



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA  
DIPARTIMENTO DI AGRONOMIA ANIMALI ALIMENTI RISORSE NATURALI E  
AMBIENTE

Corso di laurea in Scienze e Tecnologie Alimentari

Aspetti microbiologici degli alimenti destinati alle  
missioni spaziali

**Relatore**

Chiar.mo Prof. Alessio Giacomini

**Laureando**

Gabriele Zanardi

Matricola n. 2007464

ANNO ACCADEMICO 2022 - 2023



# Indice

Pagina

<b>RINGRAZIAMENTI</b> .....	5
<b>RIASSUNTO</b> .....	6
<b>ABSTRACT</b> .....	7
<b>Capitolo 1 – SPACE FOOD: L’ALIMENTAZIONE NELLO SPAZIO</b> .....	8
1.1 La Stazione Spaziale Internazionale .....	8
1.2 Normal Food .....	11
1.2.1 Requisiti fondamentali .....	12
1.2.2 Gruppi di classificazione .....	12
1.2.3 Bonus food personale .....	14
1.2.4 Acqua e bevande .....	15
1.3 Tecnologie di produzione .....	17
1.3.1 Liofilizzazione .....	17
1.3.2 Sterilizzazione per irradiazione .....	17
1.3.3 Termostabilizzazione inversa .....	18
1.3.4 Nuove tecnologie .....	18
1.4 Space Crops .....	19
1.5 <i>Shelf-life</i> e modalità d’impiego .....	19
1.5.1 Stabilità e stoccaggio .....	19
1.5.2 Conseguenze nutrizionali .....	20
1.5.3 Consumazione finale .....	21
<b>Capitolo 2 – IL MICROBIOTA DELLA STAZIONE SPAZIALE INTERNAZIONALE</b> .....	23
2.1 Analisi delle superfici .....	24
2.2 Analisi dell’impianto idrico .....	25
2.3 Analisi dell’aria .....	25
2.4 Contributo dell’equipaggio .....	26
<b>Capitolo 3 – MICRORGANISMI NELLO “SPAZIO”</b> .....	30
3.1 Batteri in microgravità .....	30
3.2 Cambiamenti nel comportamento microbico .....	31
3.2.1 Sviluppo batterico .....	31
3.2.2 Produzione di biofilm batterico .....	32
3.2.3 Variazioni nelle membrane .....	33
3.2.4 Resistenza a stress ambientali ed antibiotici .....	34
3.2.5 Virulenza .....	35
3.3 Variazioni nel microbiota umano .....	38
3.4 Salute degli astronauti e variazioni nel sistema immunitario .....	39

<b>Capitolo 4 – SICUREZZA MICROBIOLOGICA DELLO SPACE FOOD .....</b>	<b>41</b>
4.1 Analisi dei pericoli e valutazione dei rischi nello Space Food .....	41
4.1.1 Pericoli microbiologici .....	41
4.1.2 Rischio microbiologico per l’equipaggio .....	41
4.2 Gestione pre-lancio .....	42
4.2.1 Requisiti microbiologici .....	42
4.2.2 Modalità di prevenzione .....	43
4.2.3 Conseguenze sul prodotto finito .....	43
4.3 Gestione post-lancio .....	44
4.3.1 Fattori di rischio .....	44
4.3.2 Contaminazioni crociate .....	44
4.4 Sicurezza microbiologica degli Space Crops .....	45
<b>Capitolo 5 – APPLICAZIONI, CONSIDERAZIONI E CONCLUSIONI .....</b>	<b>46</b>
5.1 Relazioni con il sistema HACCP .....	46
5.2 Applicazioni future e conclusioni.....	47
<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>49</b>
<b>SITOGRAFIA .....</b>	<b>50</b>

## RINGRAZIAMENTI

La realizzazione di questo elaborato è stata possibile grazie al gentile contributo di alcune tra le figure più importanti a livello internazionale in materia di produzione di alimenti destinati alle missioni spaziali. Sono pertanto riportate alcune informazioni inedite e altre raramente recuperabili altrove, frutto di numerosi e proficui incontri e comunicazioni telematiche con specialisti del settore.

In particolar modo, si ringraziano:

- Lo **Chef Stefano Polato**, responsabile dello Space Food Lab dell'azienda Argotec e creatore del bonus food dell'astronauta italiana Samantha Cristoforetti, per il grande supporto nel progetto, le informazioni in merito alle tecnologie di produzione degli alimenti e per la fornitura di alcuni campioni di Space Food;
- L'astronauta italiano e Colonnello dell'Aeronautica Militare **dott. Luca Parmitano**, per la gentile disponibilità nel fornire contatti interni all'Agenzia Spaziale Europea;
- La **dott.ssa Sonja Brungs**, *Crew Support Engineer* dell'Agenzia Spaziale Europea, per le informazioni in merito alla gestione post-lancio dello Space Food;
- La **dott.ssa Sara Piccirillo**, Biologa Ricercatrice presso l'Unità Volo Umano Spaziale dell'Agenzia Spaziale Italiana, per le informazioni in merito ai requisiti nutrizionali e tutela della salute degli equipaggi delle missioni spaziali.

## RIASSUNTO

La tendenza all'esplorazione dell'uomo ha da sempre caratterizzato il suo stile di vita, determinando lo sviluppo di risorse utili ad adattarsi a situazioni più o meno scomode. Durante le missioni spaziali si verificano condizioni ambientali uniche, dove i principi della biologia, della fisica e della chimica vengono alterati dalla microgravità. La nutrizione si rivela fondamentale nella gestione del benessere psicofisico degli equipaggi ed ogni imprevisto in tale ambito può attentare alla loro salute. Pertanto, la produzione degli alimenti destinati al consumo durante le missioni spaziali deve rispettare specifici standard per ridurre al minimo il livello di rischio microbiologico e la possibilità di incorrere in tossinfezioni, intossicazioni e infezioni alimentari causate da microrganismi patogeni. La gestione a Terra dello Space Food prevede modalità di intervento sui fattori endogeni agli alimenti, quali umidità relativa,  $A_w$  e pH mediante l'applicazione di opportuni trattamenti tecnologici combinati sottoforma di *hurdle technologies*.

È stato dimostrato come anche i principali microrganismi patogeni di interesse alimentare subiscano, in condizioni di microgravità, modificazioni nel loro sviluppo, permanenza negli ambienti, virulenza, resistenza ad antibiotici e stress esogeni. Lo stesso microbiota della Stazione Spaziale Internazionale costituisce un pericolo che potrebbe determinare situazioni di contaminazioni crociate tra gli ambienti e gli alimenti. Inoltre, le avverse condizioni di vita degli equipaggi durante le missioni spaziali influiscono sulla risposta del sistema immunitario e sulla sua capacità di riconoscimento dei patogeni, rendendo necessario lo sviluppo di specifiche strategie di prevenzione e nuove misure di profilassi.

La gestione del rischio microbiologico negli alimenti destinati alle missioni spaziali non è tuttavia fine a sé stesso in quanto ha avuto in passato e avrà in futuro un ruolo determinante nel risolvere problematiche sempre più di attualità.

## **ABSTRACT**

Man's tendency toward exploration has always characterized his way of life, leading to the development of useful resources to adapt to more or less uncomfortable situations. During space missions, unique environmental conditions occur, where the principles of biology, physics and chemistry are altered by microgravity. Nutrition proves to be crucial in managing the mental and physical well-being of the crews, and any unforeseen event in this area can threaten their health. Therefore, the production of food for consumption during space missions must meet specific standards to minimize the level of microbiological risk and the possibility of incurring toxins, poisonings and food infections caused by pathogenic microorganisms. Ground-based management of space food involves ways of intervening on factors endogenous to food, such as relative humidity, Aw and pH through the application of appropriate combined technological treatments in the form of hurdle technologies.

It has been demonstrated how even the main pathogenic microorganisms of food interest undergo changes in their development, permanence in environments, virulence, resistance to antibiotics and exogenous stresses under microgravity conditions. The microbiota of the International Space Station itself poses a hazard that could lead to situations of cross-contamination between environments and food. In addition, the adverse living conditions of crews during space missions affect the immune system's response and its ability to recognize pathogens, necessitating the development of specific prevention strategies and new prophylactic measures.

However, microbiological risk management in foods destined for space missions is not an end in itself as it has played a crucial role in the past and will play a role in solving increasingly topical issues in the future.

# Capitolo 1 – SPACE FOOD: L’ALIMENTAZIONE NELLO SPAZIO

## 1.1 La Stazione Spaziale Internazionale

A partire dal 2 novembre 2000 non c’è stato giorno in cui l’uomo non abbia vissuto contemporaneamente sia sul pianeta terra, che in ambiente extraterrestre. Tutto questo è frutto di una longeva collaborazione internazionale che coinvolge decine di Stati e cinque agenzie spaziali: la statunitense **NASA** (*National Aeronautics and Space Administration*), la russa **RKA** (*Roscosmos*), l’europea **ESA** (*European Space Agency*), la giapponese **JAXA** e infine la canadese **CSA** (*Canadian Space Agency*).

Con una massa di circa 420 tonnellate ed un volume abitabile di circa 388 m<sup>3</sup>, la Stazione Spaziale Internazionale (ISS) orbita attorno alla terra ad una altitudine compresa tra 330 e 410 km e ad una velocità di 27 600 km/h (circa 8 km/s), osservando ogni giorno 16 albe e 16 tramonti (Figura 1.1).

L’astronauta italiana Samantha Cristoforetti definisce la ISS come “l’avamposto umano nello spazio”, difatti questa struttura è un vero e proprio laboratorio orbitante, con un ruolo primario nella ricerca scientifica.



Figura 1.1 La stazione spaziale internazionale (Fonte: NASA)

È composta da sedici moduli pressurizzati comprendenti laboratori, *airlock* per l’aggancio dei vettori spaziali, sistemi di supporto alla vita ed unità abitative per gli astronauti (Figura 2.2). Il numero di inquilini è variabile a seconda delle necessità e delle disponibilità di navicelle, tuttavia è ordinariamente composto da sei o sette astronauti di diverse nazionalità a seconda dei contributi alla missione dei singoli stati: Stati Uniti e Russia apportano da sempre la maggioranza dei fondi, tuttavia l’Agenzia Spaziale Europea ha contribuito nella produzione di diversi moduli, tra cui il laboratorio *Columbus*, i nodi di collegamento *Harmony* e *Tranquillity*, il modulo *Cupola* e il modulo di stoccaggio *Leonardo* (costruito in Italia).



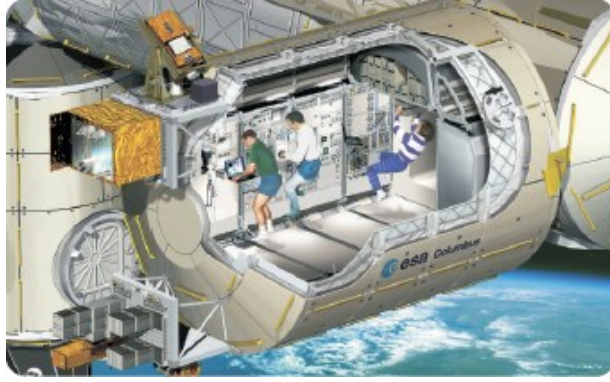


Figura 1.2 Rappresentazione della struttura di un modulo abitativo nella ISS

La sfida più grande per gli ingegneri che hanno progettato e che tuttora mantengono questa struttura è mantenere in piene condizioni vitali l'equipaggio per circa sei mesi alla volta, garantendo loro i servizi fondamentali alla cura e all'igiene della persona, utilizzando in maniera intelligente e *smart* le limitate risorse che hanno a loro disposizione. Questo avviene grazie a quello che viene definito *Environmental Control and Life Support System (ECLSS)*, un sistema di supporto vitale che controlla e regola le condizioni atmosferiche, la pressione, il livello di ossigeno, l'acqua e la presenza di eventuali fiamme libere nella ISS.

Il sistema ECLSS utilizza tecnologie sofisticate per raggiungere i suoi obiettivi, che includono:

1. Purificazione e riciclaggio dell'acqua attraverso l'uso di filtri e processi chimici per rimuovere impurità e contaminanti dall'acqua di scarico e sterilizzazione dell'acqua purificata attraverso l'uso di raggi ultravioletti e altri processi per garantire la sicurezza degli astronauti;
2. Controllo della qualità dell'aria attraverso l'uso di filtri a carbone attivo per rimuovere anidride carbonica, composti organici volatili, composti organoclorurati e altri inquinanti atmosferici;
3. Produzione di ossigeno attraverso un processo di elettrolisi dell'acqua, in cui l'ossigeno viene separato dall'idrogeno;
4. Gestione dei reflui prodotti nella stazione spaziale, inclusi i fluidi provenienti dai servizi igienici e i sottoprodotti del metabolismo umano, attraverso l'uso di filtri a carbone attivo e il sistema di purificazione dell'acqua.

Questi processi complessi e sofisticati sono fondamentali per garantire la sopravvivenza e la sicurezza degli astronauti a bordo della stazione spaziale.

Vi sono poi diversi moduli abitativi dedicati all'equipaggio e alle loro necessità (Fig. 1.3):

- Gli astronauti durante le missioni spaziali riposano in cabine private dotate di sacchi a pelo ancorati alle pareti e si lasciano fluttuare all'interno di essi. Tali cabine sono fornite di dispositivi per il tempo libero e le comunicazioni private con la Terra;
- Durante i pasti, gli astronauti si dirigono al Modulo 1, comunemente noto come "cucina", anche se non vi sono fornelli o pentole tradizionali. Il tavolo è invece dotato di utensili e tappezzato di "velcro" per ancorare le buste di cibo precedentemente riscaldate negli appositi fornetti;
- La ISS è dotata di un bagno per le esigenze fisiologiche degli astronauti. Questo è costituito da una cabina in cui un tubo richiudibile viene utilizzato per aspirare i rifiuti umani. Per quanto riguarda l'igiene personale, vengono fornite salviette monouso umidificate, asciugamani, sapone e dentifricio liquidi che non richiedono risciacquo;
- Per l'attività fisica, essenziale al mantenimento della massa ossea e muscolare, vi è inoltre una palestra con macchinari predisposti al sollevamento pesi in microgravità e tapis-roulant dotati di elastici per mantenere ancorata la persona al tappeto.



Figura 1.3 Cabine private, "cucina", bagno e palestra nella ISS

La gestione dei rifiuti avviene secondo il principio del massimo risparmio in imballaggi e materiali; tuttavia, vengono stoccati nei veicoli utilizzati precedentemente per i rifornimenti che poi bruceranno al rientro in atmosfera.

I costi di trasporto in orbita dei rifornimenti, degli esperimenti e di tutta la merce si aggiravano intorno a 55.000 dollari al chilogrammo nelle missioni Shuttle (fino al 2011) e intorno ai 2.000 dollari al chilogrammo nelle moderne missioni cargo di *Space X*.

Il progresso scientifico e lo sviluppo delle nuove tecnologie hanno portato a grandi miglioramenti nelle strutture orbitanti e nella loro capacità di resistere a tali ambienti estremi; tuttavia, i costi rimangono ancora alla portata di poche agenzie spaziali, principalmente quelle finanziate dai governi. Si è reso inoltre meno indispensabile qualcosa che fino a pochi anni prima era essenziale e rappresentava uno dei maggiori costi riscontrati, ad esempio il continuo e incessante rifornimento di acqua potabile. A seguito della progettazione di un sistema di ricircolo dell'acqua estremamente efficiente, vennero ridotti di circa il 90% i costi legati a questa essenziale materia prima; seguì lo sviluppo di ulteriori innovazioni, tutte volte a concentrare le limitate risorse economiche disponibili a quello che è effettivamente il ruolo primario di tutte le missioni ISS: la ricerca scientifica.

## **1.2 Normal Food**

Per Normal Space Food si intendono le forniture alimentari di base destinate agli astronauti e preparate appositamente per rispettare precisi requisiti nutrizionali e salutistici determinati dalle particolari condizioni ambientali in cui l'equipaggio deve svolgere le proprie attività.

La gestione dello Space Food è amministrata dall'agenzia spaziale statunitense NASA attraverso un dipartimento dedicato, lo *Space Food Team*, che si occupa di formulare delle diete personalizzate per ogni astronauta statunitense, canadese, europeo e giapponese volte a garantire il rispetto dei fabbisogni essenziali in materia di nutrizione umana. Il termine "pasto dell'astronauta" è sempre stato utilizzato in maniera dispregiativa per indicare derrate alimentari dalle caratteristiche inusuali, talvolta inappetibili, sottoforma di purea e trattate appositamente per essere correttamente conservate e adoperate secondo specifici requisiti definiti in questo capitolo. Nonostante le forniture alimentari di base rispecchino piuttosto fedelmente quanto sopra descritto, negli ultimi anni il benessere degli equipaggi ed il miglioramento della qualità della vita sono diventati di notevole spessore e rilevanza nell'organizzazione delle missioni spaziali, portando allo sviluppo di miglioramenti nella produzione degli alimenti destinati al consumo durante tali attività. Nei successivi paragrafi verrà dimostrata una panoramica della moderna concezione dello *Space Food*, evidenziando le tipologie, le caratteristiche, i requisiti fondamentali ed i progressi effettuati dalla comunità scientifica per contribuire al benessere dell'equipaggio.

### 1.2.1 Requisiti fondamentali

Le derrate alimentari destinate agli astronauti rappresentano l'unica fonte di approvvigionamento alimentare durante le missioni spaziali; è pertanto indispensabile la formulazione dei pasti secondo precisi requisiti fondamentali che mentre sulla Terra rappresentano una situazione di ordinarietà, durante le lunghe permanenze nello spazio, rappresentano un protocollo di vitale importanza per garantire il benessere fisico, mentale e sociale. La produzione dello Space Food avviene dunque secondo i seguenti criteri:

- Sicurezza alimentare per la gestione del rischio biologico, fisico e chimico;
- Stabilità nella conservazione, oltre cinque anni;
- Palatabilità, assecondando gusti e preferenze dei consumatori;
- Nutrizione, garantendo il fabbisogno giornaliero di principi nutritivi;
- Minimizzazione delle risorse per la gestione dei rifiuti e del carico;
- Varietà, combinando diverse tipologie di alimenti per indurre la palatabilità;
- Affidabilità nella gestione in condizioni di microgravità;
- Praticità nell'utilizzo.

### 1.2.2 Gruppi di classificazione

I principali gruppi di classificazione dello Space Food sono cinque, suddivisi sulla base del trattamento tecnologico subito e delle modalità di preparazione.

- Alimenti in forma naturale: mantenuti nel loro stato originario. Vi appartengono frutta e ortaggi freschi, frutta secca, biscotti, dolci ecc... (Fig. 1.4). I prodotti freschi possiedono una *shelf-life* ridotta, sono potenzialmente contaminati dall'origine e vengono consumati a ridosso del lancio per evitare proliferazioni e aumento della carica microbica;
- Alimenti parzialmente disidratati: l'attività dell'acqua ( $A_w$ ) di questi alimenti è ridotta a valori prossimi a 0.9 per concentrazione dei soluti dovuta alla parziale disidratazione. Vi appartiene la frutta disidratata (albicocche, pere, pesche...) con valori di pH acidi che impediscono lo sviluppo dei patogeni alimentari (Fig. 1.5);
- Alimenti termostabilizzati: sono trattati termicamente con un processo di sterilizzazione per eliminare i microrganismi e le loro spore. Rappresentano la maggioranza delle derrate alimentari e sono costituiti da alimenti ready-to-eat confezionati singolarmente, ad esempio spezzatino di manzo, ravioli, pollo al curry, purè di patate, vellutata di piselli ecc... (Fig. 1.6);

- Alimenti disidratati e liofilizzati: confezionati a porzioni e predisposti alla reidratazione con acqua calda in loco. Il processo di disidratazione comporta valori di umidità relativa finale  $< 25\%$  e attività dell'acqua  $< 0,6$ . Sono esempi gli spinaci disidratati, il caffè liofilizzato, la carne secca, ecc... (Fig. 1.7)
- Alimenti irradiati: sterilizzati mediante l'esposizione a radiazioni ionizzanti tra cui raggi gamma, raggi X e fasci di elettroni ad alta energia. Il trattamento è mirato ad eliminare i microrganismi e le loro spore provocando mutazioni fatali nel genoma microbico. Le radiazioni vengono applicate nei prodotti già confezionati, rendendo l'irradiazione una tecnologia ad ostacoli. (Fig. 1.8)



Figura 1.4 Alimenti freschi (frutta) e in forma naturale (caramelle e frutta secca)



Figura 1.5 Albicocche parzialmente disidratate

Figura 1.6 Alimenti termostabilizzati in busta e in scatola



Figura 1.7 Alimenti disidratati e liofilizzati

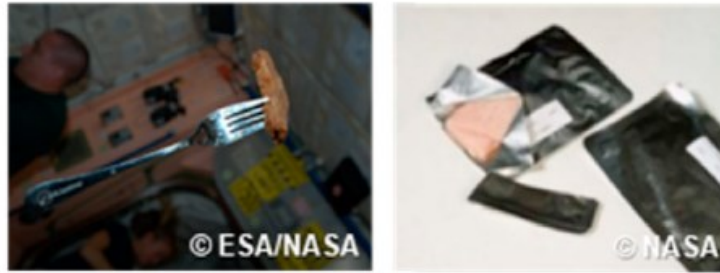


Figura 1.8 Beef steak e petto di tacchino irradiati

### 1.2.3 Bonus Food personale

Per il rispetto dei principi di palatabilità e variabilità, il 20% degli alimenti formulati per l'equipaggio rappresenta il bonus food personale. Vi appartengono pietanze, *snack* e bevande scelti personalmente dall'astronauta sulla base della propria tradizione gastronomica e delle proprie abitudini alimentari (Fig. 1.9). L'agenzia spaziale di riferimento, in accordo con l'astronauta stesso, provvede alla nomina di un consulente alimentare o di uno chef di cucina a cui verrà attribuito il compito di produrre il bonus food. La preparazione avviene in aziende alimentari locali affittate temporaneamente per questo preciso scopo, al fine di garantire il rispetto dei requisiti di igiene e sicurezza alimentare nonché i requisiti tecnici imposti dalla NASA. Quest'ultima impone infatti diverse GHP (Buone prassi igieniche) e GMP (buone pratiche di fabbricazione), tra cui il divieto di utilizzare materie prime particolarmente esposte a pericoli, come la carne proveniente dalla Francia, a maggior rischio di infezione da prioni (morbo della "Mucca Pazza"). Al fine di tutelare la salute del consumatore finale, viene affidato alle autorità locali il compito di effettuare controlli ufficiali e rintracciabilità del prodotto, riservando sempre alle autorità statunitensi le ultime ispezioni prima e durante la missione.

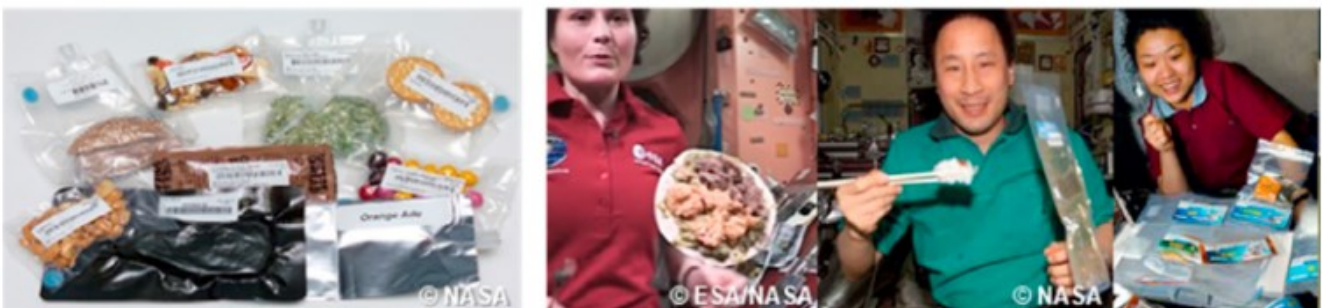


Figura 1.9 Il bonus food è basato su abitudini alimentari della cultura di appartenenza

L'astronauta italiana Samantha Cristoforetti ha affidato allo chef Stefano Polato l'incarico di produrre il suo bonus food personale, prediligendo una dieta equilibrata, ricca di *novel food* e prodotti salutistici e della tradizione; tra questi: alga spirulina, noci di macadamia, olio extravergine di oliva, quinoa, bacche di goji, barrette energetiche naturali, insalata di cereali con sgombro, ecc... L'astronauta italiano Luca Parmitano ha invece composto il proprio bonus food sulla base della tradizione italiana, includendo la torta tiramisù ed il caffè espresso.

#### **1.2.4 Acqua e bevande**

La gestione dell'acqua e dell'impianto idrico nella Stazione Spaziale Internazionale rappresenta una delle più grandi sfide ingegneristiche realizzate. Durante le missioni spaziali l'acqua è utilizzata per tre scopi principali:

- Produzione di ossigeno molecolare (atmosferico) e idrogeno molecolare (combustibile) tramite elettrolisi;
- Reidratazione di alimenti e bevande disidratati;
- Consumo come nutriente per l'idratazione personale.

Essendo una risorsa altamente limitata, durante le missioni spaziali il consumo di acqua deve essere controllato e monitorato. Vi sono tre sistemi di gestione delle risorse idriche:

- Rifornimento periodico con vettori di lancio cargo;
- Filtrazione e potabilizzazione della condensa e del sudore dall'impianto di ventilazione;
- Riciclaggio dall'urina degli astronauti.

Il rifornimento da Terra dell'acqua rappresenta il metodo microbiologicamente più sicuro, in quanto proviene da fonte e si dispone di efficaci strumentazioni per il controllo e il monitoraggio. Il costo di trasporto in orbita varia, tuttavia, da 25.000 dollari a 50.000 dollari al litro, a seconda del vettore di lancio.

La condensazione/potabilizzazione del vapore acqueo e il riciclaggio dell'urina rappresentano pertanto i metodi più convenienti per la gestione dell'acqua.

L'*Urine Processing Assembly* è lo strumento predisposto a riciclare e potabilizzare il 70% dei 9 Kg di urina prodotti al giorno dai sei membri dell'equipaggio, garantendo un continuo ricircolo del 90% di tutta l'acqua utilizzata (circa 4000 litri all'anno).

L'urina viene pretrattata aggiungendo una sostanza ossidante (triossido di cromo) e un acido inorganico (acido solforico) al fine di ridurre la carica microbica ed inibirne la crescita, impedendo inoltre la precipitazione dei sali nel serbatoio. Quest'ultimo fattore è stato più volte causa di guasti nel sistema poiché in condizioni di microgravità l'urina degli astronauti risulta ricca di calcio, dovuto alla decalcificazione del tessuto osseo.

Successivamente avviene un processo di distillazione sottovuoto in cui l'urina viene riscaldata ed esposta a pressione sub-atmosferica, determinando l'evaporazione dell'acqua e la concentrazione dei soluti in una salamoia urinaria destinata all'eliminazione. L'acqua distillata ottenuta viene microfiltrata (0,1  $\mu\text{m}$ ), mineralizzata ed immessa nell'impianto idrico.

L'acqua potabilizzata può essere erogata dai dispenser (Fig. 1.10) sia a temperatura ambiente che riscaldata, mediante l'utilizzo di *water bag* apposite per evitarne la dispersione.

Tra le bevande vi sono succhi di frutta, the e caffè liofilizzati (Fig. 1.11). Recentemente è stata inoltre portata in orbita una macchina per l'espresso a capsule, progettata e costruita in Italia.



Figura 1.10 Dispenser di acqua fredda e calda



Figura 1.11 Bevande energetiche ed acqua



## **1.3 Tecnologie di produzione**

### **1.3.1 Liofilizzazione**

Il processo di liofilizzazione è basato sul principio di sublimazione del solvente (acqua) contenuto all'interno dell'alimento. La liofilizzazione dello Space Food si articola in tre fasi principali:

1. Congelamento
2. Prima essiccazione
3. Seconda essiccazione

Questa tecnica può essere applicata alla maggioranza degli alimenti destinati al consumo nello spazio, in quanto preserva maggiormente la componente nutrizionale e aromatica, escludendo l'impiego di additivi conservanti. A trattamento ultimato il prodotto presenta un valore di umidità relativa compreso tra il 2 e l'8% e un valore di  $A_w$  (attività dell'acqua) inferiore a 0,25.

Gli alimenti liofilizzati vengono confezionati sottovuoto in sacchetti contenenti un sottile film di alluminio per prevenire l'ingresso di acqua.

### **1.3.2 Sterilizzazione per irradiazione**

L'irradiazione degli alimenti destinati al consumo nello spazio avviene esponendo il prodotto a radiazioni ionizzanti, tra cui raggi gamma, raggi X ed elettroni ad alta energia prodotti da acceleratori di particelle.

Le radiazioni interagiscono con l'acqua e le molecole biologiche portando alla formazione di prodotti radiolitici con funzione ossidante e mutagena nei confronti dei microrganismi presenti, causando la loro inattivazione. I valori di radiazioni variano considerevolmente in relazione alla tipologia di alimento, partendo da 1-2 kGy per i vegetali e arrivando a 44 kGy per i prodotti già confezionati.

Ad esempio, l'applicazione di un dosaggio di radiazioni pari a 15 kGy in *fajitas* di manzo, comporta una riduzione di cellule batteriche di *Escherichia coli* produttori di *Shiga-toxin* di 10 log ed una riduzione delle spore di *Clostridium sporogenes* di 5 log.

L'elevata efficienza e versatilità dell'irradiazione degli alimenti ne comporta l'uso come tecnologia ad ostacoli a seguito del processo di liofilizzazione, ma anche come valida alternativa di sterilizzazione dello Space Food prodotto in loco (Cap. 1.3) durante le missioni.

### 1.3.3 Termostabilizzazione inversa

La termostabilizzazione prevede il trattamento degli alimenti con una temperatura e un tempo sufficienti ad abbassare il livello di rischio microbiologico. Nello Space Food questo procedimento viene definito “reverse”, in quanto il prodotto viene sterilizzato solo all’interno del proprio imballaggio sigillato, sottoponendo quest’ultimo a getti di vapore a 121°C oppure all’immersione in acqua a  $P > P_{ATM}$ , causando la penetrazione del calore nell’alimento per convezione. Il processo è mirato ad eliminare le cellule vegetative e le spore dei microrganismi patogeni e deterioranti.

Gli alimenti termostabilizzati sono imballati in sacchetti flessibili, laminati con un sottile strato di alluminio.

### 1.3.4 Nuove tecnologie

Le innovazioni nei processi di produzione dello Space Food riguardano l’ampio uso di *hurdle technologies* (tecnologie ad ostacoli) per abbassare a livelli accettabili il rischio microbiologico e prolungare la *shelf-life* del prodotto. Le tecnologie ad ostacoli attualmente in corso di sperimentazione sono:

- *High Pressure Processing* (HPP): il prodotto viene sottoposto a pressioni comprese tra 300 e 600 MPa per 1-6 minuti. Questo porta all’inattivazione delle cellule vegetative, tuttavia le spore dei patogeni e gli enzimi rimangono attivi.
- *Microwave Assisted Thermal Sterilization* (MATS): il processo combina l’energia sotto forma di microonde (915 MHz) e l’immersione in acqua ad elevate temperature e pressioni ( $T > 121^{\circ}\text{C}$ ,  $P > 3$  bar) del prodotto imballato per determinare l’inattivazione delle cellule vegetative e delle spore di *Clostridium botulinum*, considerato il patogeno target nei processi di sterilizzazione.
- *High Pressure Thermal Processing* (HPTP): il processo combina la tecnologia HPP e le alte temperature per la sterilizzazione del prodotto.
- *3D-printed Space Food*: già sperimentata a bordo della ISS per la produzione di una pizza, la stampa 3D prevede l’utilizzo di alimenti in polvere come inchiostro che, a seguito di reidratazione, fuoriesce dall’estrusore della stampante componendo l’alimento in un ambiente controllato.

## 1.4 Space crops

A differenza del *normal Space Food*, gli *space horticultural crops* rappresentano il futuro degli alimenti destinati al consumo nello spazio in quanto l'aumentare della durata delle missioni richiede la produzione del cibo in loco invece del trasporto dalla Terra. Dal 2015 sulla Stazione Spaziale Internazionale vengono periodicamente coltivati prodotti ortofrutticoli destinati al consumo da parte dell'equipaggio, al fine di procedere con la sperimentazione sullo sviluppo dei vegetali in microgravità, ma soprattutto con la finalità di limitare il trasporto di prodotti freschi dalla Terra, limitando quanto più possibile il trasporto di microrganismi potenzialmente patogeni dalla superficie.

Tra i principali alimenti coltivati a bordo della ISS vi sono verdure a foglia verde (lattuga, cavolo, spinaci), radicchio, peperoni, peperoncini e pomodori (Fig. 1.12); sono stati tuttavia oggetto di esperimenti i seguenti vegetali: cipolle, piselli, ravanelli, grano, aglio, cetrioli, prezzemolo, patate, aneto e basilico.



Figura 1.12 Space horticultural crops nella ISS

## 1.5 Shelf-life e modalità d'impiego

### 1.5.1 Stabilità e stoccaggio

Per stabilità dello Space Food si intende l'insieme delle caratteristiche biologiche, fisiche e chimiche che determinano nelle loro condizioni la *shelf-life* del prodotto.

- Stabilità microbiologica: garantita dai trattamenti tecnologici volti ad inattivare i microrganismi e le loro spore.
- Stabilità fisico-chimica: controllata mediante l'utilizzo di imballaggi resistenti di materiale plastico, talvolta rivestiti con un sottile *foil* di alluminio per evitare processi di foto-ossidazione dei composti organici (tra cui lipidi e vitamine) e limitare l'esposizione del

prodotto alle radiazioni cosmiche che potrebbero avere effetti negativi sulla componente nutrizionale.

Lo stoccaggio avviene a temperatura ambiente in appositi moduli-magazzino oppure vettori trasporto cargo. Recenti esperimenti prevedono l'implementazione di un refrigeratore termoelettrico per la conservazione dei prodotti freschi ed eventualmente nuovi prodotti surgelati. Nella tabella 1.1 sono riportate le modalità di processamento, il packaging e la *shelf-life* dei principali gruppi di Space Food.

Tabella 1.1 Processamento, Imballaggio e *Shelf-life* dello Space Food prodotto da NASA (NASA)

<b>Gruppi di classificazione</b>	<b>Processamento</b>	<b>Imballaggio</b>	<b><i>Shelf-life</i></b>
Prodotti freschi	nessun trattamento	Sigillato in confezioni	1-2 settimane
Prodotti essiccati/disidratati	Riduzione Aw	Sacchetti flessibili laminati	1,5-2,5 anni
Prodotto Irradiati	trattamento con raggi $\gamma/44$ kGy	Buste flessibili laminate	2-3 anni
Prodotti termostabilizzati	trattamento con alte temperature	Buste flessibili laminate	2-3 anni
Prodotti liofilizzati	Riduzione Aw	Sacchetti flessibili laminati	1,5-2,5 anni

### 1.5.2 Conseguenze nutrizionali.

I trattamenti di stabilizzazione dello Space Food effettuati dalla NASA riducono la qualità nutrizionale e commerciale dei prodotti. È stato dimostrato che durante la preparazione e lo stoccaggio, gli alimenti subiscono rilevanti perdite nutrizionali determinando negli astronauti una carenza di nutrienti nonostante le regolari quantità ingerite. Si registra una alterazione nel 58% delle vitamine totali (tra cui acido ascorbico, riboflavina e tiamina) dopo due anni di stoccaggio a 26.7°C correlate ad una diminuzione della concentrazione, della biodisponibilità e della stabilità.

Alcuni fattori antinutrizionali (inibitori della tripsina ed emocoagulanti) non vengono inoltre inattivati durante i processi tecnologici, riscontrandone dunque la presenza nel prodotto finito.

L'impiego di prodotti freschi, come frutta e ortaggi, compensa solo in parte i fabbisogni nutrizionali dell'equipaggio, rimediando alle carenze dei prodotti processati; a causa della loro instabilità non possono tuttavia rappresentare una valida alternativa.

### 1.5.3 Consumazione finale

La consumazione dello Space Food avviene nel modulo 1 della ISS, impropriamente definito “cucina”. La postazione è dotata di forbici per l’apertura delle confezioni, tappeti in velcro per l’ancoraggio degli utensili e posate monouso. Non si utilizzano piatti e stoviglie in quanto, in assenza di gravità, perdono la loro funzione; sono sostituiti da tortillas di frumento utilizzate anche al posto del pane per evitare la dispersione di residui polverulenti difficilmente recuperabili.

Gli alimenti termostabilizzati *ready to eat* che necessitano di una consumazione a caldo vengono riscaldati in un forno a conduzione (Figura 1.13) ancora confezionati ed essendo principalmente puree e creme vengono spalmate sulle tortillas e consumate con le mani. Eventuali snack sono inoltre consumati nella postazione di lavoro durante la giornata.



Figura 1.13 Riscaldatore degli alimenti



Figura 1.14 Reidratazione degli alimenti disidratati



Figura 1.15 Condimenti (olio EVO e sale liquido) e tortillas

Gli alimenti disidratati e liofilizzati sono reidratati con una quantità predefinita di acqua fredda o calda mediante erogazione da dispenser (Figura 1.14) e consumati singolarmente o accompagnati da un *main dish*.

L'acqua e le bevande sono contenute all'interno di sacchetti dotati di cannucce sigillabili per impedire la fuoriuscita di liquido per capillarità.

I condimenti includono olio extravergine di oliva, pasta di pepe, sale in soluzione acquosa, salsa piccante e miele (Figura 1.15).

Nonostante siano presenti dispositivi di disinfezione delle mani, la mancata detersione e talvolta la possibile contaminazione delle confezioni contenenti gli alimenti, determinano un maggior rischio di contaminazioni crociate (Capitolo 4).

## Capitolo 2 – IL MICROBIOTA DELLA STAZIONE SPAZIALE INTERNAZIONALE

Le pareti della Stazione Spaziale Internazionale sono spesse pochi millimetri e separano un ambiente perfettamente adattato al mantenimento della vita dal vuoto, in grado di uccidere qualsiasi forma di vita complessa in pochi secondi. I continui rifornimenti da un ecosistema altamente contaminato, come il pianeta Terra, e le particolari condizioni con cui si ha a che fare (come la microgravità), determinano con il tempo lo sviluppo di un vero e proprio microbiota specifico; il che rende assolutamente necessario un suo riconoscimento e un continuo monitoraggio. Dopo il lancio, infatti, vi è la reale possibilità di contaminazioni crociate nello Space Food poiché le capsule, i vettori di lancio e la Stazione Spaziale Internazionale sono ambienti confinati dove l'aria, l'acqua e le forniture alimentari sono continuamente riciclate; come verrà dimostrato in seguito anche gli stessi membri dell'equipaggio sono dei veri e propri *reservoir* (serbatoi) di microrganismi. La maggior parte dei microbi ambientali o di origini umane non costituiscono pericoli rilevanti nelle persone sulla Terra, possono tuttavia rappresentare un serio rischio per la salute per gli astronauti, in quanto, per via delle condizioni in cui vivono, possiedono un sistema immunitario seriamente compromesso. La carica microbica totale degli ambienti deve essere quindi controllata per garantire un'adeguata qualità di vita per l'equipaggio.

Le contaminazioni microbiologiche dell'acqua potabile sono inoltre una minaccia alla salute degli esseri umani: nei serbatoi e nel sistema di depurazione, la formazione di biofilm batterico è uno dei più importanti fattori di presenza e resistenza dei microrganismi ai disinfettanti. Se poi l'acqua potabile viene utilizzata riscaldata o a temperatura ambiente per re-idratare i cibi e le bevande, la sua contaminazione può essere causa di tossinfezioni ed intossicazioni alimentari durante le missioni.

Sono dunque necessarie adeguate procedure di monitoraggio e disinfezione, utilizzate a partire dalle missioni *Shuttle-Mir* nel 1993 per le lunghe permanenze nello spazio e tuttora applicate regolarmente nella Stazione Spaziale Internazionale. I limiti di accettabilità di batteri e funghi nell'aria, nelle superfici e nell'acqua potabile sono riportati nella tabella 2.1.

A seguito di diversi controlli sulla qualità microbiologica degli ambienti nella ISS, sono stati trovati diversi microrganismi, anche di particolare e rilevante interesse alimentare, schematizzati nella tabella 2.2.

Tabella 2.1 Limiti di carica microbica nell'aria, superfici e acqua potabile nella ISS (Hurst, 2017)

Ambiente	Microrganismi	Limiti di accettabilità	
		Prima della missione	Durante la missione
ARIA	Batteri totali	$3 \cdot 10^2$ UFC/m <sup>3</sup>	$10^3$ UFC/m <sup>3</sup>
	Funghi totali	$5 \cdot 10$ UFC/m <sup>3</sup>	$10^2$ UFC/m <sup>3</sup>
SUPERFICI	Batteri totali	$5 \cdot 10^2$ UFC/cm <sup>2</sup>	$10^4$ UFC/cm <sup>2</sup>
	Funghi totali	10 UFC/cm <sup>2</sup>	$10^2$ UFC/cm <sup>2</sup>
ACQUA (potabile)	Batteri totali	$5 \cdot 10$ UFC/ml	$5 \cdot 10$ UFC/ml
	Coliformi	ND/100 ml	ND/100 ml

ND, not detected (non rilevato)

## 2.1 Analisi delle superfici

Il contatto diretto e la formazione di biofilm sulle superfici dei veicoli spaziali adibiti al trasporto umano sono le principali vie di trasmissione microbica che hanno le maggiori implicazioni in materia di salute degli astronauti e produzione industriale. Dal monitoraggio di 243 campioni di superficie, provenienti dalla Stazione Spaziale Internazionale, si evidenziano livelli di contaminazione batterica e fungina compresi rispettivamente tra  $2,5 \cdot 10^4$  e  $4,3 \cdot 10^4$  UFC/100 cm<sup>2</sup> e tra  $2,5 \cdot 10^4$  e  $3 \cdot 10^5$  UFC/100 cm<sup>2</sup>.

Nel corso del tempo sono state campionate anche le superfici di veicoli appartenenti a missioni diverse dalle *Expedition* (ovvero tutte le missioni verso e dalla Stazione Spaziale Internazionale), come ad esempio la Stazione Spaziale sovietica/russa "MIR", distrutta dal rientro in atmosfera nel 2001 e la *Mars Odyssey Orbiter*, tuttora in orbita intorno al pianeta Marte.

I generi dei batteri isolati a seguito delle analisi in queste tre missioni sono: *Acinetobacter*, *Actinobacillus*, *Aeromonas*, *Aureobasidium*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Delftia*, *Eikenella*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Hafnia*, *Microbacterium*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Staphylococcus*, *Streptophomonas*, *Streptococcus* e *Vibrio* sp. I generi dominanti di batteri sono tuttavia *Staphylococcus* e *Bacillus*; invece, quelli di muffe sono principalmente *Penicillium* e *Aspergillus*.



## 2.2 Analisi dell'impianto idrico

Per l'analisi dei campioni di condensa dell'umidità è stato utilizzato un metodo di conta diretta al microscopio che ha rivelato una carica microbica di  $8,4 \cdot 10^4$  cellule/ml, ma nessuna di queste rappresentava un'unità formante colonia (UFC). Una possibile spiegazione di questa discrepanza potrebbe essere riguardo alla presenza di cellule vive e vitali, ma non coltivabili. Nonostante ciò, un campione della superficie interna del serbatoio di scarico ha rivelato la presenza di  $3,3 \cdot 10^5$  cellule/ml, comprese unità batteriche e fungine in grado di formare colonie.

Dal 2001 il sistema "SVO-ZV" della Stazione Spaziale Internazionale, il quale distribuisce acqua a temperatura ambiente, è stato monitorato 27 volte (fino al 2020). Ci sono stati 16 casi di campioni d'acqua prelevati durante la missione in cui i livelli di contaminazione batterica erano ben oltre le  $10^2$  UFC/100ml; infatti, nel 2004 è stato riscontrato che l'acqua utilizzata per reidratare gli alimenti a bordo della ISS aveva un livello di contaminazione di  $5,1 \cdot 10^3$  UFC/100 ml.

I batteri isolati dall'impianto idrico della Stazione Spaziale Internazionale e della Stazione Spaziale MIR, compresa l'acqua potabile e la condensa dell'umidità sono: *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Chryseobacterium*, *Citrobacter*, *Corynebacterium*, *Delftia*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Flavimonas*, *Flavobacterium*, *Kingella*, *Klebsiella*, *Methylobacterium*, *Microbacterium*, *Ochrobacterium*, *Pantoea*, *Legionella*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Serratia*, *Sphingomonas*, *Streptococcus*, *Xanthomonas* e *Yersinia* sp.

Dal 2009 al 2012 i batteri più frequentemente isolati dai campioni di acqua provenienti dalla ISS, erano *Ralstonia pickettii* e *Burkholderia multivorans*, mentre i coliformi fecali non sono stati rilevati nell'acqua potabile.

Recenti studi sul microbioma hanno inoltre riportato che i Proteobatteri, ovvero la maggiore divisione dei batteri gram negativi compresi una grande varietà di generi patogeni, sono i microrganismi prevalenti nelle riserve d'acqua della Stazione Spaziale Internazionale.

## 2.3 Analisi dell'aria

L'atmosfera a bordo della ISS è simile a quella terrestre ed è composta da una miscela di azoto e ossigeno ad una pressione pari al valore di quella atmosferica al livello del mare. Questa scelta garantisce il comfort dell'equipaggio e assicura una maggiore sicurezza rispetto ad un'atmosfera composta unicamente da ossigeno puro, a maggior rischio di incendio. L'ossigeno proviene da tre diverse fonti; la principale e la più utilizzata è la sua produzione a bordo tramite elettrolisi dell'acqua: questo è infatti il principio di funzionamento del sistema OGS (*Oxygen Generation*

*System*), appartenente all'“ECLSS”. Vi sono tuttavia regolari rifornimenti di ossigeno puro in concomitanza con l'arrivo di nuovi equipaggi, questo per garantire quella che viene definita una “sensazione di aria fresca” e contribuire al benessere degli inquilini.

Nella Stazione Spaziale “MIR”, operativa dal 1986 al 2001, è stato riscontrato che il 95% dei campioni di aria prelevati aveva una carica batterica intorno alle  $5 \cdot 10^2$  UFC/m<sup>3</sup>, mentre una carica fungina variabile dalle 2 alle  $10^4$  UFC/m<sup>3</sup>.

Nel caso della Stazione Spaziale Internazionale sia le contaminazioni batteriche che quelle microbiche dell'aria sono state rilevate piuttosto basse, rispettivamente con un massimo di  $7,1 \cdot 10^2$  UFC/m<sup>3</sup> e 44 UFC/m<sup>3</sup>. Nonostante i livelli di contaminazione batterica presenti nell'aria fossero ben al di sotto dei limiti di accettabilità, la sola carica microbica non dà nessuna informazione in merito alla possibile presenza di patogeni; il che rende dunque necessario un isolamento per ottenere una dettagliata identificazione delle specie.

Dai campioni d'aria recuperati dai vettori, dalla stazione spaziale *MIR* e dalla Stazione Spaziale Internazionale (ISS), sono stati isolati i seguenti generi di batteri: *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Bacillus*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Staphylococcus* e *Xanthomonas* spp.

In particolare, le specie batteriche dominanti sono rappresentate da *Staphylococcus* e *Bacillus* spp, dato riscontrato anche in alcuni studi riguardanti altri ambienti confinati, come ad esempio gli aeroplani e le basi militari polari.

Le specie dominanti di funghi sono invece appartenenti ai generi *Penicillium* e *Aspergillus*.

Si noti la stretta somiglianza tra i microrganismi presenti nell'aria e quelli riscontrati nelle superfici, il che evidenzia come l'assenza di alcuni fattori che sulla Terra tendono a limitare certi tipi di contaminazioni, come ad esempio la forza di gravità, siano causa di tale facilità di contaminazione.

## **2.4 Contributo dell'equipaggio**

Dagli equipaggi delle missioni Apollo e SkyLab sono stati isolati diversi microrganismi patogeni opportunisti, ovvero microrganismi normalmente poco virulenti e con limitata capacità di causare patologie che in determinate situazioni di debolezza del loro ospite, come un repentino abbassamento delle difese immunitarie oppure una temporanea situazione di indisposizione, sono in grado di diventare patogeni e portare anche a gravi complicanze per la salute dell'uomo e degli animali. Tra questi sono stati identificati *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e altri microrganismi appartenenti alla famiglia delle Enterobatteriacee.

Le analisi microbiologiche effettuate sugli equipaggi degli Space Shuttle (25 missioni, 144 astronauti) pre-missione e post-missione, hanno individuato che *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* e *Streptococcus agalactiae* sono i batteri più frequentemente isolati dalla cavità orale, dal naso, dall'urina e dai campioni di feci degli astronauti.

Durante alcune missioni russo-sovietiche nelle stazioni spaziali *Salyut* e *MIR* è stata osservata quantitativamente la continua crescita di alcuni microrganismi patogeni opportunisti, quali: *Proteus*, *Clostridium*, *Staphylococcus aureus* ed *Escherichia coli*, mentre le popolazioni di microrganismi protettivi (come, ad esempio, *Bifidobacteria*) tendevano a diminuire costantemente con il passare del tempo in condizioni di microgravità.

Nella Stazione Spaziale Internazionale sono invece stati prelevati campioni dall'inguine, dagli arti superiori e dalla lingua, riscontrando la presenza di *Staphylococcus lugdunensis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus hominis*.

Tabella 2.2 Batteri di interesse alimentare isolati dagli habitat degli astronauti, vettori di trasporto e astronauti post-missione (H.W. Kim, M.S. Rhee 2020)

Batterio	Aria	Equipaggio	Superfici	Acqua
<i>Bacillus cereus</i>			✓	
<i>Bacillus sp.</i>	✓		✓	✓
<i>Enterobacteriaceae</i>		✓		
<i>Escherichia coli</i>		✓		✓
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		✓		
<i>Pseudomonas fluorescens</i>		✓		✓
<i>Staphylococcus aureus</i>	✓	✓	✓	
<i>Clostridia sp.</i>		✓		
<i>Citrobacter freundii</i>		✓		✓
<i>Legionella sp.</i>				✓
<i>Vibrio sp.</i>			✓	
<i>Yersinia frederiksenii</i>				✓

Da recenti studi sia a bordo della Stazione Spaziale Internazionale che nel suo simulatore presso il *Jet Propulsion Laboratory* in California, emerge evidente la differenza tra il microbioma/microbiota terrestre e quello caratteristico di diversi ambienti in microgravità.

Il microbioma terrestre è determinato principalmente dall'insieme dei microrganismi presenti nel suolo, un ambiente molto competitivo e ricco di nutrienti; vi sono batteri dei generi *Azotobacter*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Rhizobium*, *Pseudomonas...*; funghi dei generi *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* e molteplici altri microrganismi tra cui i protozoi e i parassiti.

Dagli studi di ambienti confinati nello spazio (altitudine superiore ai 100 km), emerge che i microrganismi predominanti sono associati al microbioma umano\_e tra di loro potrebbero esserci anche alcuni patogeni.

Nella tabella 2.3 vengono contestualizzati tutti i microrganismi ritrovati a seguito di analisi nelle stazioni orbitanti e in alcune missioni finanziate dagli Stati Uniti. Come anticipato, è possibile notare alcuni generi presenti in tutti, o quasi, gli ambienti presi in considerazione; tra questi ritroviamo principalmente: *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella* e *Proteus* che appartengono alla famiglia delle Enterobacteriaceae; *Pseudomonas*, *Staphylococcus* e *Streptococcus*.

Tutti questi batteri sono caratteristici del microbioma umano, giungendo pertanto alla conclusione che l'uomo è il principale portatore di microrganismi in ambiente spaziale.

Tabella 2.3 Generi di batteri isolati nelle stazioni orbitanti e nelle missioni spaziali (H.W. Kim, M.S. Rhee 2020)

Genere Batterico	Stazioni Orbitanti		Missioni			
	"ISS"	"MIR"	<i>Mars Odyssey Orbiter</i>	<i>Apollo 11-17</i>	<i>Skylab</i>	<i>Space Shuttle</i>
<i>Acinetobacter</i>	✓	✓	✓			
<i>Actinobacillus</i>	✓	✓	✓			
<i>Aeromonas</i>	✓	✓	✓			
<i>Alcaligenes</i>	✓	✓				
<i>Aureobasidium</i>	✓	✓	✓			
<i>Bacillus</i>	✓	✓	✓			
<i>Burkholderia</i>	✓	✓				
<i>Chryseobacterium</i>	✓	✓				
<i>Citrobacter</i>	✓	✓				
<i>Clostridium</i>		✓				

<i>Corynebacterium</i>	✓	✓	✓			
<i>Delftia</i>	✓	✓	✓			
<i>Eikenella</i>	✓	✓	✓			
<i>Enterobacter</i>	✓	✓	✓	✓	✓	✓
<i>Enterococcus</i>						✓
<i>Escherichia</i>	✓	✓	✓			✓
<i>Flavimonas</i>	✓	✓				
<i>Flavobacterium</i>	✓	✓				
<i>Hafnia</i>	✓	✓	✓			
<i>Legionella</i>	✓	✓				
<i>Methylobacterium</i>	✓	✓				
<i>Microbacterium</i>	✓	✓	✓			
<i>Kingella</i>	✓	✓				
<i>Klebsiella</i>	✓	✓		✓	✓	
<i>Pantoea</i>	✓	✓				
<i>Proteus</i>	✓	✓	✓			✓
<i>Pseudomonas</i>	✓	✓	✓	✓	✓	
<i>Ralstonia</i>	✓	✓	✓			
<i>Sphingomonas</i>	✓	✓				
<i>Staphylococcus</i>	✓	✓	✓	✓	✓	✓
<i>Streptococcus</i>	✓	✓	✓			✓
<i>Streptophomonas</i>	✓	✓	✓			
<i>Vibrio</i>	✓	✓	✓			
<i>Xanthomonas</i>	✓	✓				
<i>Yersinia</i>	✓	✓				

## Capitolo 3 – MICRORGANISMI NELLO SPAZIO

### 3.1 Batteri e microgravità

Per microgravità, o assenza di forza peso, si intende una condizione ambientale che simula l'effetto dell'assenza di gravità, sottoponendo un corpo a continua e costante caduta libera. Qualsiasi oggetto orbitante intorno al pianeta terra, infatti, non è soggetto all'assenza di gravità; al contrario è proprio questa forza a permettere di simulare l'assenza della forza peso. La combinazione di alcuni fattori quali altitudine, velocità, massa, curvatura terrestre e mancanza di una componente atmosferica di attrito, permettono una continua ed incessante caduta della Stazione Spaziale intorno al pianeta, portando ad una modificazione temporanea dei principi della fisica come la tensione superficiale dell'acqua ed il trasferimento di calore e ulteriori cambiamenti negli esseri viventi.

Gli aspetti principali riscontrati nella risposta cellulare alle condizioni di microgravità sono:

- assenza di sedimentazione;
- perdita di convezione legata alla gravità;
- ridotta idrodinamica;
- assenza di pressione idrostatica.

Questi fattori potrebbero avere un impatto nelle cellule presenti in ambiente liquido, come ad esempio nelle colture batteriche, organi e tessuti.

Nei microrganismi sono stati evidenziati alcuni cambiamenti globali nelle caratteristiche fenotipiche e genotipiche in risposta a condizioni di assenza di peso, come, peraltro, anche nelle cellule eucariote degli animali.

Nelle missioni spaziali, in aggiunta all'assenza di peso, i microrganismi sono esposti a vibrazioni, accelerazioni e radiazioni sotto forma di raggi cosmici e solari. Quest'ultime hanno la capacità di aumentare il tasso di mutazione microbica durante il volo.

Le missioni nello spazio alterano, nei microrganismi, le caratteristiche di crescita, morfologia, metabolismo, espressione genica, sintesi proteica, virulenza e produzione di biofilm. Sulla base dei dati raccolti, in questo capitolo verranno analizzate le modificazioni nel comportamento di alcuni microrganismi target, tutti accomunati dalla capacità di causare tossinfezioni, infezioni oppure intossicazioni alimentari.

## 3.2 Cambiamenti nel comportamento microbico

### 3.2.1 Sviluppo batterico

Numerosi studi riportano che le condizioni di microgravità riscontrate durante le missioni spaziali possono alterare le caratteristiche di crescita e sviluppo cellulare nei batteri.



Figura 3.1 Esperimento BIOMEX, colture batteriche in MG (Fonte: NASA)

Nella tabella 3.1 vengono evidenziate le variazioni nella crescita di alcuni microrganismi di interesse alimentare a seguito della loro coltivazione in condizioni di assenza di peso (Fig. 3.1).

Tabella 3.1 Variazioni nello sviluppo in microgravità di alcuni microrganismi di interesse alimentare (H.W. Kim, M.S. Rhee 2020)

Microrganismi	Variazioni nello sviluppo cellulare
<i>Escherichia coli</i> non patogeni	<ul style="list-style-type: none"><li>• Crescita rallentata in terreno <i>LB medium</i></li><li>• Ridotta fase di latenza</li><li>• Maggior durata della fase di crescita esponenziale</li><li>• Maggior numerosità della popolazione finale</li></ul>
<i>E. coli</i> enteroemorragici (EHEC)	<ul style="list-style-type: none"><li>• Aumento della biomassa e della dimensione cellulare in terreni NA e <i>minimal medium</i></li><li>• Aumento della biomassa in presenza di acido nalidixico sub-inibitore.</li><li>• Aumento della biomassa a pH 5.5</li></ul>
<i>E. coli</i> enteropatogeni (EPEC)	<ul style="list-style-type: none"><li>• Nessun cambiamento osservabile</li></ul>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Aumento della biomassa in condizioni di carenza di fosforo e calcio</li></ul>
<i>Salmonella</i> Typhimurium	<ul style="list-style-type: none"><li>• Aumento della biomassa in terreno <i>minimal M9 medium</i>.</li></ul>
<i>Staphylococcus aureus</i>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Crescita rallentata</li><li>• Aumento della biomassa in terreno "<i>nutrient rich medium</i>"</li></ul>

Si noti come una caratteristica che accomuna la maggior parte delle specie batteriche nel loro sviluppo in assenza di peso sia la presenza finale di una biomassa di dimensioni maggiori,

conseguente ad una popolazione batterica più numerosa oppure ad un aumento delle dimensioni cellulari.

### 3.2.2 Produzione di biofilm batterico

Per biofilm batterico si intende un insieme di cellule batteriche, aggregate dalla presenza di una complessa matrice adesiva e protettiva di natura principalmente glucidica e proteica, derivata dal metabolismo cellulare secondario.

La formazione di biofilm batterico nello spazio è stata documentata a seguito di una massiva colonizzazione di batteri nella stazione spaziale MIR che, a seguito della produzione di acidi organici ed enzimi, causò gravi problemi di corrosione delle superfici e malfunzionamenti nel sistema di purificazione dell'acqua.

A seguito di specifici studi sulla produzione di biofilm batterico in microgravità, sono state riscontrate variazioni significative nella quantità, tipologia e capacità protettiva delle matrici che lo costituiscono (Tabella 3.2).

Tabella 3.2 Variazioni nella produzione di biofilm in alcuni batteri di interesse alimentare (H.W. Kim, M.S. Rhee 2020)

Microrganismi	Variazioni nella produzione di biofilm
<i>Acinetobacter baumannii</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Diminuzione della capacità di formare biofilm a seguito di un volo spaziale.</li> </ul>
<i>Escherichia coli</i> non patogeni	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ispessimento dello strato di biofilm;</li> <li>• Aumento della resistenza del biofilm alla pressione osmotica, etanolo e due antibiotici (penicillina e cloramfenicolo)</li> </ul>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Aumento della produzione di biofilm (Fig 3.2)</li> <li>• Aumento della resistenza del biofilm al calore e allo stress ossidativo.</li> </ul>
<i>Staphylococcus aureus</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Aumento della produzione di biofilm.</li> </ul>

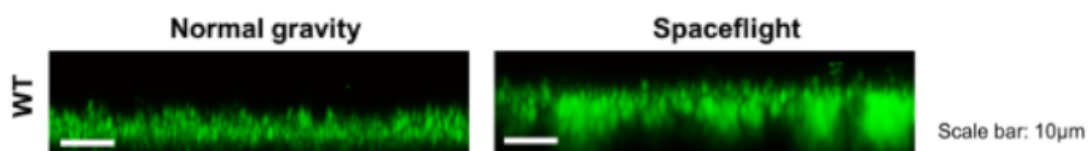


Figura 3.2 Micrografie a scansione laser confocale di biofilm prodotto dal "wild type" (ceppo selvatico) di *P. aeruginosa* che confrontano le condizioni di coltura in gravità normale e nei voli spaziali

La presenza della matrice polisaccaridica permette un miglior ancoraggio del microrganismo alle superfici, ma soprattutto un effetto protettivo nei confronti delle cellule microbiche stesse. La probabilità di contatto tra le cellule e i disinfettanti viene ridotta drasticamente, rendendo le



operazioni di pulizia più lunghe ed onerose, senza la certezza di aver rimosso un numero sufficiente di microrganismi per scongiurare possibili contaminazioni dello Space Food.

### 3.2.3 Variazioni nelle membrane

Nelle strutture cellulari, la funzione delle membrane è quella di confinare in un ambiente chiuso e controllato il contenuto cellulare; sono dotate di una permeabilità più o meno specifica a seconda della molecola da trasportare. La fluidità delle membrane è determinata principalmente dalla composizione lipidica che può essere attivamente alterata dai microrganismi stessi, in risposta a precisi stimoli esterni o condizioni di stress. Questo rende l'integrità della membrana cellulare fondamentale nei processi metabolici e di trasporto della cellula batterica.

Oggetto di studio sulle conseguenze dell'assenza di peso nelle membrane cellulari sono stati due microrganismi patogeni di interesse alimentare: *Escherichia coli* EHEC e *Staphylococcus aureus*.

In condizioni di microgravità, gli *Escherichia coli* enteroemorragici (EHEC) hanno dimostrato un aumento della fluidità della membrana cellulare, conseguente ad un aumento nella biosintesi di acidi grassi insaturi.

*Staphylococcus aureus* ha invece reagito aumentando l'integrità e la resistenza della sua membrana cellulare presentando uno strato di peptidoglicano insolitamente spesso (Fig. 3.3) aumentando, inoltre, la produzione di agenti impermeabilizzanti della membrana, come lo ioduro di propidio ( $C_{27}H_{34}I_2N_4$ ).

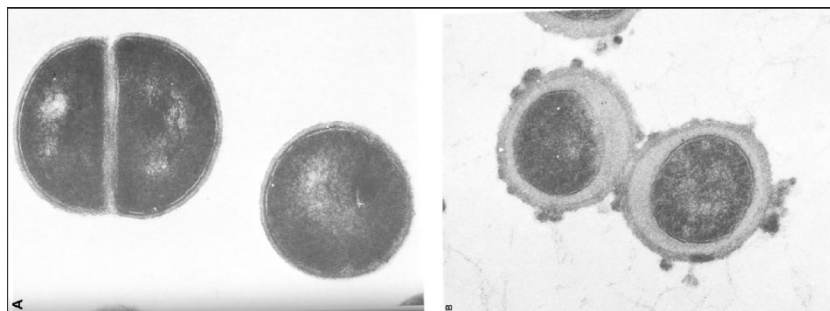


Figura 3.3 Sezione di *S.aureus* cresciuto sulla Terra (A) e in microgravità (B)

### 3.2.4 Resistenza a stress ambientali e antibiotici

La durata della fase di latenza dei microrganismi è fortemente condizionata dalle differenze nelle caratteristiche che il batterio riscontra nel nuovo ambiente rispetto a quelle dell'ambiente da cui è stato prelevato. Le condizioni che causano situazioni di stress maggiori nei batteri anche di interesse alimentare, sono collegabili alla presenza:

- di un ambiente fortemente acido ( $\text{pH}<4$ ) o fortemente basico ( $\text{pH}>10$ );
- di ossigeno molecolare e ROS (Specie reattive dell'ossigeno), in grado di ossidare i componenti cellulari causando reazioni a catena (radicali liberi)
- di alcol etilico, che causa disidratazione "scalzando" lo strato di solvatazione delle membrane cellulari causando il passaggio incontrollato di ioni e molecole tossiche (come i solfiti), oltre che denaturare le proteine;
- di elevate temperature, che portano a denaturazione delle proteine danneggiando i processi metabolici secondari e primari;
- di elevate pressioni osmotiche, conseguenti alla presenza di soluti che abbassano l'attività dell'acqua ( $A_w$ ) limitandone la disponibilità per i microrganismi;
- di antibiotici, che hanno un preciso target cellulare.

Questi fattori determinano nei microrganismi una condizione di stress, in quanto il consumo di energia necessario per ristabilire nuovamente le condizioni ottimali per il loro sviluppo impatta sulle normali attività metaboliche che vengono ad essere ridotte e classificate di secondaria importanza. I batteri sono stati portati a bordo della Stazione Spaziale Internazionale e nelle analisi a fine missione sono stati riscontrati sia incrementi che decrementi nella resistenza a condizioni ambientali avverse al loro sviluppo (Tab 3.3).

Si noti come in condizioni di microgravità gli *E. coli* enteroemorragici (EHEC) e *Staphylococcus aureus*, entrambi patogeni per l'uomo, hanno aumentato la resistenza a diverse tipologie di antibiotici. Da alcune osservazioni effettuate durante le missioni *Apollo* e *Soyuz* si è visto come alcuni batteri coltivati dagli astronauti durante il volo, sono diventati più antibiotico-resistenti rispetto agli stessi ceppi coltivati in laboratorio sulla Terra: dai ceppi di *S. aureus* e *E.coli* prelevati dalla cavità nasale e dal tratto gastrointestinale dell'astronauta francese J. Chrétien, ed è stato riscontrato che la concentrazione minima inibitoria per *E.coli* è aumentata da 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  a  $>16 \mu\text{g}/\text{mL}$  di colistina e kanamicina, invece per *S. aureus*. è approssimativamente raddoppiata (da valori-controllo: 0,16  $\mu\text{g}/\text{mL}$  di oxacillina, 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  di cloramfenicolo, 0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  di eritromicina).

Tabella 3.3 Variazioni nella resistenza agli stress ambientali di microrganismi di interesse alimentare (H.W. Kim, M.S. Rhee 2020)

Microrganismi	Variazioni nella resistenza agli stress
<i>Citrobacter freundii</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Diminuzione della resistenza allo stress ossidativo</li> </ul>
<i>Enterobacter cloacae</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Diminuzione della resistenza allo stress ossidativo</li> <li>• Diminuzione della resistenza ad ambienti acidi</li> </ul>
<i>Escherichia coli</i> non patogeni	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Diminuzione della resistenza allo stress ossidativo</li> </ul>
<i>Escherichia coli</i> enteroemorragici (EHEC)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Diminuzione del parametro <math>D_{55^{\circ}C}</math> (tempo di riduzione decimale a 55°C)</li> <li>• Aumento della resistenza agli antibiotici: ampicillina, gentamicina e acido nalidixico</li> <li>• Aumento della resistenza ad ambienti acidi (terreno LB medium addizionato di succo di mela con pH 3.5)</li> </ul>
<i>Escherichia coli</i> enteroinvasivi (AIEC)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Aumento della resistenza ad ambienti acidi</li> <li>• Aumento della resistenza al calore</li> </ul>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Aumento della resistenza allo stress ossidativo</li> <li>• Aumento della resistenza al calore</li> </ul>
<i>Salmonella</i> Typhimurium	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Aumento della resistenza ad ambienti acidi, calore, pressione osmotica e stress ossidativo</li> <li>• Aumento della sopravvivenza in presenza di macrofagi</li> </ul>
<i>Staphylococcus aureus</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Diminuzione della resistenza allo stress ossidativo</li> <li>• Diminuzione della sopravvivenza in campioni di sangue umano</li> <li>• Aumento della resistenza all'antibiotico ciprofloxacina</li> </ul>

### 3.2.5 Virulenza

Per “virulenza” si intende la capacità di un agente patogeno di attraversare i sistemi di difesa di un organismo ospite, per poi moltiplicarsi in esso causando patologie di diversa gravità.

I cambiamenti legati alla virulenza dei microrganismi in microgravità sono stati più volte oggetto di studio durante le missioni spaziali. In una serie di pubblicazioni di *Nickerson et al, 2000* viene dimostrato l’impatto della microgravità sulla virulenza di *Salmonella enterica* Typhimurium (patogeno responsabile di frequenti gastroenteriti nell’uomo e negli animali) rispetto a prove analoghe effettuate sul medesimo ceppo rimasto sulla terra. (Fig. 3.4)

Dai risultati degli esperimenti si evidenzia come, a parità di carica microbica somministrata per via orale, i topi inoculati con il ceppo cresciuto in microgravità sono morti in tempi più brevi, riscontrando inoltre una maggior colonizzazione del microrganismo nel fegato e nella milza e una maggior resistenza ai succhi gastrici.

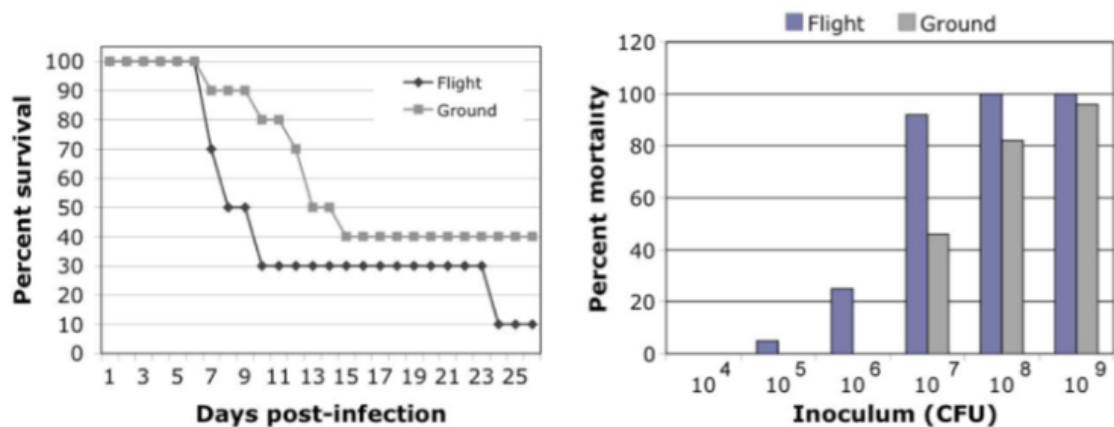


Figura 3.4 A sinistra il grafico di diminuzione nel tempo di morte di topi inoculati con *S. typhimurium* nello "spazio", rispetto a controlli identici effettuati a Terra. A destra il grafico con l'aumento della percentuale di mortalità nei topi infettati con diverse livelli di inoculo di *S. typhimurium*. (Wilson et al. 2007)

In seguito è stato dimostrato che la microgravità causa una differente regolazione nell'espressione di 163 geni con diverse funzionalità, ed è stato ipotizzato che l'assenza di peso possa determinare nel microrganismo un nuovo tipo di segnale ambientale, in grado di stimolare l'espressione del gene "fur", il quale normalmente regola la virulenza, la resistenza agli stress e la sintesi proteica in *S. enterica*, ma in situazioni complesse, come l'assenza di peso, consente alla cellula di agire con nuovi meccanismi di virulenza.

Il parametro LD50 esprime la "tossicità acuta", cioè quella dose alla quale, dopo la somministrazione di una singola quantità di sostanza chimica, provoca la morte del 50% degli animali trattati; dalla sua osservazione a seguito dell'inoculo di *S. enterica* nei topi, si è visto un importante decremento del valore, rappresentato nella Figura 3.5.

Questa risposta cellulare sembra essere comune ad altri batteri gram-negativi; tuttavia, i batteri gram-positivi come *Staphylococcus aureus*, è probabile che presentino un maggior rischio di infezione opportunistica, rispetto a *S. enterica* che raramente si è riscontrata nei voli spaziali.

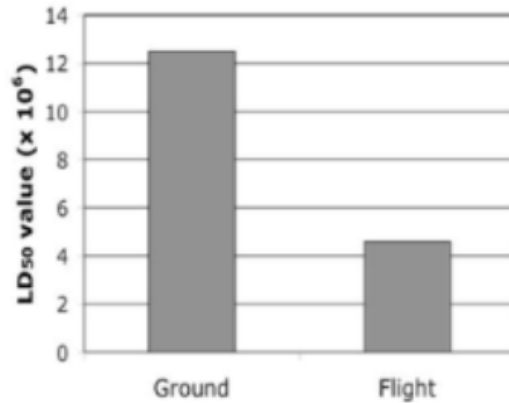


Figura 3.5 Decremento del parametro LD50 nell'infezione di topi da parte di *S. typhimurium*. (Wilson et al. 2007)

Da esperimenti su *S. aureus* e altri gram-positivi risulta comunque una variazione nell'espressione genica correlata solo a 25 geni, tra cui una sovra regolazione del gene "*vraX*" comune a tre esperimenti in situazioni di stress causato da antibiotici con target la parete cellulare, ma senza evidenti risultati di una effettiva differenza nella sua espressione. Nella tabella 3.4 si riportano i risultati degli esperimenti su *S. enterica* Typhimurium e *S. aureus*, oltre che i risultati di esperimenti su altri microrganismi di interesse alimentare.

Tabella 3.4 Variazioni della virulenza in batteri di interesse alimentare

Microorganismi	Variazioni nella virulenza
<i>Enterococcus faecalis</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Diminuzione dell'azione citotossica in coculture di larve e parassita adulto di <i>C. elegans</i></li> </ul>
<i>Escherichia coli</i> enteroemorragici EHEC	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Aumento dell'espressione dei geni <i>stx1</i> e <i>stx2</i> per la produzione di <i>Shiga Toxin</i> in presenza di acido nalidixico</li> <li>• Aumento della produzione del fattore "intimina" per l'adesione alle pareti intestinali</li> </ul>
<i>Escherichia coli</i> enteropatogeni EPEC	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Aumento dei livelli di <i>TNFα</i> (Fattore di necrosi tumorale) nei macrofagi</li> </ul>
<i>Escherichia coli</i> enterotossigeni ETEC	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Aumento dell'espressione genica per la sintesi dell'enterotossina I termolabile.</li> </ul>
<i>Escherichia coli</i> enteroinvasivi EIEC	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Aumento dell'aderenza alle cellule dell'epitelio intestinale</li> <li>• Aumento dell'infettività delle cellule <i>Caco-2</i> dell'adenocarcinoma del colon</li> </ul>
<i>Listeria monocytogenes</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Diminuzione dell'azione citotossica in coculture di larve e parassita adulto di <i>C. elegans</i></li> </ul>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Aumento dell'espressione genica dei geni di virulenza <i>lecA</i>, <i>lecB</i> e <i>rhIA</i></li> </ul>
<i>Salmonella</i> Typhimurium	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Aumento della virulenza nei topi</li> </ul>

	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Aumento della capacità di invasione dei macrofagi e delle cellule epiteliali</li> <li>• Iper Aumento della virulenza nelle infezioni alla cavità orale dei topi BALB/c</li> </ul>
<i>Staphylococcus aureus</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Diminuzione dell'attività emolitica</li> <li>• Diminuzione dell'azione citotossica in coculture di larve e parassita adulto di <i>C. elegans</i></li> </ul>

Si notino le variazioni nella virulenza di *Escherichia coli*; sono coinvolte tutte e quattro le principali tipologie di *E. coli* di interesse alimentare (EHEC, EPEC, EIEC, ETEC) che presentano alterazioni molto importanti dal punto di vista della loro patogenicità. Tra queste vi è un aumento dell'espressione genica per la produzione della tossina *Shiga*, tipica di *Shigella dysenteriae* ma acquisita anche dagli *E.coli* enteroemorragici (EHEC). Questa esotossina ha un'azione citotossica e causa un danneggiamento dei ribosomi e una conseguente inibizione della sintesi proteica, causando nei casi più gravi la patologia nota come Sindrome Emolitico Uremica (SEU). Altre alterazioni che coinvolgono la virulenza di *E. coli* riguardano una maggior capacità di adesione alle cellule dell'epitelio intestinale e un coinvolgimento indiretto nell'insorgenza di tumori come l'adenocarcinoma del colon.

### 3.3 Variazioni nel microbiota umano

La fonte maggiore di potenziali microrganismi patogeni durante le missioni spaziali è rappresentata dalla popolazione microbica presente nel microbioma umano. Il corpo umano è un serbatoio di diverse categorie di microrganismi che svolgono un ruolo attivo nel corretto mantenimento dei processi fisiologici dell'ospite, inclusa la regolazione della risposta immunitaria. La maggior parte di questa popolazione microbica è costituita da batteri presenti sulla pelle, nella cavità orale e nasale, nel tratto urogenitale e soprattutto nel tratto gastrointestinale. Infatti, quest'ultimo è caratterizzato da circa mille specie batteriche ed eventuali modifiche a questa popolazione sono in grado di causare patologie.

Nel corso del tempo sono stati effettuati molteplici studi sulla variazione del microbioma umano in condizioni di microgravità ed è emerso che questo subisce modifiche significative durante un volo spaziale. È infatti dimostrato che il numero totale delle specie batteriche presenti nel tratto gastrointestinale dell'equipaggio si riduce significativamente e alcuni batteri gram-negativi potenzialmente patogeni più resistenti come *Klebsiella* e *Pseudomonas* aumentano il loro numero.

Lo stesso stress accumulato dagli astronauti prima dei lanci verso la Stazione Spaziale Internazionale contribuisce alla diminuzione dei microrganismi probiotici (come i lattobacilli).

### **3.4 Salute degli astronauti e variazioni nel sistema immunitario**

Agli astronauti si richiedono particolari abilità e competenze per poter lavorare e svolgere mansioni in un ambiente confinato e in condizioni molto stressanti dal punto di vista fisiologico e psichico. Osteoporosi, atrofia muscolare, redistribuzione dei fluidi corporei, allungamento della colonna vertebrale e deficit nel sistema di orientamento ed equilibrio sono solo parte di una lunga serie di risposte dell'organismo alle condizioni di microgravità che, combinate con l'isolamento e il confinamento in un ambiente dalle dimensioni limitate, causano importanti conseguenze nell'interazione psicosociale e sulla salute.

Anche il sistema immunitario risulta compromesso dagli effetti delle missioni spaziali, presentando deficit di risposta alla presenza di patogeni. Tra i maggiori cambiamenti nelle funzioni del sistema immunitario sono stati riscontrati:

- inibizione indotta nella sintesi degli interferoni  $\alpha$  e  $\beta$ , normalmente impiegati dall'organismo per la loro funzione antivirale e antinfiammatoria;
- alterazioni nello sviluppo dei leucociti nel midollo e nella milza;
- inibizione delle cellule NK (Natural Killer)
- riduzione della dimensione del timo e della milza nei topi;
- diminuzione del numero di linfociti B e T e delle cellule eritroidi nel sangue.

Studi recenti dimostrano che il fattore di trascrizione p53 per la regolazione del ciclo cellulare e la soppressione delle cellule tumorali, risulta fortemente inibito dalle condizioni di microgravità;

Da studi sui cambiamenti dei linfociti, emerge inoltre un'anomala alterazione della molecola interleuchina-2 (IL-2), normalmente prodotta con funzione di mediatrice nella differenziazione dei linfociti T effettori.

I risultati riportano dunque che il corretto svolgimento del ciclo cellulare è gravità-dipendente nelle cellule che costituiscono il sistema immunitario in quanto, in assenza di essa, si riscontra una variazione globale nell'espressione di 1599 geni.

Nella capacità di riconoscimento dei patogeni, invece, risulta che in co-coltura con *E. Coli* produttori di enterotossina termolabile, i monociti hanno diminuito la capacità di fagocitare il batterio (ridotta espressione dei geni CD32 e CD64).

Gli effetti delle variazioni nella risposta del sistema immunitario sono stati già visibili durante alcune missioni "*Space Shuttle*", dove alcuni virus latenti (come *Herpes Virus*, *Epstein-Barr virus* e *cytomegalovirus*) si sono riattivati e hanno manifestato i sintomi delle patologie correlate in 14 dei 17 membri dell'equipaggio.



## CAPITOLO 4 – SICUREZZA MICROBIOLOGICA DELLO SPACE FOOD

### 4.1 Analisi dei pericoli e valutazione dei rischi nel consumo dello Space Food

#### 4.1.1 Pericoli microbiologici nello Space Food

Nei precedenti capitoli sono stati analizzati i microrganismi presenti a bordo della Stazione Spaziale Internazionale oltre che le variazioni nel metabolismo e nella crescita dei batteri patogeni che costituiscono un pericolo microbiologico nella produzione di alimenti destinati al consumo durante le missioni spaziali. La contaminazione da pericoli microbiologici nello Space Food può avvenire:

- durante le fasi di preparazione e confezionamento negli stabilimenti predisposti a Terra, coinvolge dunque gli alimenti appartenenti al *Normal Space Food* ed è determinata dai pericoli comunemente riscontrati nell'industria alimentare, ovvero: *Salmonella*, *Escherichia coli* (EHEC, EPEC, ETEC, EIEC), *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*.
- durante la fase di consumazione del prodotto in orbita, da attribuirsi alla possibilità di contaminazioni crociate tra i microrganismi presenti nelle superfici, aria e acqua della zona abitativa ed il prodotto alimentare esposto a tali condizioni. I generi batterici coinvolti sono: *Clostridium*, *Escherichia*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* e *Yersinia*.
- durante la coltivazione degli *space horticultural crops* nel corso delle missioni spaziali in quanto i microrganismi costituenti il microbiota della stazione spaziale stessa determinano una situazione di contaminazione primaria del prodotto.

#### 4.1.2 Rischio microbiologico per l'equipaggio

L'ingestione di microrganismi patogeni presenti negli alimenti, e/o delle loro tossine, comporta la comparsa di tossinfezioni, intossicazioni ed infezioni alimentari, patologie di gravità variabile in relazione alla tipologia di ospite target: il rischio di contrazione di tali patologie è infatti correlato a fattori come la dose infettante e la capacità di difesa del sistema immunitario umano, considerando soggetti in buono stato di salute come a rischio basso e soggetti con uno stato fisiologico alterato (immunocompromessi, bambini, anziani...) come a rischio alto.

Gli equipaggi delle missioni spaziali si classificano nella fascia di consumatori a rischio alto, in quanto maggiormente esposti alla comparsa di patologie correlate con l'alimentazione. I fattori determinanti sono da attribuirsi a:

- Deficit di risposta del sistema immunitario, caratterizzato da ridotta capacità di riconoscimento e fagocitazione dei patogeni;
- Incremento delle caratteristiche di virulenza, resistenza a stress ambientali e resistenza agli antibiotici dei patogeni;
- Ridotta disponibilità di efficaci misure di profilassi e supporto medico, determinata dalla lontananza delle strutture sanitarie e dalla ridotta capacità di azione dei principi attivi medicinali;
- Elevata trasmissibilità delle patologie a causa del confinamento in ambienti sigillati e contenuti nelle dimensioni.

La produzione degli alimenti destinati al consumo nello spazio deve pertanto tararsi su una fascia di consumatori a rischio alto ed una capacità dei microrganismi di svilupparsi e indurre patologie nettamente superiore.

## 4.2 Gestione dello Space Food a Terra

### 4.2.1 Requisiti microbiologici pre-volo

La sicurezza alimentare in ambiente spaziale rappresenta un complesso problema ancora in corso di studio. Al fine di garantire la conformità del cibo spaziale ai requisiti di qualità e sicurezza, la NASA ha imposto dei limiti massimi di carica microbica consentiti sia nelle aree di produzione, attrezzature ed imballaggi, sia nei prodotti alimentari finiti (Tabella 4.1)

Tabella 4.1 Limiti di carica microbica nei locali del JSC e negli alimenti pre-volo (NASA)

Area	Tipologia di campione	Limiti di carica microbica aerobia
Superfici	3 tamponi al giorno	3 UFC/cm <sup>2</sup>
Pellicole di imballaggio	2 campioni al giorno	
Utensili		
Aria	1 campione da 320 L al giorno	113 UFC/320L

Prodotto alimentare	Microrganismo	Limiti di carica microbica
Alimenti non termostabilizzati	Conta totale aerobia	2·10 <sup>5</sup> UFC/g
	Coliformi	10 <sup>2</sup> UFC/g
	Stafilococchi coagulasi +	10 <sup>2</sup> UFC/g

	<i>Salmonella</i>	Assenza/g
	Lieviti e muffe	10 <sup>3</sup> UFC/g
Alimenti sterilizzati (termostabilizzati ed irradiati)	Nessun microrganismo ricercato	Verifica dell'integrità degli imballaggi

#### 4.2.2 Modalità di prevenzione

I trattamenti tecnologici effettuati sugli alimenti destinati al consumo nello spazio sono mirati:

- Ad inattivare i microrganismi e le loro spore mediante la sterilizzazione del prodotto finito con trattamenti di termostabilizzazione e irradiazione;
- A controllare i fattori di crescita microbica endogeni, quali pH, attività dell'acqua (*A<sub>w</sub>*) ed umidità relativa del prodotto, ove un trattamento termico possa influire negativamente sulla componente nutrizionale.

Lo stabilimento di produzione si avvale della certificazione di sicurezza alimentare rilasciata dalla FDA (*Food and Drug Administration*), rispettando protocolli di analisi microbiologiche approfondite delle superfici, delle pellicole di imballaggio, delle attrezzature e dell'aria nell'area di produzione, con l'obiettivo di determinare la conta totale dei microrganismi aerobi. I prodotti sterilizzati sono sottoposti ad analisi microbiologiche dettagliate sia come materie prime che in forma di prodotto finito, al fine di determinare la conta totale dei microrganismi aerobi, dei coliformi fecali, degli stafilococchi coagulasi-positivi, di *Salmonella*, lieviti e muffe.

Nei prodotti imballati e sterilizzati si verifica l'integrità degli imballaggi ed eventuali rigonfiamenti, suddividendo la produzione in lotti contrassegnati da un numero di riconoscimento per garantire allerte rapide agli astronauti da parte della NASA.

La prevenzione rappresenta pertanto il sistema più efficiente per scongiurare il rischio di contrarre intossicazioni ed infezioni alimentari, il cui contenimento risulterebbe difficile a causa della permanenza dell'equipaggio in ambienti confinati e della mancanza di efficaci misure di profilassi.

#### 4.2.3 Conseguenze nel prodotto finito

La presenza di una componente microbica contaminante viva e vitale all'interno dei prodotti alimentari destinati al consumo nello spazio è una condizione che, sebbene infrequente, rappresenta una possibilità reale, poiché il rischio associato non è mai nullo. Le condizioni di

sviluppo e metabolismo dei principali microrganismi di interesse alimentare sono alterate in assenza di peso, e la conservazione dei prodotti alimentari a temperatura ambiente potrebbe favorire la proliferazione dei patogeni. Ciò comporterebbe un aumento della carica batterica totale nel prodotto, l'acquisizione di una maggiore capacità di virulenza di alcuni patogeni (tra cui *Salmonella* ed *Escherichia coli*) e una dose infettante inferiore, fattori che aumenterebbero l'esposizione dell'equipaggio ai batteri patogeni contaminanti. Pertanto, rispetto alle situazioni analoghe che si verificano sulla Terra, la fase di conservazione delle derrate di Space Food espone gli equipaggi ad un maggior rischio di incorrere in patologie di interesse alimentare.

### **4.3 Gestione dello Space Food durante le missioni**

#### **4.3.1 Fattori di rischio**

Alla luce di quanto esposto nel secondo capitolo del presente elaborato, tra i microrganismi presenti nelle superfici e nell'impianto idrico della Stazione Spaziale, sono stati rilevati batteri patogeni appartenenti ai generi *Clostridium*, *Escherichia*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* e *Yersinia*. In condizioni di microgravità, l'incremento nella produzione di biofilm batterico e, di conseguenza, l'aumento della biomassa totale nelle superfici, determinano il principale fattore di rischio per la sicurezza alimentare degli equipaggi nelle missioni spaziali rendendo maggiormente dispendiose e talvolta inefficaci le operazioni di pulizia e disinfezione, costituendo uno strumento di difesa batterica dagli agenti esterni.

#### **4.3.2 Contaminazioni crociate**

Il rischio microbiologico nello Space Food durante le missioni spaziali è da attribuirsi alla possibilità di incorrere in contaminazioni crociate, causando una migrazione dei microrganismi patogeni dagli ambienti confinati, ai prodotti in corso di consumazione.

Le principali fonti di contaminazione crociata degli alimenti sono:

- Le superfici interne, poiché in assenza di peso, gli astronauti si spostano tra segmenti della stazione spaziale mediante l'utilizzo di maniglie uniformemente distribuite su tutta la superficie, ricavando energia cinetica dalla spinta con gli arti superiori. Gli stessi vengono successivamente utilizzati per la consumazione dei pasti, in quanto in assenza di forza peso, il ruolo dei piatti e delle posate diventa irrilevante.

- L'impianto di distribuzione dell'acqua potabile, utilizzato per reidratare gli alimenti disidratati. Da analisi effettuate risulta contaminato da *Proteobacteria*, *phylum* a cui appartengono diversi generi patogeni.

Le contaminazioni crociate dello Space Food costituiscono un problema rilevante soprattutto quando il pasto non ultimato, viene stoccato a temperatura ambiente per essere consumato in un secondo momento; questo favorisce lo sviluppo dei microrganismi patogeni nell'aumento del numero di cellule e contribuisce ad aumentare il rischio di contrarre tossinfezioni, intossicazioni ed infezioni alimentari.

#### **4.4 Sicurezza microbiologica degli *Space Crops***

A differenza degli alimenti prodotti negli stabilimenti sulla Terra per il consumo nello spazio, i requisiti di sicurezza degli *space horticultural crops* variano a seconda dell'alimento e dei metodi di coltivazione. Ad oggi il piano HACCP risulta il più efficace nella gestione delle produzioni alimentari in microgravità. A questo si aggiungono le procedure di sicurezza nella gestione degli innesti a Terra e l'uso di guanti per la manipolazione nello spazio al fine di limitare il contatto tra il microbiota della ISS e i vegetali in fase di sviluppo prevenendo situazioni di contaminazione primaria del prodotto. Infatti, alcuni ortaggi coltivati a partire da semi sterilizzati sono stati analizzati a Terra riscontrando la presenza di microrganismi provenienti dalle superfici circostanti la piantagione ed una carica microbica totale superiore rispetto ai controlli effettuati nei laboratori, compresi alcuni batteri potenzialmente patogeni per l'uomo. La NASA riporta infatti un aumento annuale del 10% del rischio di esposizione a *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas* spp. dalla consumazione di lattuga e radicchio coltivati nello spazio

Per procedere alla consumazione gli *Space Crops* vengono sanitizzati mediante il delicato strofinamento di salviette igienizzanti, riducendo tuttavia solo parzialmente, la presenza di microrganismi contaminanti dannosi.

## CAPITOLO 5 – APPLICAZIONI, CONSIDERAZIONI E CONCLUSIONI

### 5.1 Relazioni con il sistema H.A.C.C.P.

Il concetto di Space Food e di alimentazione nello spazio appare tutt'oggi ancora molto distante dalla quotidianità; tuttavia, la sicurezza alimentare moderna ha trovato origine da alcune necessità direttamente collegate all'industria aerospaziale.

Nel 1962 il presidente degli Stati Uniti *J.F. Kennedy* annunciò lo sbarco sulla Luna entro la fine del decennio, accelerando lo sviluppo di tutte le tecnologie necessarie a portare a termine la missione. Tra queste vi era la necessità di produrre alimenti microbiologicamente stabili e sicuri per gli equipaggi delle missioni spaziali che iniziavano a diventare sempre più durevoli ed impegnative; i metodi di controllo in vigore erano tuttavia molto approssimativi e non garantivano un sufficiente abbassamento del rischio.

Fu così che la *NASA*, la *Pillsbury Company* ed i *U.S. Army National Research Laboratories* elaborarono un insieme di procedure standardizzate per il controllo del processo produttivo dello Space Food, basandosi sul principio della prevenzione mediante l'applicazione di tre principi fondamentali:

- Identificazione dei pericoli;
- Determinazione dei CCP (punti critici di controllo) per ogni pericolo riscontrato;
- Monitoraggio dei CCP individuati.

L'applicazione di queste procedure si rivelò efficace nel prevenire infezioni, tossinfezioni ed intossicazioni alimentari, portando la *Pillsbury Company* (maggior produttrice di cereali dell'epoca negli Stati Uniti) a presentare la metodologia alla conferenza nazionale per la sicurezza alimentare del 1971, con la proposta di espanderne il campo di applicazione a tutte le industrie alimentari e conserviere. In seguito, verificata l'efficacia del sistema esternamente alle missioni spaziali, l'insieme delle procedure venne migliorato e battezzato "HACCP" (*Hazard Analysis Critical Control Point*, in italiano Analisi dei pericoli e dei punti critici di controllo).

Ad oggi il sistema HACCP è un sistema standardizzato adottato da U.S.A, Canada ed Unione Europea, per l'applicazione del piano di autocontrollo. È costituito da 7 principi fondamentali e rappresenta il miglior sistema di gestione della sicurezza alimentare nel processo produttivo degli alimenti attualmente a disposizione.

## 5.2 Applicazioni future e conclusioni

Nei capitoli precedenti sono state analizzate le tecnologie attualmente a disposizione nella ISS per la gestione delle derrate alimentari e della sicurezza microbiologica dello Space Food, evidenziandone tuttavia i costi proibitivi per la loro realizzazione, alla sola portata di poche istituzioni. Questi sono tuttavia determinati per la maggior parte dalla loro destinazione, in quanto il solo costo di trasporto delle merci con un vettore di lancio spaziale comprende i costi del combustibile, del comburente, della manodopera, della manutenzione e soprattutto della gestione delle procedure per garantire l'incolumità delle persone sia sulla Terra che sulla ISS.

Lo scopo di tali investimenti si riflette esclusivamente nell'unicità delle condizioni in cui ci si ritrova: come esposto in questo elaborato, l'ambiente spaziale è rappresentato da una maggior esposizione della salute umana a pericoli di tipo microbiologico e da un'alterata osservazione dei principi della fisica e della chimica. Le condizioni precarie richiedono inoltre una maggiore capacità di adattamento, in quanto i rifornimenti dei beni primari sono estremamente limitati e sono necessarie procedure di risparmio ed ottimizzazione delle risorse. L'insieme di queste condizioni sono oggetto di studio dall'anno 2000 e come dimostrato, sono state individuate soluzioni efficaci e molto efficienti, dimostrando la capacità dell'uomo di sopravvivere e adattarsi a tali ostacoli.

Si noti dall'attualità come negli ultimi vent'anni le condizioni solo simulate agli inizi della missione ISS, stiano entrando gradualmente nella normalità e nella vita di tutti i giorni:

- La siccità e la carenza di acqua potabile prima solo in alcuni paesi del terzo mondo ed oggi, in parte, anche nei paesi più sviluppati, rappresenta un rilevante problema di attualità. Il *Water Recycling System* è stato progettato per riciclare il 90% dell'acqua nella Stazione Spaziale Internazionale, mediante la purificazione dei reflui di origine umana ed ha recentemente trovato applicazione in alcuni villaggi dell'Africa sub-sahariana e del Kurdistan (Turchia), garantendo alla popolazione locale una maggior quantità di acqua potabile priva di microrganismi patogeni.
- L'incremento della resistenza batterica agli antibiotici richiama l'attenzione crescente della comunità scientifica in quanto le attuali misure di profilassi potrebbero non rivelarsi più efficaci in un prossimo futuro. Lo studio del comportamento microbico in microgravità e la gestione delle patologie anche di interesse alimentare ha evidenziato come in tali condizioni vi sia un aumento della resistenza agli stress ambientali (a cui mirano peraltro i trattamenti tecnologici degli alimenti) e agli antibiotici. Lo sviluppo di nuove tecnologie ad

ostacoli e di nuove misure di profilassi, con conseguente sperimentazione in cellule batteriche alterate nello spazio, permette di prevenire ed imparare a gestire future criticità microbiologiche legate al trasferimento genico orizzontale di fattori di resistenza e mutazioni, prima nelle missioni spaziali a tutela della salute degli astronauti e in futuro sulla Terra a tutela della popolazione mondiale.

- Lo sviluppo di nuove tecnologie di conservazione dello Space Food, come ad esempio la liofilizzazione o l'essiccazione di alimenti comunemente non trattati in tale maniera si potrebbe esprimere nell'aumento della capacità di stoccaggio dei mezzi di trasporto, contribuendo a diminuire le emissioni di CO<sub>2</sub>.
- Il prolungamento della *shelf-life* nei prodotti destinati al consumo nello spazio trova applicazione nella politica della *Food Security*, ovvero la volontà di garantire l'accesso al cibo a tutta la popolazione del pianeta, normalmente contrastata anche dalla deperibilità dei prodotti alimentari.

In conclusione, la produzione dello Space Food deve essere controllata e gestita correttamente, in quanto le condizioni ambientali, fisiche e sociali che si riscontrano durante le missioni spaziali determinano un rischio per la salute degli equipaggi; il consumo di alimenti contaminati da microrganismi patogeni porterebbe a complicanze tendenzialmente peggiori rispetto a condizioni analoghe sulla terra che sono tutt'ora oggetto di studio. Il campo di applicazione non si limita tuttavia alle missioni spaziali, le quali rappresentano solamente una simulazione di alcune condizioni che avranno un impatto rilevante nella vita quotidiana di un futuro più o meno prossimo.



## BIBLIOGRAFIA

Bhatia, Sohini & Wall, K. & Kerth, Chris & Pillai, Suresh. (2017). **Benchmarking the Minimum Electron Beam (eBeam) Dose Required for the Sterilization of Space Foods**. Radiation Physics and Chemistry. 143. 10.1016/j.radphyschem.2017.08.007.

Cooper, Maya & Douglas, Grace & Perchonok, Michele. (2011). **Developing the NASA Food System for Long-Duration Missions**. Journal of food science. 76. R40-8. 10.1111/j.1750-3841.2010.01982.x.

Green, Macauley & Aylott, Jonathan & Williams, Paul & Ghaemmaghami, Amir & Williams, Philip. (2021). **Immunity in Space: Prokaryote Adaptations and Immune Response in Microgravity**. Life. 11. 112. 10.3390/life11020112.

Kim, Hye Won & Rhee, M.S.. (2020). **Space food and bacterial infections: Realities of the risk and role of science**. Trends in Food Science & Technology. 106. 275-287. 10.1016/j.tifs.2020.10.023.

Lee, Jessica Audrey & Brecht, Jeffrey & Castro-Wallace, Sarah & Donovan, Frances & Hogan, John & Liu, Tie & Massa, Gioia & Parra, Macarena & Sargent, Steven & Settles, A. & Singh, Nitin & Velez Justiniano, Yo-Ann. (2021). **Microbial food safety in space production systems**.

Pandith, Junaid & Neekhara, Somya & Ahmad, Saghir & Sheikh, Rayees. (2022). **Recent developments in space food for exploration missions: A review**. Life Sciences in Space Research. 36. 10.1016/j.lssr.2022.09.007.

Taylor PW (2015). **Impact of space flight on bacterial virulence and antibiotic susceptibility**. Infect Drug Resist. Jul 30;8:249-62. doi: 10.2147/IDR.S67275. PMID: 26251622; PMCID: PMC4524529

Watkins, Peter & Hughes, Joanne & Gamage, Thambaramala & Knoerzer, Kai & Ferlazzo, Mélanie & Banati, Richard. (2021). **Long term food stability for extended space missions: a review**. Life Sciences in Space Research. 32. 10.1016/j.lssr.2021.12.003.

Wilson, J & Ott, C. & Honer Zu Bentrup, Kerstin Honer & Ramamurthy, R & Quick, L & Porwollik, S & Cheng, P & McClelland, Michael & Tsaprailis, George & Radabaugh, T & Hunt, Andrea & Fernandez, D & Richter, E & Shah, M & Kilcoyne, Michelle & Joshi, Lokesh & Nelman, Mayra & Hing, S & Parra, Macarena & Nickerson, Cheryl. (2007). **Space flight alters bacterial gene expression and virulence and reveals a role for global regulator Hfq**. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 104. 16299-304. 10.1073/pnas.0707155104.

## SITOGRAFIA

NASA *Food Department*: <https://www.nasa.gov/content/space-food-systems>

ASI & ESA, progetto “avamposto42”: <https://avamposto42.esa.int/>

Agenzia Spaziale Italiana (ASI):

- <https://www.asi.it/2022/07/lolio-extravergine-doliva-italiano-e-in-orbita-ha-raggiunto-la-stazione-spaziale-internazionale/> (Bonus Food ASI)
- <https://www.asi.it/2021/11/giornata-dellulivo-lolio-extravergine-di-oliva-entra-nella-dieta-degli-astronauti/> (Bonus Food ASI)

Agenzia Spaziale Europea (ESA):

- [https://www.esa.int/Enabling\\_Support/Preparing\\_for\\_the\\_Future/Space\\_for\\_Earth/Space\\_for\\_health/Food](https://www.esa.int/Enabling_Support/Preparing_for_the_Future/Space_for_Earth/Space_for_health/Food)
- [https://www.esa.int/Science\\_Exploration/Human\\_and\\_Robotic\\_Exploration/Business/From\\_tubes\\_and\\_cubes\\_to\\_haute\\_cuisine - the refinement of space food](https://www.esa.int/Science_Exploration/Human_and_Robotic_Exploration/Business/From_tubes_and_cubes_to_haute_cuisine_-_the_refinement_of_space_food)
- [https://www.esa.int/ESA\\_Multimedia/Images/2017/09/Recycling\\_water\\_on\\_the\\_ISS\\_How\\_it\\_works\\_pt.\\_2](https://www.esa.int/ESA_Multimedia/Images/2017/09/Recycling_water_on_the_ISS_How_it_works_pt._2)