

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

FACOLTÀ DI SCIENZE MM. FF. NN.



Laurea Specialistica in Scienze della Natura

Studio sulla sopravvivenza di endospore  
batteriche in ambiente marziano

*Survival of bacterial endospores under martian environment*

**Relatore:** Ch.mo Prof. Giuseppe Galletta

*Dipartimento di Astronomia*

**Correlatore:** Ch.mo Prof. Giulio Bertoloni

*Dip. Istologia, Microbiologia e Biotecnologie  
Mediche*

**Laureanda:** Rosita Visentin

ANNO ACCADEMICO 2008 – 2009



*Ai miei genitori*

*A mio fratello*



# Indice

Sommario	iii
<b>1 L’Astrobiologia</b>	<b>1</b>
1.1 L’Astrobiologia e la ricerca sull’origine della vita . . . . .	2
1.2 I progressi nella ricerca e i temi affrontati . . . . .	2
1.2.1 Titano . . . . .	5
1.2.2 Encelado . . . . .	6
1.2.3 Europa . . . . .	7
1.3 L’esplorazione del pianeta Marte . . . . .	9
1.3.1 Caratteristiche generali . . . . .	10
1.3.2 La storia del pianeta rosso . . . . .	13
1.3.3 La Missione Viking . . . . .	15
1.3.4 La meteorite ALH84001 . . . . .	18
<b>2 La sopravvivenza nello spazio e su Marte</b>	<b>21</b>
2.1 Il problema della protezione planetaria . . . . .	22
2.2 Il genere <i>Bacillus</i> . . . . .	24
2.2.1 La sporulazione . . . . .	25
2.2.2 Meccanismi di resistenza agli UV . . . . .	27
<b>3 Materiali e Metodi</b>	<b>31</b>
3.1 LISA: Laboratorio Italiano di Simulazione Ambienti . . . . .	32
3.1.1 L’apparato sperimentale . . . . .	33
3.1.2 Modello UV . . . . .	35
3.1.3 Condizioni sperimentali . . . . .	36
3.2 Gli esperimenti . . . . .	37

3.2.1	Modalità di preparazione e raccolta spore . . . . .	37
3.2.2	Esposizione a UVC di cellule vegetative . . . . .	39
3.2.3	Allestimento vetrini per LISA ed esposizione . . . . .	41
3.2.4	Le prove di sopravvivenza a tempi lunghi a basse temperature: esposizione a -80° . . . . .	42
3.2.5	Problemi di contaminazione e prove di estrazione del DNA da spore . . . . .	42
<b>4</b>	<b>Risultati e discussione</b>	<b>49</b>
4.1	Sopravvivenza in ambiente marziano simulato . . . . .	49
4.2	Sopravvivenza alla disidratazione . . . . .	52
4.3	Sopravvivenza di cellule vegetative esposte a UVC . . . . .	53
<b>5</b>	<b>Conclusioni e sviluppi futuri</b>	<b>55</b>
	<b>Bibliografia</b>	<b>58</b>

# Sommario

Negli ultimi anni sono stati fatti notevoli passi avanti nel campo dell'esplorazione spaziale e numerose missioni sono state progettate allo scopo di scoprire eventuali tracce di vita al di fuori della Terra. Studi recenti hanno messo in luce l'esistenza di zone, all'interno del Sistema Solare, con condizioni favorevoli alla sopravvivenza e allo sviluppo di forme di vita. In particolare tale ricerca si è concentrata sul pianeta Marte, in quanto con composizione, storia geologica e caratteristiche più simili alla Terra. L'invio di sonde o *lander* in grado di atterrare sulla superficie planetaria ha sollevato il problema della contaminazione da parte di organismi terrestri. L'ambiente presente su Marte può essere letale agli organismi in quanto caratterizzato da temperature, pressione e composizione atmosferica molto diverse dalla Terra e soprattutto da radiazioni ultraviolette fortemente sterilizzanti. Tuttavia le specie appartenenti al genere *Bacillus*, in grado di formare endospore, sono tra gli organismi più resistenti a tali condizioni, di conseguenza assumono una particolare rilevanza negli studi sulla contaminazione e sopravvivenza planetaria.

In questo lavoro sono stati analizzati gli effetti dell'ambiente marziano, in particolare il forte irraggiamento UV, su endospore di varie specie batteriche e in particolare di *Bacillus pumilus* SAFR 032. Gli esperimenti sono stati condotti mediante l'utilizzo di un simulatore di ambienti estremi costruito presso l'Università di Padova: LISA, Laboratorio Italiano Simulazione Ambienti. All'interno del simulatore sono state mantenute le stesse condizioni presenti sulla superficie di Marte, ovvero temperatura di -80 °C, pressione di 7.5 mbar, atmosfera composta per il 95.5% di CO<sub>2</sub> e irraggiamento UVA, UVB e UVC. Le cinetiche di inattivazione di questa specie ne sottolineano la particolare resistenza alla radiazione ultravioletta, che si dimostra essere il principale fattore

biocida dell'ambiente marziano.



# Capitolo 1

## L'Astrobiologia

Negli ultimi decenni si sta assistendo ad uno sviluppo senza precedenti delle tecnologie legate all'esplorazione spaziale. A partire dal 1957, quando lo Sputnik 1 per primo si spinse al di fuori dell'atmosfera terrestre, sono stati fatti notevoli passi avanti nell'esplorazione dell'intero Sistema Solare fino ad arrivare, in tempi recenti, alla discesa di sonde automatizzate su altri pianeti. Inoltre si è fatto molto più stretto il rapporto tra due scienze quali l'Astronomia e la Biologia. La possibilità d'indagine in campo astronomico e spaziale, infatti, potrebbe permettere di dare delle risposte sull'esistenza di forme di vita al di fuori della Terra. L'acceso dibattito sulla possibilità o meno che possano esistere forme di vita extraterrestri ha spinto *in primis* numerosi scienziati a interrogarsi sul concetto stesso di vita e a indagare sugli ambienti in cui essa potrebbe essersi sviluppata.

In questo capitolo verranno introdotte le principali tematiche inerenti all'Astrobiologia, la disciplina che si occupa dei problemi connessi all'origine della vita, alla sua evoluzione e distribuzione nell'Universo. Verranno descritte le zone, all'interno del Sistema Solare, che più facilmente possono aver ospitato od ospitare organismi viventi. In seguito verrà approfondito il pianeta Marte, in quanto sembra essere il miglior candidato per questa ricerca ed è il principale protagonista dell'esplorazione spaziale degli ultimi anni.

## 1.1 L'Astrobiologia e la ricerca sull'origine della vita

L'Astrobiologia e la ricerca sull'origine della vita sono due campi di ricerca strettamente legati e, prima ancora di chiedersi se esistono altre forme di vita nella nostra Galassia o nell'Universo, bisogna porsi un'altra fondamentale domanda: quanto facilmente può nascere la vita? Dare una risposta a questa domanda è estremamente difficile, soprattutto perché la stessa definizione di vita è quantomai oggetto di controversia e numerosi sono gli esempi di organismi che sono ai limiti della vita così come noi la conosciamo, come ad esempio i virus, o addirittura strutture molto più semplici come i prioni o i nanobi. Quello che però accomuna la maggior parte degli studiosi dell'argomento è la convinzione che tutte le forme di vita presenti sulla Terra abbiano delle somiglianze notevoli, nonostante siano estremamente complesse ed eterogenee (basti pensare alle differenze in termini di forma e fisiologia all'interno dei domini Archaea, Eukarya e Bacteria). Sono infatti caratterizzate dalla medesima architettura di base, in particolare dagli stessi venti amminoacidi con una spiccata omochiralità, dagli stessi acidi nucleici, DNA e RNA, per la trasmissione dell'informazione genetica e dagli stessi elementi chimici. In particolare è da notare la presenza del fosforo, che è piuttosto raro nell'Universo rispetto al carbonio, l'azoto, l'ossigeno e l'idrogeno. Tutti questi fattori portano alla conclusione che la vita così come la osserviamo oggi non sia altro che la naturale eredità evolutiva di un organismo primordiale, LUCA (*Last Universal Common Ancestor*) [1]. Anche se si è ancora lontani dal dare delle risposte certe a queste importanti questioni, negli ultimi anni, soprattutto col progresso della scienza e dell'esplorazione dello spazio, si possono fare delle considerazioni preliminari che possono fungere da guida nelle ricerche future.

## 1.2 I progressi nella ricerca e i temi affrontati

La Terra si è formata attorno a 4.6 miliardi di anni fa all'interno di un disco di gas e polveri detto disco protoplanetario che ruotava intorno al protosole. Nella

sequenza di eventi che ha portato all'emergere della vita a partire da particelle elementari, un passo fondamentale è di sicuro la formazione delle prime più semplici molecole prebiotiche. L'aggregazione di elementi chimici quali idrogeno, ossigeno, carbonio e il fosforo per formare molecole e la loro evoluzione chimica avvengono continuamente nell'Universo, come suggerito dall'identificazione di più di cento molecole nel mezzo interstellare [2, 3]. E' un dato di fatto quindi che nell'Universo siano presenti molecole di tipo organico. Prove di questo si possono avere sia dall'analisi dei dati raccolti dalle sonde inviate nello spazio [4, 5, 6], sia da analisi effettuate con spettrometri direttamente sulla Terra [7]. Un'altra importante fonte di informazioni in questo campo viene dall'analisi delle meteoriti rinvenute direttamente sul nostro pianeta.

Le Meteoriti, corpi rocciosi o metallici di dimensione variabile con caratteristiche fisiche e chimiche assai eterogenee, rappresentano un campo di studio privilegiato, in quanto permettono analisi piuttosto sofisticate direttamente nei laboratori sulla Terra. Alcune di esse, le cosiddette Condriti Carbonacee (una fra le più note è la meteorite Murchinson), sono particolarmente ricche di carbonio e sembrano essersi formate direttamente per condensazione nel disco protoplanetario. In questo tipo di meteorite sono stati rinvenuti tutta una serie di composti volatili, come gli idrocarburi policiclici aromatici (PAHs), numerosi amminoacidi e addirittura delle basi azotate, quali le purine e le pirimidine [8, 9, 10]. Su questa base si comprende come lo studio sull'origine della vita nel nostro pianeta sia strettamente legato alla presenza di molecole prebiotiche nello spazio. Non bisogna infatti dimenticare che la Terra è soggetta, giornalmente, a una pioggia incessante di materiale extraterrestre sotto forma di polveri, meteoriti, o piccole comete che la arricchiscono continuamente di acqua [11]. Se attualmente cadono sulla Terra 17000 ton/anno di materiale extraterrestre, principalmente oggetti più piccoli di 1 mm, l'entità di questo bombardamento incessante è stata molto maggiore nelle prime fasi dopo la nascita del nostro pianeta [12]. Altre ricerche sono in atto per provare quale può essere la resistenza di molecole prebiotiche a lunghe permanenze nello spazio. Infatti tali sostanze sono sottoposte a numerosi tipi di stress nello spazio, primo fra tutti la continua esposizione alla radiazione cosmica che tende a

romperle e scinderle in composti più semplici [6].

La comparsa della vita sulla Terra è datata almeno a 3.5 Ga, ovvero l'età di alcune rocce studiate in Australia (Pilbara) e in Sud Africa (Barberton) in cui sono presenti delle strutture interpretabili come fossili e stromatoliti.

Lo studio di questi organismi ha rivelato forme già piuttosto evolute e differenziate, portando a pensare che l'evoluzione biologica sia ben anteriore. Purtroppo non ci sono prove certe a favore di questa tesi, in quanto le rocce della crosta terrestre sono state sottoposte a stress che non hanno permesso la conservazione di fossili più antichi. Tuttavia misure recenti sugli isotopi del carbonio sembrano far propendere per la presenza di forme di vita prima di 3.7 Ga [13].

Sono state formulate numerose ipotesi di ambienti che avrebbero potuto permettere la nascita della vita primordiale sulla Terra. A partire dai primi esperimenti di Urey e Miller [14], che hanno dimostrato la formazione di aminoacidi a partire da un cosiddetto brodo primordiale in condizioni riducenti o neutre [15], sono stati fatti numerosi passi avanti nella conoscenza dei processi prebiotici. Attualmente molti gruppi di ricerca sembrano ipotizzare due ambienti diversi sull'origine dei principali composti che hanno portato allo sviluppo della vita sulla Terra: i grandi vulcani subaerei e le sorgenti idrotermali sottomarine. Infine è necessario sottolineare che numerose sono le controversie sulle modalità di formazione della vita e su quali ne siano stati i precursori. Attualmente la comunità scientifica sembra propendere per un cosiddetto Mondo a RNA primordiale.

La vita così come noi la conosciamo ha bisogno di condizioni piuttosto particolari per potersi sviluppare, di qui la necessità di prendere in esame gli ambienti presenti nel nostro Sistema Solare più simili alla Terra. In particolare si parla di zona di abitabilità di un sistema planetario: la fascia di spazio in cui è presente acqua allo stato liquido sulla superficie di un pianeta roccioso. Nel Sistema Solare questa zona inizia poco al di fuori dell'orbita di Venere e termina poco prima dell'orbita di Marte. Bisogna però considerare che la presenza d'acqua non è legata solo all'energia della stella vicina ma anche a numerosi altri fattori, come l'effetto serra e l'attività vulcanica, entrambi soggetti a

	Sistema Planetario	Raggio (km)	Massa (kg)	Densità media (g/cm <sup>3</sup> )
Terra		6378	$5,976 \times 10^{24}$	5,52
Marte		3398	$6,424 \times 10^{23}$	3,93
Titano	Saturno	2575	$1,35 \times 10^{23}$	1,88
Encelado	Saturno	249	$7,30 \times 10^{19}$	1,12
Europa	Giove	1565	$4,80 \times 10^{22}$	2,99

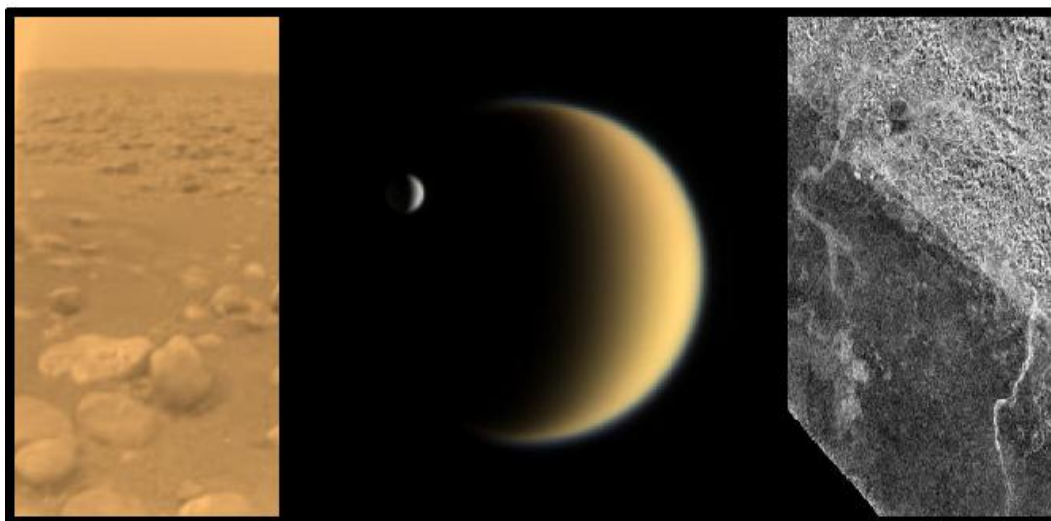
**Tabella 1.1:** Caratteristiche dei principali corpi celesti oggetto di ricerche.

variazioni nel corso della storia geologica del pianeta. Inoltre, alcune forme di vita sono in grado di svilupparsi a temperature anche molto basse (i batteri *psicrofili* [16]), per cui la ricerca della vita nel sistema solare si estende oltre la fascia di abitabilità, fino a comprendere alcuni satelliti di Giove e Saturno. Tali satelliti, oltre a essere i migliori candidati per la ricerca di possibili forme di vita, possono comunque essere considerati dei veri e propri laboratori di chimica abiotica o prebiotica. Alcuni di questi corpi celesti verranno discussi in seguito. In Tabella 1.1 ne vengono riportate le caratteristiche principali.

### 1.2.1 Titano

Titano è il più grande fra i 31 satelliti di Saturno e recentemente è stato fra gli oggetti di studio della Missione Cassini-Huygens; il *lander* Huygens, staccatosi dalla sonda Cassini, è riuscito ad atterrare sulla superficie del satellite il 14 gennaio del 2005 (Figura 1.1).

Titano, le cui dimensioni sono circa la metà della Terra, è formato da un nucleo roccioso circondato da un'atmosfera estremamente spessa. Essa è dovuta alla bassissima temperatura (la temperatura superficiale è attorno ai  $-180$  °C), infatti le molecole di gas non hanno energia cinetica sufficiente a lasciare il satellite, nonostante la velocità di fuga sia piuttosto bassa. L'azoto costituisce il 98.4% dell'atmosfera di Titano; il rimanente 1.6% è composto da metano e da tracce di vari idrocarburi. In particolare, alla sommità delle nubi che ricoprono Titano, i raggi UV tendono a dissociare le molecole organiche, le quali formano polimeri di tolina (un solido organico; dal greco *tholos*, fangoso) che precipitano al suolo. Uno spesso strato di foschia, causato dalla dissocia-



**Figura 1.1:** Immagini provenienti dalla Missione Cassini-Huygens: al centro sono visibili Titano e, più piccolo, Encelado. A sinistra suolo fotografato nel luogo d’atterraggio del *lander*. A destra l’immagine dei canali di drenaggio presenti nella regione di Xanadu ottenuta dal radar della sonda Cassini.  
(Foto: NASA/JPL)

zione delle molecole negli strati superiori, provoca un considerevole aumento dell’albedo e il conseguente abbassamento della temperatura superficiale.

La sua superficie è liscia e porta chiari segni di attività erosiva dovuta alla presenza di un liquido, sono infatti presenti fango, canali di drenaggio e laghi di etano. Tutto ciò fa ipotizzare la presenza di un ciclo del metano o etano molto simile al ciclo dell’acqua sulla Terra. Inoltre sembra essere confermata la presenza di attività criovulcanica, ovvero attività vulcanica a bassa temperatura con eruzione di acqua, ammoniaca o composti del metano.

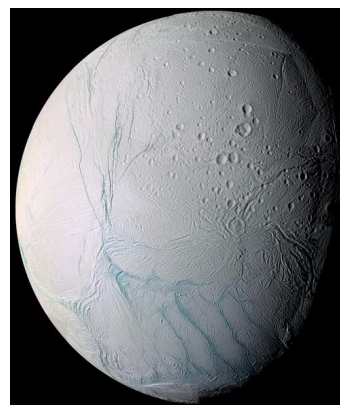
### 1.2.2 Encelado

Tra i satelliti di Saturno si può poi nominare Encelado, il quale ha un diametro di soli 507 km, solo un settimo del diametro della Luna, e orbita nella regione più densa dell’anello E di Saturno.

La sonda Cassini ha effettuato diversi sorvoli ravvicinati nel 2005, rivelando dettagli della superficie di questo satellite, che si possono vedere in Figura 1.2, e facendo delle scoperte assai interessanti dal punto di vista astrobiologico [17].

In particolare la sonda ha osservato, nella regione polare sud, una serie di pennacchi formati da materiale eiettato nello spazio. Il meccanismo che li genera è molto probabilmente analogo a quello dei geysers terrestri, in quanto causato dalla presenza di sacche di liquidi ad alte pressioni sotto la superficie. L'analisi della composizione dei gas ha rilevato principalmente vapore acqueo assieme a elementi minori come azoto, metano e anidride carbonica. Inoltre nel luglio 2005 lo spettrometro infrarosso (CIRS) ha potuto rilevare una regione calda vicino al polo sud, con temperature attorno a 85 - 90 K e delle piccole aree che raggiungevano i 157 K. Queste temperature sono troppo elevate per essere causate dal riscaldamento solare, quindi alcune zone della regione polare sono riscaldate dall'interno del satellite.

Encelado riflette quasi il 100% della luce solare e, viste le ridotte dimensioni, la presenza di un nucleo geologicamente attivo è da ricercarsi principalmente nelle intense forze mareali dovute a Saturno e al rapporto di risonanza 2:1 con un altro satellite, Dione. Le scoperte fatte dalla sonda Cassini negli ultimi anni e la presenza di pochi crateri da impatto nel polo sud, indicano che Encelado è attualmente geologicamente attivo, infatti una parte della superficie è relativamente giovane, avendo meno di 100 milioni di anni. Assieme alle analisi chimiche del pennacchio, queste scoperte hanno alimentato le speranze che Encelado possa diventare un promettente oggetto di studio nel campo dell'Astrobiologia, in quanto è stata accertata la presenza di acqua, forse allo stato liquido [18].

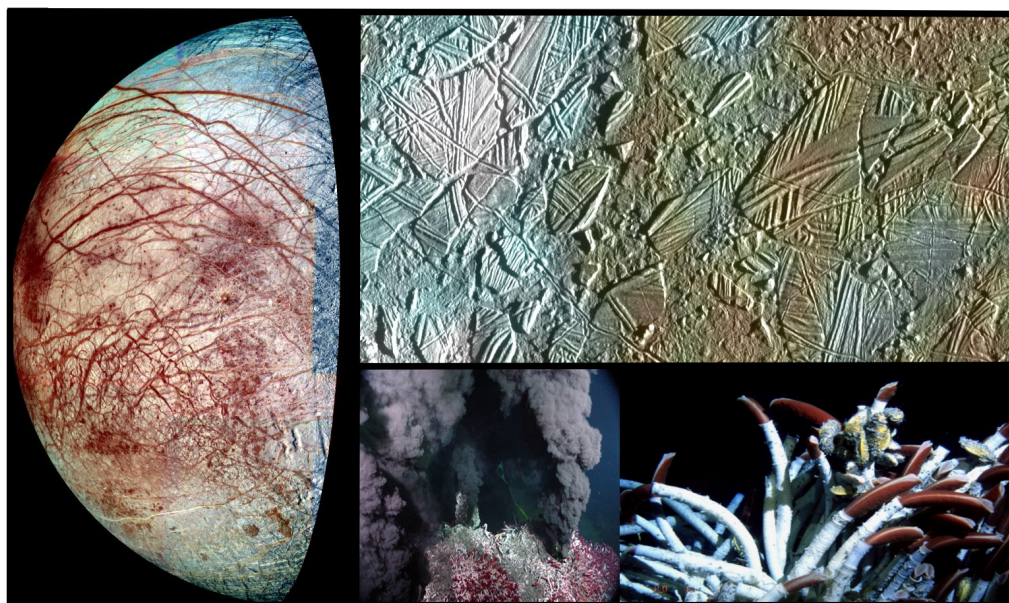


**Figura 1.2:** Mosaico di immagini scattate dalla sonda Cassini durante dei sorvoli nel 2005. (Foto: NASA/JPL/Space Science Institute)

### 1.2.3 Europa

Altro satellite piuttosto interessante dal punto di vista astrobiologico è Europa, uno dei quattro grandi satelliti di Giove scoperti da Galileo nel 1610.

Europa ha dimensioni paragonabili alla Luna e presenta delle caratteristiche molto particolari. La sua superficie ha un albedo molto alto, di 0.64 (la



**Figura 1.3:** La superficie ghiacciata di Europa così come si è presentata alla Sonda Cassini, si noti l'estesa fratturazione visibile ingrandita in alto a destra. In basso comunità chemiotrofiche che vivono attorno ai cosiddetti *black smokers*, le sorgenti idrotermali sottomarine. (Foto: NASA/JPL/Space Science Institute)

Terra, per confronto, solo di 0.37 - 0.39) dovuto alla presenza di uno spesso strato di ghiaccio che lo ricopre interamente. La vicinanza a un pianeta di enormi dimensioni come Giove provoca degli sforzi tensionali notevoli in questo satellite, di conseguenza le forze mareali, fornendo calore, lo rendono in parte attivo geologicamente (anche se in misura molto minore rispetto al vicino satellite Io); ciò è provato dalla presenza di pochissimi crateri da impatto sulla sua superficie. Una delle caratteristiche peculiari di questo satellite è la presenza di lunghe fratture sulla sua superficie (Figura 1.3) dovute alla rottura dello strato di ghiaccio superficiale. Queste fratture spesso sono disallineate di alcuni chilometri e sono spiegabili se si ipotizza la presenza di un oceano liquido sottostante sul quale galleggerebbe lo strato di ghiaccio superficiale.

Attualmente una teoria molto accreditata prevede l'esistenza di un oceano d'acqua salata e clatrati di metano e ammoniaca profondo più di 100 km al di sopra del mantello roccioso. Ad avvalorare questa ipotesi vi è l'analisi dei dati magnetometrici forniti dalla sonda Galileo che, partita dalla Terra nel 1989, ha raggiunto il sistema gioviano nel 1995. Questi dati dimostrano che a una



profondità compresa tra i 5 e 20 km esiste uno strato di materia in grado di condurre corrente elettrica. Secondo modelli attualmente in studio, uno strato salmastro, simile a quello presente negli oceani terrestri, sarebbe in grado di riprodurre perfettamente le variazioni del campo magnetico osservate [19].

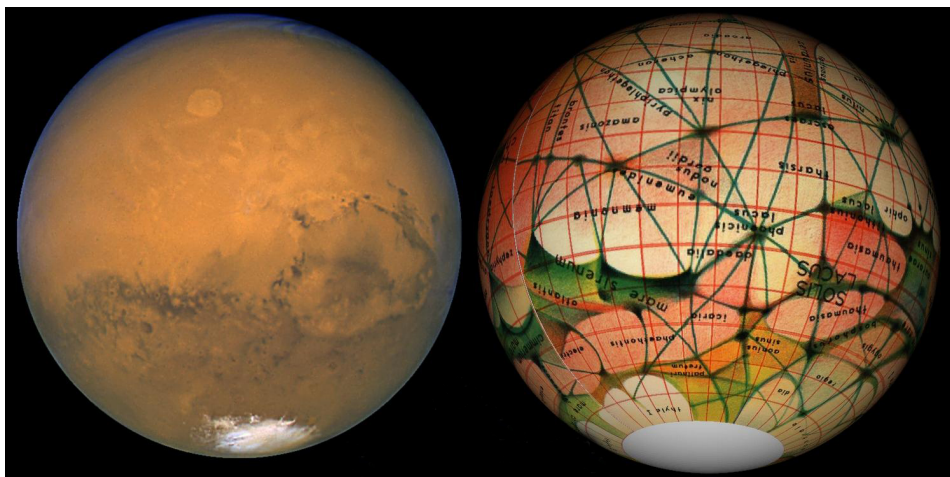
La temperatura sulla superficie di Europa è di circa 110 K (-163 °C) all'equatore e di solo 50 K (-223 °C) ai poli, ma le temperature sul fondale dell'oceano sarebbero molto maggiori. È stato ipotizzato che, al di sotto della superficie di Europa, possano essersi sviluppati ambienti molto simili alle sorgenti idrotermali sottomarine presenti sulla Terra [20, 21].

Le sorgenti idrotermali sottomarine, i cosiddetti *black smokers*, sono state scoperte attorno alla fine degli anni '70 e sono zone ricche di sfiatatoi vulcanici che emettono gas ricchi in solfuri. Attorno a essi esistono interi ecosistemi formati principalmente da Archaea e Estremofili (Figura 1.3) il cui metabolismo non si basa sull'energia solare ma sullo zolfo e sulla radiazione infrarossa emessa da questi sfiatatoi. Alcuni scienziati ipotizzano che su Europa possano esistere o essere esistite forme di vita di questo tipo. Inoltre una delle teorie sull'origine della vita, la cosiddetta Teoria del mondo a Ferro-Zolfo, prevede che la vita primordiale abbia avuto origine su superfici minerali, come le piriti ferrose, presso fonti idrotermali profonde [22].

Nella sezione successiva viene presentato il pianeta Marte, che più di ogni altro sembra essere il miglior candidato per aver ospitato la vita, in quanto con composizione, storia geologica e caratteristiche più simili alla Terra.

### 1.3 L'esplorazione del pianeta Marte

*“Marte non ha nulla di particolare che io sappia. I suoi giorni sono leggermente più lunghi di quelli della Terra e i suoi anni ne valgono due dei nostri all'incirca. È cinque volte più piccolo di noi e vede il Sole un po' meno grande e meno vivace di come lo vediamo noi”*



**Figura 1.4:** Marte ripreso dal telescopio spaziale Hubble nell'agosto del 2003 e, più a destra, una mappa raffigurante i “canali” di Marte. Questa mappa si basa sui disegni di Eugène Michael Antoniadi (1870-1940), un astronomo greco che, inizialmente concorde con l'esistenza dei “canali”, in seguito a osservazioni successive arrivò alla conclusione che si trattasse di illusioni ottiche.

(Foto: NASA, Roy A. Gallant, Lowell Hess, HST)

Marte, che da Fontenelle non era ritenuto un pianeta promettente per la ricerca di vita extraterrestre, è invece uno dei luoghi del Sistema Solare che nei secoli ha incuriosito maggiormente l'opinione pubblica e attirato l'interesse della comunità scientifica. A partire dai primi anni dell'Ottocento si sono intensificati gli studi su questo pianeta a opera di scienziati quali William Herschel, Richard Proctor, Giovanni Virgilio Schiaparelli<sup>1</sup> e molti altri (Figura 1.4). La prova definitiva della non esistenza di vita intelligente su Marte arriverà molto più tardi, il 15 luglio del 1965, quando il Mariner 4, sorvolando per la prima volta il pianeta, invierà sulla Terra immagini di un mondo completamente deserto e intensamente craterizzato, con profondi canyons e vulcani giganti.

### 1.3.1 Caratteristiche generali

Marte, quarto pianeta del Sistema Solare, ha dimensioni doppie rispetto alla Luna, e solo il 53% rispetto alla Terra (Tabella 1.2).

<sup>1</sup>Fu Schiaparelli, tra l'altro, a scoprire i cosiddetti *canali* di Marte. A causa di un eccesso di immaginazione e probabilmente di una traduzione in inglese errata (furono tradotti in *canals*, canali artificiali, e non in *channels*), questi canali fecero credere all'esistenza di forme di vita intelligenti e intere civiltà su Marte (Figura 1.4).

	Terra	Marte
periodo di rotazione	23 <sup>h</sup> 56 <sup>m</sup> 4 <sup>s</sup>	24 <sup>h</sup> 37 <sup>m</sup> 23 <sup>s</sup>
inclinazione dell'orbita	23°27'	25°19'
velocità di fuga (km/s)	11,2	5
temperatura superficiale media	288 K (15 °C)	210 K (- 64 °C)
pressione atmosferica (mbar)	1036	7 - 9
composizione dell'atmosfera	N <sub>2</sub> (78,08%) O <sub>2</sub> (20,95%) Ar (0.93%)	CO <sub>2</sub> (95,32%) N <sub>2</sub> (2,7%) Ar (1,6%)

**Tabella 1.2:** Caratteristiche fisiche della Terra e di Marte

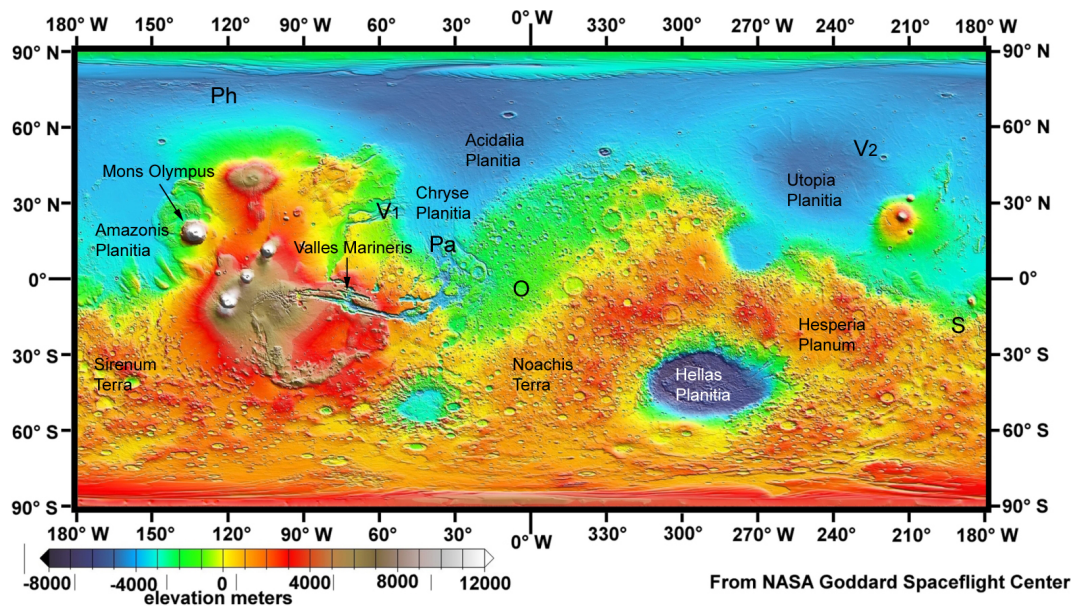
Innanzitutto i suoi due emisferi hanno caratteristiche geomorfologiche nettamente diverse in quanto soggetti a processi evolutivi differenti. In particolare la zona a sud ha un'altitudine media di 4 km sopra il raggio medio planetario, mentre la parte a nord è di 4 km sotto la media (Figura 1.6).

La zona meridionale è formata da un altopiano con numerosi crateri da impatto, di dimensioni maggiori di quelli presenti nella Luna, con fondo piuttosto piatto ed evidenti segni di erosione che ne hanno smussato le pareti, originariamente aspre. Nella Noachis Terra e nei terreni più antichi e craterizzati dell'emisfero australe si osserva una estesa rete di vallate (Figura 1.5) che possono essersi originate per scorrimento di un liquido. Così come accade nella Terra sono formate da una rete piuttosto estesa di canali tributari e presentano ampi meandri dovuti al rallentamento del flusso e al deposito di terreno e rocce trasportate.

L'emisfero boreale si presenta molto più liscio e uniforme, probabilmente a causa dell'intenso vulcanismo che lo ha interessato. I numerosi vulcani di Marte sono vulcani a scudo e possono raggiungere dimensioni immense: il Mons Olympus raggiunge i 600 km di larghezza e 25 km d'altezza. La zona a nord è molto più giovane rispetto al resto del pianeta e, secondo alcuni scienziati, avrebbe ospitato un vasto oceano [24, 17]. Questo Oceano si sarebbe esteso, con una profondità attorno ai 1000 metri, dalle basse pianure di Chryse e Acidalia Planitia a Utopia fino ad Amazonis (le zone a minor altitudine nella Figura. 1.6). La sua esistenza sarebbe



**Figura 1.5:** Hebris Vallis



**Figura 1.6:** Carta altimetrica di Marte ottenuta dal Mars Orbiter Laser Altimeter, strumento che ha raccolto dati dal 1996 al 2006 dalla sonda Mars Global Surveyor (MGS). Sono indicati inoltre i punti di atterraggio dei *lander*: Viking 1 e 2 (V<sub>1</sub>, V<sub>2</sub>), Pathfinder (Pa), Spirit (S) e Opportunity (O), Phoenix (Ph). (Foto: NASA)

provata dalla superficie smussata dell'emisfero nord, caratterizzata da basse pendenze, e dall'esistenza di dislivelli interpretati da molti come possibili linee di costa [25].

Altre strutture geomorfologiche caratteristiche dell'ambiente marziano sono crepacci, canali, morene, circhi e cosiddette "valli a U", tutte forme legate alla presenza di ingenti quantità di ghiaccio e assimilabili a quelle di origine glaciale o periglaciale presenti in varie zone della Terra (Groenlandia, Islanda) [17]. Le stesse calotte polari sono occupate da estesi mantelli di ghiaccio e polvere che ricoprono con uno spessore di 3-4 km fino al 30% della superficie del pianeta durante la stagione invernale, mentre in estate si riducono notevolmente. Queste calotte sono formate da anidride carbonica ghiacciata (ghiaccio secco) e, al di sotto, uno strato di ghiaccio d'acqua; mentre il ghiaccio sottostante si mantiene per tutto l'anno, l'anidride carbonica durante l'estate sublima, in particolare al polo nord e viene rilasciata nell'atmosfera [26]. Sono state calcolate infatti temperature estive che arrivano a 205 K al polo nord, di molto superiori ai 148 K: la temperatura di sublimazione della CO<sub>2</sub> [27]. Studi recenti dimostrano che la quantità di acqua presente al polo sud sotto forma

di ghiaccio sarebbe sufficiente a ricoprire interamente il pianeta con uno strato di acqua profondo 11 metri [28]. Queste massicce calotte ghiacciate presentano una particolare stratificazione orizzontale, con variazione sia nello spessore che nell'albedo dei vari strati. Una tale stratificazione, dovuta a un diverso apporto di polveri, è legata a variazioni nell'intensità dei venti che spazzano la superficie del pianeta, e quindi alle variazioni climatiche avute durante la deposizione dei vari strati [29].

L'atmosfera di Marte riflette la storia geologica del pianeta ed è composta principalmente da anidride carbonica, contiene solo tracce di vapore acqueo (0.03%) e ossigeno (0.13%) e la pressione atmosferica a livello del suolo è solo l'1% di quella terrestre. L'argon è presente in quantità relativamente alte (0.93%), a testimonianza del fatto che questo pianeta doveva avere un'atmosfera molto più densa nel passato (da 10 a 100 volte più spessa dell'attuale) [30]. Gli atomi di argon infatti sono piuttosto pesanti, 40 Da e difficilmente riescono a sfuggire dal pianeta, inoltre l'argon è inerte e non forma composti al suolo. Nonostante l'atmosfera sia estremamente rarefatta è caratterizzata da venti molto forti e vaste tempeste di sabbia che talvolta coprono l'intero pianeta per mesi.

Un'atmosfera di questo tipo ha una piccolissima inerzia termica e questo provoca una notevole e assai rapida variazione di temperatura al suolo con un'escursione termica giornaliera che arriva a 60 gradi e un gradiente termico verticale che può raggiungere i 10 gradi tra il suolo e 1 metro d'altezza [31]. La temperatura massima registrata è di 27 °C d'estate, mentre d'inverno, ai poli, le temperature possono abbassarsi fino a -143 °C.

### 1.3.2 La storia del pianeta rosso

Marte, nonostante le sue ridotte dimensioni, ha avuto un'evoluzione molto simile a quella della Terra e di Venere. Si è originato anch'esso dalla fusione e aggregazione di planetesimi attorno a 4.6 Ga fa e ha subito una differenziazione interna in nucleo, mantello e crosta superficiale. Successivamente è stato oggetto di un fitto bombardamento iniziale che ha dato origine ai più antichi e ampi bacini dell'emisfero sud. Studi sulla densità dei crateri d'impatto sul-

la superficie di Marte hanno permesso di identificare tre grandi periodi nella storia geologica di questo pianeta. Inoltre, mediante l'analisi delle dimensioni di questi crateri, si sono recuperate preziose informazioni sull'evoluzione dell'atmosfera del pianeta. La storia geologica di Marte è così suddivisa:

- Il primo periodo, dalla formazione del pianeta fino a circa 3.8-3.5 Ga, è detto *Noachiano*, dalla regione intensamente craterizzata Noachis Terra. A questo periodo risalgono anche le forme erosive dovute all'acqua descritte in precedenza: le reti di vallate che caratterizzano l'emisfero sud.
- Successivamente il pianeta è stato interessato da un'intensa attività vulcanica, infatti lo scorrimento di lava basaltica è rinvenibile in tutto il pianeta e ha ricoperto parzialmente i crateri noachiani. Hesperia Planum, un altopiano dell'emisfero sud, dà il nome a questo periodo, l'*Esperiano*, che è durato fino a circa 1.8 miliardi di anni fa. L'atmosfera di tipo vulcanico, composta principalmente di CO<sub>2</sub>, presente attualmente su Marte risalirebbe a questo periodo.
- E' nell'*Amazoniano* (da Amazonis Planitia, un bassopiano nell'emisfero nord) che Marte assume le caratteristiche attuali. Le dimensioni piuttosto ridotte del pianeta e la sua distanza dal Sole, circa doppia rispetto alla Terra, hanno provocato una progressiva diminuzione del calore interno e il pianeta è diventato geologicamente inattivo. La maggior parte dei gas che componevano l'atmosfera sono sfuggiti a causa della bassa velocità di fuga del pianeta e non hanno dato origine al riscaldamento per effetto serra che si ritrova in pianeti con origini simili come la Terra e Venere. Il vento solare e la radiazione UV, non più schermati dall'atmosfera o dal campo magnetico, hanno spazzato via dalla superficie una buona quantità di gas e dissociato l'acqua in idrogeno e ossigeno. Una buona parte di questo ossigeno si ritrova ancora su Marte e forma gli ossidi di ferro che rendono tale il "*Pianeta Rosso*".

Studi recenti basati sull'analisi dei dati ottenuti dall'OMEGA (Visible and Infrared Mineralogical Mapping Spectrometer) a bordo della sonda Mars Ex-

press, hanno proposto una cronologia alternativa basata invece sulla composizione mineralogica della superficie del pianeta [32]. Questa suddivisione cronologica divide la storia del pianeta in tre periodi:

- Il primo periodo (*Phyllocian*) sarebbe durato dalla formazione del pianeta fino a circa 4 Ga fa. Questo periodo, come indica il nome, è caratterizzato dalla presenza di grandi quantità di fillosilicati, di argille, in particolare fillosilicati ricchi in ferro o alluminio (come la Montmorillonite). Questi minerali si sarebbero formati in un ambiente ricco in acqua e alcalino. Secondo molti autori sono da ricercarsi in questi depositi rocciosi le eventuali tracce di vita su Marte [33].
- Il *Theiikian*, durato fino a circa 3500 milioni di anni fa, è caratterizzato da intensa attività vulcanica con il conseguente aumento dell'anidride solforosa nel pianeta. Quest'ultima avrebbe formato, combinandosi con l'acqua, i solfati di ambiente acido tipici di questo periodo.
- Infine il *Siderikian*, che si estende fino all'epoca attuale, è caratterizzato dalla fine del vulcanismo e dall'assenza di acqua allo stato liquido in superficie. E' ascrivibile a questo periodo l'intensa ossidazione delle rocce ricche in ferro.

Numerose missioni, a partire dagli anni '60, hanno permesso di conoscere molto sulla superficie di questo pianeta. In particolare grazie all'utilizzo dei *lander* sono stati fatti numerosi passi avanti nella caratterizzazione del suolo di Marte e sulla sua geomorfologia. Si ricordi a questo proposito il Viking 1 e 2 (1976), il Pathfinder (1997), i Mars Exploration Rovers (Spirit e Opportunity, 2004) e, più recentemente la missione Phoenix (2008) .

### 1.3.3 La Missione Viking

Le due sonde spaziali Viking 1 e 2, lanciate da Cape Canaveral (Florida) nel 1975, erano dotate di particolari strumentazioni in grado di analizzare il suolo marziano e portare a termine esperimenti di tipo biologico. Due sezioni di queste sonde, i *lander*, raggiunsero la superficie di Marte atterrando in due

zone distinte dell'emisfero nord, Chryse Planitia (22.3° N) e Utopia Planitia (47.7° N), nell'estate del 1976.

A bordo dei *lander* erano presenti, oltre a sensori di temperatura e pressione, il GCSM, uno strumento composto da un Gas Cromatografo e uno Spettrometro di Massa, che aveva lo scopo di analizzare il suolo di Marte e una camera sterile dove vennero eseguiti 3 esperimenti mirati alla ricerca di eventuali forme di vita [34].

Il GCSM ha analizzato il  $\delta C^{13}$  dei campioni di suolo alla ricerca di un eventuale arricchimento di  $^{12}C$  nel terreno, ovvero la forma di carbonio metabolizzata nelle forme di vita. Inoltre si deve considerare che Marte, così come la Terra, è stato interessato dal Grande Bombardamento Iniziale e i meteoriti, caduti in grande quantità in questo periodo, sono andati a far parte del suolo di questo pianeta. Il valore del  $\delta C^{13}$  avrebbe dovuto tener conto della presenza del carbonio meteoritico, invece si è rivelato di molto inferiore a quello previsto, ponendo interrogativi sulla presenza di processi (ossidazione, radiazione ultravioletta) in grado di abbassare il contenuto di  $^{12}C$ , sia esso di natura meteoritica o biologica, fino ai valori osservati.

I tre esperimenti effettuati all'interno del *lander* prevedevano la raccolta di un certo quantitativo di suolo mediante un braccio meccanico e la ripetizione di 3 cicli per ogni singolo esperimento. Inoltre, in caso di risultato positivo, il campione veniva sterilizzato mediante riscaldamento per 3 ore a 160°C e veniva ripetuto l'esperimento in modo da escludere eventuali processi abiotici.

Il cosiddetto esperimento dello "scambio di gas" (*gas exchange*) prevedeva l'aggiunta di brodo nutriente ai campioni di terreno e la continua lettura dei gas rilasciati dal terreno mediante un gascromatografo e un misuratore di conduttività termica. Prima di entrare a contatto con la soluzione nutriente, i campioni da analizzare furono esposti a vapor acqueo e venne rilevata una intensa e inaspettata emissione di ossigeno e CO<sub>2</sub>. Tale emissione era legata alla presenza d'acqua e non alle sostanze nutritive presenti nel terreno e inoltre, se i campioni venivano preriscaldati, l'emissione di ossigeno diminuiva ma non si azzerava. Dall'analisi di questi dati si è potuto concludere che il suolo marziano è fortemente reattivo chimicamente, anche se questo esperimento si

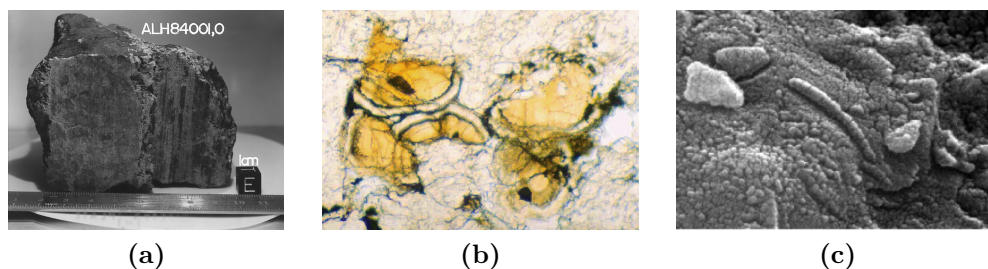


è rivelato poco risolutivo dal punto di vista biologico.

Un secondo esperimento fu quello della “emissione marcata” (*labelled release*), con lo scopo di verificare la presenza di forme di vita dallo studio dei prodotti della respirazione. Anche in questo caso a un campione di suolo marziano veniva aggiunta una soluzione nutriente che conteneva carbonio radioattivo  $^{14}\text{C}$ . Nel caso gli organismi avessero metabolizzato il carbonio presente nella soluzione, l'avrebbero rilasciato sotto forma di anidride carbonica o metano radioattivo, rilevabile attraverso un contatore Geiger installato nella camera. In questo caso l'esperimento diede esito nettamente positivo, con un aumento progressivo della radioattività, mentre i campioni sterilizzati non presentavano emissione di carbonio radioattivo. Tuttavia una seconda aggiunta di brodo di coltura marcato non diede origine a un ulteriore aumento della radioattività come ci si sarebbe potuto aspettare in caso di batteri terrestri. Anche questo esperimento rimane quindi non definitivo, in quanto tali risultati potrebbero essere legati alla chimica fortemente ossidante del suolo marziano.

Il terzo esperimento effettuato all'interno dei Viking aveva lo scopo di misurare il rilascio pirolitico di gas (*pyrolytic release*). In particolare si voleva verificare se eventuali organismi fossero in grado, mediante l'energia solare, di trasformare in sostanza organica l'anidride carbonica presente nell'atmosfera, similmente agli organismi fotosintetici terrestri. I campioni furono esposti a un'atmosfera di  $\text{CO}_2$  e  $\text{CO}$  radioattivo e a luce solare simulata e incubati per 5 giorni. Successivamente il campione di suolo, una volta rilasciati i gas ancora presenti, fu riscaldato a  $625^\circ\text{C}$  (pirolisi) e ne fu rilevata la radioattività. L'esperimento diede esito solo parzialmente positivo, e inoltre sembrò indipendente dalle condizioni d'illuminazione, di conseguenza i risultati ottenuti, anche in questo caso, furono estremamente ambigui.

I dati ottenuti da questi esperimenti sono tuttora oggetto d'indagine da parte della comunità scientifica e sono interpretati in modo assai diverso. Da un lato alcuni autori, come Gilbert V. Levin [35], sostengono che l'esperimento del rilascio di gas sarebbe una prova decisiva a favore dell'esistenza di vita su Marte. Altri autori ipotizzano la presenza di forme di vita il cui metabolismo è basato sul perossido di idrogeno [36]. Molti altri però sostengono che i risultati



**Figura 1.7:** La meteorite ALH84001 (a) e possibili tracce di forme di vita: globuli con associazione di dolomite e magnesite (b) e strutture riconducibili a batteri fossili.

(Foto: (a) e (c) NASA, (b) Lunar and Planetary Institute/NASA )

degli esperimenti sono riconducibili solamente alla particolare chimica del suolo marziano. Come si deduce dalle controversie sui risultati degli esperimenti del Viking, non sembra possibile poter ottenere delle risposte certe mediante l'analisi *in situ* del suolo marziano senza contare che la progettazione di esperimenti risulta estremamente difficoltosa vista la complessità dei processi che vi sono in atto. Una possibile risposta potrebbe arrivare grazie a un progetto attualmente in studio alla NASA e all'ESA che prevede una missione per il recupero di campioni dal suolo marziano e il loro trasporto sulla Terra, dove sarebbe possibile un'analisi approfondita con esami *ad hoc* (iMARS, International Mars Architecture for Return of Samples, data di lancio prevista: 2018) [37].

D'altra parte sulla Terra sono già presenti dei campioni provenienti da Marte che sono di primaria importanza nel campo dell'Astrobiologia. Sono le meteoriti SNC (Shergottite, Nakhlite, Chassignite), una serie di 16 meteoriti ritrovate in Antartide le quali presentano una composizione tale da farle ritenere, quasi certamente, di origine marziana. In particolare una di queste si è rivelata una fonte estremamente preziosa di informazioni in tal senso: la meteorite ALH84001.

### 1.3.4 La meteorite ALH84001

Questa meteorite, ritrovata ad Alan Hills nel 1984, è una roccia basaltica, del peso di 1.93 kg (Figura 1.7). A differenza delle altre meteoriti marziane presen-

ti sulla Terra, ALH84001 è di origini molto antiche, si è formata infatti attorno a 4.5 miliardi di anni fa (in base allo studio sul decadimento del samario in neodimio). Successivamente la roccia è stata soggetta a uno shock, probabilmente in seguito a un impatto meteoritico, e si è fratturata (tra i 3.6 e i 4 Ga). L'acqua sembra aver riempito le fratture depositando noduli di minerali carbonatici. Un secondo impatto ha interessato la roccia attorno a 16 milioni di anni fa, lanciandola nello spazio (stima legata al grado di esposizione ai raggi cosmici rinvenuto nella meteorite). La sua caduta sulla Terra risalirebbe infine a 13000 anni fa, in base al decadimento del  $^{14}\text{C}$ . Questa meteorite è stata analizzata approfonditamente e secondo alcuni autori conterrebbe tracce lasciate da organismi vissuti su Marte [38].

Il primo dato significativo è stato ottenuto dall'analisi dei noduli di carbonati. Questi sono di dimensione variabile da 25  $\mu\text{m}$  a un decimo di millimetro, possiedono un nucleo ricco in manganese e, verso l'esterno, vari strati di carbonati e solfuri di ferro e magnetite. Strutture con questo pattern sono presenti anche sulla Terra ma sono associate, tranne rari casi, all'attività batterica.

Altra caratteristica peculiare in questa meteorite è la presenza di idrocarburi policiclici aromatici (PAHs) che sono maggiormente presenti nelle zone vicine ai noduli carbonatici e diminuiscono verso l'esterno (non sono quindi frutto di contaminazione terrestre). Questa classe di composti è estremamente diffusa in natura, in quanto si origina dalla decomposizione batterica, ma è abbondante anche in molti materiali di tipo extraterrestre (come le condriti carbonacee). Tuttavia si è potuto provare che gli idrocarburi presenti in ALH84001 differiscono da questi ultimi per composizione e sono invece maggiormente assimilabili a quelli di origine biologica presenti sulla Terra.

Infine associati ai globuli sono state osservate delle strutture ovoidali o tubolari che potrebbero essere interpretate come nanobatteri fossili associati alla deposizione di calcite. Queste strutture sono estremamente piccole, vanno dai 20 ai 100 nm e sono state trovate esclusivamente all'interno della meteorite, non nella zona di recupero né in altre meteoriti trovate finora. Le dimensioni di tali strutture sarebbero però troppo piccole per essere fossili di batteri, essendo di molto inferiori al limite dei 200 nm imposto dal metabolismo cellulare, e

sembra comunque più plausibile che derivino solo indirettamente dall'attività batterica.

Tuttora l'origine delle varie strutture presenti nel meteorite ALH84001 è argomento di accese discussioni per l'intera comunità scientifica.

## Capitolo 2

# La sopravvivenza nello spazio e su Marte

L'esplorazione spaziale, oltre ad aver permesso importanti scoperte dal punto di vista astronomico, è legata alla ricerca di tipo astrobiologico. Sono state progettate numerose missioni a tal scopo e queste hanno permesso l'ideazione di particolari strumentazioni e sofisticati esperimenti al fine di trovare tracce che indichino la presenza di forme di vita. Un tale sviluppo della tecnologia spaziale ha però reso necessario avvalersi di procedure di sterilizzazione notevolmente efficaci al fine di evitare ogni possibilità di contaminazione di tipo biologico legata all'atterraggio di sonde o *lander* sulla superficie stessa del corpo celeste oggetto dell'esplorazione. In particolare tale problema è legato all'esistenza di organismi particolarmente resistenti a condizioni estreme di temperatura, pressione e irradiazione ultravioletta come quelle presenti nello spazio e in altri pianeti.

Nel seguente capitolo verranno descritte alcune problematiche legate alla contaminazione spaziale e verrà descritto uno dei gruppi di organismi che è diventato negli ultimi anni tra i principali oggetti di analisi nel campo dell'Astrobiologia: il genere *Bacillus*.

## 2.1 Il problema della protezione planetaria

Lo spazio è un ambiente estremamente ostile alla vita, presenta condizioni di temperatura, pressione, irradiazione solare deleterie per qualunque tipo di forma di vita conosciuta. Studi sulla sopravvivenza di organismi in ambienti extraterrestri furono avviati a partire dagli anni '70 grazie alla scoperta di un primo caso di sopravvivenza spaziale. Nel novembre del 1969 fu messa in atto l'operazione di recupero del Surveyor III, una sonda inviata sulla Luna con lo scopo di fotografare l'ambiente lunare. Una volta che la fotocamera fu riportata sulla Terra, i suoi pezzi furono sottoposti ad analisi e, dal guscio di poliuretano che doveva isolarla, furono estratte poche cellule di *Streptococcus mitis alfaemofilico*: un batterio diffuso nella cavità orale umana. Queste cellule, dopo 30 mesi (presunti) passati sulla Luna furono coltivate senza problemi nei laboratori terrestri. Nonostante resti da verificare la possibilità di contaminazione al rientro, questo avvenimento ha permesso lo sviluppo di un ramo intero della Microbiologia, la cosiddetta Microbiologia Spaziale, che studia la sopravvivenza batterica nell'ambiente extraterrestre.

Questi studi sottolineano una delle più importanti problematiche correlate all'esplorazione spaziale: la necessità di prevenire la contaminazione biologica da parte di materiale terrestre di altri corpi celesti, come viene affermato nell'Articolo IX del Trattato sullo Spazio Esterno delle Nazioni Unite ratificato nel 1967 [39].

Per contaminazione biologica si possono intendere due diversi processi: la vera e propria colonizzazione da parte di organismi di origine terrestre di altri pianeti o la falsificazione degli esperimenti volti alla scoperta di vita extraterrestre. La colonizzazione da parte di organismi terrestri è estremamente improbabile, tuttavia nel Sistema Solare esistono svariati ambienti con condizioni favorevoli alla vita e lo stesso Marte è ancora poco conosciuto per poter scartare completamente tale ipotesi [40]. Molto meno remota è invece la possibilità di contaminazione degli strumenti inviati nello spazio per rilevare tracce di eventuali forme di vita. A partire dagli anni '70, con la missione Viking, vi sono stati continui miglioramenti nelle tecniche di valutazione della carica batterica e, di pari passo, un notevole progresso nei sistemi di sterilizzazione



**Figura 2.1:** Tecnici all'opera durante l'assemblaggio del *rover* Phoenix.  
(Foto: NASA/JPL)

utilizzati per sonde e navicelle spaziali (Figura 2.1).

Le missioni precedenti al Viking presentavano una carica batterica totale (cellule e spore) che variava da  $5 \times 10^2$  cellule/m<sup>2</sup> fino a  $2 \times 10^6$  cellule/m<sup>2</sup> [41], ma successivamente i miglioramenti nel campo della sterilizzazione delle sonde hanno portato ad abbassare questi valori. Attualmente il limite massimo accettato dall'Organic Contamination Science Steering Group (OCSSG) è di 300 cellule/m<sup>2</sup>, vale a dire meno di 300000 cellule/veicolo [42]. Le specie formanti endospore del genere *Bacillus* comprendono mediamente il 10% della popolazione batterica di una navicella spaziale, anche se in alcuni casi tale valore raggiunge il 36% [43] e tra queste le prevalenti sono il *Bacillus licheniformis* (25%) e il *Bacillus pumilus* (16%) [44].

La teoria della panspermia, sostenuta originariamente da Richter, Lord Kelvin e Arrhenius [45, 46, 47], prevede che possano essersi sviluppate condizioni favorevoli alla nascita della vita in luoghi e tempi diversi durante l'evoluzione dell'Universo. Successivamente tali forme di vita avrebbero potuto essere trasferite in altri pianeti dove, se presenti condizioni favorevoli alla loro crescita e proliferazione, sarebbero andate incontro a un'evoluzione verso forme più complesse [48]. Negli ultimi anni si sta affermando, nel campo dell'astrobiologia, la teoria della litopanspermia ovvero la possibilità di trasferimento di microbi endolitici tra pianeti rocciosi del Sistema Solare [49, 50]. A causa

della loro longevità e resistenza a condizioni estreme le spore batteriche sono state studiate come possibili candidati per il trasferimento di vita tra pianeti.

Recenti studi hanno dimostrato la sopravvivenza a lungo termine di microrganismi terrestri associati a sonde artificiali nello spazio interplanetario e quindi la possibilità che tali organismi possano raggiungere la superficie di altri pianeti come ad esempio Marte [48, 51]. Alla luce di tali scoperte è quindi necessario stabilire l'effetto dell'ambiente marziano sulla sopravvivenza di questi organismi al fine di evitare una possibile contaminazione ad opera dell'uomo. In particolare alcuni microrganismi terrestri sono in grado di sopravvivere a condizioni di bassa pressione e bassa temperatura in atmosfera composta da CO<sub>2</sub>. L'irraggiamento UV, a causa dell'alta energia associata ai fotoni e del facile assorbimento da parte delle molecole biologiche (acidi nucleici), è considerato il parametro che influisce maggiormente sulla sopravvivenza batterica [49, 51].

## 2.2 Il genere *Bacillus*

Durante la seconda metà del Diciannovesimo secolo venne scoperta la capacità di alcuni batteri di sviluppare delle forme inattive (criptobiotiche) molto resistenti in grado di sopravvivere in caso di limitata disponibilità di sostanze nutritive. Tali strutture, denominate endospore, sono tra le più tenaci forme di resistenza esistenti sulla Terra e appartengono a molti generi diversi di organismi: eterotrofi aerobi (*Bacillus* spp.), anaerobi (*Clostridium* o *Anaerobacter* spp.) ma anche autotrofi (*Heliobacterium* spp.).

Il genere *Bacillus* appartiene al phylum *Firmicutes* ed è formato da circa 114 specie. Tra queste assume notevole importanza il *B. anthracis* che provoca l'antrace, mentre *B. thuringiensis* e *B. popilliae* sono patogeni per alcune specie di insetti e pertanto vengono utilizzati come insetticidi nel campo dell'agricoltura biologica. Il *Bacillus subtilis* è stato ampiamente studiato ed è un organismo modello per la sua capacità di produrre spore.

Questi batteri a forma di bastoncino sono Gram-positivi e si riproducono in condizioni aerobiche [52]. Sono ubiquitari in natura e perlopiù saprofiti mesofili,



hanno come habitat preferenziale lo strato superiore del suolo ma sono stati rinvenuti anche nei basalti del Sonoran Desert [53].

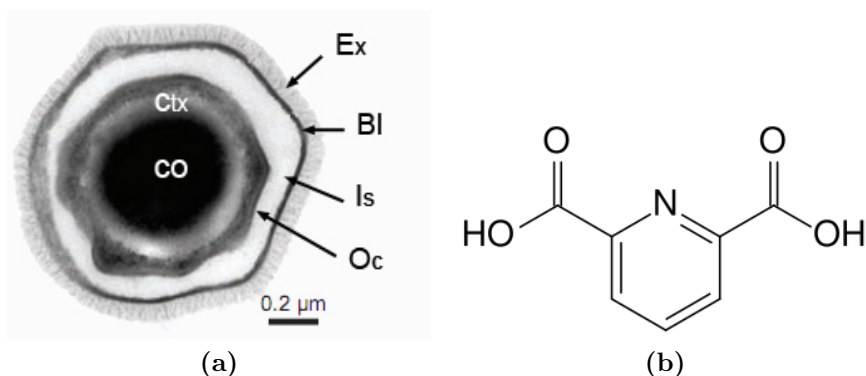
### 2.2.1 La sporulazione

In caso di mancanza di carbonio, azoto o fosforo nell'ambiente circostante o di elevata densità cellulare, le specie del genere *Bacillus* sono in grado di dare origine a spore che mantengono la cellula in uno stato di dormienza finché non vengono ripristinate le condizioni favorevoli alla loro crescita. Le spore possono essere facilmente trasportate in ambienti che ne permettono la germinazione attraverso il vento, l'acqua o ospiti viventi. Inoltre presentano una notevole longevità: in letteratura sono stati descritti casi di sopravvivenza in campioni di terreno di più di 100000 anni<sup>1</sup> [55]. Altra caratteristica peculiare delle spore batteriche è la particolare resistenza al calore, all'essiccamento, al congelamento, ad agenti chimici e a radiazioni [48]. La sporulazione rappresenta quindi una strategia di enorme successo per la sopravvivenza e la diffusione della specie.

Le endospore batteriche sono impermeabili alla maggior parte dei coloranti normalmente utilizzati, quindi al microscopio ottico si presentano come zone incolori all'interno della cellula madre, lo sporangio (Figura 3.5a). La posizione assunta dalla spora all'interno dello sporangio varia a seconda della specie considerata: si può trovare in posizione centrale, terminale o subterminale ed è quindi importante per l'identificazione della specie. La struttura dell'endospora è piuttosto complessa, essendo formata da più strati e, in alcune specie, da un involucro lipoproteico esterno detto esosporio (Figura 2.2a). Il protoplasto della spora (*core*), che contiene il DNA, pochi enzimi e il citoplasma, è racchiuso dalla membrana della cellula germinale. Una caratteristica peculiare dell'endospora batterica è la presenza di acido dipicolinico che arriva a costituire il 15% del peso della spora. Il dipicolinato è un prodotto intermedio della via biosintetica della lisina in grado di chelare il  $\text{Ca}^{2+}$ , contenuto in

---

<sup>1</sup>Alcuni autori sostengono che sia possibile la sopravvivenza di spore del genere *Bacillus* di età molto più antica. Appare però ancora controversa la scoperta di spore vitali di batteri alofili (una specie molto simile al *Bacillus marismortui*) in cristalli di sale di 250 milioni di anni [54].



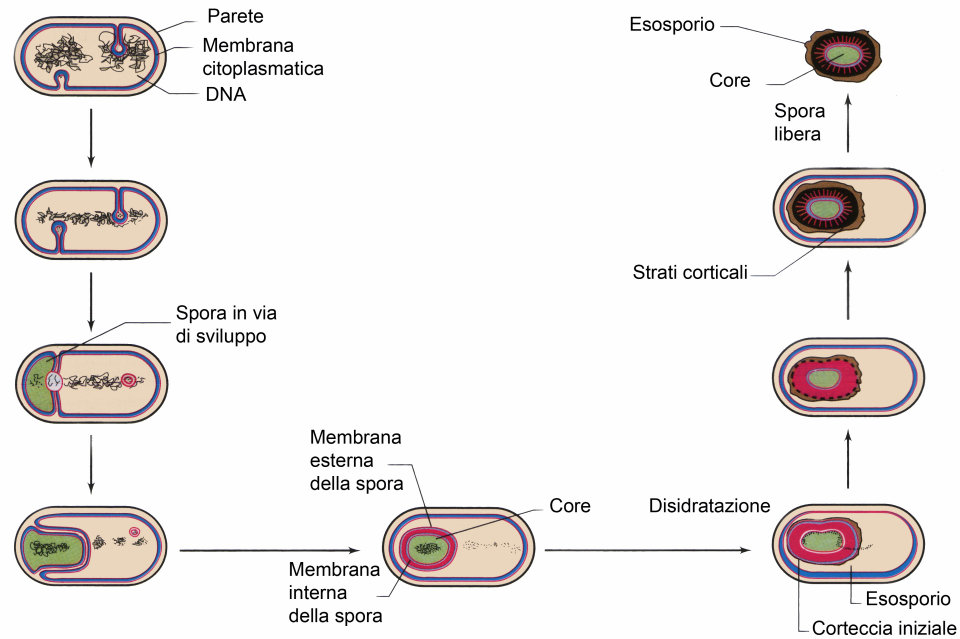
**Figura 2.2:** (a) Struttura di endospora di *Bacillus anthracis*: esosporio (Ex); strato basale dell'esosporio (Bl); interspazio (Is); involucro della spora (Oc); corteccia (Ctx); e il core della spora (CO).

(b) Acido dipicolinico: acido piridin-2,6-dicarbossilico.

(Foto: Henriques [56])

grandi quantità nella spora matura (Figura 2.2b). La corteccia, una struttura spessa e laminare, arriva a occupare metà del volume totale della spora ed è ricca in peptidoglicano e zuccheri modificati. Le membrane che sintetizzano la corteccia, appartenenti alla cellula parentale, formano due tipi diversi di peptidoglicano. Lo strato interno è sottile e persiste più a lungo durante la germinazione della cellula, mentre lo strato esterno è più spesso e lasso presentando meno legami crociati. La corteccia sembra implicata nel processo di disidratazione che interessa la spora, la quale ha un contenuto d'acqua pari al 5% - 10% del suo peso una volta giunta a maturazione. Esternamente alla corteccia si sviluppa il rivestimento formato da proteine particolarmente stabili simili alle cheratine. Queste proteine, ricche di cisteina e legami disolfuro, costituiscono circa l'80% delle proteine totali presenti nella spora e creano uno strato impenetrabile agli agenti chimici tossici. Infine alcune specie del genere *Bacillus* presentano un esosporio: un involucro lasso formato da lipoproteine che contiene alcuni enzimi attivi durante la germinazione.

La sporulazione o sporogenesi è un processo di differenziazione cellulare complesso (Figura 2.3), in cui una cellula, a seguito di una divisione asimmetrica, dà origine a una sola spora dotata di caratteristiche morfologiche e funzionali differenti da quelle della cellula vegetativa da cui deriva. Inizialmente un cromosoma neoreplicato si organizza in un filamento assiale che successivamente si sposta verso uno dei poli cellulari. Successivamente avvie-



**Figura 2.3:** Stadi del processo di sporulazione [57].

ne la divisione cellulare asimmetrica, in cui il doppio strato della membrana citoplasmatica si invagina andando a dividere il filamento di DNA dal resto della cellula con la formazione del setto della spora. La membrana del setto continua a crescere fino a racchiudere completamente il cromosoma in una doppia membrana così da creare la prespora. Tra i due strati di membrana che racchiudono il protoplasma della spora è sintetizzata la corteccia e in questa fase viene prodotto anche il dipicolinato di calcio, mentre la molecola di DNA della cellula madre viene degradata. La spora giunge poi a maturazione con la formazione del rivestimento, dell'esosporio, l'aumento della refrattilità e della resistenza al calore. Una volta matura la spora viene liberata in seguito alla lisi dello sporangio. L'intero processo è piuttosto veloce e si completa in sole 10 ore [57, 58].

### 2.2.2 Meccanismi di resistenza agli UV

La resistenza agli UV delle spore del genere *Bacillus* varia in modo significativo all'interno delle varie specie ma è notevolmente maggiore, da 10 a 100 volte, rispetto alle corrispondenti cellule vegetative [49, 59].

La radiazione ultravioletta è la parte di radiazione solare, circa il 7% del totale, con lunghezza d'onda  $\lambda$  compresa tra 10 e 400 nm. In particolare lo spettro UV è suddiviso a seconda della lunghezza d'onda in UVA (315-400 nm), UVB (280-315 nm), UVC (200-280 nm), mentre per le onde maggiormente energetiche, con  $\lambda < 200$  nm, è usato il termine UV da vuoto.

La quantità di energia sotto forma di radiazione solare che riceve un corpo nello spazio è definita dalla costante solare  $S$ . Questa costante diminuisce in modo inversamente proporzionale con il quadrato della distanza del corpo dal Sole. Di conseguenza la Terra, più vicina al Sole rispetto a Marte, mediamente ha una costante solare  $S$  pari a  $1371 \text{ W/m}^2$  mentre Marte  $590 \text{ W/m}^2$  [60]. L'entità della radiazione solare che è in grado di raggiungere la superficie di un pianeta varia in base alla posizione nell'orbita (perielio, afelio), alla latitudine e a molti altri fattori. In particolare assume grande importanza la presenza di un'atmosfera in grado di assorbire o riflettere le radiazioni UV. Mentre l'atmosfera terrestre è piuttosto densa, l'atmosfera di Marte è molto più sottile, di conseguenza l'intensità dei raggi UV risulta meno attenuata. Inoltre le variazioni stagionali che causano l'accumulo di  $\text{CO}_2$  sotto forma di ghiaccio nei poli di Marte, provocano una variazione del 40% nella pressione atmosferica, che varia tra 6 e 10 mbar circa. Altro dato importante è la presenza di polveri e tempeste di sabbia che attenuano notevolmente l'irraggiamento UV sulla superficie marziana. Sulla Terra gli UVC e la maggior parte degli UVB, ossia le radiazioni con lunghezza d'onda inferiore ai 300 nm, sono assorbite dallo strato d'ozono che forma una sorta di scudo. L'anidride carbonica presente nell'atmosfera di Marte invece assorbe le radiazioni con  $\lambda$  più corta di 190 nm, con il risultato che l'atmosfera di Marte è maggiormente trasparente agli UVB e agli UVC. Queste lunghezze d'onda sono facilmente assorbite dalle molecole di DNA e sono letali per le cellule [49, 51, 60].

La resistenza agli UV dimostrata dalle spore di *Bacillus* è legata a vari meccanismi di protezione del DNA e all'efficiente capacità di riparazione dei danni dovuti agli UV.

**Meccanismi di protezione cellulare** Tra i vari meccanismi coinvolti nella protezione delle spore un ruolo importante potrebbero svolgerlo la presenza

di copie multiple di plasmidi e la presenza di pigmenti in grado di assorbire i raggi UV a livello degli strati più esterni della cellula.

Per quanto riguarda i plasmidi, sono in corso studi per valutarne l'importanza nella resistenza ai danni causati dagli UV, anche se appare chiaro che il DNA della spora è invece presente in un'unica copia e di conseguenza manca la protezione fornita dalla duplicazione dell'informazione genetica [49].

Nel rivestimento della spora possono poi essere presenti pigmenti, simili alla melanina, che impediscono ai raggi UV di penetrare all'interno del core della spora. Il ruolo protettivo di tali pigmenti è stato accertato in specie quali *Bacillus subtilis*, *B. thuringensis* e *B. atrophaeus*, in cui i mutanti albini presentano una maggiore mortalità se esposti ai raggi UV, in particolare agli UVA e UVB [61].

**La fotochimica del DNA** Gli UVC sono i maggiori responsabili dei danni letali alle macromolecole di DNA, risultano infatti circa 300 volte più deleteri degli UVB e UVC [49]. In particolare la radiazione UVC a 254 nm, che nelle cellule vegetative provoca la formazione di dimeri di ciclobutano (CPD) e altri fotoprodotti tra pirimidine adiacenti, nelle spore in dormienza provoca la formazione del cosiddetto fotoprodotto della spora (SP): la 5-timinil-5,6-diidrotimina che si forma tra residui di timina adiacenti. Infine le spore esposte a UVA e UVB presentano rotture nella catena del DNA [62].

I meccanismi attuati dalla spora per la protezione del DNA sono principalmente tre: la presenza di acido dipicolinico chelante  $\text{Ca}^{2+}$ , la disidratazione e la presenza di proteine in grado di legarsi al DNA. L'acido dipicolinico (Figura 2.2b), che in acqua diminuisce la resistenza delle spore irradiate agendo come fotosensibilizzatore, in condizioni di disidratazione è invece in grado di aumentare la sopravvivenza [49, 63]. Il grado di idratazione all'interno del core provoca cambiamenti nel tipo di fotoprodotti originati dai raggi UV, anche se i suoi effetti sono ancora in fase di studio. Infine il fattore più importante coinvolto nella protezione del DNA è la presenza di proteine in grado di legarsi al DNA della spora: le  $\alpha/\beta$ -SASP (*Small Acid-Soluble Proteins*). Queste proteine, formate da 60-70 amminoacidi, sono sintetizzate durante la sporulazione e sono degradate rapidamente durante la germinazione. Si accumulano nel core

della spora fino a saturare il cromosoma, il quale cambia di struttura assumendo una forma ad anello o toroidale. Le  $\alpha/\beta$ -SASP proteggono la spora contro i danni dovuti agli UV rendendo il DNA chimicamente meno reattivo e sono tra i maggiori responsabili della resistenza agli agenti chimici e al riscaldamento [48].

**I meccanismi di riparazione del DNA** La capacità di sopravvivere all'irradiazione UV è dovuta anche all'efficienza con cui vengono riparati i danni a livello del DNA. I meccanismi per la riparazione sono principalmente tre: RR (*Recombinational Repair*), NER (*Nucleotide Excision Repair*) e SP-liasi. Il contributo delle diverse vie di riparazione del DNA varia in funzione dei danni presenti, ovvero della lunghezza d'onda dei raggi UV a cui la spora è stata sottoposta. Mentre il primo processo di riparazione interessa i danni al DNA provocati dagli UVA, gli altri 2 riparano danni dovuti a lunghezze d'onda minori [62]. La via di riparazione denominata NER è in grado di riparare i dimeri di ciclobutano CPD e altri fotoprodotti causati dagli UVC e dagli UVB. Gli enzimi coinvolti in questo processo sono presenti nella spora dormiente e aumentano ulteriormente durante i primi minuti della germinazione. SP-liasi invece è coinvolta solamente nella riparazione degli SP che è in grado di ridurre a monomeri di timina. Le spore *wild-type* sono 30 volte più resistenti dei mutanti senza i sistemi di riparazione NER e SP-liasi. Inoltre recenti studi hanno dimostrato che SP-liasi contribuisce maggiormente alla riparazione dei danni da UVC [64].

# Capitolo 3

## Materiali e Metodi

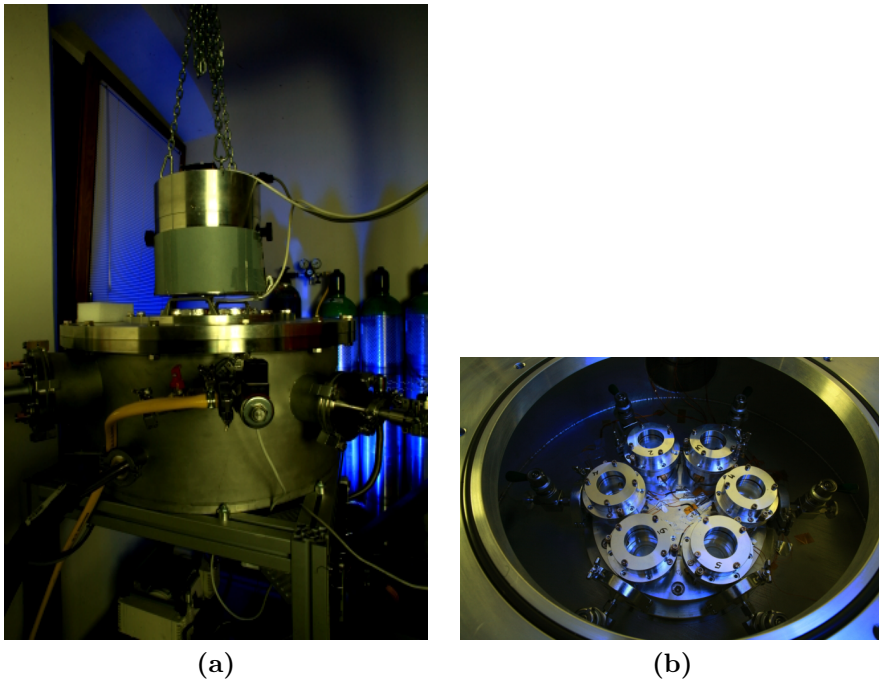
Le missioni spaziali che prevedono l'atterraggio di sonde o *lander* su altri pianeti o satelliti del Sistema Solare sono soggette a rigide norme per quanto riguarda la sterilità dell'intera componentistica. Tuttavia la possibilità di veicolare agenti microbici è ancora presente in quanto sono stati isolati, all'interno delle *clean room* in cui vengono assemblate le sonde, alcuni batteri sopravvissuti alle procedure di sterilizzazione. La resistenza di tali batteri, in particolare specie appartenenti al genere *Bacillus*, potrebbe causare problemi di contaminazione planetaria e compromettere gli esperimenti atti a scoprire eventuali forme di vita di tipo estraterrestre.

Al fine di comprendere meglio l'entità del rischio associato alla persistenza di questi batteri, sono state eseguite numerose indagini innanzitutto per isolarli e identificarli e in seguito per testare le loro capacità di sopravvivenza in ambienti fortemente sterilizzanti.

Questo lavoro si colloca all'interno degli studi sulla sopravvivenza batterica in condizioni estreme, in particolare in ambiente marziano simulato. In seguito saranno presentate le strumentazioni utilizzate ai fini della sperimentazione e le metodologie adottate per questa analisi sulla sopravvivenza.

## 3.1 LISA: Laboratorio Italiano di Simulazione Ambienti

Gli esperimenti di simulazione dell'ambiente marziano oggetto di questo lavoro sono stati condotti utilizzando una camera di simulazione LISA (Laboratorio Italiano Simulazione Ambienti) collocata presso l'Osservatorio Astronomico di Padova (Figura 3.1). Questo simulatore è frutto di un progetto a cui hanno collaborato diversi istituti ed enti di ricerca: il Dipartimento di Astronomia, il Dipartimento di Ingegneria Meccanica, il Dipartimento di Istologia, Microbiologia e Biotecnologie Mediche dell'Università di Padova, il CISAS (Centro Interdipartimentale di Studi e Attività Spaziali), l'INAF-Osservatorio Astronomico di Asiago. La sua costruzione è stata affidata ad una ditta esterna, la CINEL Strumenti Scientifici srl di Vigonza (Padova). LISA è il primo apparato italiano in grado di riprodurre condizioni estreme come quelle riscontrabili sulla superficie del pianeta Marte.



**Figura 3.1:** LISA: il simulatore di ambienti estremi: (a) apparato completo, (b) le sei celle di reazione in cui vengono ospitati i campioni biologici durante l'esposizione.



### 3.1.1 L'apparato sperimentale

LISA è una camera cilindrica in acciaio di circa 80 cm di larghezza per 50 cm di altezza ed è descritta nello schema in Figura 3.2 [65]. E' formata da una camera superiore, in cui sono alloggiare le 6 celle di reazione in alluminio con un volume di circa 250 cm<sup>3</sup> destinate a contenere i campioni biologici. Questi sono alloggiati in piattini di alluminio simili alle capsule petri del diametro di 4.5 cm costruiti presso le officine meccaniche dell'Osservatorio Astronomico di Cima Ekar, Asiago (Figura 3.8). Le celle sono in diretta comunicazione con la camera per quanto riguarda pressione e temperatura mediante un tubo che permette il passaggio dei gas, mentre la sterilità dell'ambiente dove vengono svolti gli esperimenti è garantita da filtri (Minisart SRP 25 da 0,20 µl, Sartorius) che impediscono la diffusione di microorganismi o particolato all'interno delle celle. La camera sottostante contiene invece un serbatoio di circa 2 litri riempito con azoto liquido ed è separata dalla camera superiore da una spessa piastra di alluminio. Questa piastra, oltre a permettere il raffreddamento per contatto della parte superiore, è dotata di una resistenza con una potenza di 800 W che permette di lavorare a temperature fino a 50 °C e che è fondamentale per il mantenimento di una temperatura costante nella camera sovrastante.

Al fine di mantenere costante la pressione dell'ambiente del simulatore sono presenti diverse sonde collegate ad un misuratore "Center One" che oltre a permettere la visualizzazione della pressione interna è collegato all'elettronica di controllo. Quest'ultima permette la regolazione della pressione interna mediante due potenziometri e agisce su due elettrovalvole: la prima regola l'immissione del flusso di gas verso l'interno, mentre la seconda mette in diretta comunicazione la camera con la pompa da vuoto in grado di aspirare gli eventuali gas in eccesso.

La temperatura è costantemente monitorata da sonde, identificate dalle sigle sequenziali da S2 a S8 (Figura 3.2), poste in punti diversi all'interno di LISA, collegate ad un controller elettronico RTD100 della ditta GEFTRAN programmabile alla temperatura di lavoro desiderata. Il controller è impostato in modo da minimizzare il consumo di azoto liquido ed è in grado di agire, attraverso un circuito a feedback, sull'apertura e chiusura del flusso d'azoto

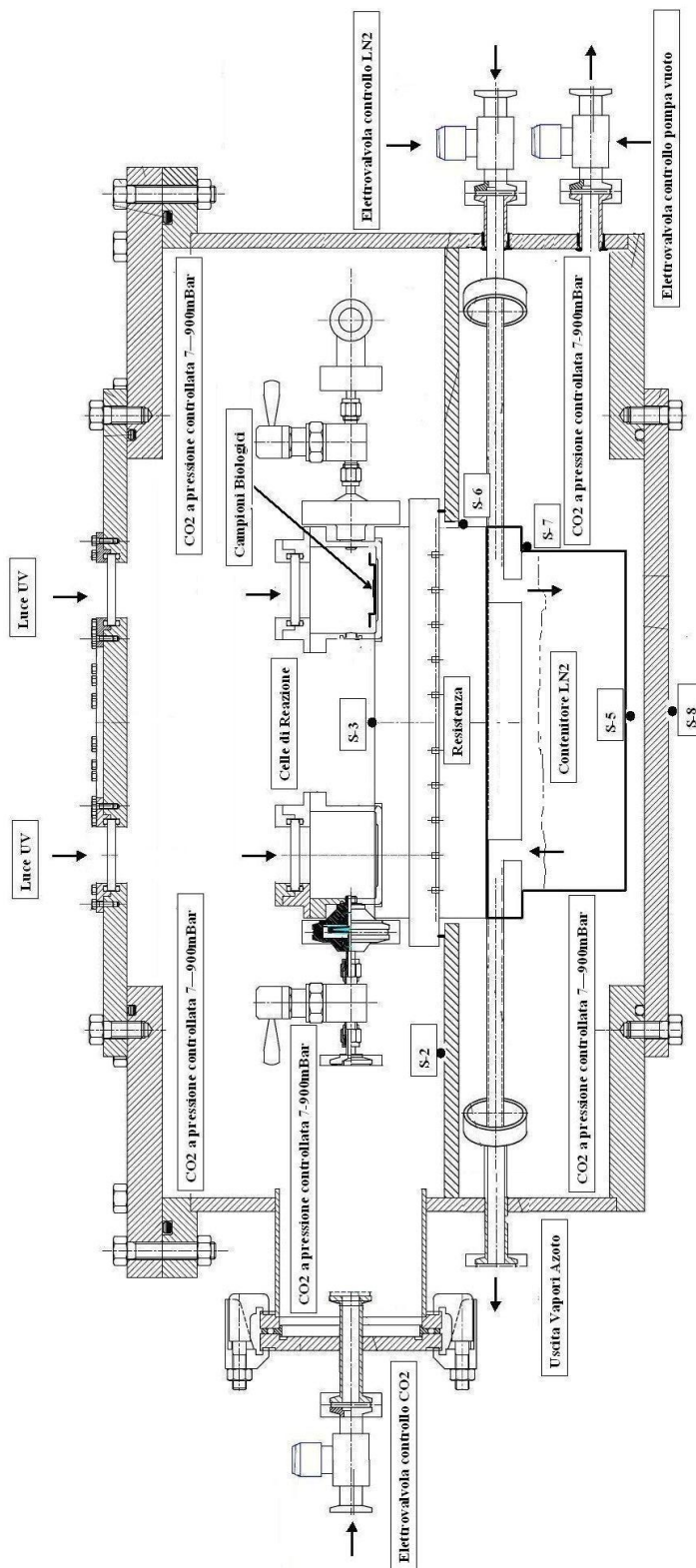
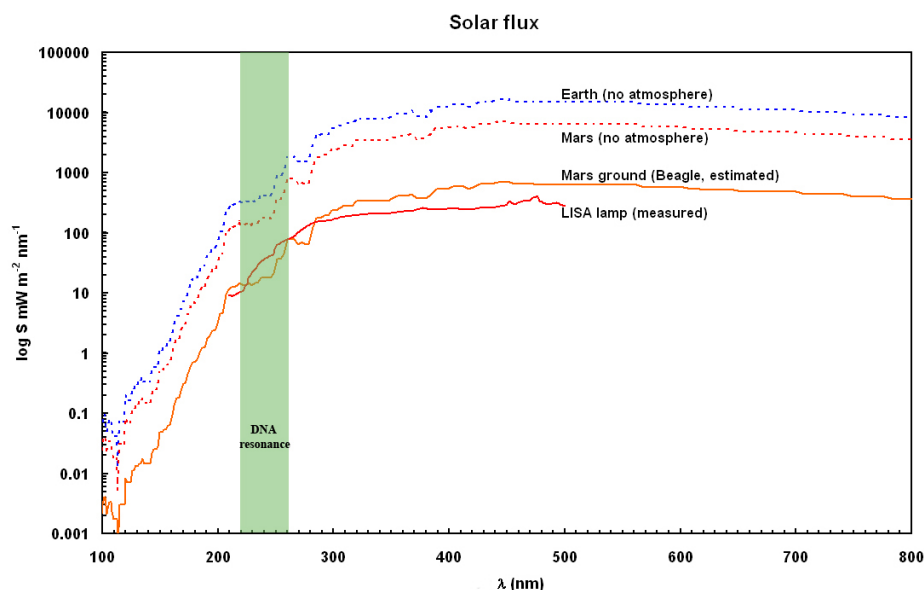


Figura 3.2: Schema costruttivo di LISA.



**Figura 3.3:** Flusso UV della lampada utilizzata in LISA rispetto a Marte.

e sull'accensione della resistenza, mantenendo la temperatura costante con uno scarto massimo di  $0.5^\circ$  sulla temperatura impostata. L'azoto liquido è contenuto in un serbatoio esterno di grandi dimensioni ed è stato fornito dalla ditta francese Air Liquide.

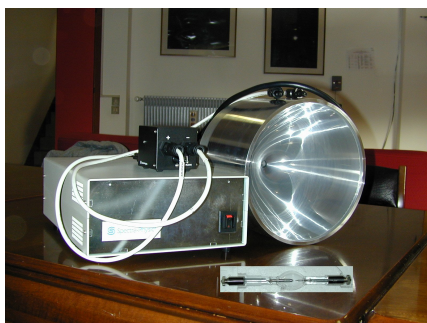
Tutti i dati relativi alla pressione e alla temperatura rilevati durante gli esperimenti sono raccolti mediante il modulo di acquisizione dati DT9812 (Data Translation) ed elaborati mediante il programma Quick DataAcq.

### 3.1.2 Modello UV

Nella parte superiore della camera, fornita di chiusura ermetica, sono presenti sei finestre circolari in quarzo (suprasil) che permettono l'esposizione delle celle di reazione ai raggi UV, in particolare ai raggi con  $\lambda > 160$  nm. Il sistema di illuminazione UV è costituito da una lampada UV (Oriel 6258 ozone-free) da 300 W focalizzata da una parabola costruita anch'essa presso le officine INAF di Cima Ekar (Asiago) ed emette prevalentemente ad una lunghezza d'onda compresa tra 160 nm e 300 nm.

<b>Gas</b>	<b>Marte</b>	<b>Lisa</b>
CO <sub>2</sub>	95.32%	95.5%
N <sub>2</sub>	2.7%	3,00%
Ar	1.6-1.7%	1.6%
O <sub>2</sub>	0.13-0.2%	0.13%
CO	0.08%	0.07%
H <sub>2</sub> O	210 ppm	assente
NO	100 ppm	assente
Ne	2.5 ppm	300 ppm
HDO	0.85 ppm	assente
Kr	0.3 ppm	300 ppm
Xe	0.08 ppm	300 ppm

**Tabella 3.1:** Atmosfera di LISA e di Marte a confronto.



**Figura 3.4:** Parabola con lampada UV 6258.

Detta parabola (Figura 3.4) crea un fascio di luce parallela che irradia di raggi UV i campioni biologici contenuti nelle celle di reazione. È stata eseguita un'analisi del modello d'irraggiamento UV ricevuto dai campioni mediante l'utilizzo di uno spettrofotometro i cui sensori erano localizzati nelle celle di reazione [66]. Il flusso che è stato misurato è

riportato in Figura 3.3 dove viene confrontato con i valori stimati a livello del suolo e al di fuori dell'atmosfera di Marte [67].

### 3.1.3 Condizioni sperimentali

Per gli esperimenti sono state riprodotte nel simulatore, per quanto possibile, le stesse condizioni presenti su Marte quindi: la pressione è stata mantenuta a 7.5-8 mbar per tutta la durata dell'esperimento mentre la temperatura ricalcava le variazioni giornaliere misurate su Marte (da -80 °C a 23 °C).

Per quanto riguarda l'atmosfera è stata utilizzata nei primi esperimenti CO<sub>2</sub> al 100%, successivamente è stato utilizzato una miscela di gas con composizione simile all'atmosfera marziana (Tabella 3.1).

L'irraggiamento UV è suddiviso in UVA 33 W/m<sup>2</sup>, UVB 5.5 W/m<sup>2</sup>, UVC 3.3 W/m<sup>2</sup>. Nella sua configurazione attuale LISA simula l'ambiente di Marte nel sito di atterraggio del *lander* Pathfinder.

## 3.2 Gli esperimenti

Il *B. pumilus* si è dimostrato particolarmente resistente a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, uno dei metodi utilizzati per la riduzione della carica batterica durante la costruzione di navicelle. Infatti sia le cellule vegetative che le spore isolate di *B. pumilus* esposte a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 5% per 60 minuti presentano una sopravvivenza di 2 - 3 volte maggiore rispetto al *B. subtilis* [68, 69]. Inoltre spore di *B. pumilus* SAFR032 hanno dimostrato una notevole resistenza alle radiazioni UV, la più alta riportata in letteratura finora [44, 70]. La sopravvivenza di tali batteri in condizioni di sterilità presenti nelle *clean-room* in cui viene assemblata la componentistica per le sonde e navicelle spaziali potrebbe compromettere le missioni volte alla ricerca di forme di vita.

Per gli esperimenti oggetto di questo lavoro è stato utilizzato principalmente il *Bacillus pumilus* SAFR032 (Space Craft Assembly Facility Resistant Isolate 32), gentilmente fornito dal Professor K. Venkateswaran (Jet Propulsion Laboratory, California, USA). Tra i batteri sporigeni isolati nelle componenti di sonde e navicelle spaziali questo *Bacillus* è la seconda tra le specie più presenti [44].

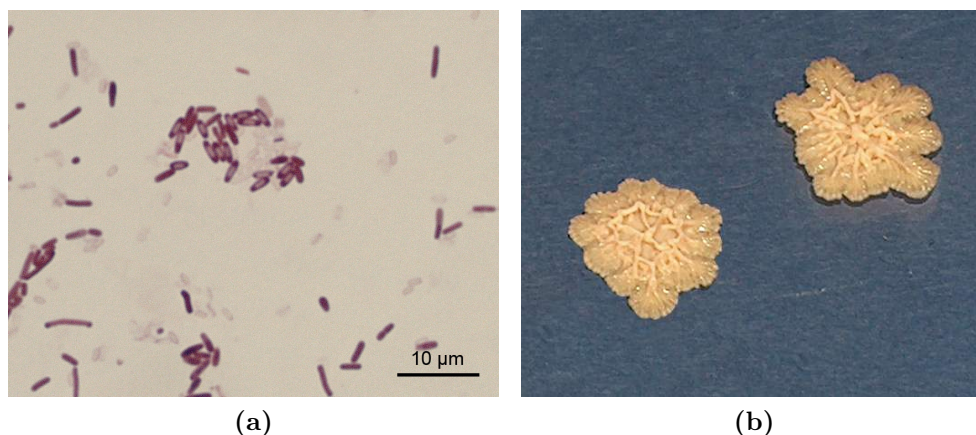
Le colonie di questa specie sono caratteristiche, hanno margini irregolari e presentano numerose creste alla superficie (Figura 3.5b).

### 3.2.1 Modalità di preparazione e raccolta spore

Le cellule e le spore utilizzate per gli esperimenti sono state ottenute da colture in terreno solido incubate a 37 °C per 24 ore (Figura 3.6).

Terreni utilizzati per la semina:

BHI (*Brain Heart Infusion*, Becton Dickinson): terreno liquido utilizzato per la coltura di batteri e funghi. La sua composizione, per un litro di terreno, è la seguente:



**Figura 3.5:** *Bacillus pumilus* SAFR032, in (a) spore al microscopio ottico, in (b) due colonie isolate in TSA.

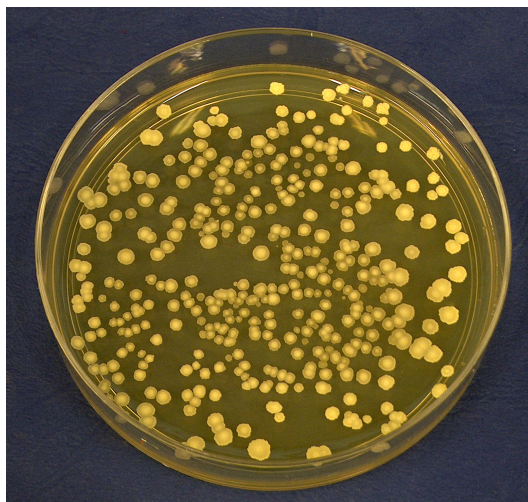
Infusione di cervello e cuore (solidi)	6 g
Digestivo peptico di tessuto animale	6 g
Cloruro di sodio	5 g
Destrosio	3 g
Digestivo pancreatico di gelatina	14,5 g
Fosfato di sodio	2,5 g

TSA (*Tryptic-Trypticase Soy Agar*, Difco): terreno di coltura d'uso generale, che permette la crescita di una grande varietà di microorganismi. Un litro di terreno è così composto:

Triptone	14.5 g
Peptone di soia	5 g
Cloruro di sodio	5 g
Agar	15 g

Le sospensioni di spore derivano da colture in piastra incubate a temperatura ambiente per circa 7-10 giorni, le cellule che non hanno sporulato sono state eliminate mediante incubazione della sospensione in bagnetto caldo a 80 °C per 20 min.

In seguito, al fine di ottenere una sospensione di spore pure senza residui cellulari, si è utilizzato il protocollo di Spudich e Kornberg per la purificazione delle spore [71]. Sono state utilizzate spore provenienti da colture di 1-2 settimane, raccolte con un'ansa sterile sotto cappa a flusso laminare e sottoposte a lavaggio in acqua distillata sterile. La sospensione è stata centrifugata (20



**Figura 3.6:** Piastra di *Tryptic Soy Agar* (TSA) con colonie di *Bacillus pumilus* SAFR 032 a 5 giorni d'incubazione.

minuti a 3500 rpm) e, dopo aver eliminato l'acqua, è stato prelevato il pellet. Un'aliquota da 0.1 g di pellet umido è stata poi incubata in 10 ml di acqua distillata con 1-2 mg di lisozima (*lysozyme from chicken egg white*, Sigma) a 37 °C per 10 minuti. La sospensione così ottenuta è stata successivamente sottoposta a lavaggi successivi in 10 ml di SDS (*Sodio dodecil solfato*, Serva) allo 0.5%, in 10 ml NaCl 1 M, in 10 ml di NaCl 0.14 M e ulteriori lavaggi in acqua distillata.

Una volta ottenuta la sospensione finale in acqua distillata si è provveduto a titolarla mediante semina in *Tryptic Soy Agar* (TSA) a diverse diluizioni a fattore 10 e conta delle colonie (UFC). La sospensione è stata infine portata alla densità necessaria per gli esperimenti.

### 3.2.2 Esposizione a UVC di cellule vegetative

Sono stati sottoposti a irradiazione a UVC delle sospensioni di cellule vegetative di varie specie di *Bacillus* per verificarne la diversa sensibilità a questo tipo di radiazione particolarmente energetica. Inoltre, per quanto riguarda il *Bacillus pumilus* ceppo SAFR032, sono stati eseguiti successivi esperimenti di esposizione a UVC per poter selezionare mutanti resistenti da utilizzare, sotto forma di spore, nel simulatore.



**Figura 3.7:** Stratagene Stratalinker 1800.

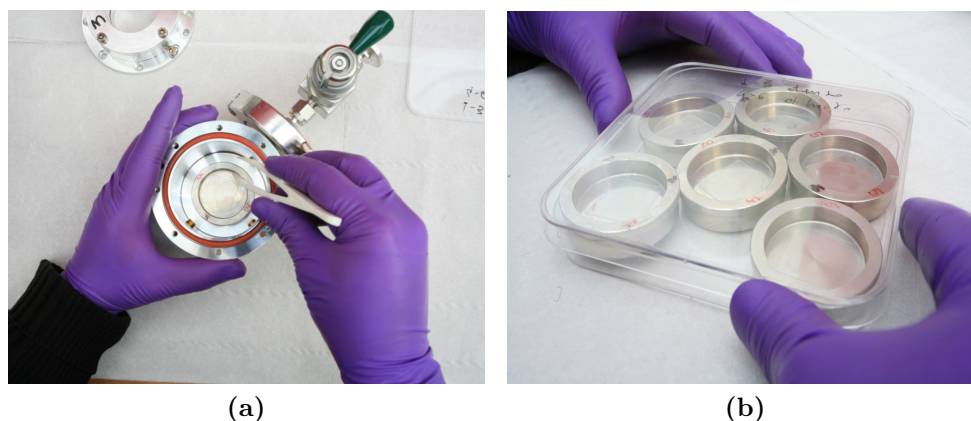
Ceppi Esposti:

*B. pumilus* FO 036b    *B. pumilus* SAFN 036    *B. pumilus* SAFR 032  
*B. pumilus* DSMZ 361    *B. nealsonii* DSMZ 15077    *B. subtilis* ATCC 6633  
*B. pumilus* SAPN 036

E' stata inoculata un'aliquota di 10  $\mu$ l dei ceppi congelati in 5 ml di *Brain Heart Infusion* (BHI) e lasciata crescere in agitazione a 37 °C per la notte. Successivamente è stata centrifugata (15 minuti a 3500 rpm), risospesa in acqua distillata sterile e portata ad una DO<sub>650</sub> pari a 0.6. Una parte di tale sospensione (300  $\mu$ l) è stata distribuita uniformemente sul fondo dei pozzetti di una piastra a 24 pozzetti, in modo da ricoprirli interamente (Figura 4.4). Successivamente si è proceduto con l'esposizione a UVC (245 nm) mediante UV Stratalinker 1800 (Stratagene, Figura 3.7).

Lo Stratalinker è uno strumento formato da 5 lampade UVC da 8 Watt ciascuna con una potenza di circa 3000  $\mu$ Watt/cm<sup>2</sup>. Inizialmente gli intervalli di esposizione sono stati di 10 secondi tra un pozzetto e l'altro. Nelle esposizioni successive, vista la risposta al trattamento da parte delle cellule, i tempi sono stati aumentati. In seguito si è proceduto ad aggiungere alla sospensione precedentemente esposta a UV 1.7 ml di *Brain Heart Infusion* (BHI) e a incubarla in stufa a 37 °C per la notte. Il giorno seguente, a seconda della sopravvivenza dei batteri (in base ad una stima qualitativa sulla densità dei pozzetti), si è proceduto a inoculare 10  $\mu$ l di ogni ceppo cresciuto a tempo





**Figura 3.8:** (a) Estrazione di un piattino contenente un campione dalla cella di reazione.  
(b) Campioni esposti pronti per essere idratati.

d'esposizione maggiore in 5 ml di BHI, lasciandolo crescere per la notte. Il giorno seguente una parte di tale inoculo è stato miscelato a glicerolo, che funge da crioprotettore (0.9 ml di sospensione e 0.5 ml di glicerolo), e conservato a  $-20^{\circ}\text{C}$  per i successivi esperimenti. La sospensione rimanente è stata centrifugata e il pellet risospeso in acqua distillata al fine di creare una nuova sospensione a  $\text{DO}_{650} = 0.6$  da sottoporre a tempi d'esposizione maggiori.

### 3.2.3 Allestimento vetrini per LISA ed esposizione

Le sospensioni di spore sono state preparate in precedenza a densità diversa. Successivamente 100  $\mu\text{l}$  di tali sospensioni sono state distribuite il più uniformemente possibile mediante un'ansa su vetrini coprioggetto sterili delle dimensioni di  $22\text{ mm} \times 22\text{ mm}$  e lasciati asciugare sotto cappa a flusso laminare per alcune ore. Una volta completamente asciugati i vetrini sono stati posti nei piattini precedentemente sterilizzati in autoclave e inseriti nelle celle di reazione di LISA. Una volta esposti alle condizioni desiderate i piattini sono stati rimossi dalle celle di reazione (Figura 3.8) e reidratati per alcune ore con 1 ml di acqua distillata sterile. In seguito la patina di spore è stata grattata dal vetrino e la sospensione ottenuta è stata seminata in *Tryptic Soy Agar* o in *Brain Heart Infusion* addizionato con 15 g di agar al litro dopo diluizioni a fattore 10, a seconda del tempo d'esposizione. Le colonie sono state infine contate per risalire alle UFC/ml e quindi alla sopravvivenza. In parallelo si è

proceduto alla titolazione delle sospensioni dopo la sola disidratazione, per valutarne l'effetto citocida. Un ulteriore controllo è stato fornito dalla titolazione dei vetrini immessi nella camera LISA, quindi sottoposti alle stesse condizioni di temperatura, composizione atmosferica e pressione del simulatore, ma non esposti ai raggi UV.

### **3.2.4 Le prove di sopravvivenza a tempi lunghi a basse temperature: esposizione a -80°**

Si è cercato di valutare infine l'effetto della disidratazione sulla sopravvivenza cellulare. In particolare, oltre all'effetto a breve termine sulla sopravvivenza cellulare si sono fatti esperimenti a lungo termine, della durata massima di 110 giorni, utilizzando campioni disidratati di spore batteriche esposti a temperature di -80 °C. In seguito tali campioni sono stati idratati, titolati e confrontati con le sospensioni di partenza.

### **3.2.5 Problemi di contaminazione e prove di estrazione del DNA da spore**

Durante la messa in opera di alcuni esperimenti, al momento della semina su terreno, si sono verificati casi di contaminazione causata da altre specie batteriche. Queste potevano essere presenti nell'aria al momento del recupero dei campioni o all'interno della camera marziana, dal momento che quest'ultima ha ospitato esperimenti che coinvolgevano gruppi di ricerca e ceppi batterici diversi. Si è quindi reso necessario talvolta procedere ad un'analisi più rigorosa delle colonie cresciute, nel caso la loro identificazione risultasse difficoltosa.

**Estrazione di DNA da cellule vegetative** L'estrazione del DNA è stata effettuata sui ceppi microbici isolati nel caso la loro identificazione risultasse dubbia. Si è proceduto al prelievo di alcune colonie fresche di 1-2 giorni mediante ansa sterile, tali colonie sono state stemperate in 300 µl di acqua distillata sterile e mescolate mediante vortex. In seguito le provette da 1.5 ml contenenti le cellule in sospensione sono state fatte bollire per 15 minuti, il ca-

lore infatti causa la rottura della parete cellulare e la conseguente fuoriuscita del DNA. I campioni sono stati poi centrifugati per 5 minuti a 4000 rpm al fine di separare il surnatante, contenente il DNA, dal resto delle componenti cellulari.

**Estrazione di DNA da spore** Altre prove sono state fatte al fine di poter estrarre direttamente il DNA da spore batteriche prima della loro germinazione. Tale lavoro è importante al fine di ottimizzare questa tecnica che potrebbe venire utilizzata negli esperimenti successivi per analisi più approfondite di tipo biomolecolare sui danni al DNA in seguito ad esposizione all'ambiente marziano.

Per poter estrarre il DNA dalle le spore è stato utilizzato il seguente protocollo [72]:

Una sospensione di acqua distillata contenente  $2 \times 10^5$  spore precedentemente purificate è stata centrifugata a 6000 rpm per 30 minuti. In seguito il pellet ottenuto è stato incubato in una soluzione tampone per 30 minuti a 70°C in un bagnetto mescolandola ogni 10 minuti. Il tampone era così composto:

NaOH	0.1 M
NaCl (pH 10.8)	0.1 M
SDS ( <i>sodio dodecil solfato</i> , Serva)	1%
$\beta$ – mercaptoetanololo	1%

in seguito è stato lavato mediante centrifugazione in 1 ml di PBS (*phosphate buffered saline*). Il campione è stato sottoposto a digestione con lisozima (*lysozyme from chicken egg white*, Sigma) ad una concentrazione di 1.5 g/l in 100  $\mu$ l di TE (*Tris-EDTA*, composto da Tris 10 mM ed EDTA 1 mM, pH 8) per 1 ora a 37 °C in bagno in agitazione.

Successivamente è stato aggiunto SDS (*sodio dodecil solfato*, Serva) e proteinasi K (*proteinase K from Tritirachium album*, Serva) ad una concentrazione finale rispettivamente dell'1% e di 0.2 g/l. Il campione è stato quindi incubato per 1 ora a 50 °C in bagno in agitazione.

Al fine di far precipitare le proteine rimaste il campione, in seguito alla digestione, è stato mescolato con acetato d'ammonio freddo fino alla concen-

trazione finale di 2.5 M e lasciato per 10 minuti in ghiaccio. Dopo averlo centrifugato per 5 minuti a 12000 rpm il surnatante è stato mescolato con 2 volumi di etanolo al 100% freddo e conservato per la notte a -20 °C per favorire la precipitazione degli acidi nucleici. Il giorno seguente il campione, sotto forma di pellet, è stato risospeso in 50 µl di TE (*Tris-EDTA*) per poter essere utilizzato durante le fasi successive delle analisi.

**Reazione di PCR** La *Polymerase Chain Reaction*, nota come PCR, è stata inizialmente utilizzata per amplificare la porzione che codifica una parte della subunità 16S ribosomiale, che ha la caratteristica di essere ben conservata. Nel caso del genere *Bacillus* l'amplificato ha le dimensioni di circa 587 pb.

Il master mix utilizzato per la reazione ha la seguente composizione:

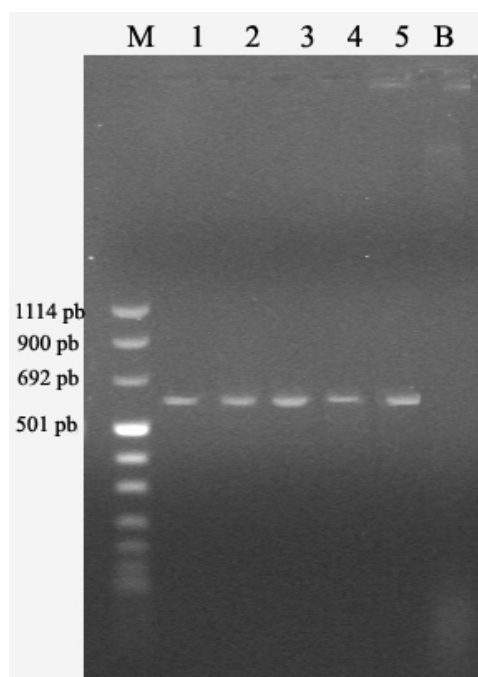
Primer 355 F, interno o 27 F, esterno (10 µM, Sigma)	2 µl
Primer 910 R, interno o 1492 R, esterno (10 µM, Sigma)	2 µl
MgCl <sub>2</sub> (15 mM, Eurobio)	3 µl
Tampone (10X, Eurobio)	5 µl
Taq polimerasi (5 U/ml, Eurobio)	0.5 µl
dNTPs (10 mM, Eurobio)	1 µl
DNA da analizzare	2 µl

I primer hanno la seguente sequenza:

Primer	Sequenza	Temp. <i>annealing</i>
355 Forward	5' CTT ACG GGA GGC AGC AG 3'	56 °C
910 Reverse	5' CCC GTC AAT TCC TTT GAG TT 3'	56 °C

La miscela di reazione ottenuta è stata poi inserita nel termociclatore (Mastercycler gradient, Eppendorf) col seguente programma:

1. 94 °C per 5 minuti (fase di denaturazione)
2. 94 °C per 1.5 minuti
3. 56 °C per 1.5 minuti (fase di *annealing*)
4. 72 °C per 2 minuti (fase di prolungamento)
5. ripetizione dal punto 2 al 4 per 32 volte



**Figura 3.9:** Profili elettroforetici degli amplificati ottenuti mediante l'utilizzo dei primer 355F e 910R: M, marcatore; 1-5 *Bacillus pumilus* SAFR032, delle dimensioni di circa 587 pb; B, bianco.

6. 72 °C per 10 minuti (rinaturazione DNA)

7. Fine ciclo, la miscela di reazione viene portata a 4 °C

**Elettroforesi di DNA su gel d'agarosio** Per verificare l'avvenuta amplificazione del DNA è stato poi allestito un gel di agarosio all'1% in un tampone TBE 0.5× (*Tris-Borato-EDTA*) contenente bromuro d'etidio alla concentrazione di 0.5 µl/ml. Una volta solidificato, tale gel è stato posto nell'apposita vaschetta per elettroforesi ed è stato ricoperto dal tampone utilizzato nella corsa, TBE 1× (*Tris-Borato-EDTA*). Una aliquota di 10 µl di ciascun amplificato è stata miscelata a 5 µl di GLB 6× (*Gel loading buffer*, composto dallo 0.25% di blu di bromofenolo, 0.25% di cianolo di xilene FF e dal 30% di glicerolo) e in seguito, dopo essere stata caricata nei pozzetti all'interno del gel, è stata fatta migrare per circa un'ora a 90 Volt (Figura 3.9).

In parallelo, al fine di avere un riferimento dimensionale, sono stati caricati 3 µl di marker (*molecular weight marker VIII*, da 1114-1121 pb, Roche).

La presenza dell'amplificato è stata verificata mediante osservazione al transilluminatore (Biorad), in quanto il DNA è in grado di legarsi al bromuro d'etidio presente nel gel ed è quindi visualizzabile mediante esposizione ai raggi UV. Successivamente, una volta accertata la presenza degli amplificati, si è proseguito con la loro purificazione.

**Purificazione** Per svolgere l'operazione di purificazione è stato utilizzato il kit *Microcon* (Centrifugal Filter Devices, Amicon Bioseparations) caratterizzato dalla presenza di un filtro a scambio ionico.

La procedura di purificazione prevede l'aggiunta di 250  $\mu\text{l}$  di acqua a 40  $\mu\text{l}$  di amplificato. Tale sospensione è stata posta nella parte alta della provetta contenente il filtro e sottoposta a centrifuga per 10 minuti a 10000 rpm. Dopo essere stato centrifugato l'eluato è stato eliminato. Il materiale restante è stato raccolto mediante l'inserimento del filtro, questa volta capovolto, all'interno di una nuova provetta con aggiunta, nella parte alta, di 35  $\mu\text{l}$  di acqua. La provetta è stata centrifugata nuovamente per 10 minuti a 10000 rpm.

Il DNA purificato è stato poi raccolto e conservato a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  fino al suo utilizzo.

**Sequenziamento** Per la PCR di sequenziamento utilizzata è stata usata la seguente miscela conservata in ghiaccio:

Primer, <i>forward o reverse</i> (10 $\mu\text{M}$ )	4 $\mu\text{l}$
Buffer Big Dye 5X ( <i>sequencing buffer</i> , AB)	2 $\mu\text{l}$
Acqua distillata sterile	3 $\mu\text{l}$
Big Dye Terminator ( <i>terminator RR mix</i> , AB)	1 $\mu\text{l}$
Amplificato purificato	5 $\mu\text{l}$

Il programma utilizzato dal termociclatore (Mastercycler gradient, Eppendorf) è il seguente:

1.  $96\text{ }^{\circ}\text{C}$  per 10 secondi
2.  $55\text{ }^{\circ}\text{C}$  per 10 secondi (fase di *annealing*)
3.  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  per 4.5 minuti (fase di prolungamento)

4. Ripetizione dal punto 1 al 3 per 30 volte
5. Fine ciclo, la miscela di reazione viene portata a 4 °C

**Sequenziamento ed analisi delle sequenze ottenute** Le sequenze così ottenute sono state sequenziate mediante ABI Prism 3100 Genetic Analyzer, Perkin Elmer.

In seguito sono state analizzate con il software DNASTar (Lasergene) e confrontate con la banca dati dell'NCBI mediante Blast per l'identificazione dei ceppi.





# Capitolo 4

## Risultati e discussione

### 4.1 Sopravvivenza in ambiente marziano simulato

Alle condizioni sperimentali utilizzate: temperatura di a  $-80^{\circ}\text{C}$ , pressione di 7.5 mbar, composizione atmosferica composta al 95.5% da anidride carbonica e irraggiamento UV totale pari a  $41.8 \text{ W/m}^2$ ; il *Bacillus pumilus* SAFR 032 ha dato prova di essere l'organismo più resistente tra quelli testati finora. Tuttavia come già dimostrato in studi precedenti, il tempo richiesto per una riduzione del 99% (tre ordini di grandezza) della sopravvivenza è di almeno 5 minuti di esposizione [51].

Il tempo per raggiungere la dose di irradiazione UV letale  $\text{LD}_{100}$  richiesta per azzerare il numero di spore vitali si attesta a poco più di 6 ore. La parte dello spettro UV che influisce maggiormente sulla sopravvivenza microbica, in quanto è in grado di danneggiare direttamente le molecole di DNA, è quella con lunghezze d'onda  $< 260 \text{ nm}$  [49]. Nel caso del *Bacillus pumilus* SAFR032 esposto a condizioni marziane tale valore corrisponde ad una dose di UVC pari a  $2.75 \text{ KJ/m}^2$ .

Per quanto riguarda gli altri parametri che potrebbero influenzare la sopravvivenza in ambiente marziano, gli esperimenti eseguiti dimostrano chiaramente che questi svolgono un ruolo secondario rispetto all'irraggiamento UV. Infatti all'interno di LISA sono stati immessi dei campioni che sono stati però

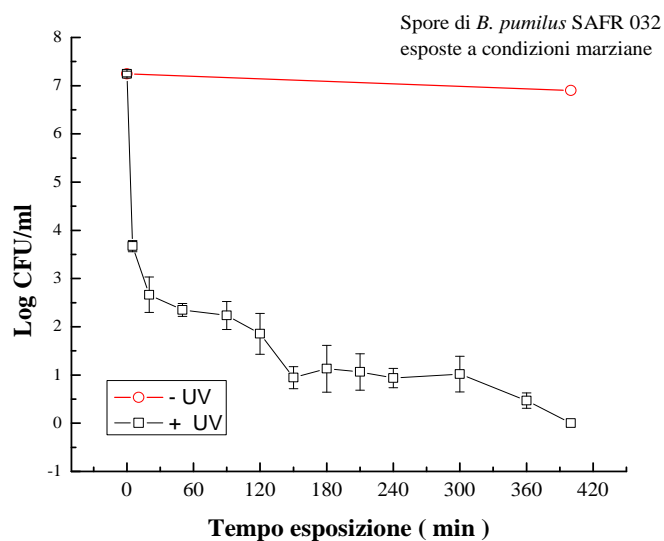
mantenuti al buio durante lo svolgimento degli esperimenti di esposizione UV. Tali campioni presentano un calo poco marcato nella sopravvivenza rispetto ai campioni di partenza mantenuti in condizioni ambientali terrestri.

La cinetica di inattivazione del *Bacillus pumilus* SAFR 032 è caratterizzata da un andamento bifasico: una rapida diminuzione nella sopravvivenza delle spore nei primi minuti di esposizione e, successivamente, una riduzione molto più lenta fino ad arrivare, dopo circa 6 ore di esposizione, alla completa sterilità (Figura 4.1). Se si confrontano i dati sulla sopravvivenza di questa specie con un'altra specie, il *Bacillus pumilus* DSMZ 27, esposto anch'esso alle stesse condizioni all'interno della camera marziana, si può notare come la sopravvivenza del ceppo *B. pumilus* SAFR 032 sia notevolmente maggiore. Infatti il tempo necessario a raggiungere la sterilità si attesta attorno ai 400 minuti di esposizione per quest'ultimo rispetto ai 120 minuti del *B. pumilus* DSMZ 27, nonostante inizialmente entrambe le curve presentino un andamento simile ed un abbassamento di 3 ordini di grandezza nei primi minuti di esposizione.

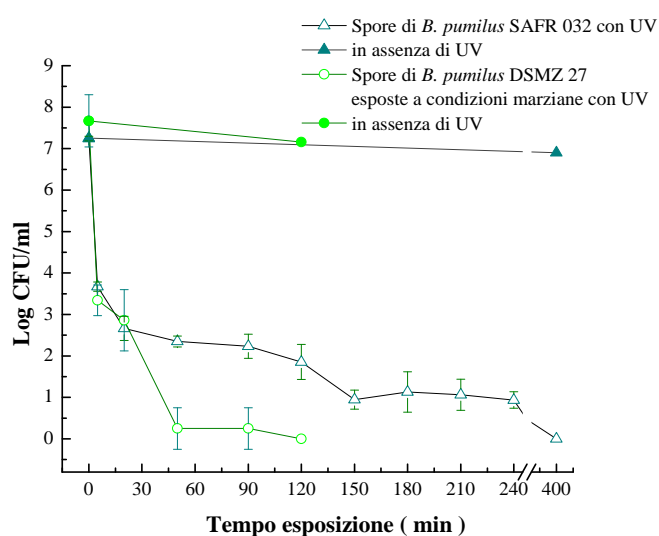
Il calo meno marcato nella seconda parte della curva di sopravvivenza potrebbe essere dovuta sia a spore resistenti agli UV, che quindi necessitano di una dose maggiore di radiazione per la loro inattivazione, sia dalla protezione fornita dalle spore superficiali, che creano una barriera in grado di assorbire i raggi ultravioletti e schermare di conseguenza le cellule sottostanti.

Questo studio, in conclusione, sottolinea come le spore di questa specie siano inattivate dopo poche ore (6 ore) di esposizione a irraggiamento UV di tipo marziano e di conseguenza le superfici esposte al sole di sonde o *lander* verrebbero sterilizzate in breve tempo.

L'esatto meccanismo che contribuisce alla resistenza agli UV nel genere *Bacillus* non è ancora conosciuto completamente e può essere dovuto a vari fattori tra i quali meccanismi di protezione cellulare, la particolare fotochimica del DNA e i meccanismi di riparazione delle spore. Inoltre i valori di sopravvivenza riportati sono derivati da un'esposizione agli UV pari a UVA  $33\text{W/m}^2$ , UVB  $5.5\text{ W/m}^2$  e UCV  $3.3\text{ W/m}^2$  in un cielo sereno. Tuttavia il flusso UV che raggiunge la superficie marziana varia del 18% a seconda che il pianeta si trovi in perielio o afelio rispetto al Sole, di conseguenza il tempo necessario per



(a)

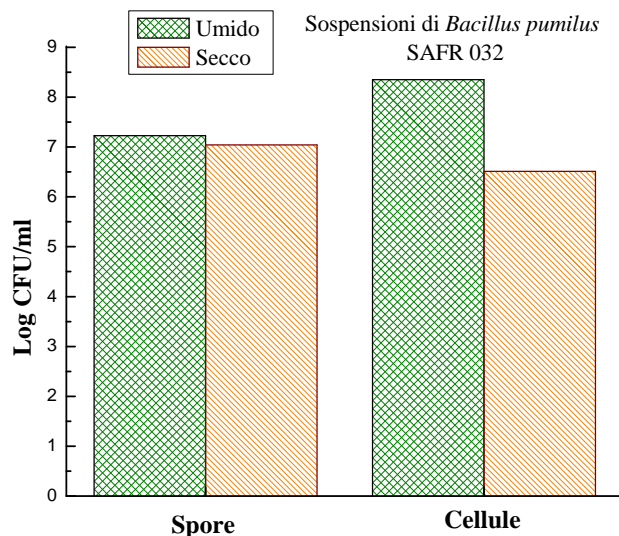


(b)

**Figura 4.1:** (a) Cinetiche di sopravvivenza ottenute con cellule batteriche esposte a condizioni marziane per le variabili di T ( $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), P (7.5 mbar), atmosfera (100%  $\text{CO}_2$ ), e irraggiamento UV ( $\sim 41.8\text{ W/m}^2$ ).

(b) Cinetiche di sopravvivenza di *Bacillus pumilus* SAFR 032 e *Bacillus pumilus* DSMZ 27 [73] a confronto.

Le 2 cinetiche rappresentate per ciascun grafico mostrano le cinetiche di abbattimento della sopravvivenza in presenza e assenza di UV.

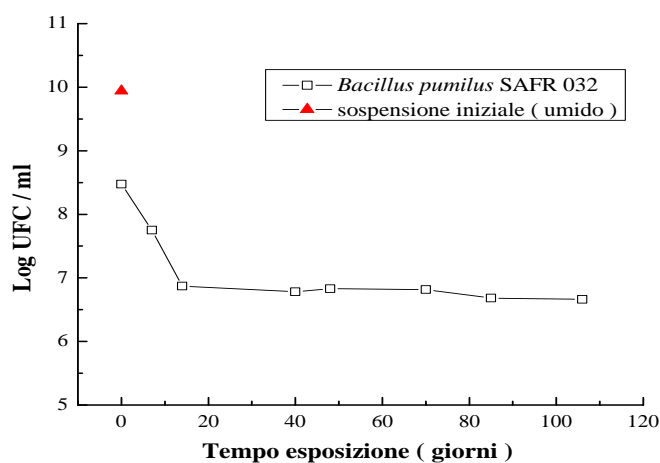


**Figura 4.2:** Sopravvivenza osservata per il titolo Umido rapportato al Secco in sospensioni di partenza di spore e cellule vegetative di *Bacillus pumilus* SAFR 032.

raggiungere la dose letale di radiazione può variare a seconda del periodo dell'anno. Inoltre il flusso UV può ridursi significativamente in caso di tempeste di sabbia come quelle che interessano la superficie marziana. Secondo alcuni autori in tali condizioni il flusso UV che è in grado di raggiungere la superficie di Marte può ridursi del 75% [60]. Infine il tempo necessario al raggiungimento di una dose letale di UV può aumentare nel caso di superfici di navicelle parzialmente schermate dai raggi UV e ad alte latitudini, dove, a causa della bassa altezza del sole, vi è un flusso UV minore.

## 4.2 Sopravvivenza alla disidratazione

In seguito è stata valutata la sopravvivenza di endospore sottoposte a disidratazione, procedimento necessario durante la preparazione dei campioni. I dati dimostrano che la disidratazione è responsabile di un abbattimento batterico, per quanto riguarda le spore, pari mediamente al 50% rispetto alla sospensione di partenza in acqua. Tale abbattimento è sensibilmente maggiore sulle cellule vegetative, come dimostrato da studi precedenti [73] (Figura 4.2).



**Figura 4.3:** Cinetiche di sopravvivenza ottenute con cellule batteriche esposte a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  in condizioni ambientali terrestri.

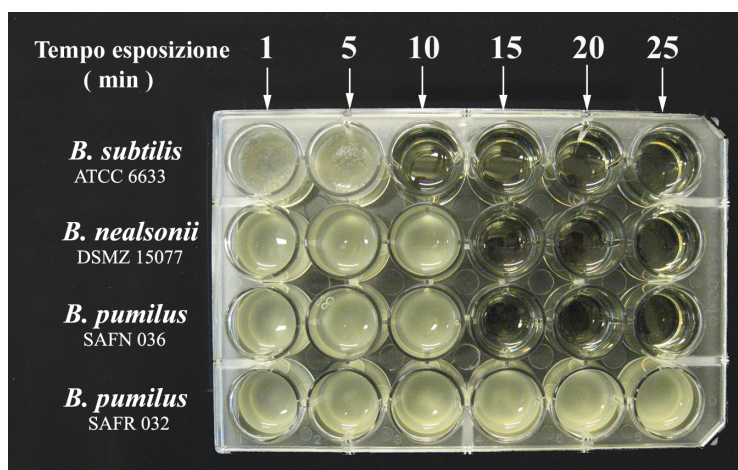
Inoltre è stato fatto uno studio a lungo termine sulla sopravvivenza di spore disidratate esposte a temperature di  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . L'esperimento è stato condotto al buio, in condizioni di composizione e pressione atmosferica terrestri a livello del mare (1013 mbar)(Figura 4.3).

La sopravvivenza delle spore subisce una diminuzione dell'80% nei primi sette giorni e di quasi 2 ordini di grandezza a 14 giorni di esposizione. In seguito la percentuale di sopravvivenza si mantiene costante con un tempo massimo di esposizione analizzato di 110 giorni. Tale cinetica potrebbe essere legata ad una selezione delle spore più resistenti, anche se i meccanismi alla base di questa resistenza non sono ancora noti.

### 4.3 Sopravvivenza di cellule vegetative esposte a UVC

Sono stati sottoposti a irradiazione UVC delle sospensioni di cellule vegetative di varie specie di *Bacillus* per verificarne la diversa sensibilità a questo tipo di radiazione particolarmente energetica (Figura 4.4).

Da questo studio sulla sopravvivenza, i cui risultati sono riportati in Tabella 4.1, si può notare come il *Bacillus pumilus* SAFR 032 si presenti ancora



**Figura 4.4:** Piastra ottenuta in seguito ad esposizione a UVC e incubazione dei campioni cellulari in *Brain Heart Infusion*. I pozzetti in cui è avvenuta la crescita si presentano torbidi e più densi.

SPECIE	Dose UV (KJ/m <sup>2</sup> )	Tempo Esposizione (min)
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	14,4	8
<i>Bacillus pumilus</i> DSMZ 361	18	10
<i>Bacillus nealsonii</i> DSMZ 15077	21,6	12
<i>Bacillus pumilus</i> SAFN	21,6	12
<i>Bacillus pumilus</i> SAPN	27	15
<i>Bacillus pumilus</i> FO 036b	27	15
<i>Bacillus pumilus</i> SAFR032	45	25

**Tabella 4.1:** Risultati sulla sopravvivenza in seguito ad esposizione di cellule di varie specie di *Bacillus* agli UVC (254 nm).

come la specie più resistente a irradiazione ultravioletta tra tutte le specie oggetto d'indagine. In particolare è stata notata crescita batterica in seguito a esposizione a UVC della durata di 25 minuti, corrispondenti a un totale di 45 KJ/m<sup>2</sup>. La specie meno resistente agli UVC si è dimostrata essere il *Bacillus subtilis* ATCC 6633, il cui limite massimo per la sopravvivenza, nelle condizioni testate, è stato 8 minuti, pari a 14.4 KJ/m<sup>2</sup>.

## Capitolo 5

### Conclusioni e sviluppi futuri

La ricerca di forme di vita che si sono evolute all'esterno del pianeta Terra è uno degli obiettivi più ambiziosi dell'esplorazione spaziale. Essa richiede notevoli sforzi al fine di progettare le tecnologie e gli esperimenti più adatti a rivelare tracce anche minime di tali organismi. La contaminazione di campioni extraterrestri dovuta a cellule o spore provenienti dalla Terra potrebbe di conseguenza compromettere seriamente la validità dei risultati ottenuti in questo tipo di missioni. La contaminazione è un problema sotto vari punti di vista. Innanzitutto dal punto di vista prettamente scientifico, in quanto potrebbe falsare i risultati ottenuti durante gli esperimenti. D'altra parte le missioni spaziali che prevedono l'uso di mezzi automatizzati e di esperimenti di tipo biologico coinvolgono ingenti somme di denaro nonché anni di preparazione da parte di equipe di scienziati. La mancanza di risultati o la loro inattendibilità rappresenta quindi un problema anche dal punto di vista economico.

Al fine di prevenire la contaminazione microbica del materiale inviato nello spazio, quest'ultimo è assemblato in *clean room* e sottoposto a rigidi protocolli di sterilizzazione. Tuttavia alcuni organismi sono in grado di sopravvivere a tali procedure e di conseguenza possono essere veicolati nello spazio a bordo di sonde o navicelle. L'esistenza di tali batteri resistenti richiede innanzitutto un continuo monitoraggio durante l'assemblaggio della componentistica spaziale al fine di isolare gli organismi più resistenti alle normali procedure utilizzate. L'identificazione e lo studio delle caratteristiche che permettono la sopravvivenza di tali specie rappresenta quindi un passo fondamentale al fine di sviluppare

nuove tecnologie di sterilizzazione.

Inoltre le specie appartenenti al genere *Bacillus* sono tra le più tenaci forme di vita esistenti, dimostrando una notevole resistenza a diversi tipi di stress (calore, agenti chimici, UV), di conseguenza possiedono meccanismi di tipo diverso in grado di proteggerle a più livelli. Lo studio sulla sopravvivenza in specie particolarmente resistenti a stress quali la radiazione ultravioletta potrebbe permettere di far luce sulle caratteristiche biomolecolari associate a questa peculiarità. Attualmente non esistono infatti modelli in grado di spiegare la resistenza alla radiazione solare dimostrata da questi organismi.

Al momento non sono state ancora sviluppate delle tecnologie di sterilizzazione in grado di azzerare la carica microbica presente sulle navicelle spaziali senza andare a danneggiare i componenti elettronici e meccanici ivi presenti, di conseguenza il rischio di contaminazione è ancora presente. D'altra parte lo spazio e in particolare Marte, principale protagonista della ricerca spaziale degli ultimi anni, sono ambienti con condizioni estremamente ostili e sfavorevoli alla vita. Sulla superficie di Marte i batteri sarebbero soggetti a temperature molto basse, mediamente tra i  $-90^{\circ}\text{C}$  e i  $20^{\circ}\text{C}$ , pressione atmosferica tra 6 e 10 mbar e soprattutto forte irraggiamento UV. Tali condizioni rendono estremamente improbabile la sopravvivenza di organismi di tipo terrestre.

Tuttavia nel presente lavoro è stato verificato che un particolare ceppo di *Bacillus* è in grado di sopravvivere fino a 6 ore in ambiente marziano simulato, risultando essere l'organismo più resistente studiato finora. In ogni caso la radiazione ultravioletta rappresenta il principale fattore biocida presente su Marte e può abbassare la sopravvivenza batterica di molti ordini di grandezza in pochi minuti d'esposizione. Ciononostante la radiazione UV possiede un basso potere di penetrazione, di conseguenza la presenza di uno scudo è in grado di ridurre notevolmente la capacità sterilizzante [74]. Ulteriori ricerche in questo campo, sfruttando dei simulatori d'ambiente marziano in grado di riprodurre le variazioni giornaliere sulla sua superficie, potrebbero permettere di valutare la sopravvivenza a lungo termine di campioni biologici in presenza non solo di atmosfera marziana ma anche di polveri sulla sua superficie.

La sperimentazione utilizzando dei simulatori ambientali quali LISA, uti-



lizzato in questo lavoro, potrebbe permettere di creare dei modelli alquanto realistici della sopravvivenza microbica in ambiente marziano. Infatti una conoscenza il più possibile dettagliata dei meccanismi e delle cinetiche legate alla resistenza agli UV e alla sopravvivenza in ambienti extraterrestri è fondamentale a questo punto della ricerca di forme di vita in altre zone del Sistema Solare.

Tale necessità deriva dalla possibilità, tutt'altro che remota, di acquisire dati fuorvianti a causa di contaminazione biologica e rilevare tracce di vita laddove essa non è mai stata presente.

. Inoltre, per quanto improbabile possa essere, sarebbe inammissibile la contaminazione veicolata dall'uomo di un ambiente ancora inesplorato come quello marziano.



# Bibliografia

- [1] C. De Duve, *Alle origini della vita*. Longanesi, 2008.
- [2] C. Chyba e C. Sagan, “Endogenous production, exogenous delivery and impact-shock synthesis of organic molecules: an inventory for the origins of life,” *Nature*, vol. 355, pp. 125–132, 1992.
- [3] P. Thaddeus, “The prebiotic molecules observed in the interstellar gas,” *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, vol. 361, pp. 1681–1687, 2006.
- [4] S. A. Sandford, *et al.*, “Organics captured from comet 81P/Wild 2 by the Stardust Spacecraft,” *Science*, vol. 314, pp. 1720–1724, 2006.
- [5] D. Glavin, J. Dworkin, e S. Sandford, “Detection of cometary amines in samples returned by Stardust,” *Meteoritics and Planetary Science*, vol. 43, pp. 399–414, 2008.
- [6] N. Balucani e P. Casavecchia, “Gas-phase reactions in extraterrestrial environments: laboratory investigations by crossed molecular beams,” *Origin of Life and Evolution of Biospheres*, vol. 36, pp. 443–450, 2006.
- [7] A. C. Cheung, D. M. Rank, C. H. Townes, D. D. Thornton, e W. J. Welch, “Detection of NH<sub>3</sub> molecules in the interstellar medium by their microwave emission,” *Physical Review Letters*, vol. 21, pp. 1701–1705, 1968.
- [8] Z. Martins, O. Botta, M. L. Fogel, M. A. Sephton, D. P. Glavin, J. S. Watson, J. P. Dworkin, A. W. Schwartz, e P. Ehrenfreund, “Extraterrestrial

- nucleobases in the Murchison meteorite,” *Earth and Planetary Science Letters*, vol. 270, pp. 130–136, 2008.
- [9] Z. Martins, C. M. D’Alexander, G. E. Orzechowska, M. L. Fogel, e P. Ehrenfreund, “Indigenous amino acids in primitive CR meteorites,” *Meteoritics and Planetary Science*, vol. 42, pp. 2125–2136, 2007.
- [10] O. Botta e J. Bada, “Extraterrestrial organic compounds in meteorites,” *Surveys in Geophysics*, vol. 23, pp. 411–467, 2002.
- [11] S. Love e D. Brownlee, “A direct measurement of the terrestrial mass accretion rate of cosmic dust,” *Science*, vol. 262, pp. 550 – 553, 1993.
- [12] G. Ryder, “Mass flux in the ancient Earth-Moon system and benign implications for the origin of life on Earth,” *Journal of Geophysical Research*, vol. 107, pp. 1–14, 2002.
- [13] A. A. Nemchin, M. J. Whitehouse, M. Menneken, T. Geisler, R. T. Pidgeon, e S. A. Wilde, “A light carbon reservoir recorded in zircon-hosted diamond from the Jack Hills,” *Nature*, vol. 454, pp. 92–95, 2008.
- [14] S. L. Miller, “A production of amino acids under possible primitive Earth conditions,” *Science*, vol. 117, pp. 528–529, 1953.
- [15] H. J. Cleaves, J. p. Chalmers, A. Lazcano, S. Miller, e J. Bada, “A reassessment of prebiotic organic synthesis in neutral planetary atmospheres,” *Origin of Life and Evolution of Biospheres*, vol. 38, pp. 105–115, 2008.
- [16] S. D’Amico, T. Collins, J.-C. Marx, G. Feller, e C. Gerday, “Psychrophilic microorganisms: challenges for life,” *EMBO Reports*, vol. 7, pp. 385–389, 2006.
- [17] V. R. Baker, “Water and the martian landscape,” *Nature*, vol. 412, pp. 228–236, 2001.
- [18] C. D. Parkinson, M. C. Liang, Y. L. Yung, e J. L. Kirschvink, “Habitability of Enceladus: Planetary conditions for Life,” *Origin of Life and Evolution of Biospheres*, vol. 38, pp. 355–69, 2008.

- [19] C. Zimmer, K. K. Khurana, e M. G. Kivelson, "Subsurface oceans on Europa and Callisto: Constraints from Galileo Magnetometer observations," *Icarus*, vol. 147, pp. 329–347, 2000.
- [20] T. M. McCollom, "Methanogenesis as a potential source of chemical energy for primary biomass production by autotrophic organisms in hydrothermal systems on Europa," *Journal of Geophysical Research*, vol. 104, pp. 729–742, 1999.
- [21] G. Marion, C. Fritsen, H. Eicken, e M. Payne, "The search for life on Europa: Limiting environmental factors, potential habitats, and Earth analogues," *Astrobiology*, vol. 3, pp. 785–811, 2003.
- [22] G. Wachtershauser, "Evolution of the first metabolic cycles," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 87, pp. 200–204, 1990.
- [23] B. de Fontenelle, *Conversazioni sulla pluralità dei mondi*, Theoria, Ed., 1984.
- [24] M. H. Carr e J. W. Head, "Oceans on Mars: An assessment of the observational evidence and possible fate," *Journal of Geophysical Research*, vol. 108, pp. 1–28, 2003.
- [25] J. T. Perron, J. X. Mitrovica, M. Manga, I. Matsuyama, e M. A. Richards, "Evidence for an ancient martian ocean in the topography of deformed shorelines," *Nature*, vol. 447, pp. 840–843, 2007.
- [26] P. B. James, P. C. Thomas, M. J. Wolff, e B. P. Bonev, "MOC observations of four Mars year variations in the south polar residual cap of Mars," *Icarus*, vol. 192, pp. 318–326, 2007.
- [27] H. H. Kieffer, "Mars south polar spring and summer temperatures - A residual CO<sub>2</sub> frost," *Journal of Geophysical Research*, vol. 84, pp. 8263–8288, 1979.
- [28] J. Plaut, *et al.*, "Subsurface radar sounding of the South polar layered deposits of Mars," *Science*, vol. 316, pp. 92–95, 2007.

- [29] A. D. Howard, “The role of eolian processes in forming surface features of the martian polar layered deposits,” *Icarus*, vol. 144, pp. 267–288, 2000.
- [30] M. A. Seeds, *Foundations of Astronomy*, Brooks/Cole, Ed., 2001.
- [31] G. Galletta e V. Sergi, *Astrobiologia: le frontiere della vita*, Hoepli, Ed., 2005.
- [32] J. P. Bibring, *et al.*, “Global mineralogical and aqueous Mars history derived from OMEGA/Mars Express data,” *Science*, vol. 312, pp. 400–404, 2006.
- [33] J. P. Ferris, “Montmorillonite-catalysed formation of RNA oligomers: the possible role of catalysis in the origins of life,” *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, vol. 361, pp. 1777–1786, 2006.
- [34] H. P. Klein, J. Lederberg, A. Rich, N. H. Horowitz, V. I. Oyama, e G. V. Levin, “The Viking Mission search for life on Mars,” *Nature*, vol. 262, pp. 24–27, 1976.
- [35] G. V. Levin, “Analysis of evidence of Mars life,” *Electroneurobiología*, vol. 15, pp. 39–47, 2007.
- [36] J. M. Houtkooper e D. Schulze-Makuch, “A possible biogenic origin for Hydrogen Peroxide on Mars: The Viking results reinterpreted,” *International Journal of Astrobiology*, vol. 6, pp. 147–152, 2007.
- [37] International Mars Architecture for the Return of Samples (iMARS) Working Group, “Preliminary planning for an international Mars sample return mission,” iMARS, Tech. Rep., 2008.
- [38] D. S. McKay, E. K. Gibson Jr, K. L. Thomas-Keprta, H. Vali, C. S. Romanek, S. J. Clemett, X. D. F. Chillier, C. R. Maechling, e R. N. Zare, “Search for past life on Mars: possible relic biogenic activity in martian meterite ALH84001,” *Science*, vol. 273, pp. 924–930, 1996.

- [39] Nazioni Unite, *Treaty on Principles Governing the Activities of States in the Exploration and Use of Outer Space, Including the Moon and Other Celestial Bodies, Article IX*. U.N. Doc. TIAS No. 6347, 1967.
- [40] Task Group on Planetary Protection, Space Studies Board, National Research Council, *Biological Contamination of Mars: Issues and Recommendations*. National Academies Press, 1992.
- [41] M. S. Favero, “Microbiologic assay of space hardware,” *Environmental Biology and Medicine*, vol. 1, pp. 27–36, 1971.
- [42] P. Mahaffy, *et al.*, “Science priorities related to the organic contamination of martian landers,” Mars Exploration Program Analysis Group (MEPAG), Tech. Rep., 2004.
- [43] R. T. Dillon, W. R. Gavin, A. L. Roark, e C. R. Trauth Jr., “Estimating the number of terrestrial organisms on the Moon,” *Origins of Life and Evolution of Biospheres*, vol. 4, pp. 180–199, 1973.
- [44] D. A. Newcombe, A. C. Schuerger, J. Benardini, D. Dickinson, R. Tanner, e K. Venkateswaran, “Survival of spacecraft-associated microorganism under simulated martian UV irradiation,” *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 71, pp. 8147–8156, 2005.
- [45] H. E. Richter, “Zur darwischen lehre,” *Schmidt’s Jahrbücher der in-und ausländischen gesammten Medicin*, vol. 126, pp. 243–253, 1865.
- [46] W. Thomson (Lord Kelvin), *Popular Lectures and Addresses*, 1894, ch. Presidential Address to the British Association for the Advancement of Science, pp. 132–205.
- [47] S. Arrhenius, “Die Verbreitung des Lebens im Weltenraum,” *Die Umschau*, vol. 7, pp. 481–485, 1903.
- [48] W. L. Nicholson, N. Munakata, G. Horneck, H. J. Melosh, e P. Setlow, “Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments,” *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, vol. 64, pp. 548–572, 2000.

- [49] W. L. Nicholson, A. C. Schuerger, e P. Setlow, "The solar UV environment and bacterial spore UV resistance: considerations for Earth-to-Mars transport by natural processes and human spaceflight," *Mutation Research*, vol. 571, pp. 249–264, 2005.
- [50] G. Horneck, *et al.*, "Microbial rock inhabitants survive hypervelocity impacts on Mars-like host planets: First phase of Lithopanspermia experimentally tested," *Astrobiology*, vol. 8, pp. 17–44, 2008.
- [51] A. C. Schuerger, R. L. Mancinelli, R. G. Kern, L. J. Rothschild, e C. P. McKay, "Survival of endospores of *Bacillus subtilis* on spacecraft surfaces under simulated martian environments: implications for the forward contamination of Mars," *Icarus*, vol. 165, pp. 253–276, 2003.
- [52] B. D. Davis, R. Dulbecco, H. N. Eisen, e H. S. Ginsberg, *Microbiologia*, Zanichelli, Ed. Lippincott Company, 1993.
- [53] J. Benardini, J. Sawyer, K. Venkateswaran, e W. Nicholson, "Spore UV and acceleration resistance of endolithic *Bacillus pumilus* and *B. subtilis* isolates obtained from Sonoran desert basalt: implications for lithopanspermia," *Astrobiology*, vol. 3, pp. 709–717, 2003.
- [54] R. H. Vreeland, W. D. Rosenzweig, e D. W. Powers, "Isolation of a 250 million-year-old halotolerant bacterium from a primary salt crystal," *Nature*, vol. 407, pp. 897–900, 2000.
- [55] H. Gest e J. Mandelstam, "Longevity of microorganisms in natural environments," *Microbiological Sciences*, vol. 4, pp. 69–71, 1987.
- [56] A. O. Henriques e C. P. Moran Jr., "Structure, assembly and function of the spore surface layers," *Annual Review of Microbiology*, vol. 61, pp. 555–588, 2007.
- [57] M. T. Madigan, J. M. Martinko, e J. Parker, *Brock Biologia dei Microorganismi*, C. E. Ambrosiana, Ed., 2003.
- [58] L. M. Prescott, J. P. Harley, e D. A. Klein, *Microbiology*. Wm. C. Brown Publisher, 1996.



- [59] P. Setlow, "Resistance of spores of *Bacillus* species to ultraviolet light," *Environmental and Molecular Mutagenesis*, vol. 38, pp. 97–104, 2001.
- [60] J. Applebaum e D. J. Flood, "Solar radiation on Mars," *Solar Energy*, vol. 45, pp. 353–363, 1990.
- [61] R. Moeller, G. Horneck, R. Facius, e E. Stackebrandt, "Role of pigmentation in protecting *Bacillus* sp. endospores against environmental UV radiation," *Microbiology Ecology*, vol. 51, pp. 231–236, 2005.
- [62] W. L. Nicholson, P. Fajardo-Cavazos, R. Rebeil, P. J. Riesenman, e T. A. Slieman, "DNA photochemistry, DNA repair and bacterial spore structure as determinants of spore resistance to solar UV radiation," 2000.
- [63] M. Paidhungat, B. Setlow, A. Driks, e P. Setlow, "Characterization of spores of *Bacillus subtilis* which lack Dipicolinic Acid," *Journal of Bacteriology*, vol. 182, pp. 5505–5512, 2000.
- [64] Y. Xue e W. L. Nicholson, "The two major spore DNA repair pathways, Nucleotide Excision Repair and Spore Photoproduct lyase, are sufficient for the resistance of *Bacillus subtilis* spores to artificial UV-C and UV-B but not to solar radiation," *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 62, pp. 2221–2227, 1996.
- [65] G. Galletta, F. Ferri, G. Fanti, M. D'Alessandro, G. Bertoloni, D. Pavarin, C. Bettanini, P. Cozza, P. Pretto, e S. Debei, "S.A.M., the italian martian simulation chamber," *Origin of Life and Evolution of Biospheres*, vol. 36, pp. 625–627, 2006.
- [66] D. Garoli e M. Pelizzo, "Misure irradiazione UV all'interno di LISA," Università degli Studi di Padova, Tech. Rep., 2007.
- [67] C. S. Cockell, D. C. Catling, W. L. Davis, K. Snook, R. L. Kepner, P. Lee, e C. P. McKay, "The ultraviolet environment of Mars: Biological implications past, present, and future," *Icarus*, vol. 146, pp. 434–459, 2000.

- [68] J. Gioia, *et al.*, “Paradoxical DNA repair and peroxide resistance gene conservation in *Bacillus pumilus* SAFR-032 ,” *PLoS ONE*, vol. 2:e928, 2007.
- [69] M. Kempf, F. Chen, M. Satomi, R. Kern, e K. Venkateswaran, “Recurrent isolation of hydrogen peroxide-resistant spores of *Bacillus pumilus* from a Spacecraft Assembly Facility,” *Astrobiology*, vol. 5, pp. 391–405, 2005.
- [70] L. Link, J. Sawyer, K. Venkateswaran, e W. Nicholson, “Extreme spore UV resistance of *Bacillus pumilus* isolates obtained from an ultraclean spacecraft assembly facility,” *Microbial Ecology*, vol. 47, pp. 159–163, 2004.
- [71] J. A. Spudich e A. Kornberg, “Biochemical studies of bacterial sporulation and germination,” *Journal of biological chemistry*, vol. 243, pp. 4588–4599, 1968.
- [72] B. D’Alessandro, K. Antùnez, C. Piccini, e P. Zunino, “DNA extraction and PCR detection of *Paenibacillus larvae* spores from naturally contaminated honey and bees using spore-decoating and freeze-thawing techniques,” *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol. 23, pp. 593–597, 2007.
- [73] G. D’Angelo, “Sopravvivenza di cellule e spore batteriche esposte a condizioni ambientali estreme,” Tesi di laurea, Università degli Studi di Padova, 2007.
- [74] R. Mancinelli e M. Klovstad, “Martian soil and UV radiation: microbial viability assesment on spacecraft surfaces,” *Planetary and Space Science*, vol. 48, pp. 1093–1097, 2000.

## *Ringraziamenti*

Un primo ringraziamento va alle persone che mi hanno seguito durante questo lavoro.

Il Professor Giuseppe Galletta, che oltre ad essere un ottimo docente è stato anche un relatore attento, disponibile ed entusiasta del proprio lavoro.

Il Professor Giulio Bertoloni, che mi ha aiutato ad affrontare i problemi in un campo a me completamente nuovo e mi ha permesso di lavorare in un laboratorio davvero straordinario.

Il Dottor Maurizio D'Alessandro, una persona preziosa che mi ha aiutato molto nell'ultimo anno e che ringrazio di cuore.

I miei compagni di laboratorio, un gruppo speciale che ha reso davvero piacevoli le giornate trascorse insieme a lavorare e in particolare Francesco, il mio tutor e la mia guida.

I compagni di università con cui condivido la stessa grande passione per la Natura e da cui ho imparato molto e soprattutto Daniele, con cui ho iniziato e sto per finire questa avventura.

I miei compagni d'appartamento che mi hanno tenuto compagnia e distratto proprio quando ne avevo più bisogno.

I miei amici dell'Altopiano, che hanno sempre avuto una considerevole dose di pazienza nei miei confronti...Grazie!

La Famiglia Campese (allargata) che è stata un pò la mia seconda famiglia e in particolare Andrea, senza il quale non avrei mai raggiunto questo traguardo, e Matteo, che mi ha spronato e aiutato in ogni modo. Non ti ringrazierò mai abbastanza e questa tesi è anche per te.

Ma soprattutto la mia Famiglia che mi ha dato questa grande opportunità e che mi ha sostenuto e mi è stata vicina sempre.

Grazie a tutti Voi.