence of the Andes, which increases the precipitation on

the east side and decreases on the west side. Still, the extent of the continental prevents humid winds move within the continent (Thompson, 1975), a situation that probably exists a few hundred million years.

The absence of clouds contributing to the occurrence of high levels of solar radiation over the entire length of the Atacama. Any microorganisms present on the Martian surface are subject to constant exposure to high fluxes of UV light highly deleterious (Cockell, 2001). On the Martian surface, high levels of UV-C radiation reaching the surface (Schuerger *et al.*, 2003), contrary to what occurs on Earth where the solar spectrum corresponding to wavelengths below 300nm is attenuated by the atmosphere, particularly by the ozone layer.

The samples used in this study were collected in different regions of the Atacama Desert. Laguna Llamas is a salt deposit located in northern Chile, where you can find microbial mats composed of cyanobacteria present beneath layers of salt (Demergasso *et al.*, 2003). The deposit of quartz is right next to the deposit of gypsum, a mountainous region south of Antofagasta. The site corresponding to sample 3 is located north of Antofagasta, where there is a cliff covered with a black biofilm in a region known as La Portada. The site 3.S4, corresponding to sample 5 is probably the most arid region on the planet, reaching zero values of relative humidity (Navarro-Gonzalez *et al.*, 2003). Despite the inhospitable conditions of these environments, our data revealed a surprising abundance of culturable microorganisms in all samples (Figure 16).

VI – Concluding remarks:

Despite the technical challenges imposed by most of the experimental setups, the results demonstrate that the proposed objectives were achieved. The main results demanded innovations in experimental approaches, integrating techniques of experimental physics and biology of microorganisms. The new techniques developed allow for a series of new studies of microbial survival under conditions that simulate long periods in space environment. The main findings of the project were:

- 1 - Microbial cells protected by micrometer-sized particles against ultraviolet (UV) and vacuum ultraviolet (VUV), benefit from protection and remain viable for long periods of time under chronic irradiation.
- 2 - Regarding survival to dehydration and vacuum, the presence of organic compounds in the samples is more important than any microenvironment preserved within micrometric grains.
- 3 - Grains with micrometer dimensions contribute to decrease microbial survival after acute irradiation with X-ray beam in low vacuum (200Pa). Probably this effect is due to production of secondary electrons into the grains, since this phenomenon was more evident for basalt grains, which contain heavier elements in their composition than sandstone.
- 4 - Contrary to what occurs with electromagnetic irradiation, micrometric grains are efficient to protect microbial cells against irradiation with charged particles (electrons, protons and carbon ions) regardless of the type of grain.
- 5 - Microbial inactivation by irradiation with charged particles is much more dependent on energy than the flux of particles. Low energy particles, in the energy range of the solar wind ($\sim 1\text{keV}$), were not able to inactivate *D. radiodurans* cells, even with doses equivalent to hundreds of years of exposure.
- 6 - Cells deposited on a substrate containing iron in its molecular composition (Fe_2SiO_4 fayalite) are inactivated more efficiently than those deposited on substrate containing magnesium instead of iron (Mg_2SiO_4 forsterite). This result seems to corroborate the hypothesis that heavier elements may

contribute to cell inactivation via production of secondary electrons after treatment with ionizing radiation.

7 - The use of facilities for the isolation of new microorganisms exposed to simulated extraterrestrial environments is efficient and represents a good tool for the use of biological resources with potential applications in different sectors.

8 - The set of experimental data supports a version of the Panspermia hypothesis, in which microscopic forms of biological systems minimally protected by dust grains, could remain viable in different regions of the galaxy until they were intercepted by bodies with favorable environments for further proliferation, contributing to life transfer in the galactic level.

VII – Project-related publications:

1 – Laboratory simulation of interplanetary ultraviolet radiation (broad spectrum) and its effects on *Deinococcus radiodurans*. IG Paulino-Lima, S Pilling, E Janot-Pacheco, A Naves-de-Brito, JARG Barbosa, AC Leitão, C Lage. Planetary and Space Science, 58(10), 1180-1187, 2010.
[doi:10.1016/j.pss.2010.04.010](https://doi.org/10.1016/j.pss.2010.04.010)

2 – Laboratory simulation of acute X-ray radiation emitted by stellar explosions conditions and survival of extremophilic microorganisms. IG Paulino-Lima, Douglas Galante, Charles Cockell, Karen Olsson-Francis, Armando Azua-Bustos, Rafael Vicuña, Eduardo Janot Pacheco, Claudia Alencar Santos Lage, Nigel Mason. Astrobiology Science Conference, Houston, Texas, USA, 26-29 April 2010.

3 - Irradiation of extremophilic microorganisms with 200keV protons. Paulino-Lima IG, Baratta G, Brucato J, Cockell C, Olsson-Francis K, Spinella F, Strazzullo G, Mason N, Lage C. 3rd Workshop of Italian Astrobiology Society, Duino Castle, Duino, Trieste, Italy, 26-28 May 2010.

4 – Effects of dust grains on survival of *Deinococcus radiodurans* to charged particle irradiation I Paulino-Lima, D Galante, C Cockell, K Olsson-Francis, C Lage, N Mason. Astrobiology Graduate Conference, Talborg, Sweden, 13-18 June 2010.

5 – Survival of *Deinococcus radiodurans* to laboratory-simulated solar wind charged particles. IG Paulino-Lima, E Janot-Pacheco, D Galante, CS Cockell, K Olsson-Francis, NJ Mason, JR Brucato, C Lage. Manuscript in preparation for submission to Icarus.

VIII. Cited bibliography:

Ashwoods, M. J.; Copeland, J.; Wilcocks, J. Response of bacterial spores and *Micrococcus radiodurans* to ultraviolet irradiation at low temperatures. *Nature*, 217(5126), 337-338, 1968.

Battista, JR. Against all odds: The survival strategies of *Deinococcus radiodurans*. *Annual Review of Microbiology*, 51, 203-224, 1997.

Battista, J. R.; Park, M. J.; McLemore, A. E. Inactivation of two homologues of proteins presumed to be involved in the desiccation tolerance of plants sensitizes *Deinococcus radiodurans* R1 to desiccation. *Cryobiology*, 43(2), 133-139, 2001.

Burchell, M. J.; Mann, J. R.; Bunch, A. W. Survival of bacteria and spores under extreme shock pressures. *Monthly Notices of The Royal Astronomical Society*, 352(4), 1273-1278, 2004.

Cockell, C. S. The Martian and extraterrestrial UV radiation environment Part II: further considerations on materials and desiccation. Criteria for artificial ecosystems. *Acta Astronautica*, 49(11), 631-640, 2001.

Cockell, C. S.; Brack, A.; Wynn-Williams, D. D.; Baglioni, P.; Brandstatter, F.; Demets, R.; Edwards, H. G. M.; Gronstal, A. L.; Kurat, G.; Lee, P.; Osinski, G. R.; Pearce, D. A.; Pillinger, J. M.; Roten, C. A.; Sancisi-Frey, S. Interplanetary transfer of photosynthesis: an experimental demonstration of a selective dispersal filter in planetary island biogeography. *Astrobiology*, 7(1), 1-9, 2007.

Cockell, C. S.; Rettberg, P.; Horneck, G.; Scherer, K.; Stokes, M. D. Measurements of microbial protection from ultraviolet radiation in polar terrestrial Microhabitats. *Polar Biology*, 26(1), 62-69, 2003.

Cockell, C. S.; Schuerger, A. C.; Billi, D.; Friedmann, E. I.; Panitz, C. Effects of a simulated martian UV flux on the Cyanobacterium, *Chroococcidiopsis* Sp 029. *Astrobiology*, 5(2), 127-140, 2005.

Connon, S. A.; Lester, E. D.; Shafaat, H. S.; Obenhuber, D. C.; Ponce, A. Bacterial diversity in hyperarid Atacama Desert soils. *Journal of Geophysical Research-Biogeosciences*, 112, G4, 2007.

Cox, M. M.; Battista, J. R. *Deinococcus radiodurans* - The consummate survivor. *Nature Reviews Microbiology*, 3(11), 882-892, 2005.

D'Hondt, S.; Jorgensen, B. B.; Miller, D. J.; Batzke, A.; Blake, R.; Cragg, B. A.; Cypionka, H.; Dickens, G. R.; Ferdelman, T.; Hinrichs, K. U.; Holm, N. G.; Mitterer, R.; Spivack, A.; Wang, G. Z.; Bekins, B.; Engelen, B.; Ford, K.; Gettemy, G.; Rutherford, S.; D. Sass, H.; Skilbeck, C. G.; Aiello, I. W.; Guerin, G.; House, C. H.; Inagaki, F.; Meister, P.; Naehr, T.; Niitsuma, S.; Parkes, R. J.; Schippers, A.; Smith, D. C.; Teske, A.; Wiegel, J.; Padilla, C. N.; Acosta, J. L. S. Distributions of microbial activities in deep subseafloor sediments. *Science*, 306(5705), 2216-2221, 2004.

Daly, M. J.; Gaidamakova, E. K.; Matrosova, V. Y.; Vasilenko, A.; Zhai, M.; Leapman, R. D.; Lai, B.; Ravel, B.; Li, S. M. W.; Kemner, K. M.; Fredrickson, J. K. Protein oxidation implicated as the primary determinant of bacterial radioresistance. *Plos Biology*, 5(4), 769-779, 2007.

Daly, M. J. Gaidamakova, E. K. Matrosova, V. Y. Vasilenko, A. Zhai, M. Venkateswaran, A. Hess, M. Omelchenko, M. V. Kostandarithes, H. M. Makarova, K. S. Wackett, L. P. Fredrickson, J. K. Ghosal, D. Accumulation Of Mn(II) in *Deinococcus radiodurans* facilitates gamma-radiation resistance. *Science*, 306(5698), 1025-1028, 2004.

Daly, M. J. Ling, O. Y. Fuchs, P. Minton, K. W. In-vivo damage and RecA-Dependent Repair of plasmid and chromosomal DNA in the radiation-resistant bacterium *Deinococcus radiodurans*. *Journal of Bacteriology*, 176(12), 3508-3517, Jun 1994.

de la Torre, R.; Sancho, L. G.; Horneck, G.; Rettberg, P.; Ascaso, C.; de los Rios, A.; Wierzchos, J.; de Vera, J. P.; Ott, S.; Cockell, C.; Olsson, K.; Frias, J. M.; Demets, R. Lichens survive in space: Results from the 2005 LICHENS experiment. *Astrobiology*, 7(3), 443-454, 2007.

de la Torre, R.; Sancho, L. G.; Horneck, G.; Rettberg, P.; Ascaso, C.; de los Rios, A.; Wierzchos, J.; de Vera, J. P.; Ott, S.; Cockell, C.; Olsson, K.; Frias, J. M. Demets, R. Testing the Lithopanspermia theory in the Foton-M3 mission: Simulation of interplanetary transfer and re-entry process of epi- and

endolithic microbial communities with the Lithopanspermia experiment. *Origins of Life and Evolution of the Biosphere*, 39(3-4), 356-357, 2009.

Demergasso, C., Chong, G., Galleguillos, P., Escudero, L., Martínez-Alonso, M., Esteve, I. Tapetes Microbianos Del Salar De Llamará, Norte De Chile. *Revista Chilena De Historia Natural*, 76, 485-499, 2003.

Dose, K. Biegerdose, A. Dillmann, R. Gill, M. Kerz, O. Klein, A. Meinert, H. Nawroth, T. Risi, S. Stridde, C. Era-Experiment Space Biochemistry. *Eureca Scientific Results*, 16(8), 119-129, 1995.

Dose, K.; BiegerDose, A.; Dillmann, R.; Gill, M.; Kerz, O.; Klein, A.; Stridde, C. UV Photobiochemistry under space conditions. *Life Sciences: Space and Mars recent results*, 18(12), 51-60, 1996.

Dreibus, G.; Wanke, H. Mars, A Volatile-Rich Planet. *Meteoritics*, 20(2), 367-381, 1985.

Fajardo-Cavazos, P.; Langenhorst, F.; Melosh, H. J.; Nicholson, W. L. Bacterial spores in granite survive hypervelocity launch by spallation: implications for Lithopanspermia. *Astrobiology*, 9(7), 647-657, 2009.

Fritz, J.; Artemieva, N.; Greshake, A. Ejection of Martian meteorites. *Meteoritics & Planetary Science*, 40(9-10), 1393-1411, 2005.

Galante, D. Efeitos Astrofísicos e Astrobiológicos de *Gamma-Ray Bursts*. Tese De Doutorado. Instituto De Astronomia, Geofísica E Ciências Atmosféricas, Universidade De São Paulo, São Paulo, Sp, 2009.

Galante, D.; Horvath, J. E. Biological Effects of *Gamma-Ray Bursts*: Distances for severe damage on biota. *International Journal Of Astrobiology*, 6(1), 19-26, 2007.

Ghosal, D.; Omelchenko, M. V.; Gaidamakova, E. K.; Matrosova, V. Y.; Vasilenko, A.; Venkateswaran, A.; Zhai, M.; Kostandarithes, H. M.; Brim, H.; Makarova, K. S.; Wackett, L. P.; Fredrickson, J. K.; Daly, M. J. How radiation kills cells: Survival of *Deinococcus radiodurans* and *Shewanella oneidensis* under oxidative stress. *FEMS Microbiology Reviews*, 29(2), 361-375, 2005.

Hartley, A. J.; Chong, G.; Houston, J.; Mather, A. E. 150 Million years of climatic stability: evidence from the Atacama Desert, Northern Chile. *Journal of the Geological Society*, 162, 421-424, 2005.

He, Y. High Cell density production of *Deinococcus radiodurans* under optimized conditions. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 36(4), 539-546, 2009.

Hiragi, Y., J. *General Microbiology*, 72, 87, 1972.

Horneck, G. European activities in exobiology in Earth Orbit: Results and perspectives. *Life Sciences: Exobiology*, 23(2), 381-386, 1999.

Horneck, G.; Mileikowsky, C.; Melosh, H.J.; Wilson, J.W.; Cuccinotta, F.A.; Gladman, B., Viable transfer of microorganisms in the solar system and beyond. In: Horneck, G., Baumstark-Khan, C. (Eds.), *Astrobiology: The quest for the conditions of life*. Springer, New York, Pp. 57–76, 2003.

Horneck, G.; Bucker, H.; Reitz, G. Long-term survival of bacterial spores in space. *Life Sciences and Space Research*, 14(10) 41-45, 1994a.

Horneck, G.; Krasavin, E. A.; Kozubek, S. Mutagenic effects of heavy-ions in bacteria. *Life Sciences and Space Research*, 14(10), 315-329, 1994b.

Horneck, G.; Klaus, D. M.; Mancinelli, R. L. Space Microbiology. *Microbiology and Molecular Biology Review*, 74(1), 121-156, 2010.

Horneck, G.; Stöffler, D.; Ott, S.; Hornemann, U.; Cockell, C. S.; Moeller, R.; Meyer, C.; De Vera, J. P.; Fritz, J.; Schade, S.; Artemieva, N. A. Microbial rock inhabitants survive hypervelocity impacts on Mars-like host planets: first phase of lithopanspermia experimentally tested. *Astrobiology*, 8(1), 17-44, 2008.

Huang, W. D.; Yu, Z. L. A dose-survival model for low energy ion irradiation. *International Journal of Radiation Biology*, 83(2), 133-139, 2007.

Ito, T.; Kobayashi, K.; Ito, A. Effects of broad-band Vacuum-UV synchrotron radiation on wet yeast-cells. *Radiation Research*, 82(2), 364-373, 1980.

Jacobs, J. L.; Carroll, T. L.; Sundin, G. W. The role of pigmentation, ultraviolet radiation tolerance, and leaf colonization strategies in the epiphytic survival of phyllosphere bacteria. *Microbial Ecology*, 49(1), 104-113, 2005.

Kamada, T.; Tsujii, H.; Tsuji, H.; Yanagi, T.; Mizoe, J.; Miyamoto, T.; Kato, H.; Yamada, S.; Morita, S.; Yoshikawa, K.; Kandatsu, S.; Tateishi, A. Efficacy and safety of carbon ion radiotherapy in bone and soft tissue sarcomas. *Journal of Clinical Oncology*, 20(22) 4466-4471, 2002.

Kopylov, V. M.; Bonch-Osmolovskaya, E. A.; Svetlichnyi, V. A.; Miroshnichenko, M. L.; Skobkin, V. S. Gamma-irradiation resistance and UV-sensitivity of extremely thermophilic archebacteria and eubacteria. *Microbiology*, 62(1), 63-67, 1993.

Kozubek, S.; Horneck, G.; Krasavin, E. A.; Ryznar, L. Interpretation of mutation-induction by accelerated heavy-ions in bacteria. *Radiation Research*, 141(2), 199-207, 1995.

Kuhlman, K. R.; Allenbach, L. B.; Ball, C. L.; Fusco, W. G.; La Duc, M. T.; Kuhlman, G. M.; Anderson, R. C.; Stuecker, T.; Erickson, I. K.; Benardini, J.; Crawford, R. L. Enumeration, isolation, and characterization of Ultraviolet (UV-C) resistant bacteria from rock varnish in the whipple mountains, California. *Icarus*, 174(2), 585-595, 2005.

Liu, Y. Q.; Zhou, J. Z.; Omelchenko, M. V.; Beliaev, A. S.; Venkateswaran, A.; Stair, J.; Wu, L. Y.; Thompson, D. K.; Xu, D.; Rogozin, I. B.; Gaidamakova, E. K.; Zhai, M.; Makarova, K. S.; Koonin, E. V.; Daly, M. J. Transcriptome dynamics of *Deinococcus radiodurans* recovering from ionizing radiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(7), 4191-4196, 2003.

Makarova, K. S.; Aravind, L.; Wolf, Y. I.; Tatusov, R. L.; Minton, K. W.; Koonin, E. V.; Daly, M. J. Genome of the extremely radiation-resistant bacterium *Deinococcus radiodurans* viewed from the perspective of comparative genomics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65(1), 44-79, 2001.

Makarova, K. S.; Omelchenko, M. V.; Gaidamakova, E. K.; Matrosova, V. Y.; Vasilenko, A.; Zhai, M.; Lapidus, A.; Copeland, A.; Kim, E.; Land, M.; Mavromatis, K.; Pitluck, S.; Richardson, P. M.; Detter, C.; Brettin, T.; Saunders, E.; Lai, B.; Ravel, B.; Kemner, K. M.; Wolf, Y. I.; Sorokin, A.; Gerasimova, A. V.;

Gelfand, M. S.; Fredrickson, J. K.; Koonin, E. V.; Daly, M. J. *Deinococcus geothermalis*: The pool of extreme radiation resistance genes shrinks. *Plos One*, 2(9), 2007.

Mancinelli, R. L. White, M. R. Rothschild, L. J. Biopan-survival I: exposure of the osmophiles *Synechococcus* sp. (Nageli) and *Haloarcula* sp. to the space environment. *Life Sciences: Exobiology*, 22(3), 327-334, 1998.

Matsushita, K.; Ochiai, T.; Shimada, H.; Kato, S.; Ohno, T.; Nikaido, T.; Yamada, S.; Okazumi, S.; Matsubara, H.; Takayama, W.; Ishikura, H.; Tsujii, H. The effects of carbon ion irradiation revealed by excised perforated intestines as a late morbidity for uterine cancer treatment. *Surgery Today*, 36(8), 692-700, 2006.

Mattimore, V.; Battista, J. R. Radioresistance of *Deinococcus radiodurans*: functions necessary to survive ionizing radiation are also necessary to survive prolonged desiccation. *Journal of Bacteriology*, 178(3), P. 633-637, 1996.

Mileikowsky, C.; Cucinotta, F. A.; Wilson, J. W.; Gladman, B.; Horneck, G.; Lindegren, L.; Melosh, J.; Rickman, H.; Valtonen, M.; Zheng, J. Q. I. Natural transfer of viable microbes in space - 1. From Mars to Earth and Earth to Mars. *Icarus*, 145(2), 391-427, 2000.

Moeller, R.; Horneck, G.; Rabbow, E.; Reitz, G.; Meyer, C.; Hornemann, U.; Stoffler, D. Role of DNA Protection and Repair in Resistance of *Bacillus subtilis* Spores to Ultrahigh Shock Pressures Simulating Hypervelocity Impacts. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(21), 6682-6689, 2008a.

Moeller, R.; Setlow, P.; Horneck, G.; Berger, T.; Reitz, G.; Rettberg, P.; Doherty, A. J.; Okayasu, R.; Nicholson, W. L. Roles of the major, small, acid-soluble spore proteins and spore-specific and universal DNA repair mechanisms in resistance of *Bacillus subtilis* spores to ionizing radiation from x rays and high-energy charged-particle bombardment. *Journal of Bacteriology*, 190(3), 1134-1140, 2008b.

Navarro-Gonzalez, R.; Rainey, F. A.; Molina, P.; Bagaley, D. R.; Hollen, B. J.; de la Rosa, J.; Small, A. M.; Quinn, R. C.; Grunthaner, F. J.; Caceres, L.; Gomez-Silva, B.; McKay, C. P. Mars-like soils in the Atacama Desert, Chile, and the dry limit of Microbial Life. *Science*, 302(5647), 1018-1021, 2003.

Nicholson, W. L. Ancient Micronauts: Interplanetary transport of microbes by cosmic impacts. *Trends in Microbiology*, 17(6), 243-250, 2009.

Nicholson, W. L.; Schuerger, A. C.; Setlow, P. The solar UV environment and bacterial spore UV resistance: considerations for Earth-to-Mars transport by natural processes and human spaceflight. *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 571(1-2), 249-264, 2005.

Okeefe, J. D.; Ahrens, T. J. Oblique Impact - A process for obtaining meteorite samples from other planets. *Science*, 234(4774), 346-349, 1986.

Olsson-Francis, K.; Cockell, C. S. Experimental methods for studying microbial survival in extraterrestrial environments. *Journal of Microbiological Methods*, 80(1), 1-13, 2010.

Raballand, V.; Benedikt, J.; Wunderlich, J.; von Keudell, A. Inactivation of *Bacillus antrophaeus* and *Aspergillus niger* using beams of argon ions, of oxygen molecules and of oxygen atoms. *Journal of Physics D-Applied Physics*, 41(11), 2008.

- Rothschild, L. J.; Mancinelli, R. L. Life in extreme environments. *Nature*, 409(6823), 1092-1101, 2001.
- Saffary, R.; Nandakumar, R.; Spencer, D.; Robb, F. T.; Davila, J. M.; Swartz, M.; Ofman, L.; Thomas, R. J.; DiRuggiero, J. Microbial survival of space vacuum and extreme ultraviolet irradiation: strain isolation and analysis during a rocket flight. *FEMS Microbiology Letters*, 215(1), 163-168, 2002.
- Salton M. R. J., The Bacterial Cell Wall (Elsevier, Amsterdam) 1964.
- Sancho, L. G.; de la Torre, R.; Horneck, G.; Ascaso, C.; de los Rios, A.; Pintado, A.; Wierzchos, J.; Schuster, M. Lichens survive in space: Results from the 2005 LICHENS experiment. *Astrobiology*, 7(3), 443-454, 2007.
- Schuerger, A. C.; Mancinelli, R. L.; Kern, R. G.; Rothschild, L. J.; McKay, C. P. Survival of endospores of *Bacillus subtilis* on spacecraft surfaces under simulated Martian environments: Implications for the forward contamination of Mars. *Icarus*, 165(2), 253-276, 2003.
- Sghaier, H.; Narumi, I.; Satoh, K.; Ohba, H.; Mitomo, H. Problems with the current deinococcal hypothesis: An alternative theory. *Theory in Biosciences*, 126, 43-45, 2007.
- Shuster, D. L.; Weiss, B. P. Martian surface paleotemperatures from thermochronology of meteorites. *Science*, 309(5734), 594-597, 2005.
- Stöffler, D.; Horneck, G.; Ott, S.; Hornemann, U.; Cockell, C. S.; Moeller, R.; Meyer, C.; de Vera, J. P.; Fritz, J.; Artemieva, N. A. Experimental evidence for the potential impact ejection of viable microorganisms from Mars and Mars-like planets. *Icarus*, 186(2), 585-588, 2007.
- Strazzulla, G.; Brucato, J. R.; Cimino, G.; Leto, G.; Spinella, F. Interaction of solar-wind ions with planetary surfaces. *Laboratory Planetology*, 15(10), 13-17, 1995.
- Thompson, R.D. The climatology of the arid world. University of Reading, *Department of Geography, Geographical Papers*, 35, 1975.
- Weber, P.; Greenberg, J. M. Can spores survive in interstellar space. *Nature*, 316(6027), 403-407, 1985.
- Winstead, C.; McKoy, V. Resonant interactions of slow electrons with DNA constituents. *Radiation Physics and Chemistry*, 77(10-12), 1258-1264, 2008.
- Woods, T. Solar vacuum ultraviolet irradiance measurements and models for solar cycle 23. Full paper presented at Proceedings of Soho 11 Symposium, Davos, Switzerland, 11-15, March, 2002.
- Yang, Z.; Gan, B.; Lin, J. The mutagenic effect on plant growth by ion implantation on wheat. *Anhui Agriculture University Acta* 18:282- 288, 1991.
- Yu, Z.L. Introduction to ion beam technology. Hefei: Anhui Science and Technology Publishing Company, 1998.
- Yu, Z.L. Studying of ion implantation effect on biology in China. China Nuclear Science and Technology Report (Chinese), CNIC-00746, China Nuclear Information Centre, 1993.

APÊNDICE 2 – Artigo 1. Survival of *Deinococcus radiodurans* to laboratory-simulated solar wind charged particles

Survival of *Deinococcus radiodurans* to laboratory-simulated solar wind charged particles

Authors:

- (1) Ivan Glaucio PAULINO-LIMA^a
- (3) Eduardo JANOT-PACHECO^b
- (3) Douglas GALANTE^b
- (4) Charles S COCKELL^c
- (5) Karen OLSSON-FRANCIS^c
- (6) Nigel MASON^d
- (7) John R Brucato^e
- (8) Claudia LAGE^a

Affiliations:

- a- Instituto de Biofisica Carlos Chagas Filho. Avenida Carlos Chagas Filho, 373. Cidade Universitaria, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, CEP 21941-902.
- b- Instituto de Astronomia, Geofisica e Ciencias Atmosfericas. Rua do Matao, 1226. Cidade Universitaria. 05508-900, Sao Paulo, SP, Brasil.
- c- Planetary and Space Science Research Institute, Open University, Walton Hall, Milton Keynes, United Kingdom, Buckinghamshire, MK7 6AA.
- d- Department of Physics and Astronomy, Open University, Walton Hall, Milton Keynes, United Kingdom, Buckinghamshire, MK7 6AA.
- e- INAF, Osservatorio Astrofisico di Arcetri, Largo Enrico Fermi 5, I - 50125 Florence, Italy.

Corresponding author: Ivan Glaucio Paulino-Lima. igplima@biof.ufrj.br

Abstract

The radiation-resistant bacterium *Deinococcus radiodurans* was exposed to sources simulating solar wind charged particles emissions such as electrons, protons and ions. Cells were mixed or not with dust grains (basalt or sandstone) differing in elemental composition, and deposited on smooth polycarbonate substrate to verify the shielding efficiency of fine grains (<20µm) as well as to determine how much cell survival each one could afford after dehydration after irradiation. Doses necessary to inactivate 90% of the initial cell population (LD_{10}) were determined for different experimental conditions. Results indicate that low energy particle radiation (2keV to 4keV) have no effects on dehydrated cells, whilst higher energy ions (200keV) inactivate cells only if heavily irradiated ($>10^{10}$ ions.cm $^{-2}$). Considering the low flux of energetic particles originating from actual astrophysical sources, these results emphasise the resilience of life in space and support the concept of an interplanetary transfer of viable microbes.

1. Introduction

The ion population of low energy cosmic rays in the interplanetary medium is essentially due to the solar wind and to particles accelerated by magnetic energy released in solar flares. Solar wind ions are produced by a plasma expansion whose velocity becomes supersonic at a distance of a few solar radii, roughly $400\text{km}\cdot\text{sec}^{-1}$ (i.e., ions at energies of $\sim 1\text{keV}/\text{amu}$ are expelled). At 1AU the wind density is in the order of $5\text{ protons}\cdot\text{cm}^{-3}$, corresponding to a flux of $\sim 2\times 10^8\text{ protons}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{sec}^{-1}$ (STRATZULLA *et al.*, 1995). Although the flux drops proportionally to the inverse of the square distance from the Sun, some $10^{17}\text{protons}\cdot\text{cm}^{-2}$ reach a hypothetical average-sized asteroidal surface at 3AU in only 100 years (STRAZZULA *et al.*, 1995). Such high flux is expected to produce a number of effects as sputtering (THIEL *et al.*, 1982), and ion implantation (STRAZZULA *et al.*, 1995). Electron distribution functions in the solar wind have approximately Maxwellian cores with energies of the order of ten eV (VESELOVSKY, 2006) and density around $5\text{ electrons}\cdot\text{cm}^{-3}$ (SALEM *et al.*, 2003), corresponding to a flux of $2 \times 10^8\text{ electrons}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

Studies on low energy charged particle irradiation on plants and microbes, especially with energies in the range of several to hundred keV, attracting great interest (Yang *et al.*, 1991; Yu, 1998). By using such low energy range for ion irradiation, it is easier to develop biotechnologically important traits (Huang & Yu, 2007). Low energy ion irradiation has also being investigated for potential application in cancer treatment (Matsushita *et al.*, 2006; Kamada *et al.*, 2002), and sterilization procedures in the medical industry (Raballand *et al.*, 2008). Besides its application in biotechnology, low energy ion irradiation is useful to study the effects of space radiation on microbial cells using space simulation facilities. Conditions to afford

microbial survival in space environment have been extensively simulated in laboratory (reviewed in Olsson-Francis e Cockell, 2010 e Horneck et al., 2010).

The effects of low energy particle radiation on microorganisms have not been fully investigated under simulated space conditions. As far as it is studied, it has been shown to result in less cell death than that observed for other forms of radiation, even though at the cost of higher mutation rates (Yu, 1993). Apparently, the biological hazard impinged by such radiations is related to their highly localized energy deposition. Inactivation may be restricted to those cells placed within the radiation path (Horneck, 1994), in an extent depending on the radiation Linear Energy Transfer (LET) (Kozubek *et al.*, 1995). On the other hand, two specific pieces of evidence indicate that mutagenic events seem to arise if damages form in the very neighbourhood of the genetic material. Low-energy electrons appear to interact with particular DNA targets by resonance mechanisms (McKoy & Winstead, 2008), and the error-prone Non-Homologous End Joining (NHEJ) repair has been demonstrated by Moeller *et al.* (2008) to be the key one to repair DNA breaks induced by particle-bombardment in *Bacillus subtilis*.

The abovementioned reasoning bears in one important issue connected with the panspermia hypothesis (Mileikowsky *et al.*, 2000). Any viable life form putatively travelling from one inhabited planet to another should escape the heavy particle bombardment inflicted by a nearby star in the meanwhile. Predictions by the lithopanspermia version account on large rock fragments to assure shielding against radiation to buried microorganisms inside (Mileikowsky *et al.*, 2000). Of capital importance, larger volumes better absorb secondary radiation accumulated within some million years stay in space, which is thought to grant cell integrity upon landing in a habitable environment.

Astronomical data coming from recent observation has input information on life-threatening scenarios concerning the panspermia hypothesis. In this paper, more elaborate laboratory apparatus allowed the experimental simulation of these conditions to some extent, including high vacuum and exposure to solar-like particulate radiation. To better understand the limits of life in extreme environments and its resilience in the Universe, this study was designed to investigate conditions to allow survival of extremophilic microorganisms after irradiation with low-energy charged particles under several experimental conditions, simulating the solar exposure during a putative interplanetary travel.

2. Material and Methods

2.1. Sample preparation and analysis after irradiation

Cells of *Deinococcus radiodurans* were cultivated in TGY culture medium (0.5% Tryptone, 0.3% Yeast Extract, 0.1% Glucose), at 32°C, 200rpm for 18 hours. Basalt or sandstone grains were added or not to the culture (10^8 ml^{-1}) for a final concentration of 1.25% w/v (Figure 1). The mixture (1 μl) was deposited on polycarbonate substrates (Millipore filters) previously set on top of the sample holder stuck with double sided carbon tapes, resulting in samples with $\sim 10^5$ cells mixed to 12.5 μg grains.

Figure 1.

After irradiation assays in triplicate, the substrates containing monolayer cells of *D. radiodurans* were removed from the sample holder and put into 1.5ml microcentrifuge tubes (eppendorf) containing 100 μl TGY. After gently mixing for

1min, the expected cell concentration was 10^5 cells·ml⁻¹. Serial dilutions (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}) were performed using 1.5ml microcentrifuge tubes (Eppendorf) containing a final volume of 100µl TGY each. A volume of 10µl was taken from each tube and seeded on agar-solidified TGY containing Petri dishes, followed by incubation at 32°C for up to 48 hours. After this period, grown colony-forming units (CFU) were counted and multiplied by the corresponding dilution factor to estimate the average number of survivors (N). This number was divided by the value corresponding to the non-irradiated control (N_0), yielding a survival rate (N/N_0) for each dose. Survival curves were plotted in semi-log graphs with survival rates in the ordinates vs radiation doses shown in the abscissas.

2.3. Irradiation with 200keV proton beam

Proton beam irradiations were performed at the Osservatorio Astrofisico di Catania, Sicily, Italy. A vacuum chamber capable of maintaining the system in the order of 10^{-4} Pa was coupled to a system generating protons with final energy set at 200keV. Samples were deposited on polycarbonate substrates (Millipore filters) and placed in a sample holder using a double-sided carbon tape. The sample holder was then assembled inside the chamber, normal to the beam direction. Either naked cells or cells mixed with basalt or sandstone grains were exposed in triplicate to the indicated fluencies of 200keV protons.

In a pilot experiment, samples of *D. radiodurans* were also deposited on substrates mimicking meteoritic analogues (CDAs). Amorphous forsterite (Mg_2SiO_4) or amorphous and crystalline fayalite (Fe_2SiO_4) were tested to check whether they could influence cell inactivation by particles. These minerals are considered good

analogues of meteoritic metallic blends due to both their morphology and molecular composition.

2.4. Irradiation with 4keV carbon ions

Experiments of irradiation with carbon ions were performed at Queens University Belfast, Northern Ireland, UK. A vacuum chamber (10^{-5} Pa) capable of maintaining a system generating ions with final energy of 4keV was used. Samples were deposited on a polycarbonate substrate (Millipore filters) and stuck on top of a sample holder using a double-sided carbon tape. The sample holder was then assembled inside the chamber, in a position against the beam. An attached rotating device controlled the exposition of the samples with the programmed doses. Either naked cells or cells mixed with sandstone or basalt grains were exposed in triplicate to the indicated fluencies (Figure 4A) of 4keV carbon ions.

2.2. Irradiation with 2keV electron beam

Electron irradiation experiments were performed at the Open University, UK. A vacuum chamber (10^{-5} Pa) was coupled to an electron gun model ELG-2/EGPS-1022 Kimball, emitting a 2keV electron beam with controlled energy and flux. Samples were deposited on polycarbonate substrate (Millipore filters) and stuck on top of a metallic sample holder using a double-sided carbon tape. The sample holder was then assembled inside the chamber, in a position against the beam. An attached rotating device controlled the exposition of the samples with the programmed doses. Either naked cells or cells mixed with sandstone or basalt grains were exposed in triplicate to the indicated fluencies (Figure 4B) of 2keV electrons.

3. Results

The linear energy transfer (LET) to the target (single-cell 2 μm in diameter, 1g·cm⁻³ density) was calculated using the software SRIM 2010, resulting in 7.378 eV·Å⁻¹ for 200keV protons. The penetration range of these particles was estimated to be 2.7 μm . According to these calculations, 1kGy is the estimated absorbed dose to inactivate 90% of the population of free cells (LD₁₀), corresponding to 10¹⁰ ions·cm⁻². The LD₁₀ is therefore 10-fold less for protons compared to gamma rays (10kGy). In fact, electromagnetic gamma rays interact with matter only through ionizations and excitations, while protons, besides those, also interact via mass transfer and momentum transfer, resulting in increased LET.

Regarding the effect of grains (Cosmic Dust Analogs, CDA's), many cells appeared to be protected by the overlapping grains and therefore survived the highest doses. Moreover, there was no detectable difference in the protection afforded by either type of grain, arenite or basalt, and the survival rates scored in their presence were orders of magnitude above that obtained for naked cells.

Cells deposited on meteoritic material, on the other hand, suffered some radiation impact. Survival rates of cells deposited on amorphous forsterite (Mg_2SiO_4) were very similar to survival rates of naked cells deposited on a polycarbonate filter (Millipore). Cells deposited on amorphous and crystalline fayalite (Fe_2SiO_4) could not be recovered at all, indicating that the survival rate was below the detection limit of the method (<10⁻⁵). Considering that the only difference between forsterite and fayalite is the replacement of magnesium in forsterite by iron in fayalite, it is possible that iron atoms somehow contribute to inactivate cells when irradiated with 200keV protons (Figure 2).

Figure 2.

Electron microscopy (SEM) images were produced for non-irradiated controls and for samples of *D. radiodurans* irradiated at the maximum dose of 200keV protons. There was no detectable difference between controls and irradiated samples with respect to the structure of cell surfaces, even after visualization of naked cells irradiated at the maximum dose (Figure 3). The impact of low energy ions on *Bacillus atrophaeus* and of *Aspergillus niger* was investigated by Raballand et al. (2008). They found that 200eV ions do not cause significant erosion for fluences up to $1.15 \times 10^{18} \text{ cm}^{-2}$. However, the combined impact of argon ions and oxygen molecules or atoms causes significant etching of the spores and significant inactivation. This is explained by the process of chemical sputtering, where an ion-induced defect at the surface of the spore reacts with either the incident bi-radical O₂ or with an incident O atom. This leads to the formation of CO, CO₂ and H₂O and thus to erosion.

Figure 3.

The calculated LET predicted by the SRIM code for 4keV carbon ions on the target (single-cell 2μm in diameter, 1g·cm⁻³ density) was 3.57eV·Å⁻¹, with a penetration path of 30nm. The estimated dose to inactivate 90% of the population of naked cells (LD₁₀) was 1kGy, which corresponds to $2.65 \times 10^{11} \text{ ions} \cdot \text{cm}^{-2}$. However, there was no cell inactivation even at doses 10,000-fold above this dose (Figure 3). Probably this is due to the low penetrating power of 4keV carbon ions, whose trajectory is interrupted in the cell wall. There are no significant differences in the radiation protection afforded by either type of grain.

Regarding irradiation with 2keV electrons, all survival curves showed low values of cell inactivation (Figure 4). Apparently, naked cells are inactivated faster than cells mixed with grains, although this effect was only observed for higher doses. There are no significant differences in the radiation protection afforded by either type of grain.

Figure 4.

4. Discussion

The interaction between low energy ions and the organisms is characterized by energy deposition, momentum transferring, mass deposition and charge neutralization and/or exchange (HUANG *et al.*, 1996; SHAO *et al.*, 1997b) whereas UV and other ionizing radiation into organisms only produce the effect of energy deposition (SONG *et al.*, 2001). A particle with more than one or two hundred volts initial energy will make a number of collisions before stopping. The average process introduced by the relatively numerous collisions needed to stop such a particle insures that the average distance along the particle track will not vary enormously from a mean value. In particular, most particles will stop within a distance, called the range, which will depend on the type of particle and the energy, and only a minute number will travel even slightly farther than this range (HUTCHINSON, 1955).

The survival fraction of microorganisms after low energy irradiation has a peak at a definite dose and the shape of the curve is saddle-like (SHAO and YU, 1997a), in which the survival fraction of microorganisms increases linearly as the dose increases over some dose ranges. The saddle-type dose survival curve has been

observed in many organic molecules in vitro irradiated by low energy ions. This has been verified to be caused by the unique physical processes that occur for low energy ion irradiation through research on the physical and chemical processes of low energy ion irradiation in biomolecules (HUANG *et al.*, 1998a; YU and SHAO, 1994; SHAO and YU, 1997b). The restoration effects of low energy ion irradiation observed in molecules can also be applied to microorganisms. Previously, the Energy transfer, Mass deposition and Charge exchange model (EMC model) based on the repair effects caused by mass deposition and charge exchange of low energy ions has been proposed and has given a good explanation of the experimental data (SHAO and YU, 1997a). However, more recent studies on the physical and chemical processes of low energy ion irradiation of microorganisms indicates that momentum transfer is the main repair physical process during low energy ion irradiation of biomolecules and organism (HUANG *et al.*, 1998a-d; ROSSLER, 1985; HUANG, 1995). Moreover, the EMC model does not consider the stopping range of keV ions in biomaterial.

The maximum stopping range of keV ion in biological samples is much more than in inorganic crystalline material (HUANG and YU, 2007). The stopping range of low energy ions in tomato film for instance is proportional to the radiation dose, and 30keV ions could penetrate 180 micron potato film at the dose of 2×10^{17} ions \cdot cm $^{-2}$ (YU *et al.*, 1994). The implanted ion was detected at tens of micron depth in the mung bean seed capsule when the seed capsule was irradiated with low energy ions at dose of 2×10^{17} ions \cdot cm $^{-2}$ (SU *et al.*, 1997). A 30keV ion could also penetrate 50 microns of dry tomato peel (HAN and YU, 1998) and 20 microns of Mylar film (a polymer used in radiation dosimetry) (HUANG *et al.*, 1999; YU, 2000). The main factor controlling the depth of penetration was the formation of channels when

biomaterial was irradiated by low energy ions at high dose (HUANG *et al.*, 1999).

When the low energy ions enter the biomaterial, they sputter atoms from their route. The sputtered atom extracts other atom in the sample to form small molecules such as H₂O and CH₄. More and more channels were formed when more and more small molecules escaped after doses of more than 10¹⁷ ion·cm⁻² of low energy ion irradiation. The depth of the channel was proportional to the dose of low energy ion irradiation and the stopping range of low energy ions in biomaterial was also increased as the dose increases (HUANG *et al.*, 1999).

It is known that energy of incident ions is transferred to the electronic and nuclear target systems leading to electronic excitation and ionisation and elastic nuclear collisions. Basing on results obtained for ribonuclease (JUNG *et al.*, 1966), the enzymatic protein having chemical composition similar to the coat of microbial cells, one can assume that under irradiation conditions the electronic and nuclear stopping powers are comparable. However, the cross-section for the spore inactivation by elastic nuclear collisions can be predominant, as shown for ribonuclease (JUNG *et al.*, 1966). The energetic ions cause displacement and sputtering of target species due to breaking of chemical bonds. In the case of the target composed of proteins, one can expect rupturing of peptide, disulphide and hydrogen bonds, which leads to fragmentation of polypeptide chains and conformational changes of proteins. Also, deamination, decarboxylation and dehydrogenation of aminoacids in the chain are possible. Such processes were observed for glycine irradiated by low-energy helium ions causing the development of a carbonised crust (FOTI *et al.*, 1991). Alternatively, the rearrangement of target species can involve their new aggregation and the creation of unspecific bonds for the given protein. In addition, protons slowing down in the target can cause its

hydrogenation. The above mechanism can generate decomposition and a loss of the biological activity of coat proteins, especially enzymes responsible for germination and outgrowth of microbial spores.

In fact, the momentum transferring of implanted ion exerted an etching action on organisms (YANG *et al.*, 1995). Song and Wu (2000), using scanning Electron Microscopy, have observed the etching effect of 20keV N⁺ beam on cell surfaces of *Deinococcus radiodurans* and *Escherichia coli*. The results showed that the etching depth and zone, and the damaged degree of cells increased gradually with the increase in implanted dose, and the cells' surface was avulsed gravely. Although the interior damage and etched micro-holes could not be seen at low dose, there is no doubt that implanted ion could also etch some micro-holes on the surface of cells and penetrate into the interior and result in damage to cytoplasm. When implanted dose increased continually, the damage to cells became more and more serious. Could ion beam etch much more microholes on the cells' surface, while the cells' membrane and/or wall could be struck into cracks and fragments and avulsion, cytoplasm would be also damaged more seriously in this case. According to photographs taken, a conclusion may be drawn that the "moment etching channels" would be formed due to the action of a large number of successively implanted ion, and connected to DNA. Therefore, DNA would be hit and damaged by successively implanted ion of high dose.

Other experiment results also proved that the DNA of microbes and plants' cells produced ssbDNA and dsbDNA by the action of a high dose ion injections, so exposure to low energy ion beam could exert a direct action on DNA, leading to its damage and mutation of organisms (SONG and WU, 2000).

Low energy ion beam as a new mutagenic approach has been used widely in improving crops and modifying microbes breeding program since 1986 in China (SONG and WU, 2000), and made considerable headway. For example, there have been two varieties of double-cropping rice, one is early-season Indian rice named S₉₀₉₄ and the other is late-season Japanese rice named D₉₀₉₅, has been popularized in Anhui province. Both varieties possess a higher grain yield, multi-disease resistance and good quality (SONG and WU, 2000). In modifying industrial microbes, some higher potency and stable strains have also been obtained (SONG and WU, 2000). Moreover, low energy ion irradiation is also being investigated for potential application in cancer treatment (MATSUSHITA *et al.*, 2006), bone and soft tissue sarcomas (KAMADA *et al.*, 2002), and sterilization procedures in the medical industry (RABALLAND *et al.*, 2008).

1.1 Electrons

The application of low-energy electrons was introduced in biological studies by D. A. Wells, in 1929 (ZERMENO and COLE, 1969). Since then, low velocity or partially penetrating electrons of various energies have been used by several laboratories for the determination of the spatial localization of enzymes (PREISS, 1958; PREISS, 1959; PREISS and POLLARD, 1961) and radiosensitive structures in micro-organisms (HASKINS, 1938; MOOS, 1951; DAVIS and HUTCHINSON, 1952; DAVIS, 1954a,b; HUTCHINSON, 1955; KNAUSS, 1956; McREA, 1960; WILSON and POLLARD, 1958; COLE and LANGLEY, 1963). The method was adapted for low-voltage irradiation of fully hydrated specimens such as viral, bacterial, and mammalian systems (COLE, 1961; COLE and LANGLEY, 1963; COLE *et al.*, 1963; COLE, 1965).

However, electrons are not the most suitable charged particles for use as radiation probes, because their small mass lets them be strongly scattered in their interactions with atoms (HUTCHINSON, 1955). The total range measured along the actual track is about constant for all electrons of a given energy, but the many sudden changes in direction mean that electrons diffuse different distances into matter before being stopped. There will be a few electrons which, by chance, will be very little deviated from the forward direction at any time, and will consequently penetrate, at most, to a distance substantially the range of the electrons. In short, radiation effects will be a maximum at the surface, and will drop off rapidly with depth. Heavy charged particles such as protons, which are far less likely to be deflected in collisions would make a better probe, but an electron beam is much easier to obtain. When the concept of a radiation probe arose, the organisms under consideration were viruses and bacterial spores. The dimensions of interest were thus from tens up to thousands of Angstroms. From existing data, it was possible to estimate that the electron beam energies needed were from hundreds to thousands of volts. Before quantitative work could be done, it was first necessary to measure the actual ranges in matter of electrons of these energies (HUTCHINSON, 1955). Several measurements and calculations about the penetration of electrons into different materials, biological system and water were performed in the past decades and Table 1 provides some values obtained so far for different types of biological materials and different energies.

Table 1.

The mechanism of bacterial inactivation by electron beam is not conclusively known but it is widely believed that it is similar to other ionization radiations such as

gamma-ray or X-ray (CURRY *et al.*, 2000; CLELAND *et al.*, 2001; WATANABE, 2000). The fundamental difference, however, is that in case of electron beam the cell inactivation is due to the highly energetic electrons whereas in the cases of gamma-rays or X-rays the inactivation is due to the energetic photons (CHALISE *et al.*, 2004). In previous studies with cellular monolayers (COLE and Langley, 1963; COLE *et al.*, 1963; ZERMENO and COLE, 1969; COLE *et al.*, 1974), it was shown that electron beams which penetrated only 0.10 to 0.33 the cell thickness (both animal cells and microbial spores) were three to ten times more efficient in producing killing, inactivation, or DNA breakage than were fully penetrating electron beams (TOBLEMAN and COLE, 1974). An interpretation of these results was either that the major radiosensitive sites were located on or very close to the nuclear membrane or that the sensitive sites maybe more diffuse within the nucleus if an enhanced relative biological effectiveness (RBE) of greater than 4 were found at electron track-ends where the linear energy transfer (LET) approaches $40\text{keV}\cdot\mu\text{m}^{-1}$ or greater (TOBLEMAN and COLE, 1974).

Currently, the main bio-technologic application of electron irradiation is decontamination of food (WAJE *et al.*, 2009; SONG *et al.*, 2009; CHALISE *et al.*, 2007; SMOLKO *et al.*, 2005; CHALISE *et al.*, 2004; JACZYNSKI and PARK, 2003; CALENBERG *et al.*, 1999). According to data from the U.S. General Accounting Office (2000), USDA estimated that illness from food-borne pathogens resulted in productivity losses and medical expenses at \$37.1 and \$23 billion, respectively. The vast majority of these experiments use high-energy electrons with enhanced penetration into matter, usually obtained from synchrotrons or linear accelerators. However, low-energy electrons are very important to understand the physical processes involved in the interaction of radiations with biological systems (STENN *et*

al., 1970; JOHNSON, 1972; LIN, 1974; NABBEN *et al.*, 1982; BOUDAIFFA *et al.*, 2000).

4. References

- Anderson, A. W., Nordan, H. C., Cain, R. F., Parrish, G. & Duggan, D. (1956) Studies on a radio-resistant micrococcus .1. Isolation, morphology, cultural characteristics, and resistance to gamma radiation. *Food Technology*, 10(12), 575-578.
- Boudaiffa, B., Cloutier, P., Hunting, D., Huels, M.A., Sanche, L. (2000) Resonant formation of DNA strand breaks by low-energy (3 to 20 eV) electrons. *Science*, 287(5458), 1658-1660.
- Chalise, P.R., Hotta, E., Matak, K.E., Jaczynski, J. (2007) Inactivation kinetics of *Escherichia coli* by pulsed electron beam. *Journal of Food Science*, 72, M280-M285.
- Chalise, P.R., Rahman, M.S., Ghomi, H., Hayashi, Y., Watanabe, M., Okino, A., Ano, T., Shoda, M., Hotta, E. (2004) Bacterial inactivation using low-energy pulsed-electron beam. *Ieee Transactions on Plasma Science*, 32(4), 1532-1539.
- Cleland, M.R., Meissner, J., Herer, A.S., Beers, E.W. (2001) Treatment of foods with high-energy X rays. *Application of Accelerators in Research and Industry*, 576, 783-786.
- Cole, A. (1961) Study of radiation susceptible structures in microorganisms with monoenergetic electron beams of 0.5 to 150kev energies. *Abstracts of International Biophysic Congress* 95.
- Cole, A. (1959) ELECTRON-GUN IRRADIATOR FOR MICROORGANISMS. *Radiation Research*, 11(3), 438-438.
- Cole, A., Cooper, W.G., Shonka, F., Corry, P.M., Humphrey, R.M., Ansevin, A.T. (1974) DNA SCISSION IN HAMSTER CELLS AND ISOLATED-NUCLEI STUDIED BY LOW-VOLTAGE ELECTRON-BEAM IRRADIATION. *Radiation Research*, 60(1), 1-33.
- Cole, A., Humphrey, R.M., Dewey, W.C. (1963a) LOW-VOLTAGE ELECTRON BEAM IRRADIATION OF NORMAL AND 5-BROMOURIDINE DEOXYRIBOSIDE-TREATED L-P59 MOUSE FIBROBLAST CELLS IN VITRO. *Nature*, 199(489), 780-&.

- Cole, A., Humphrey, R.M., Dewey, W.C. (1963b) LOW-VOLTAGE ELECTRON BEAM IRRADIATION OF NORMAL AND 5-BROMOURIDINE DEOXYRIBOSIDE-TREATED L-P59 MOUSE FIBROBLAST CELLS IN VITRO. *Nature*, 199(489), 780-&.
- Cole, A. and Langley, R. (1963a) STUDY OF RADIOSENSITIVE STRUCTURE OF T2 BACTERIOPHAGE USING LOW ENERGY ELECTRON BEAMS. *Biophysical Journal*, 3(3), 189-&.
- Cole, A. and Langley, R. (1963b) STUDY OF RADIOSENSITIVE STRUCTURE OF T2 BACTERIOPHAGE USING LOW ENERGY ELECTRON BEAMS. *Biophysical Journal*, 3(3), 189-&.
- Cole, A. (1965) The study of radiosensitive structures with low voltage electron beams. In *Cellular Radiation Biology*, The University of Texas, M. D. Anderson Hospital and Tumor Institute, Eighteenth Annual Symposium on Fundamental Cancer Research. Williams and Wilkins, Baltimore, pp.267- 271.
- Curry, R.D., Unklesbay, K., Unklesbay, N., Clevenger, T.E., Brazos, B.J., Mesyats, G., Filatov, A. (2000) The effect of high-dose-rate X-rays on E-coli O157 : H7 in ground beef. *Ieee Transactions on Plasma Science*, 28(1), 122-127.
- Davis, M. (1954a) IRRADIATION OF T-1 BACTERIOPHAGE WITH LOW-VOLTAGE ELECTRONS. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 49(2), 417-423.
- Davis, M. (1954b) RANGE MEASUREMENT OF LOW-VOLTAGE ELECTRONS. *Physical Review*, 94(2), 243-245.
- Davis, M. (1954c) THE IRRADIATION OF BACTERIAL SPORES WITH LOW-VOLTAGE ELECTRONS. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 48(2), 469-481.
- Davis, M. and Hutchinson, F. (1952) LOW-VOLTAGE ELECTRON BOMBARDMENT OF BACTERIAL SPORES. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 39(2), 458-461.
- Foti, A.M., Baratta, G.A., Leto, G., Strazzulla, G. (1991) MOLECULAR ALTERATION AND CARBONIZATION OF GLYCINE BY ION IRRADIATION. *Europhysics Letters*, 16(2), 201-204.
- Han, J., Yu, Z. (1998) Study on etching and penetrating of low energy ion into tomato peel. *Journal of Biophysics (Chinese)* 14:757-761.
- Haskins, C. P. Apparatus for studying the biological effects of cathode rays. (1938) *J. App. Phys.* 9, 553-561.
- Horneck G. HZE particle effects in space. *Acta Astronaut.* 1994 Nov;32(11):749-55.
- Huang, W.D., Han, J.W., Wang, X.Q., Yu, Z.L., Zhang, Y.H. (1998a) keV ion irradiation of solid glycine: an EPR study. *Nuclear Instruments & Methods in*

Physics Research Section B-Beam Interactions with Materials and Atoms, 140(1-2), 137-142.

Huang, W., Han, J., Yu, Z. (1999) Ranges of keV ion in mylar films. Nuclear Technology (Chinese) 22:1-5.

Huang, W.D., Wang, X.Q., Yu, Z.L., Zhang, Y.H. (1998b) Research into keV N+ irradiated glycine. Nuclear Instruments & Methods in Physics Research Section B-Beam Interactions with Materials and Atoms, 140(3-4), 373-379.

Huang, W.D. and Yu, Z.L. (2007) A dose-survival model for low energy ion irradiation. International Journal of Radiation Biology, 83(2), 133-139.

Huang, W.D., Yu, Z.L., Jiang, X.Y., Yang, X.H. (1996) Study of mass and energy deposit effects of ion implantation of NAA. Radiation Physics and Chemistry, 48(3), 319-323.

Huang, W.D., Yu, Z.L., Zhang, Y.H. (1998c) Reactions of solid glycine induced by keV ion irradiation. Chemical Physics, 237(1-2), 223-231.

Huang, W.D., Yu, Z.L., Zhang, Y.H. (1998d) Repair by radiation itself or not? A study of threonine irradiated by keV ion. Nuclear Instruments & Methods in Physics Research Section B-Beam Interactions with Materials and Atoms, 134(2), 202-208.

Huang, W. (1995) The mechanism studies of low energy ion irradiated biomolecules. PhD Dissertation (Chinese) Institute of Plasma Physics, Chinese Academy of Science.

Hutchinson, F. (1954) Use of charged particles to measure skin thickness and other surface properties. Proceedings of the Institute of Radio Engineers, 42(3), 613-613.

Hutchinson, F. (1955) Use of charged particles to measure skin thickness and other surface properties. Annals of the New York Academy of Sciences, 59(4), 494-502.

Jaczynski, J. and Park, J.W. (2003) Microbial inactivation and electron penetration in surimi seafood during electron beam processing. Journal of Food Science, 68(5), 1788-1792.

Johnson, D.E. (1972) Interactions of 25keV electrons with guanine and cytosine. Radiation Research, 49(1), 63-&.

Jung, H. and Zimmer, K.G. (1966) in Current Topics in Radiation Research Vol. 2, edited by Ebert M. and Howard A. (North-Holland, Amsterdam), p.69.

Kamada, T., Tsujii, H., Tsuji, H., Yanagi, T., Mizoe, J., Miyamoto, T., Kato, H., Yamada, S., Morita, S., Yoshikawa, K., Kandatsu, S., Tateishi, A., Work Grp Bone Soft Tissue, S. (2002) Efficacy and safety of carbon ion radiotherapy in

- bone and soft tissue sarcomas. *Journal of Clinical Oncology*, 20(22), 4466-4471.
- Knauss, H.P. (1956) Penetration of slow electrons through spore walls of *bacillus-megaterium*. *Science*, 124(3213), 182-182.
- Kozubek S, Horneck G, Krasavin EA, Rýznar L. Interpretation of mutation induction by accelerated heavy ions in bacteria. *Radiat Res*. 1995 Feb;141(2):199-207.
- Lin, S.D. (1974) Electron radiation-damage of thin-films of glycine, diglycine, and aromatic amino-acids. *Radiation Research*, 59(3), 521-536.
- Matsushita, K., Ochiai, T., Shimada, H., Kato, S., Ohno, T., Nikaido, T., Yamada, S., Okazumi, S., Matsubara, H., Takayama, W., Ishikura, H., Tsujii, H. (2006) The effects of carbon ion irradiation revealed by excised perforated intestines as a late morbidity for uterine cancer treatment. *Surgery Today*, 36(8), 692-700.
- McCrea, J. F., Preiss, J. W., O'Loughlin, J. (1960) Physical studies on pox virus.I. Inactivation of vaccinia virus infectivity with low-energy electrons. *Biophysical Journal*, 1, 43-53.
- McKoy, V and Winstead, C Electron collisions with biomolecules. *Journal of Physics. Conference Series (Online)* v. 115(1). [6 p.]. 2008.
- Meesungnoen, J., Jay-Gerin, J.P., Filali-Mouhim, A., Mankhetkorn, S. (2002) Low-energy electron penetration range in liquid water. *Radiation Research*, 158(5), 657-660.
- MILEIKOWSKY, C. et al. Natural transfer of viable microbes in space - 1. From Mars to Earth and Earth to Mars. *Icarus* [S.I.], v. 145, n. 2, p. 391-427, 2000.
- Moos, W.S. (1951) Effect of slow cathode rays on microorganisms. *Nucleonics*, 8(1), 50-53.
- Nabben, F.J., Karman, J.P., Loman, H. (1982) Inactivation of biologically-active DNA by hydrated electrons. *International Journal of Radiation Biology*, 42(1), 23-30.
- Preiss, J.W. (1958) The localization of invertase in the yeast cell with low voltage electrons. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 75(1), 186-195.
- Preiss, J.W. (1959) The effects of range-restricted electrons on intracellular yeast catalase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 79, 261-268.
- Raballand, V., Benedikt, J., Wunderlich, J., von Keudell, A. (2008) Inactivation of *Bacillus atrophaeus* and of *Aspergillus niger* using beams of argon ions, of oxygen molecules and of oxygen atoms. *Journal of Physics D-Applied Physics*, 41(11).
- Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J.B., Herdman, M., Stanier, R.Y. (1979) Generic assignments, strains histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *Journal of General Microbiology* 111, 1-61.

- Rossler, K. (1986) Chemical modification of insulators by ion-implantation, fundamental mechanisms and astrophysical implications. *Radiation Effects and Defects in Solids*, 99(1-4), 21-70.
- Salem, C., Hoang, S., Issautier, K., Maksimovic, M., Perche, C. (2003) Wind-Ulysses in-situ thermal noise measurements of solar wind electron density and core temperature at solar maximum and minimum. *Heliosphere at Solar Maximum*, 32(4), 491-496.
- Sarrias, J.A., Valero, M., Salmeron, M.C. (2003) Elimination of *Bacillus cereus* contamination in raw rice by electron beam irradiation. *Food Microbiology*, 20(3), 327-332.
- Shao, C.L. and Yu, Z.L. (1997a) Dose effects of N⁺ ion beam irradiation-induced damage to 5'-AMP and its components. *Radiation Physics and Chemistry*, 49(3), 337-345.
- Shao, C.L. and Yu, Z.L. (1997b) Mass deposition in tyrosine irradiated by a N⁺ ion. *Radiation Physics and Chemistry*, 50(6), 595-599.
- Smolko, E.E. and Lombardo, J.H. (2005) Virus inactivation studies using ion beams, electron and gamma irradiation. *Nuclear Instruments & Methods in Physics Research Section B-Beam Interactions with Materials and Atoms*, 236, 249-253.
- Song, H.P., Kim, B., Jung, S., Choe, J.H., Yun, H.J., Kim, Y.J., Jo, C. (2009) Effect of gamma and electron beam irradiation on the survival of pathogens inoculated into salted, seasoned, and fermented oyster. *Lwt-Food Science and Technology*, 42(8), 1320-1324.
- Song, D., Wu, L., Wu, L., Yu, Z. (2001) Dose effects of ion beam exposure on *Deinococcus radiodurans*: survival and dose response. *Plasma Science and Technology*, 3(1), 665-672.
- Stenn, K.S. and Bahr, G.F. (1970) A study of mass loss and product formation after irradiation of some dry amino acids, peptides, polypeptides and proteins with an electron beam of low current density. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 18(8), 574-&.
- Strazzulla, G., Brucato, J. R., Cimino, G., Leto, G., Spinella, F. (1995) Interaction of solar wind ions with planetary surfaces. *Advances in space research*, 15(10), 13-17.
- Su, Y., Li, Y., Xin, H. (1997) Ion implantation depth in embryos of mung bean. *Nuclear Technology (Chinese)* 20:718- 721.
- Thiel, K., Sassmannshausen, U., Kulzer, H., Herr, W. (1982) Ion sputtering of minerals and glasses - a 1st step to the simulation of solar-wind erosion. *Radiation Effects and Defects in Solids*, 64(1-4), 83-88.

- Tobleman, W.T. and Cole, A. (1974) Repair of sublethal damage and oxygen enhancement ratio for low-voltage electron-beam irradiation. *Radiation Research*, 60(2), 355-360.
- U.S.General Accounting Office. (2000) Food Irradiation: available research indicates that benefits outweigh risks. GAO/RCED-00-217.Washington, DC. US General Accounting Office.
- Van Calenberg, S., Van Cleemput, O., Mondelaers, W., Huyghebaert, A. (1999) Comparison of the effect of X-ray and electron beam irradiation on the microbiological quality of foodstuffs. *Food Science and Technology-Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 32(6), 372-376.
- Veselovsky, I.S., Persiantsev, I.G., Ryazanov, A.Y., Shugai, Y.S. (2006a) One-parameter representation of the daily averaged solar-wind velocity. *Solar System Research*, 40(5), 427-431.
- Veselovsky, I.S., Persiantsev, I.G., Shugai, Y.S. (2006b) Forecast of the solar wind velocity and the interplanetary magnetic field radial component polarity at the phase of decay of solar cycle 23. *Geomagnetism and Aeronomy*, 46(6), 701-707.
- Veselovsky. Solar wind and solar energetic particles: origins and effects. (2006) *Solar Activity and its Magnetic Origin Proceedings IAU Symposium*, 233, 489-494.
- Vickery, A.M. and Melosh, H.J. (1987) The large crater origin of SNC meteorites. *Science*, 237(4816), 738-743.
- Waje, C.K., Jun, S.Y., Lee, Y.X., Kim, B.N., Han, D.H., Jo, C., Kwon, J.H. (2009) Microbial quality assessment and pathogen inactivation by electron beam and gamma irradiation of commercial seed sprouts. *Food Control*, 20(3), 200-204.
- Watanabe, T. (2000) Best use of high-voltage, high-powered electron beams: a new approach to contract irradiation services. *Radiation Physics and Chemistry*, 57(3-6), 635-639.
- Weber, P. and Greenberg, J.M. (1985) Can spores survive in interstellar space? *Nature*, 316(6027), 403-407.
- Wells, D.A. (1929) Action of low velocity electrons on micro-organisms. *Nature*, 124, 983-984.
- Wilson, D. and Pollard, E. (1958) Radiation studies on the infective property of newcastle disease virus. *Radiation Research*, 8(2), 131-141.
- Wilson, W.E., Miller, J.H., Lynch, D.J., Lewis, R.R., Batdorf, M. (2004) Analysis of low-energy electron track structure in liquid water. *Radiation Research*, 161(5), 591-596.

- Yang, Z., Gan, B., Lin, J. (1991) The Mutagenic effect on plant growth by ion implantation on wheat. Anhui Agriculture University Acta 18:282- 288.
- Yang, J. B., Wu, L.J., Wu, J.D., Wu, Y. J., Yu, Z. L., XU, Z. H. (1995) Production of transgenic rice plants via low-energy ion beam-mediated DNA delivery into mature embryos. Chinese Science Bulletin, 40(5), 427-431.
- Yu, Z.L. Introduction to ion beam technology. (1998) Hefei: Anhui Science and Technology Publishing Company.
- Yu, Z.L. (2000) Ion beam application in genetic modification. IEEE Transactions on Plasma Science, 28(1), 128-132.
- Yu, Z.L. Studying of ion implantation effect on biology in China. (1993) China Nuclear Scienc and Technology Report (Chinese), CNIC-00746, China Nuclear Information Centre.
- Zermenno, A. and Cole, A. (1969) Radiosensitive structure of metaphase and interphase hamster cells as studies by low-voltage electron beam irradiation. Radiation Research, 39(3), 669.

Figures

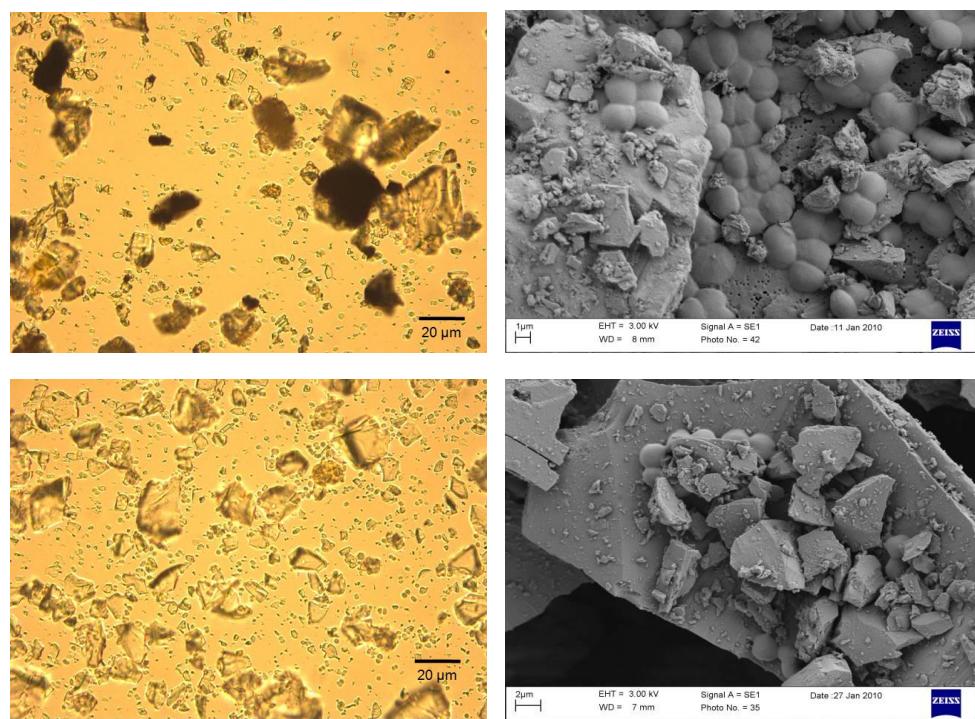


Figure 1. Optical micrographs (left) and electron micrographs (right) showing Deinococcal cells ($10^8 \cdot \text{ml}^{-1}$) mixed with basalt (top) and sandstone (bottom) grains ($1.25 \text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$).

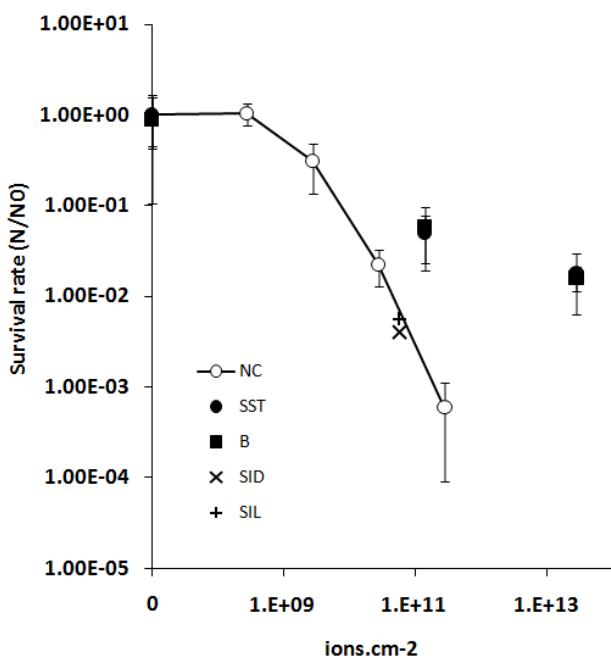


Figure 2. Survival curves of *D. radiodurans* to irradiation with a proton beam at 200keV. NC = naked cells, SST = cells mixed with grains of sandstone, B = cells mixed with grains of basalt, SID = cells mixed with crystalline forsterite, SIL = cells mixed with amorphous forsterite.

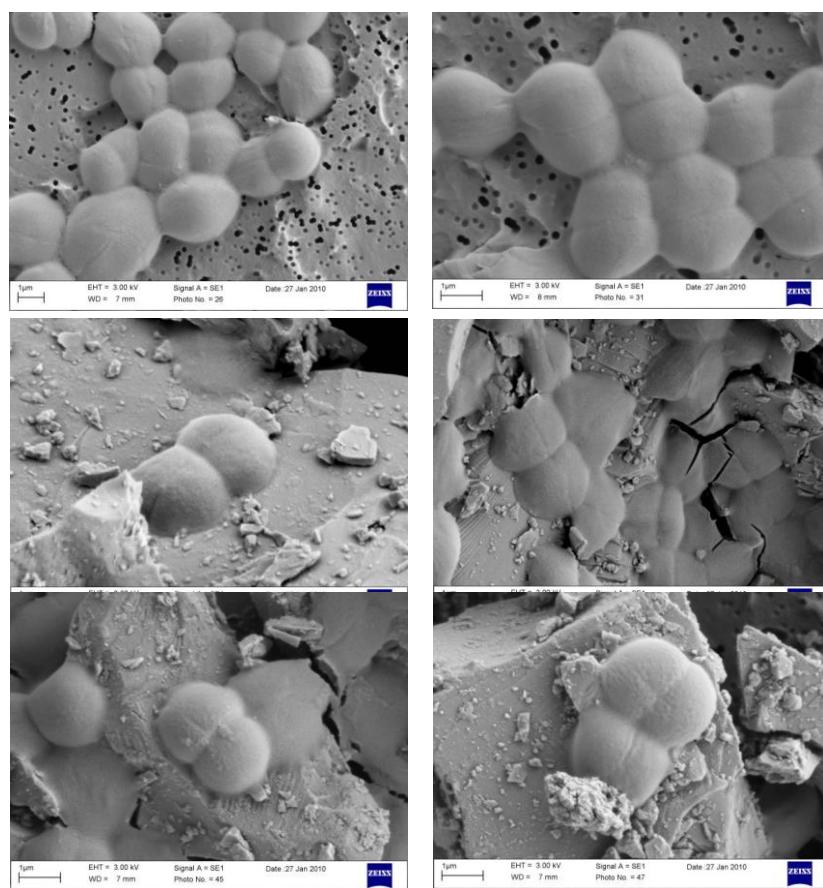


Figure 3. Images from electron microscopy (SEM) of cells of *D. radiodurans* irradiated (right) or not (left) with 200keV proton beam. Naked cells (top) and cells mixed with grains of sandstone (middle) and basalt (bottom) are shown.

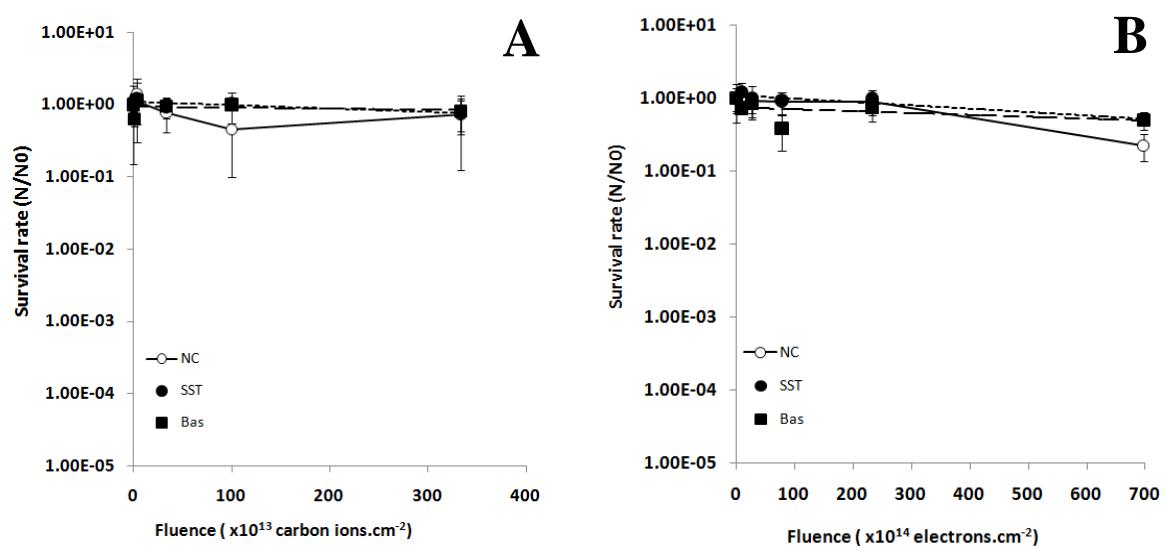


Figure 4. Survival curves of *D. radiodurans* in the absence (NC) or presence of grains of sandstone or basalt (B or SST) irradiated with 4keV carbon ions (A) and 2keV electrons (right).

Table 1. Measurements and calculations of ranges for different electron energies applied to some materials, including biological systems and water.

Energy (keV)	Track (μm)	Material	Reference
0.9	0.230	<i>Bacillus subtilis</i> spores	Hutchinson, 1955
3.5	0.400	<i>Bacillus subtilis</i> spores	Hutchinson, 1955
2.0	0.100	T2 bacteriophage	Cole and Langley, 1963
2.0	0.192	Plastic (colloidon)	Cole, 1969
2.0	0.250	Hamster cells	Zermenio and Cole, 1969
10.0	2.400	Water	Tobleman and Cole, 1974
2.0	0.100	Water	Laverne and Mozumder, 1983
2.0	0.200	Water	Meesungnoen <i>et al.</i> , 2002
2.0	0.157	Water	Wilson <i>et al.</i> , 2004
1.0	0.066	Water	Wilson <i>et al.</i> , 2004

Table's caption

Table 1. Measurements and calculations of ranges for different electron energies applied to some materials, including biological systems and water.

APÊNDICE 3 – Artigo 2. Laboratory Simulation of interplanetary ultraviolet radiation and its effects on *Deinococcus radiodurans*



Laboratory simulation of interplanetary ultraviolet radiation (broad spectrum) and its effects on *Deinococcus radiodurans*

Ivan Gláucio Paulino-Lima ^{a,*}, Sérgio Pilling ^{b,1}, Eduardo Janot-Pacheco ^c, Arnaldo Naves de Brito ^{b,2}, João Alexandre Ribeiro Gonçalves Barbosa ^{b,3}, Alvaro Costa Leitão ^a, Claudia de Alencar Santos Lage ^a

^a Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Avenida Carlos Chagas Filho, 373, Cidade Universitária, CEP 21941-902 Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^b Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, Rua Giuseppe Máximo Solfaro, 10000, Pólo II de Alta Tecnologia de Campinas, CEP 13083-970 Campinas, SP, Brazil

^c Instituto de Astronomia, Geofísica e Ciências Atmosféricas, Rua do Matão, 1226, Cidade Universitária, CEP 05508-900 São Paulo, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 December 2009

Received in revised form

11 April 2010

Accepted 13 April 2010

Available online 18 April 2010

Keywords:

Panspermia

Micro-shielding

Vacuum ultraviolet

Extremophile microorganisms

ABSTRACT

The radiation-resistant bacterium *Deinococcus radiodurans* was exposed to a simulated interplanetary UV radiation at the Brazilian Synchrotron Light Laboratory (LNLS). Bacterial samples were irradiated on different substrates to investigate the influence of surface relief on cell survival. The effects of cell multi-layers were also investigated. The ratio of viable microorganisms remained virtually the same (average 2%) for integrated doses from 1.2 to 12 kJ m⁻², corresponding to 16 h of irradiation at most. The asymptotic profiles of the curves, clearly connected to a shielding effect provided by multi-layering cells on a cavitary substrate (carbon tape), means that the inactivation rate may not change significantly along extended periods of exposure to radiation. Such high survival rates reinforce the possibility of an interplanetary transfer of viable microbes.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The hypothesis predicting that living organisms may stand viable and be transferred from one planet to another by means of natural processes (*panspermia*) is still a matter of debate. It is currently thought to be a process by which any living form, most probably microbial in nature, survives the following three steps: (i) the escape step, *i.e.* ejection of contaminated planetary material towards space, normally caused by a large impact on the parent planet; (ii) the journey in space through time scales comparable with those experienced by the Martian meteorites (estimated as 1–15 million years); and (iii) the landing process in a manner to afford non-destructive deposition of the biological material on a recipient planet (Horneck et al., 2003).

Escape and re-entry steps of this process are critical due to the high amounts of energy to which organisms may be exposed within a short period of time so recent studies have focused on

these steps (Burchell et al., 2004; Cockell et al., 2007; De la Torre et al., 2009; Fajardo-Cavazos et al., 2009; Horneck et al., 2008; Möller et al., 2008; Stöffler et al., 2007). Various types of microorganisms, such as bacterial or fungal spores and viruses, as well as biomolecules, such as DNA, amino acids and liposomes, have been exposed to selected and combined space conditions outside Earth's magnetic field (Apollo 16) or in low Earth orbit onboard missions Spacelab 1, Spacelab D2, ERA on EURECA, LDEF, BIOPAN on FOTON and EXPOSE on the International Space Station (Olsson-Francis and Cockell, 2010). Extraterrestrial parameters, such as high vacuum, intense solar ultraviolet radiation, different components of the cosmic radiation field and temperature extremes affected the genetic stability of the organisms in space, leading to increased mutation rates, DNA damage and inactivation (Horneck, 1999). Extraterrestrial solar ultraviolet (UV) radiation was shown to be the most lethal factor to naked samples. When shielded against the influx of solar UV, spores of *Bacillus subtilis* survived for more than 5 years in space (Horneck et al., 1994).

Recently, Horneck et al. (2008) have tested the first step of the panspermia hypothesis by exposing spores of *B. subtilis*, cells of *Chroococcidiopsis*, and thalli and ascocarps of the lichen *Xanthoria elegans* to shock pressures in the range 5 to ~40 GPa. Their results support the hypothesis that biological material could be successfully ejected from planets in a way that seeding of early Earth might have ensued.

Saffary et al. (2002) exposed cells of *Bacillus* sp. and *Deinococcus radiodurans*, one of the most radiation-resistant living

* Corresponding author. Tel.: +55 2125626577; fax: +55 2122808193.

E-mail address: igplima@biof.ufrj.br (I.G. Paulino-Lima).

¹ Present address: Universidade do Vale do Paraíba, Avenida Shishima Hifumi, 2911, Urbanova, CEP 12244-000 São José dos Campos, SP, Brazil.

² Present address: Instituto de Física, Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Asa Norte, CEP 70919-970 Brasília, DF, Brazil.

³ Present address: Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília, SGAN 916, Módulo C, Av. W5 Norte, Asa Norte, CEP 70790-160 Brasília, DF, Brazil.

beings known to exist on Earth, to extreme ultraviolet (EUV) radiation ($\lambda=30.4$ nm) during a rocket flight. The exposition to EUV radiation decreased the survival of both organisms by an extra order of magnitude below their desiccation tolerance. Since this type of radiation strongly interacts with biological targets, the authors attributed such inactivation to rely on superficial cellular damages other than DNA, most likely on membrane and surface proteins. On the other side, lichens were capable to fully restore their colonization ability and photosynthetic activity after an uninterrupted 16-day exposure to real outer space conditions in the Biopan-5 facility (Sancho et al., 2007).

In view of the surprisingly positive results reported above in support to the concept of *panspermia*, the critical re-entry step of the process was solely addressed by the results of the ESA's STONE experiment (Cockell et al., 2007). These authors demonstrated that the endolithic photosynthetic organism *Chroococcidiopsis* sp. inoculated in a gneissic rock sample did not resist the speedy re-entrance into the Earth atmosphere since extreme heating reached down to ~ 5 mm depth of the rock.

Shielding from deleterious ionizing radiation has been expected to provide viability of viruses, bacterial and fungal dried spores, thus alleviating radiation-imposed constraints to any putative interplanetary transfer step. Calculations by Mileikowsky et al. (2000) have predicted that microorganisms such as *D. radiodurans* and *Bacillus* sp. should be shielded against space radiation inside rocks of the order of 0.33 m, to keep a viable minimal population during time ranges suitable to afford Mars-Earth interplanetary travel (~ 1 million years). Those authors also consider that more than 1 billion fragments with temperatures below 100 °C were ejected from Mars and landed on Earth within the last 4 billion years. Early Earth has witnessed the infall of about 10-fold more extraterrestrial matter during the “heavy bombardment” period. Indeed the ~ 40 Martian meteorites discovered so far on Earth represent a tiny fraction

of those imported from Mars during Earth's history (Fritz et al., 2005).

The discovery of Martian meteorites on Earth (Dreibus and Wanke, 1985) implies that rock fragments can escape from planetary bodies and that interplanetary transfer of matter is possible to occur in the solar system (Okeefe and Ahrens, 1986). At least five out of about 40 known Martian meteorites, might not have experienced sterilizing temperatures during ejection from Mars and re-entry into the Earth's atmosphere (Shuster and Weiss, 2005). However, it is still an open question whether living beings could be transported between planets by means of such fragments, notwithstanding the harsh in-between environment (Table 1). It is tempting to think of the biological features of microbial extremophilic species (Rothschild and Mancinelli, 2001) as those necessary to cope with extraordinary environments as those found in the interplanetary space.

The present study has focused on the harsh environment that could challenge an extremophile microbe during the long time of an interplanetary migration step of *panspermia*. Survival of *D. radiodurans* to conditions similar to those present in the interplanetary space was investigated in an experimental simulation apparatus. It includes a synchrotron beamline equipped with a toroidal grating monochromator (TGM) present at the Brazilian Synchrotron (Cavasso Filho et al., 2007) and a vacuum chamber. The TGM beam spectrum comprises the vacuum-ultraviolet (VUV) down to the infrared (IR) region ranging between 0.1 and 21.6 eV (Fig. 2). Additionally, exposure to a hydrogen lamp emitting a strong Lyman-alpha photon flux (Ly- α , 10.2 eV, $\lambda=121.6$ nm) was performed to evaluate the impact of this Sun's intense VUV emission on cell viability. Replicate experiments were performed to test the viability of dehydrated non-sporeforming *D. radiodurans* vegetative cells following several doses of radiation. Comparative irradiances of TGM beamline and those at Earth and Mars orbits are summarized in Table 2.

Table 1

Physical conditions prevailing in the interplanetary space and at low Earth orbit in comparison to the conditions cast in the simulated experimental setup (modified from Nicholson et al., 2000).

Parameter	Interplanetary space	Low Earth orbit (≤ 500 km)	TGM	Hydrogen lamp
Pressure (Pa)	10^{-14}	$10^{-6}-10^{-4}$ ^a	$10^{-5}-10^{-4}$	60
Irradiance (W m^{-2})	\sim ^b	1360	0.22	16.34 ^c
Spectral range (nm)	Continuum	Continuum	57.6–12,900	121.6
Temperature (K)	> 4 ^b	Wide range ^b	~ 295	~ 295

^a Values in Earth orbit depend on outgassing of the spacecraft.

^b Values differ depending on orientation and distance to the Sun.

^c Based on direct measurements of the narrow peak emission (121.6 nm) using photodiodes.

Table 2

Solar irradiances at Earth and Mars orbits in comparison to the TGM beamline.

Spectral ranges (nm)	Earth solar constant (W m^{-2}) ^a	Mars solar constant (W m^{-2}) ^a	TGM (W m^{-2}) ^b
Vacuum UV (57.6–200)	0.014	0.006	0.2000
UVC (200–280)	7.390	3.180	0.0098
UVB (280–315)	19.490	8.380	0.0022
UVA (315–400)	89.280	38.390	0.0031
Total UV (200–400)	116.16	49.950	0.0150
VIS (400–700)	520.28	223.73	0.0028
NIR (700–1100)	448.74	141.90	0.0007
MIR (1100–3000)	259.05	162.48	0.0006
Total IR (700–2500)	707.79	304.38	0.0014
Total irradiance (57.6–2500)	1344.2	578.06	0.2200

^a Based on Schuerger et al. (2003).

^b Based on direct measurements at TGM beamline using photodiodes.

2. Methods

2.1. Sample preparation

Cultures of *D. radiodurans* R1 wild type and a *recA670*-deficient strain were obtained at Instituto de Radioproteção e Dosimetria, Rio de Janeiro, Brazil. They were cultivated in TGY broth—1.0% tryptone, 0.6% yeast extract, 0.2% glucose (Anderson et al., 1956) with shaking at 200 rpm (Innova 4080, New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA), at 32 °C for 10 h, or until reach the early stationary phase. After this period, the optical density at $\lambda=600$ nm (OD_{600}) of the culture was spectrophotometrically measured and an aliquot was taken for direct cell counting under the microscope.

2.2. Synchrotron irradiation at the Toroidal grating monochromator (TGM) beamline

Thirty-six circular carbon tape (Shinto Paint Co) with 5 mm in diameter, covered or not by a polycarbonate filter smooth surface were distributed on screws upraising from a hexagonal copper-made sample holder core. After the estimation of the cell concentration using a microscope, screws were loaded with 1 μ L of the fresh culture each (up to 10^6 cells per sample in a monolayer). Observation of the screws under scanning electron microscopy confirmed that the optimized concentration of cells resulted in a single layer (Fig. 1a). However, cells deposited on rough surfaces could be multi-layered (Fig. 1b) or could be shielded by surrounding matrix formed by organic material of the culture medium (Fig. 1c). The sample holder was placed inside a –80 °C freezer for at least 30 min, following immediate exposure

to low vacuum (600 Pa) in a lyophilizer for at least 5 h. After this period, the sample holder was aseptically transported to the experimental hall of the LNLS where it was placed inside the irradiation chamber at the TGM beamline workstation. The available experimental assembly included a differential pumping system that allowed the use of a neon filter to attenuate the X-ray portion of the synchrotron radiation spectrum (Fig. 2). The irradiation experiment was designed to allow a complete triplicate assay in a single irradiation run, using a rotary manipulator device to change sample positions. Measurements of the photon flux were taken using a photodiode and a golden grid to check for electrical current variations in real-time. The chamber pressure was kept between 10^{-4} and 10^{-5} Pa during all experimental assays. Survival curves were plotted for six different doses of irradiation plus the non-irradiated control. Samples were exposed to 0, 1, 10, 50, 100, 500 and 1000 min of UV plus VUV (wavelength ranging between 57.6 and 400 nm), which resulted in integrated doses of (kJ m^{-2}) 0, 0.012, 0.12, 0.6, 1.2, 6.0 and 12.0, respectively. All irradiation assays were performed at room temperature. Cells were reconstituted in TGY broth and the survival fraction was determined according to their colony-forming ability. The percentage values for survival have been calculated as follows: $(N_t/N_0) \times 100$, where: N_t is the number of colonies per aliquot after the exposure time t , N_0 is the number of colonies per aliquot of the non-irradiated culture. Detachment of cells from the substrates after extreme dehydration, which also reflects some loss of viability due to lyophilization and vacuum exposure (between 20% and 50%) and were computed while scoring non-irradiated controls (N_0). For each irradiation experiment, N_0 was fixed as the mean value of three replicates after lyophilization, vacuum exposure and cell recovery.

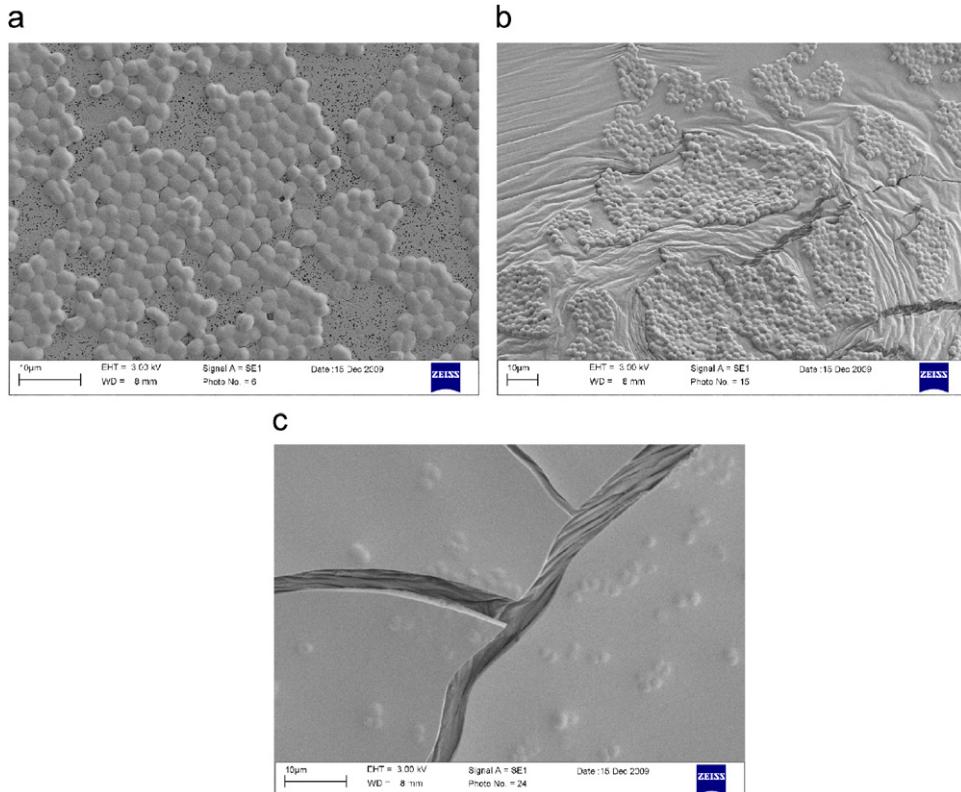


Fig. 1. Cells deposited on substrates showing three different situations: (a) cell monolayer formed over Millipore filters; (b) carbon tape surface with typical cell clumps; (c) cells embedded in a complex matrix of nutrients formed after extreme dehydration.

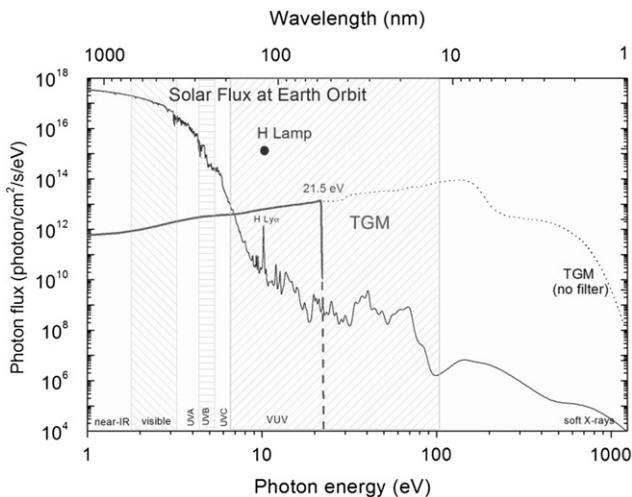


Fig. 2. TGM beamline spectrum with the harmonic gas cutting-off energies above 21.6 eV. For comparison, the dot named "H" refers to the intensity of the Ly- α line ($\lambda=121.6$ nm) emitted from the hydrogen lamp used in this study.

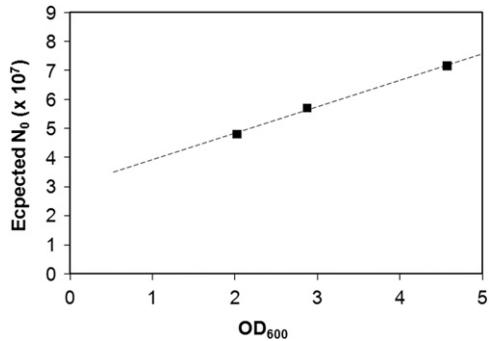


Fig. 3. Calibration curve plotting the initial optical density and viability of cell powder after sample rehydration.

2.3. Vacuum ultraviolet (VUV) inactivation assay using the hydrogen (H) lamp

Early stationary phase cultures of *D. radiodurans* were filtered on 25-mm-diameter and porosity of 0.45 μm , polycarbonate (smooth) surface. Observation of the filters under the microscope confirmed that 10^8 cells per sample resulted in a single layer of cells. Filters were fixed onto a metal sample holder, and the control samples were exposed to the same conditions, except for the irradiation. The sample holder was introduced inside the vacuum chamber at a distance of 8.0 cm away from the light source. The photon flux of the lamp (Ophthos Instruments, Inc.), measured using a photodiode, was $10^{15} \text{ cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (Fig. 2), corresponding to an irradiance of 16.34 W m^{-2} , for an internal atmosphere composed by 90% argon and 10% hydrogen at 60 Pa ($I/I_0=99.86\%$). Taking into account that biological effects of radiation are cumulative, several doses were given by increasing exposure times. To irradiate cells on the carbon tape (rough) surface, early stationary phase cultures ($\text{OD}_{600} > 1.0$) were lyophilized and the resulting powder was spread onto circular (25 mm in diameter) carbon tape, resulting in cell multi-layers. Survival curves were plotted for seven different doses of irradiation plus the non-irradiated control. Samples were exposed at room temperature to 0, 1, 5, 13, 51, 105, 227 and 771 min of Lyman-alpha radiation (10.2 eV), which resulted in doses of (kJ m^{-2}) 0, 1, 5, 12.5, 50, 103, 223 and 756, respectively. After

the irradiation treatments, cells were reconstituted in TGY broth and the OD_{600} was measured. As the amount of powder varied between the samples, and taking into account that optical density reflects the number of cells, several OD_{600} measurements were performed for cell suspensions differing in turbidity. A calibration curve was plotted correlating the initial OD_{600} for non-irradiated samples to cell viability after recovery in medium (Fig. 3). It made possible to estimate the expected N_0 for different reconstituted powders differing in turbidity without knowing the initial number of cells. After calculating the expected N_0 for all samples, the percentage values of survival have been determined according to their colony-forming ability, as described for the synchrotron irradiation experiments.

3. Results

3.1. Synchrotron irradiation

The first experimental approach consisted in spreading dehydrated cells (10^6 cells per sample) on two different surfaces and exposing them to several doses of synchrotron radiation in order to examine the influence of the substrate on cell survival. The average roughness of the two surfaces was measured in a profilometer as 7 μm for a rough carbon tape and 0.7 μm for a smooth Millipore filter. An inactivation curve entailing a two-component behavior was observed, with an initial exponential decrease followed by an asymptotic trend when cells were deposited on the rough surface (Fig. 4). The ratio of viable microorganisms remained virtually the same (average 2%) for integrated doses from 1.2 to 12 kJ m^{-2} , consisting of up to 16 h of uninterrupted irradiation. The asymptotic profile of the curve means that the inactivation rate may not change significantly along extended periods of exposure to radiation.

If the rough surface provided shielding to viable cells against radiation, then it should be also effective in shadowing the extremely radiation sensitive, *recA670*-deficient strain of *D. radiodurans*. Indeed similar to what was observed for the wild-type strain, an average 1% cells of the deficient strain was seen to survive on the rough surface after exposition to up to 1.4 kJ m^{-2}

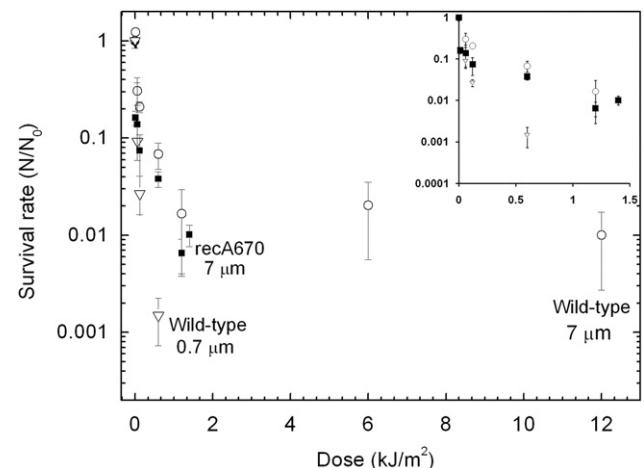


Fig. 4. Survival curves of *D. radiodurans* deposited on surfaces with two different levels of roughness (0.7 and $\sim 7 \mu\text{m}$) following several integrated doses of synchrotron radiation. The white circles represents survival of the wild type strain on a rough carbon tape; black squares, the same for the DNA repair deficient *recA670* strain of *D. radiodurans* and white triangles, wild type strain on the smooth surface. The error bars represent one standard deviation determined for each triplicate assay. Inset shows a better resolution for the points corresponding to the lower doses.

of synchrotron radiation (Fig. 4). However, these conclusions must be drawn only for the exponential phase of the inactivation curve of *recA670* (see detail in Fig. 4) because it was not exposed to higher doses due to beamtime constraints. When placed on the smooth surface this extremely radiation sensitive strain was annihilated by any tested dose.

The 7- μm cavities of the rough surface could cause layers of bacterial cells to pile, with superficial dead cells providing shielding to underneath ones which remained non-irradiated (Fig. 1b). To have such possibility checked, different cell densities were prepared by depositing 10^4 – 10^7 cells per sample on the carbon tape and irradiated at the same integrated dose of 0.6 kJ m^{-2} each. A clear enhancement of the survival rate was seen when concentrations above 10^6 cells per sample were irradiated (Fig. 5). Thus dead cell layers near the surface seem to be capable to shield underneath cells against UV and VUV photons, with fluxes comparable to that found at Earth orbit (Fig. 2).

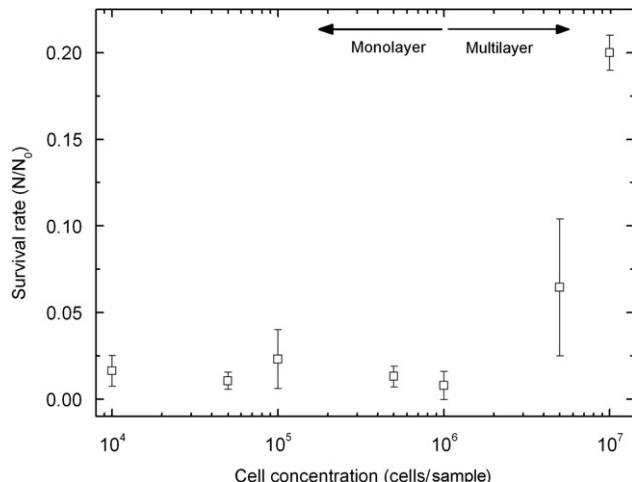


Fig. 5. Influence of cell concentration on the survival rate after 0.6 kJ m^{-2} exposure to VUV-UV radiation. Samples consisting of 10^4 , 5×10^4 , 10^5 , 5×10^5 , 10^6 , 5×10^6 and 10^7 cells μL^{-1} per exposed surface have been irradiated with synchrotron light. Note that piling up multiple layers (above 10^6) cause a sharp increase in cell survival. The error bars represent one standard deviation determined for each triplicate assay.

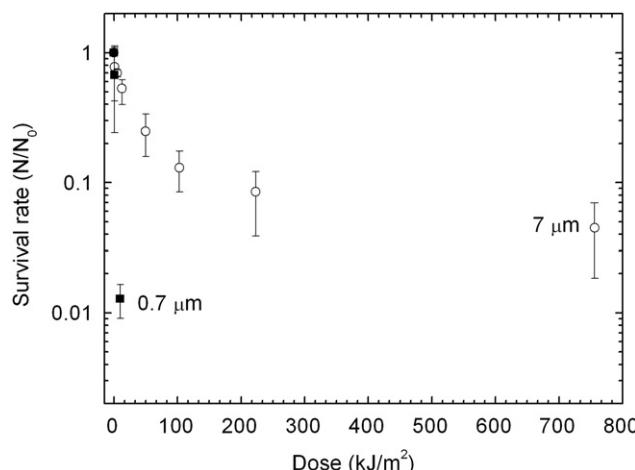


Fig. 6. Survival curves of wild-type *D. radiodurans* retrieved from surfaces with average cavities of $0.7 \mu\text{m}$ (smooth Millipore filter) or $7 \mu\text{m}$ (rough carbon tape) after irradiation with a Ly- α -emitting hydrogen lamp ($\lambda = 121.6 \text{ nm}$). The error bars represent one standard deviation determined for each triplicate assay.

3.2. Irradiation with hydrogen lamp (H lamp)

If arrival of bioactive material to any solar system's planet might have ever been possible, particularly relevant to the *panspermia* hypothesis is the resistance to the intense VUV Ly- α emission line by the Sun. A Ly- α emitting H lamp of high photon flux at $\lambda = 121.6 \text{ nm}$ was used to determine cell survival. One-hundred million (10^8) cells were used in each assay. Even exposed to radiation in multi-layers, doses greater than 50 kJ m^{-2} reduced the viable cell population to values below the detection limit of the method (near sterilization) when placed on the smooth surface. On the other hand, the similar two-component behavior was otherwise observed for inactivation by the TGM source was seen in the case of H lamp if cells were deposited on the rough surface (Fig. 6).

4. Discussion

We report the survival of the non-sporeforming radiation-resistant bacteria *Deinococcus radiodurans* to synchrotron radiation mimicking the solar spectrum if trapped into a porous carbon tape and shielded by cell multi-layers surrounded by organic matrix material (Fig. 4). *D. radiodurans* has already been tested under several laboratory conditions and also assessed in space conditions when the Exobiology and Radiation Assembly (ERA) flew on the ESA's Eureca mission. Dose et al. (1995a) reported that although survival could not be scored due to storage conditions before and after the mission, the amount of DNA double strand breaks (DSB) per chromosome could be determined. If exposed to solar light ($> 170 \text{ nm}$; $4 \times 10^8 \text{ J m}^{-2}$ with respect to the range from 175 to 340 nm) in layers of about 1.5 mm, only the upper tenths on top 1 mm layer were affected, where more than 12 DSB were found in comparison to 8 DSB for the dark control. Control experiments have shown that *D. radiodurans* survives relatively well (15–35% survival rates, depending on the strain) if kept in dry argon for 17 months, but survival in humid argon (above 20% relative humidity) is less than 0.01% when exposed for the same period of time. Survival can be improved by up to 100% if the cells are dried in the presence of organics (tryptone-yeast extract medium).

Other microorganisms have also been tested in space. According to Dose et al. (1995b), monolayer of spores, fungal conidia or vegetative cells (*D. radiodurans*) are extremely sensitive to space conditions (vacuum and solar radiation). Multi-layers or macroscopic clusters, however, may resist for months or years, even if exposed to full solar light. Although the top cell layers become inactivated, they kept protecting interior cells from UV damage and also partially from dehydration.

In the experiments reported in this paper, *D. radiodurans* samples were exposed to vacuum and subjected to lyophilization, which resembles a fast dehydration process that biological material might undergo if ejected into space (Horneck et al., 2003). Early-stationary phase cells were spread out on the irradiation surfaces and lyophilized within nutrient liquid media (Fig. 1c). Microorganisms are not usually in logarithmic growth in the environment, and are often immersed in organic matter. Sugars and polyalcohols are known to help stabilize the structure of cellular macromolecules during vacuum-induced dehydration (Horneck et al., 2003), which could have contributed to the high survival rates observed in our experiments. In fact, the lyophilization process may lead to physical alterations similar to water loss during a process of mass ejection into space. Under such conditions, metabolizing cells are unlike to occur in the space environment and cellular repair mechanisms would not take place unless they re-enter a watery environment.

Comparing effects of the integrated doses from the two radiation sources, 1% cell survival was attained after exposition to 2 kJ m^{-2} of synchrotron radiation or 1000 kJ m^{-2} monochromatic Ly- α emission. Because different biomolecules have different absorption bands, it is expected that the wider TGM emission spectra will impact more cell targets and viability. Moreover, Ly- α irradiance from the source used here was a thousand times stronger than present solar Ly- α at Earth orbit, which is $0.01 \text{ J m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (Floyd et al., 2004). Yet cells were shown to be shielded even from such acute irradiation. This result suggests that micro-sized particles could prevent extremophilic microorganism from accumulating UV radiation damage. In agreement with our results, Osman et al. (2008) observed significant survival of spore-forming bacteria after irradiation with full spectrum Martian UV irradiation if shielded by micro soil particles ($< 60 \mu\text{m}$) from the Atacama Desert. In addition, Pogoda de la Vega et al. (2007) have found that even nano-particles can afford survival of *D. radiodurans* upon UV irradiation under simulated Martian conditions.

In our experiments the fluxes of vacuum ultraviolet were much higher than those found in the interplanetary environment. Considering that dehydrated cells are metabolically inactive, dissimilar, unnatural dose rates are not expected to impact survival. In respect to this, fungal cells of *Neurospora* sp. irradiated in liquid culture at room temperature displayed 4-fold many mutants after acute UV in comparison to the same dose given at chronic rates (Stadler and Macleod, 1984). Interestingly, chronic UV at 0° incidence on the sample resulted in as many mutations as acute UV (Stadler and Macleod, 1984). Active repair during liquid holding at 22°C was thought to prevent mutations to appear. For non-metabolizing cells it is therefore not expected that differences in mutation or survival rates may occur after the same total dose given either acute or chronically. Unfortunately, there is lack of experimental data about dose-rate effects on non-metabolizing cells.

As particular targets concerning recovery of genetic material after radiation, proteins belonging to DNA repair machinery were proven to critically affect cellular sensitivity following physical and chemical DNA damage (Daly et al., 2007). This is particularly true for longer UV wavelengths, which are known to overproduce free radicals by photoionization and photodissociation of water, the cell's main component. This situation was minimized in the present experimental setup with cells previously dehydrated and maintained in such state along the procedures allowing most proteins to be kept potentially active.

Considering that intact cells are exposed, Ito et al. (1980) remark that the penetrability of VUV radiation appears to be the key factor in determining the distribution pattern of damages. Accordingly, Munakata and Ito (1979) have found that sufficient synchrotron broad-band VUV light reaches *Bacillus* spores genetic material to induce mutation and killing. Nucleic acids were shown to be far-UV chromophores in *Streptomyces* conidia by Jagger et al. (1967). Altogether those data agree with physical estimates of the penetration depth of the VUV light (Wilkinson and Johnston, 1950; Watanabe and Zelikoff, 1953; Sowers et al., 1972), although no VUV chromophore could be identified so far.

The occurring extreme low temperatures and dehydration in the interplanetary space are conceivably protective regarding the formation of free radicals from water molecules. Noteworthy, microorganisms such as *D. radiodurans* and *B. subtilis* were shown to better survive UV if irradiated under extreme low temperatures relatively to the survival rates following irradiation under room temperature (Weber and Greenberg, 1985; Ashwood et al., 1968). Results of Weber and Greenberg (1985) showing increased UV-VUV survival of *B. subtilis* spores in low temperature and vacuum lend support to these conclusions.

The ability of extremophile microorganisms to thrive in extreme environmental conditions, such as high and low temperatures, desiccation, radiation, pressure and pH strengthens the probability that they could as well survive transport through the interplanetary (Horneck et al., 2008) or even the interstellar medium (Valtonen et al., 2009).

Extra-solar dust particles have been detected in the solar system by space probes (Frisch et al., 1999) and larger extra-solar meteoroids ($5\text{--}35 \mu\text{m}$) have most likely been detected in the upper Earth atmosphere by meteor-tracking radar facilities (Baggaley et al., 1994). Because of the small dimensions of these meteoroids, the bystander effects of high-energy charged (HZE) particles caused by the production of secondary electrons, shock waves or thermophysical events would probably be far less than those occurring in larger meteoroids. Therefore, hypothetical microbes within them would be mostly inactivated by direct hits. However, because of their low flux (e.g., 1 Fe ion per μm^2 per $10^5\text{--}10^6$ years), it is predictable that damages may be localized to superficial layers, and few microorganisms would suffer hits within time scales of an interplanetary journey (Horneck et al., 2010).

Theoretical models of temperature variation alongside different altitudes above Earth atmosphere indicate that $10 \mu\text{m}$ diameter particles can withstand rapid deceleration without significant ablation (Coulson, 2004). In fact, Duprat et al. (2007) recovered highly friable micrometeorites from surface snow layers near the French-Italian station CONCORDIA in Antarctica, suggesting that those particles have experienced non-sterilizing heating upon atmospheric entry. Moreover, experimental evidence shows that small particles containing bacteria can survive the temperature regimens imposed during entry into Earth's lower atmosphere (Coulson, 2004).

The mechanisms by which microorganisms might infect interstellar dust particles are unknown. However, Napier (2004) suggests that boulders ejected putative life-bearing planets in the galaxy may be destroyed through erosion and fragmentation by impacting zodiacal light dust particles. Within less than a few thousand years, the fragmentation process leads to meteoroids of micrometer size that are ejected from the planetary system by radiation pressure. He estimates that about (10^{14}) life-bearing particles originating from the Earth leave the Solar system per year. To avoid the long travel times to other planetary systems, Napier (2004) suggests that contamination in fact occurs when the Sun passes through molecular clouds in the galaxy. Proto-planetary-forming systems within them will thus receive a certain number of Earth-born microorganisms. Supposing that the ejection mechanism occurs in all planetary systems harboring microbial life, Earth could have been in turn seeded from elsewhere. However, we should keep in mind that these numbers are highly arguable because the number of life-bearing rocks ejected into the solar system is actually unknown, as it is the density of living organisms within those rocks, their location relative to the surface, the erosive potential of micrometeorites on these rocks, etc.

The Sun and its accompanying planetary system were formed about 4.5 billion years ago. It has been shown to travel around the galactic center in a rough circular orbit with a linear rotation speed slightly greater than the local co-rotation speed. Thanks to such movement, each $\sim 70\text{--}140$ million years the solar system traverses a spiral arm containing dense ($n \geq 10^4 \text{ cm}^{-3}$) interstellar clouds. Since its formation, the solar system has thus probably crossed tens of times such regions of much higher stellar and gas density. The flux of solid material arriving on Earth from nearby stars at the present distances was calculated in detail by Murray et al. (2004). They examined three possible sources of large extra-solar

meteoroids: Asymptotic Giant Branch stars (AGB), Young Stellar Objects (YSOs) and debris disks. Fluxes from AGB are the strongest ones arriving on Earth, approaching 8 particles $\text{yr}^{-1} \text{km}^{-2}$. The flux of dust and gas of extra-solar origin arriving on top of terrestrial atmosphere will increase by many orders of magnitude at each crossing of the sun through a spiral arm. The local density of stars in the solar neighborhood will also be increased by a factor up to ten.

An interesting possibility that extends the panspermia concept is enhanced from the discussion presented in this paper. Microbes from other places in the galaxy could benefit of the shielding effect operated by microparticulate material against UV–VUV radiation of the interplanetary space. As a matter of fact, living organisms could have more intensively seeded Earth during crossings of the solar system through dense galactic regions because of shorter times required for any organism to reach Earth. This process could thus advantageously overcome the following issues considered in the lithopanspermia theory: (i) intense heating during atmospheric entry, (ii) radioactive decay of heavy elements present in large rocks and (iii) the bystander effects of HZE particle radiation. Further experiments are currently being performed in order to address the effects of ionizing radiation (electromagnetic and charged particles) on radio-resistant microbes under this micro-shielding scenario.

Authors' contributions:

I.G.P.L collected, processed and analyzed data, was involved in study design and wrote the manuscript; S.P. was involved in the experimental design, collected and processed data. E.J.P. was involved in data analysis and proposed the astronomical meaning to the primary data; A.N.B., J.A.R.G and A.A.C.L were involved in advising experimental details and data analysis, provided the facilities and contributed equally to the study. C.A.S.L designed the study, was involved in data analysis and revised the manuscript. All authors discussed the results and commented on the manuscript.

Acknowledgements

We thank Dr. Carlos Eduardo Bonacossa de Almeida (IRD/RJ) for having kindly provided bacterial strains, Dr. Diana Paula Andrade Pilling Guapayassú de Oliveira for helping data acquisition, Dr. Douglas Galante for his comments on the manuscript and Dr. Gordon Imlach from Department of Life Sciences, Open University, Milton Keynes, United Kingdom for producing the Scanning Electron Microscopy images. We also thank the Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho (IBCCF/UFRJ) for intellectual and financial contributions, the faculty from the Departamento de Física from the Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro (PUC/RJ) for managing the hydrogen lamp, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for providing I.G. Paulino-Lima's Ph.D. student fellowship and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) for research grants. This work was also partially supported by the Brazilian institution Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), Brazil, which also provided the facility and staff supervision to conduct the main experimental part of this work.

References

- Anderson, A.W., Nordan, H.C., Cain, R.F., Parrish, G., Duggan, D., 1956. Studies on a radio-resistant *Micrococcus*. I. isolation, morphology, cultural characteristics, and resistance to gamma radiation. *Food Technology* 10, 575–578.
- Ashwood, M.J., Copeland, J., Wilcocks, J., 1968. Response of bacterial spores and *Micrococcus radiodurans* to ultraviolet irradiation at low temperatures. *Nature* 217 (5126), 337–338.
- Baggaley, W.J., Bennett, R.G.T., Steel, D.I., Taylor, A.D., 1994. The advanced meteor orbit radar facility—AMOR. *Quarterly Journal of the Royal Astronomical Society* 35 (3), 293–320.
- Burchell, M.J., Mann, J.R., Bunch, A.W., 2004. Survival of bacteria and spores under extreme shock pressures. *Monthly Notices of the Royal Astronomical Society* 352 (4), 1273–1278.
- Cavasso Filho, R.L., Homen, M.G.P., Fonseca, P.T., Naves de Brito, A., De Brito, A.N., 2007. A synchrotron beamline for delivering high purity vacuum ultraviolet photons. *Review of Scientific Instruments* 78, 115104, doi:10.1063/1.2813341.
- Cockell, C.S., Brack, A., Wynn-Williams, D.D., Baglioni, P., Brandstatter, F., Demets, R., Edwards, H.G.M., Gronstal, A.L., Kurat, G., Lee, P., Osinski, G.R., Pearce, D.A., Pillinger, J.M., Roten, C.A., Sancisi-Frey, S., 2007. Interplanetary transfer of photosynthesis: an experimental demonstration of a selective dispersal filter in planetary island biogeography. *Astrobiology* 7 (1), 1–9.
- Coulson, S.G., 2004. On panspermia and the survivability of micrometre-sized meteoroids within the Earth's atmosphere. *International Journal of Astrobiology* 3 (2), 151–156.
- Daly, M.J., Gaidamakova, E.K., Matrosova, V.Y., Vasilenko, A., Zhai, M., Leapman, R.D., Lai, B., Ravel, B., Li, S.M.W., Kemner, K.M., Fredrickson, J.K., 2007. Protein oxidation implicated as the primary determinant of bacterial radioresistance. *PLoS Biology* 5 (4), 769–779.
- De la Torre, R., Sancho, L.G., Horneck, G., Rettberg, P., Ascaso, C., de los Rios, A., Wierzchos, J., de Vera, J.P., Ott, S., Cockell, C., Olsson, K., Frias, J.M., Demets, R., 2009. Testing the lithopanspermia theory in the Foton-M3 mission: simulation of interplanetary transfer and re-entry process of epi- and endolithic microbial communities with the lithopanspermia experiment. *Origins of Life and Evolution of Biospheres* 39 (3–4), 356–357.
- Dose, K., Bieger-Dose, A., Dillman, R., Gill, M., Kerz, O., Klein, A., Meinert, H., Nawrotz, T., Risi, S., Stridde, C., 1995a. ERA-experiment "Space Biochemistry". *Advances in Space Research* 16 (8), 119–129.
- Dose, K., Bieger-Dose, A., Dillman, R., Gill, M., Kerz, O., Klein, A., Stridde, C., 1995b. UV photobiochemistry under space conditions. *Advances in Space Research* 18 (12), 51–60.
- Dreibus, G., Wanke, H., 1985. Mars, a volatile-rich planet. *Meteoritics* 20 (2), 367–381.
- Duprat, J., Engrand, C., Maurette, M., Kurat, G., Gounelle, M., Hammer, C., 2007. Micrometeorites from Central Antarctic snow: the CONCORDIA collection. *Advances in Space Research* 39, 605–611.
- Fajardo-Cavazos, P., Langenhorst, F., Melosh, H.J., Nicholson, W.L., 2009. Bacterial spores in granite survive hypervelocity launch by spallation: implications for lithopanspermia. *Astrobiology* 9 (7), 647–657.
- Floyd, L.E., Cook, J.W., Herring, L.C., 2004. Poster presented at AGU Fall 2004 Meeting, San Francisco, CA, 13–17 December 2004.
- Fritz, J., Artemieva, N.A., Greshake, A., 2005. Ejection of Martian meteorites. *Meteoritics and Planetary Sciences* 40 (9–10), 1393–1412.
- Frisch, P.C., Dorschner, J.M., Geiss, J.J., Greenberg, J.M., Grun, E., Landgraf, M., Hoppe, P., Jones, A.P., Kratschmer, W., Linde, T.J., Morfill, G.E., Reach, W., Slavin, J.D., Svestka, J., Witt, A.N., Zank, G.P., 1999. Dust in the local interstellar wind. *Astrophysical Journal* 525 (1), 492–516.
- Horneck, G., 1999. European activities in exobiology in earth orbit: results and perspectives. *Life Sciences: Exobiology* 23 (2), 381–386.
- Horneck, G., Bücker, H., Reitz, G., 1994. Long-term survival of bacterial spores in space. *Life Sciences and Space Research* 14 (10), 41–45.
- Horneck, G., Klaus, D.M., Mancinelli, R.L., 2010. Space microbiology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 74 (1), 121–156.
- Horneck, G., Mileikowsky, C., Melosh, H.J., Wilson, J.W., Cucinotta, F.A., Gladman, B., 2003. Viable transfer of microorganisms in the solar system and beyond. In: Horneck, G., Baumstark-Khan, C. (Eds.), *Astrobiology: The Quest for the Conditions of Life*. Springer, New York, pp. 57–76.
- Horneck, G., Stoeffler, D., Ott, S., Hornemann, U., Cockell, C.S., Möller, R., Meyer, C., De Vera, J.P., Fritz, J., Schade, S., Artemieva, N.A., 2008. Microbial rock inhabitants survive hypervelocity impacts on mars-like host planets: first phase of lithopanspermia experimentally tested. *Astrobiology* 8 (1), 17–44.
- Ito, T., Kobayashi, K., Ito, A., 1980. Effects of broad-band vacuum-UV synchrotron radiation on wet yeast cells. *Radiation Research* 82 (2), 364–373.
- Jagger, J., Stafford, R.S., Mackin Jr., R.J., 1967. Killing and photoreactivation of *Streptomyces griseus* conidia by vacuum-ultraviolet and far-ultraviolet radiation (1500 to 2700 Å). *Radiation Research* 32 (1), 64–92.
- Mileikowsky, C., Cucinotta, F.A., Wilson, J.W., Gladman, B., Horneck, G., Lindegren, L., Melosh, J., Rickman, H., Valtonen, M., Zheng, J.Q., 2000. Natural transfer of viable microbes in space-1. From Mars to Earth and Earth to Mars. *Icarus* 145 (2), 391–427.
- Möller, R., Horneck, G., Rabbow, E., Reitz, G., Meyer, C., Hornemann, U., Stöffler, D., 2008. Role of DNA protection and repair in resistance of *Bacillus subtilis* spores to ultrahigh shock pressures simulating hypervelocity impacts. *Applied and Environmental Microbiology* 74 (21), 6682–6689.
- Munakata, N., Ito, T., 1979. Killing and mutagenic actions of broad-wavelength (> 115 nm) UV on synchrotron orbital radiation upon *Bacillus subtilis* spores. In: Abstracts, Sixth International Congress of Radiation Research, p. 91. Tokyo.
- Murray, N., Weingartner, J.C., Capobianco, C., 2004. On the flux of extrasolar dust in Earth's atmosphere. *Astrophysical Journal* 600 (2), 804–827.

- Napier, W.M., 2004. A mechanism for interstellar panspermia. *Monthly Notices of the Royal Astronomical Society* 348 (1), 46–51.
- Nicholson, W.L., Munakata, N., Horneck, G., Melosh, H.J., Setlow, P., 2000. Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64 (3), 548–572.
- Okeefe, J.D., Ahrens, T.J., 1986. Oblique impact—a process for obtaining meteorite samples from other planets. *Science* 234 (4774), 346–349.
- Olsson-Francis, K., Cockell, C.S., 2010. Experimental methods for studying microbial survival in extraterrestrial environments. *Journal of Microbiological Methods* 80 (1), 1–13.
- Osman, S., Peeters, Z., La Duc, M.T., Mancinelli, R., Ehrenfreund, P., Venkateswaran, K., 2008. Effect of shadowing on survival of bacteria under conditions simulating the Martian atmosphere and UV radiation. *Applied and Environmental Microbiology* 74 (4), 959–970.
- Pogoda de la Vega, U., Rettberg, P., Reitz, G., 2007. Simulation of the environmental climate conditions on Martian surface and its effects on *Deinococcus radiodurans*. *Advances in Space Research* 40, 1672–1677.
- Rothschild, L.J., Mancinelli, R.L., 2001. Life in extreme environments. *Nature* 409 (6823), 1092–1101.
- Saffary, R., Nandakumar, R., Spencer, D., Robb, F.T., Davila, J.M., Swartz, M., Ofman, L., Thomas, R.J., Diruggiero, J., 2002. Microbial survival of space vacuum and extreme ultraviolet irradiation: strain isolation and analysis during a rocket flight. *Fems Microbiology Letters* 215 (1), 163–168.
- Sancho, L.G., De La Torre, R., Horneck, G., Ascaso, C., De Los Rios, A., Pintado, A., Wierzchos, J., Schuster, M., 2007. Lichens survive in space: results from the 2005 lichens experiment. *Astrobiology* 7 (3), 443–454.
- Schuerger, A.C., Mancinelli, R.L., Kern, R.G., Rothschild, R.J., McKay, C.P., 2003. Survival of endospores of *Bacillus subtilis* on spacecraft surfaces under simulated Martian environments: implications for the forward contamination of Mars. *Icarus* 165, 253–276.
- Sowers, B.L., Birkhoff, R.D., Arakawa, E.T., 1972. Optical absorption of liquid water in the vacuum ultraviolet. *Journal of Chemical Physics* 57 (1), 583–584.
- Shuster, D.L., Weiss, B.P., 2005. Martian surface paleotemperatures from thermochronology of meteorites. *Science* 309 (5734), 594–597.
- Stadler, D., Macleod, H., 1984. A dose-rate effect in UV mutagenesis in *Neurospora*. *Mutation Research* 127 (1), 39–47.
- Stöffler, D., Horneck, G., Ott, S., Hornemann, U., Cockell, C.S., Moeller, R., Meyer, C., de Vera, J.P., Fritz, J., Artemieva, N.A., 2007. Experimental evidence for the potential impact ejection of viable microorganisms from Mars and Mars-like planets. *Icarus* 186 (2), 585–588.
- Valtonen, M., Nurmi, P., Zheng, J.Q., Cucinotta, F.A., Wilson, J.W., Horneck, G., Lindgren, L., Melosh, J., Rickman, H., Mileikowsky, C., 2009. Natural transfer of viable microbes in space from planets in extra-solar systems to a planet in our solar system and vice versa. *Astrophysical Journal* 690 (1), 210–215.
- Watanabe, K., Zelikoff, M., 1953. Absorption coefficients of water vapor in vacuum ultraviolet. *Journal of the Optical Society of America* 43 (9), 753–755.
- Weber, P., Greenberg, J.M., 1985. Can spores survive in interstellar space. *Nature* 316 (6027), 403–407.
- Wilkinson, P.G., Johnston, H.L., 1950. The absorption spectra of methane, carbon dioxide, water vapor, and ethylene in vacuum ultraviolet. *Journal of Chemical Physics* 18 (2), 190–193.