

Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais

Laboratório Nacional de Luz Síncrotron

BRUNA CONTRO DE GODOY

**O ambiente criogênico Antártico como análogo às
luas geladas do Sistema Solar**

CAMPINAS – SP

2016

BRUNA CONTRO DE GODOY

O ambiente criogênico Antártico como análogo às luas geladas do Sistema Solar

Monografia apresentada ao curso de graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, como requisito para obtenção do título de Bacharel.

Orientador: Prof. Dr. Douglas Galante

Co-orientador: Prof. Dr. Fabio Rodrigues

CAMPINAS – SP

2016

Á todos que sempre me incentivaram a seguir esta carreira e que me fizeram acreditar no meu potencial.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Dagmar e Antonio pelo investimento, apoio e amor incondicional.

Ao meu orientador Douglas, pela oportunidade e pela paciência e incentivo.

Ao meu co-orientador Fábio, pelas conversas e pelos ensinamentos.

À Amanda, por todas as reflexões, pelos ensinamentos, pelas conversas e pelas risadas e sobretudo pela paciência e pela boa vontade.

Ao Gabriel, por toda ajuda, pelas brigas e por me ajudar no meu crescimento profissional e pessoal.

Ao meu supervisor Luiz, por aceitar supervisionar meu projeto e pelo incentivo na escolha da área de trabalho.

Ao restante da equipe do laboratório, por toda ajuda e convivência.

“Nós somos uma maneira do Cosmos conhecer
a si mesmo.”
(Carl Sagan)

SUMÁRIO

1	RESUMO	0
2	INTRODUÇÃO.....	1
2.1	Luas geladas, Europa e suas implicações para a astrobiologia.....	1
2.2	Antártica como um ambiente análogo	4
2.3	Ilha de <i>Deception</i>	6
3	OBJETIVOS.....	8
3.1	Objetivos gerais	8
3.2	Objetivos específicos	8
4	DESENVOLVIMENTO.....	9
4.1	Coleta e preparo das amostras ambientais	9
4.2	Tratamento das amostras para o presente trabalho	14
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	19
5.1	Reativação em meio líquido	19
5.2	Crescimento em meio sólido	20
5.3	Dessecação.....	21
5.4	Radiação UV-C.....	23
6	CONCLUSÃO	25
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	27

1 RESUMO

As luas geladas que orbitam os gigantes gasosos do nosso Sistema Solar, se apresentam como foco de estudo no contexto astrobiológico e na procura de vida fora da Terra. Isto se deve ao fato de apresentarem condições necessárias para a criação e manutenção da vida, como a presença de (1) um meio líquido, (2) uma fonte de energia e (3) condições e compostos necessários para a formação de moléculas complexas. Devido ao fato de os avanços tecnológicos não permitirem, no presente momento, a exploração destas luas *in situ*, uma maneira eficiente de estudar a possibilidade de vida nestes ambientes extremos seria através de uso de ambientes análogos na Terra. A ilha de *Deception*, um estratovulcão complexo localizado nas Ilhas *Shetland* do Sul, na Península Antártica é um potencial análogo para o estudo de ambientes extremos do Sistema Solar, devido a presença de um mosaico de ambientes compostos por algumas regiões com atividade geotermal contínua, com solos quentes, podendo atingir 100°C e por grande parte do território coberto por glaciares, com solo se mantendo a temperaturas negativas. Desta forma, no presente trabalho, procuramos avaliar microrganismos coletados na ilha de *Deception* buscando uma melhor compreensão sobre a vida em ambientes extremos e sobre o uso de ambientes análogos na procura de vida fora do nosso planeta, focando, particularmente, em Europa. Uma vez que em Europa, possíveis microrganismos estariam expostos à dessecação e à radiação, o presente trabalho procurou testar a sobrevivência de microrganismos de *Deception* à ambos estressores, irradiação por UV-C e dessecação. Nos resultados obtidos, os microrganismos termofílicos apresentaram uma tendência à sobrevivência aos testes de estresse tanto por radiação UV-C como por dessecação, indicando, uma possível relação entre os estressores testados. A tendência observada está de acordo com a hipótese da adaptação à dessecação, em que a resistência à radiação é uma consequência da adaptação à dessecação (Mattimore & Batista, 1996), uma vez que o principal tipo de dano celular provocado por estes dois tipos de estresses é o mesmo, ou seja, quebra de DNA (Sghaier et al., 2007). Tais resultados indicaram que ambientes terrestres podem ser utilizados como análogos à ambientes extraterrestres, especialmente aos encontrados em Europa, uma vez que, somados aos experimentos laboratoriais, os microrganismos coletados na ilha de *Deception* se mostraram inicialmente resistentes aos principais fenômenos limitantes à vida em Europa, a radiação e a dessecação.

2 INTRODUÇÃO

2.1 Luas geladas, Europa e suas implicações para a astrobiologia

A classe de satélites naturais, cobertos principalmente por gelo, que orbitam os gigantes gasosos do nosso Sistema Solar é conhecida como luas geladas. Para que recebam esta nomenclatura, de acordo com Irwin e Schulze-Makuch (2001) é necessário que as luas apresentem três pré-requisitos, considerados como responsáveis pelo surgimento e pela manutenção da vida, sendo eles: a presença de um meio líquido, de uma fonte de energia e de condições necessárias para a formação de moléculas complexas.

Dentre estas luas podemos citar alguns satélites naturais de Júpiter, como Io, Europa, Ganimedes e Calisto (Canup & Ward, 2002) (Figura 1), de Saturno, como Encélado e Titã (Filacchione et al., 2007) e de Urano e Netuno (Brown & Cruikshank, 1985). Europa, a sexta maior lua de Júpiter, por se enquadrar nestes pré-requisitos e por apresentar características significantes relacionadas ao estudo da habitabilidade fora da Terra, é considerada uma das luas geladas de maior interesse do ponto de vista astrobiológico (Pasachoff & College, 2013).



Figura 1. Montagem das quatro principais luas geladas de Júpiter. De cima pra baixo: Io, Europa, Ganimedes e Calisto. Créditos da imagem: NASA/JPL/University of Arizona.

Nessa lua, os três pré-requisitos seriam: (1) meio líquido = água, existente na forma de gelo na crosta de Europa e na forma líquida, encontrada em seu oceano interno (Carr et al., 1998; Kargel et al., 2000); (2) fonte de energia = possivelmente proveniente da radiação ionizante dos anéis radioativos de Júpiter (Paranicas et al., 2001), bem como da força de maré originada no oceano interno da lua e do decaimento radioativo de seu núcleo (Chyba, 2000; Schubert et al., 2004; Showman & Mallhotra, 1999); (3) condições necessárias para a formação de moléculas complexas = provenientes da provável interação água líquida-rocha no leito oceânico da lua (Mckinnon & Zolensky, 2003; Zolotov & Shock, 2003) e de possível origem exógena (de fontes externas à lua), devido ao intenso contexto de bombardeamento em que Europa está inserida (Worth et al., 2013).

Esta lua, embora uma das maiores do nosso Sistema, é a menor das quatro luas geladas orbitando Júpiter, com um diâmetro de aproximadamente 3.100 km. Europa é constituída por: A) uma atmosfera pouco densa, formada principalmente de oxigênio molecular, originado a partir da radiólise da água em sua superfície (Galante et al., 2016); B) uma camada de água, com extensão estimada em 80-170 km dividida entre uma crosta congelada na porção superior e um oceano líquido logo abaixo; C) um manto rochoso; e D) um núcleo metálico (Anderson et al., 1998) (Figura 2).

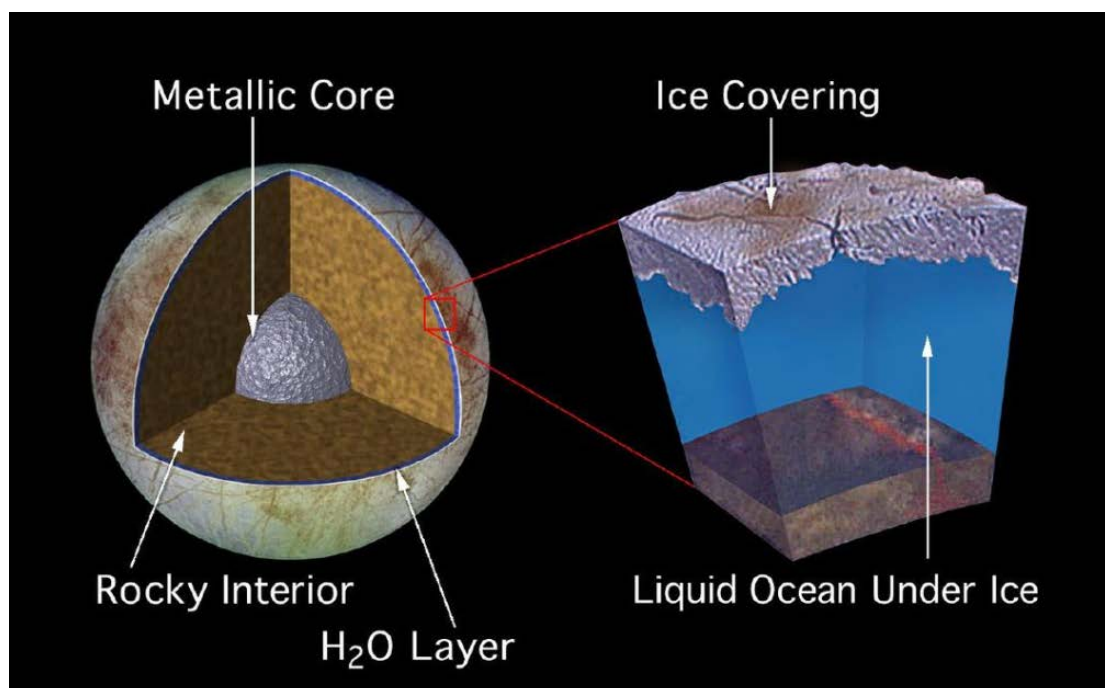


Figura 2. Representação da composição de Europa. Apresentação geral do núcleo metálico, do manto rochoso e da camada superior de água (à esquerda). Visão em mais detalhes da camada externa de

água, composta por uma crosta congelada na porção superior e um oceano líquido logo abaixo (à direita). Atmosfera não representada. Créditos da imagem: Coustenis & Encrenaz, 2013.

Além disso, modelos atuais de Europa sugerem que as condições como temperatura, pressão, pH e salinidade dos oceanos internos estão dentro dos limites capazes de suportar a vida como conhecemos na Terra (Galante et al., 2016). Estudos anteriores também revelaram que a lua possui uma superfície plana, o que indica uma constante renovação da crosta a partir de processos geológicos (Figueredo & Greeley, 2004) como: erupções locais de água aquecida; elevação e submersão de líquidos e de sólidos congelados; ruptura das camadas superficiais de gelo; translação e extensão de blocos da superfície e subsequente preenchimento destas regiões (Kargel et al., 2000).

Devido a relevância e importância desta lua, tanto no contexto astrobiológico, quanto no contexto cósmico de forma mais abrangente, agências espaciais como a Administração Nacional da Aeronáutica e Espaço (NASA) e a Agência Espacial Europeia (ESA) planejam missões ao satélite em um futuro próximo. A mais recente delas, Europa Mission (traduzido para o português como “Missão Europa”), está com lançamento programado, pelo Laboratório de Propulsão a Jato (JPL – NASA), para 2020. Ela terá como principal objetivo obter uma melhor compreensão de Europa a partir da análise de sua superfície (para determinação de sua composição), da espessura de sua crosta congelada, da salinidade e da profundidade de seu oceano interno (através da medição do campo magnético da lua), e da investigação de suas erupções termais de água, anunciadas pela agência em setembro deste ano (NASA, 2016).

A segunda missão já programada, pela ESA, para lançamento em 2022 e chegada em Júpiter em 2030, JUICE (acrônimo em inglês para “The JUpter ICy moons Explorer”, em português “Explorador das Luas Geladas de Júpiter”) terá diferentes metas. Os principais objetivos serão: (1) responder amplas questões sobre o contexto cósmico acerca do funcionamento do Sistema Solar e das condições para a formação de planetas e para a emergência da vida; e (2) trabalhar com o uso do sistema jupiteriano como um arquétipo para melhor entender o desenvolvimento de gigantes gasosos. Embora esta missão tenha a lua Ganimedes como foco de trabalho, Calisto e Europa também serão estudados a fim de facilitar o entendimento sobre a emergência de mundos habitáveis formados ao redor de gigantes gasosos (ESA,

2016).

Conforme mencionado, a existência de processos geológicos em Europa agindo como fator complicador na busca por vida antiga na lua, uma vez que sua crosta está constantemente sendo renovada, somados à presente falta de tecnologia para a exploração da lua *in situ*, revela a importância do uso de ambientes análogos para estudo da possível habitabilidade da lua.

2.2 Antártica como um ambiente análogo

O continente Antártico, devido às suas condições ambientais extremas e ao seu antigo isolamento dos demais continentes (desde o Gondwana, há cerca de 84 milhões de anos), apresenta características particulares. Acredita-se que tal isolamento, somado as pressões exercidas pela seleção natural, tenha formado habitats capazes levar a vida conhecida aqui na Terra ao limite (Soo et al., 2009) podendo ser, em alguns casos, similares ao ambiente Marciano ou ao das luas geladas.

Dentre suas características extremas, uma de grande interesse astrobiológico é a presença de atividades vulcânicas. Essas atividades, constantes durante a Era Cenozóica, ainda podem ser encontradas em algumas ilhas circumpolares (Ilhas *Sandwich* do Sul e a Ilha de *Deception*), em elevações no Estreito de Bransfield e em poucos sítios geográficos continentais (Monte *Erebus*, Monte *Melbourne* e Monte *Rittmann*) (Muñoz et al., 2011).

Tais atividades também são sugeridas nas luas geladas e em outros corpos celestes do nosso Sistema Solar, como a detecção, anunciada pela NASA em setembro deste ano, de possíveis erupções de plumas de vapor d'água em Europa através do uso de imagens obtidas pelo Telescópio Hubble. A possível presença de vulcanismo e atividades hidrotermais também já havia sido sugerida em Europa em estudos anteriores (Coustenis & Encrenaz, 2013; Kargel et al., 2000), bem como em Io (Science Daily, 2011; Schulze-Makuch, 2010) (Figura 3), em Calisto e em Ganimedes (Squyres, 1983) e em Encélado (Hedman et al., 2013; McKay et al., 2014; Porco et al., 2006; Postberg et al., 2011; Waite et al., 2006). Pesquisas também já indicaram a presença de atividades geotermiais em outros corpos celestes do nosso Sistema Solar, como por exemplo em Marte (Greeley & Spudis, 1981; Neukum et al., 2004) e em Vênus (Head & Wilson, 1986; Head et al., 1992).

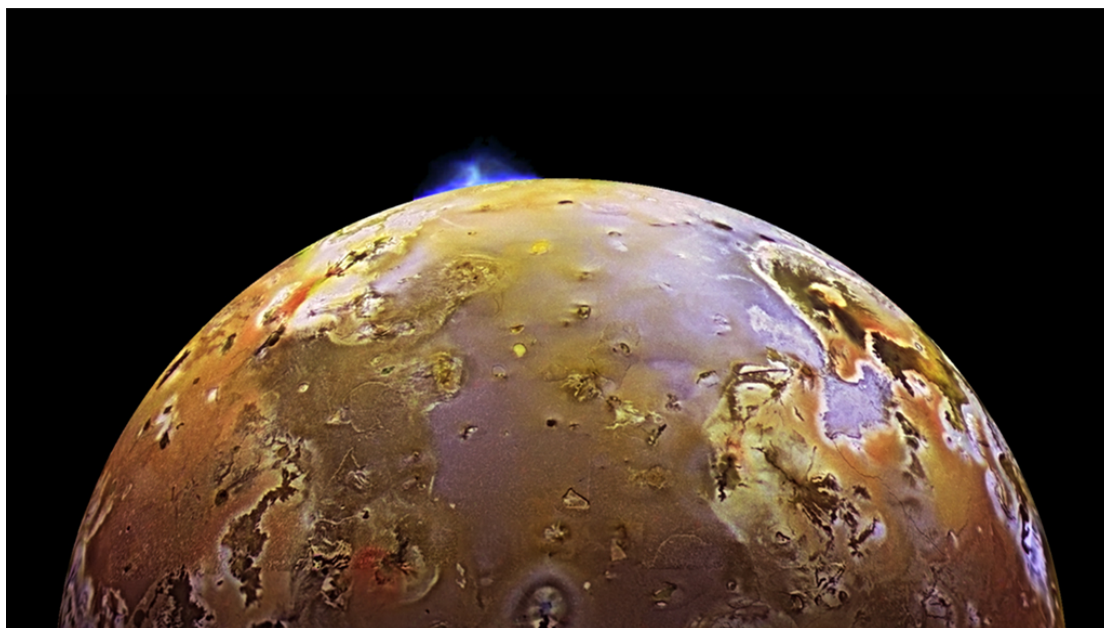


Figura 3. Visão de Io. Com mais de 400 vulcões ativos, Io é o objeto com maior atividade geológica no Sistema Solar. No topo: erupção vulcânica de Io capturada pela sonda espacial da NASA, *New Horizons*. Créditos da imagem: NASA/JPL/University of Arizona.

Na Antártica, a água do solo, nas regiões de atividade vulcânica, pode atingir temperaturas acima do ponto de ebulição devido à formação de sítios geotermicamente aquecidos gerados a partir das câmaras magmáticas ainda ativas e mais próximas à superfície na região. Quando a água atinge temperaturas suficientemente altas, a pressão força sua saída através de poros e fissuras na superfície terrestre, produzindo solos geotermais, *hot springs*, gêiseres e fumarolas. Neste processo, minerais provenientes de regiões profundas podem ser dissolvidos e depositados na superfície terrestre alterando a composição geoquímica do solo e de sedimentos a ele associados (Vickers, 2012). Estes sedimentos, por sua vez, podem servir de nutrientes para o desenvolvimento de microrganismos.

É importante ressaltar que embora o ambiente antártico possa ser considerado como um análogo às luas geladas e em especial, à Europa, por possuir atividade geotermal contínua, e ao mesmo tempo grande parte de seu território coberto por glaciares, ambos ambientes podem apenas ser considerados similares e não idênticos pois Europa, assim como as demais luas geladas apresenta condições particulares e muito mais extremas quando comparadas à qualquer ambiente terrestre.

2.3 Ilha de *Deception*

A Ilha de *Deception* localizada nas Ilhas *Shetland* do Sul, na Península Antártica, é um complexo estratovulcão em forma ferradura. Sua porção central colapsada deu origem a uma caldeira, a baía de *Port Foster*, que possui aproximadamente nove quilômetros de diâmetro (Figuras 4).

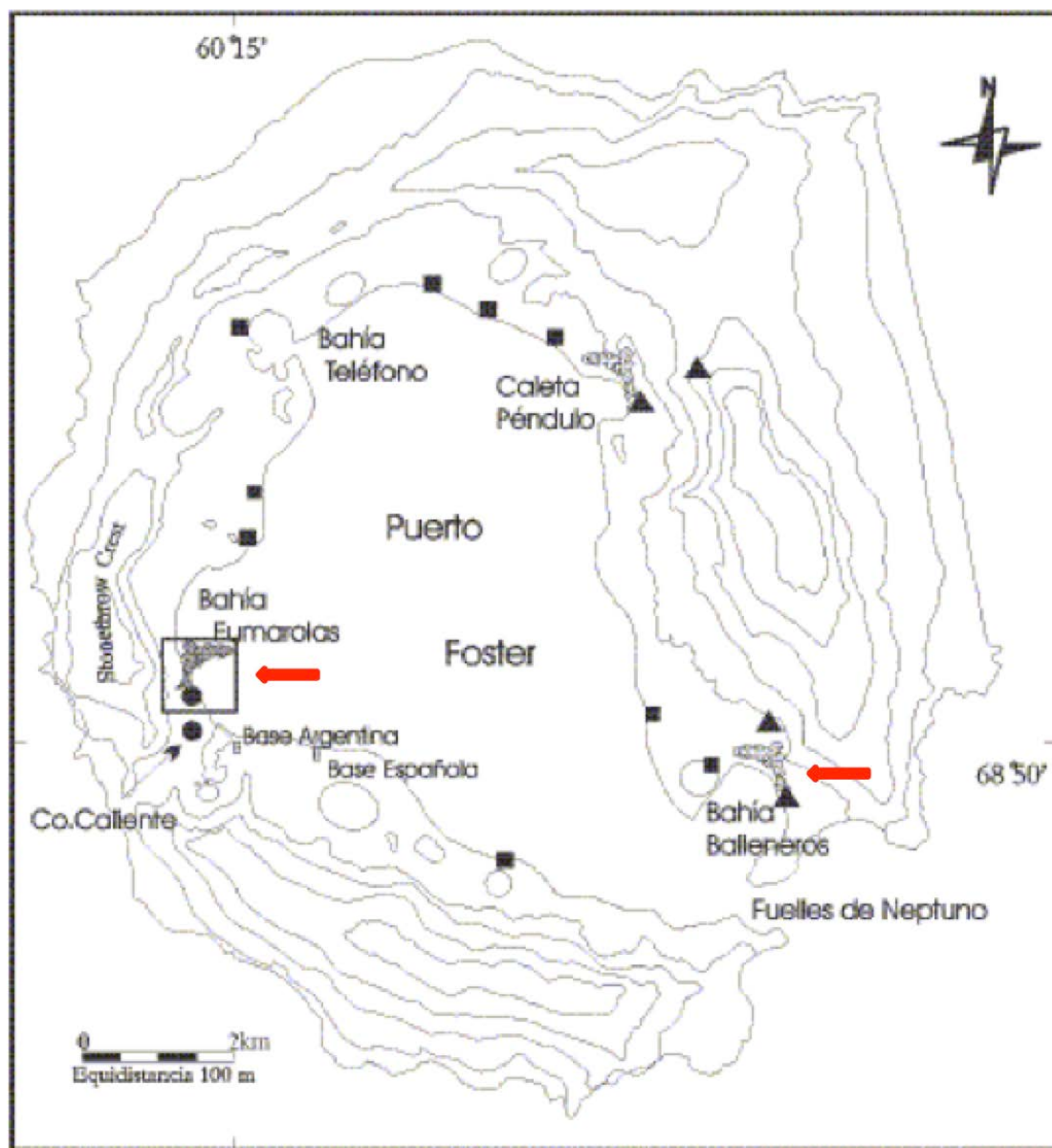


Figura 4. Mapa da Ilha *Deception*, Ilhas *Shetland* do Sul, Antártica, e suas zonas geotermicamente ativas. As setas vermelhas indicam a localização aproximada dos sítios de estudo deste trabalho. Adaptado de Caselli et al., 2004.

Esta estrutura formada ao longo dos anos é um ambiente astrobiologicamente interessante e particular por apresentar, por um lado atividade geotermal contínua, com solos quentes, podendo atingir 100°C e por outro, por possuir grande parte de seu território coberto por glaciares, com solo podendo chegar a temperaturas negativas.

Apesar das condições aparentemente inóspitas encontradas em tais sítios geotermiais, as diferentes temperaturas encontradas em distâncias próximas cria um gradiente complexo de condições ambientais e oportunidades para a colonização microbiana (bactérias e arqueias) adaptadas a estes ambientes.

Estes microrganismos são adaptados a pressões seletivas singulares, e como resultado, apresentam grande capacidade de sobrevivência às condições extremas de pH, temperatura, salinidade, dessecação, radiação e oligotrofia. A descoberta destes microrganismos, denominados extremófilos tem desafiado o entendimento das limitações químicas e físicas da vida, estimulando novas teorias a respeito da origem da vida e da possibilidade de sua existência em ambientes extraterrestres (Bonch-Osmolovskaya, 2010).

Desta forma, é de extrema relevância e importância o estudo da Ilha de *Deception*, uma vez que ecossistemas termais, inseridos em ambientes predominantemente frios da Antártica, oferecem características únicas para o estudo da diversidade funcional de microrganismos adaptados às condições extremas encontradas nestes locais, permitindo seu uso como estudo de um ambiente análogo aos ambientes encontrados nas luas geladas e principalmente em Europa.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

Em se tratando da busca por habitabilidade fora da Terra em nosso Sistema Solar, o estudo luas geladas, satélites naturais encontrados orbitando gigantes gasosos são de grande importância, principalmente no que refere ao satélite jupiteriano, Europa. Devido ao fato de, no presente momento, as tecnologias atuais não permitirem o estudo *in situ* desta lua, uma eficiente abordagem para a realização deste estudo se encontra no uso de ambientes análogos encontrados na Terra.

O ambiente antártico, e em especial a Ilha de *Deception*, apresenta, devido às suas condições ambientais extremas e ao seu antigo isolamento dos demais continentes características particulares que somadas as pressões exercidas pela seleção natural, favoreceu a formação habitats capazes levar a vida conhecida aqui na Terra ao limite (Soo et al., 2009). Desta forma, a Ilha de *Deception* se constitui em um valioso ambiente para o estudo de ambientes análogos aos encontrados em Europa. Assim sendo, o objetivo do presente trabalho é avaliar, a partir da análise de microrganismos obtidos em *Deception*, o uso da ilha de como um ambiente análogo aos encontrados em Europa.

3.2 Objetivos específicos

Para que o objetivo geral fosse atingido, o presente trabalho foi dividido nos seguintes objetivos específicos: 1) Reativação dos isolados das amostras ambientais; 2) Realização de cultivos em meio sólido em diferentes temperaturas e meios de cultura; 3) Realização de testes de estresse ambiental, incluindo dessecação e sobrevivência à irradiação por UV-C; 4) Realização de testes multiparamétricos com a utilização da Câmara de Simulação de Ambientes Espaciais e Planetários (AstroCam-1).

4 DESENVOLVIMENTO

4.1 Coleta e preparo das amostras ambientais

A. Obtenção das amostras

As amostras utilizadas neste estudo foram coletadas no trabalho intitulado *Metagenoma de comunidades microbianas em ambientes com atividade geotermal na ilha vulcânica Deception, Antártica*, desenvolvido pela bolsista de doutorado Amanda Gonçalves Bendia sob a orientação da Professora Dra. Vivian Helena Pellizari durante os anos de 2013, 2014, 2015 e 2016.

As amostras foram coletadas durante a Operação Antártica XXXII (dezembro de 2013 à janeiro de 2014), durante o Projeto “Microbiologia Polar”, coordenado pelo Professor Dr. Luiz Henrique Rosa, pertencente ao INCT da Criosfera, em colaboração com a Professora Dra. Vivian Helena Pellizari, e com o auxílio do Navio Polar Almirante Maximiano, Marinha do Brasil.

A coleta de solo/sedimento foi realizada em dois sítios diferentes na Ilha de *Deception*, sendo eles: *Fumarole Bay* (FB) e *Whalers Bay* (WB). Em cada um deles, as coletas ocorreram em um transecto de diferentes temperaturas totalizando em três pontos, intitulados A, B e C nos quais os pontos A foram considerados os mais quentes, os B os pontos intermediários e os C os pontos mais frios, próximo aos glaciares (Figura 5). Triplicatas de cada ponto foram realizadas e tratadas como amostras independentes em todas as análises posteriores.

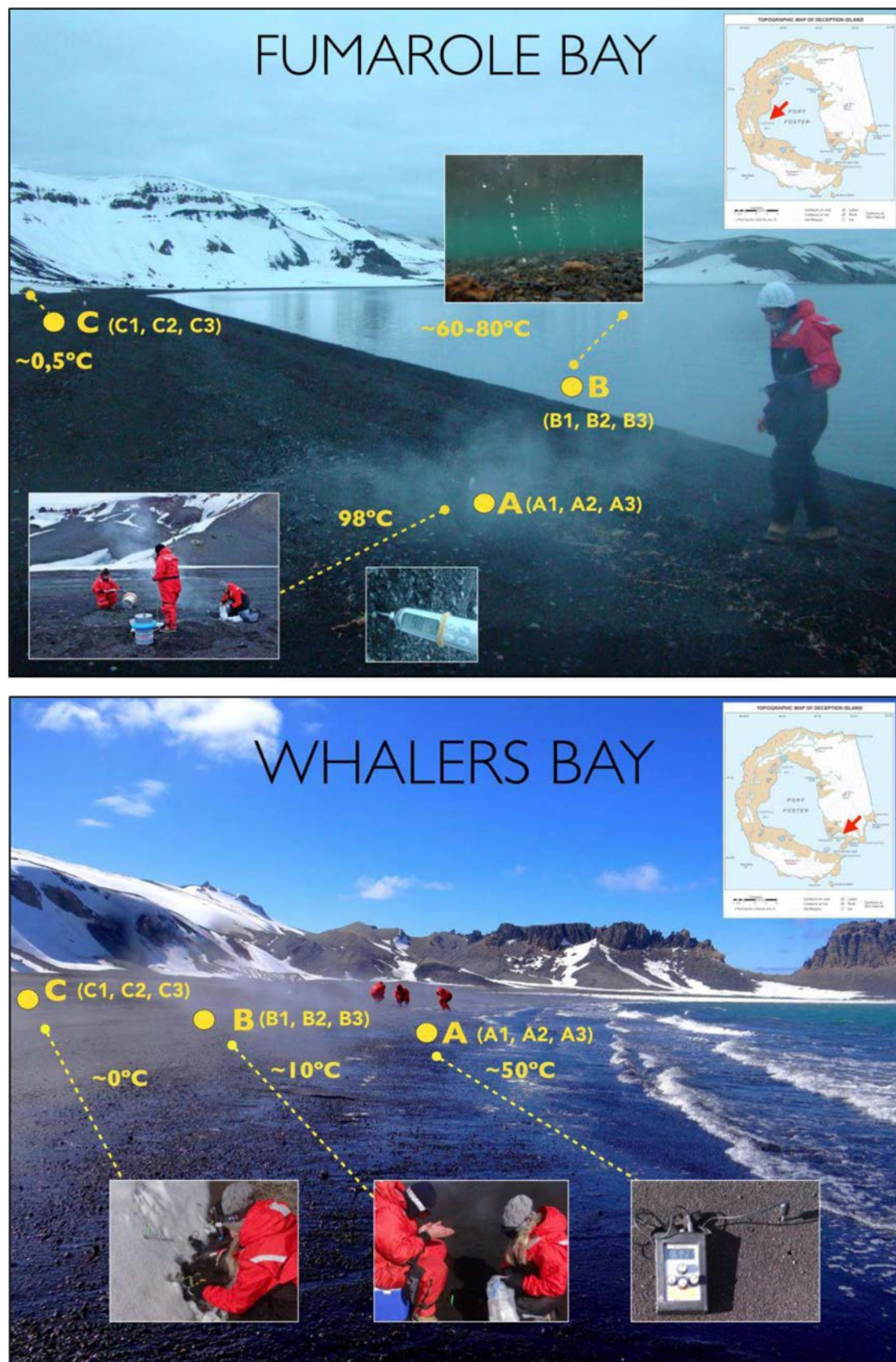


Figura 5. Visão geral dos pontos de coleta dos sítios geotermiais de *Fumarole Bay* e *Whalers Bay*, na Ilha de *Deception*. Créditos da imagem: Bendia, 2016.

B. Isolamento dos microrganismos a partir das amostras ambientais

Amostras de solo/sedimento foram processadas primeiramente pela bolsista de doutorado Amanda Gonçalves Bendia no trabalho intitulado *Metagenoma de comunidades microbianas em ambientes com atividade geotermal na ilha vulcânica Deception, Antártica* previamente a realização do presente trabalho e os procedimentos por ela realizados e descritos em Bendia (2016) estão simplificados a seguir:

Para obter microrganismos cultiváveis nas amostras ambientais coletadas, 1g de cada amostra ambiental foi adicionado em 10mL de tampão PBS (diluição de 10^{-1}). Deste volume, 100 μ L foram inoculados em dois meios sólidos próprios para o isolamento de microrganismos heterotróficos, sendo eles o *Tryptic Soy Agar* (TSA) e *Marine Agar* – (AM), ambos a 10% e com pH ajustado para 5,0. A diluição dos meios a 10% foi escolhida com o intuito de simular as condições oligotróficas encontradas no ambiente de estudo. Da mesma forma, o pH 5,0 foi escolhido de acordo com o valor médio de pH resultante das análises físico-químicas do solo/sedimento de cada amostra. As amostras foram incubadas nas temperaturas 4°C e 60°C para o isolamento de organismos psicofílicos (microrganismos com temperatura ótima de crescimento igual ou inferior à 15°C) e termofílicos (microrganismos com temperatura ótima de crescimento excedendo 45°C) respectivamente.

Para os meios sólidos que foram incubados à 60°C, 8g/L de GelzanTM CM Gelrite[®] foi adicionado em substituição ao ágar, juntamente com 0,5g/L de CaCl₂, que atua como cátion divalente, necessário para a polimerização do Gelzan.

Nenhuma colônia foi observada ao inocular diretamente as amostras de solo diluídas (10^{-1}) em PBS nos meios sólidos de TSA 10% e AM 10%. Por esse motivo, foi realizado um enriquecimento com os mesmos meios a 10%, porém líquidos, adicionando 2mL das amostras de solo diluídas em PBS (10^{-1}) para 18mL de cada meio. Os enriquecimentos foram incubados nas mesmas temperaturas (4°C e 60°C) durante aproximadamente duas semanas.

Após a incubação, os enriquecimentos foram inoculados em seus respectivos meios sólidos a 10%, utilizando diluições em série (10^{-3} a 10^{-7}) para a obtenção de colônias isoladas e para a contagem das mesmas. As placas contendo os meios sólidos foram incubadas à 4°C e 60°C durante 10 dias e 4 dias, respectivamente. Após o crescimento, foram escolhidas aleatoriamente 3 colônias de cada meio de cultura

correspondente a cada amostra, para o isolamento e posterior identificação molecular.

C. Identificação por meio de sequenciamento dos isolados

Primeiramente, foi realizado o BOX-PCR dos isolados obtidos a partir de TSA 10% e AM 10% para ambas as temperaturas. O BOX-PCR consiste na amplificação de regiões conservadas e repetitivas do DNA cromossômico bacteriano, gerando um *fingerprinting* capaz de identificar isolados possivelmente semelhantes (ou distintos) quanto ao seu filotipo. O BOX-PCR foi realizado através de 0,75µL *primer* BOX-A1R a 20µM (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG- 3') (Versalovic et al, 1991), 12,5µL de GoTaq® *Hot Start Green Master Mix* (Promega, USA), 2 µl de DNA (extraído das colônias) e 1,25µl de DMSO (Sigma-Aldrich, USA). O programa de PCR consistiu nos seguintes ciclos de reações: um ciclo a 94°C por 7 minutos, 35 ciclos a 94°C por 1 minuto, 53°C por 1 minuto e 72°C por 8 minutos e uma extensão final a 72°C por 15 minutos. Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese utilizando um gel de agarose 2%, contendo 4 µl do corante SYBR Safe (Invitrogen, Estados Unidos). O marcador de referência foi o 1 Kb DNA Ladder Plus (Invitrogen, Estados Unidos). O padrão de bandas dos isolados foi agrupado por similaridade e um dendrograma foi construído com o método de UPGMA e coeficiente de Pearson no *software* BioNumerics v.5.10 (Applied Maths, Bélgica). Os filotipos que apresentaram-se distintos foram selecionados para identificação a partir do sequenciamento do gene RNAr 16S.

Para o sequenciamento do gene do RNAr 16S das bactérias isoladas foi realizada uma PCR de colônias utilizando os *primers* 27F e 1401R, que consistiu em: 0,2µM de cada *primer*, 12,5µL de GoTaq® *Hot Start Green Master Mix* (Promega, USA), 2 µl de DNA e 1,25µl de DMSO (Sigma -Aldrich, USA). O programa utilizado iniciou-se com desnaturação a 95°C por 3 minutos, seguido de 35 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos, e extensão final a 72oC por 7 min. O *amplicon* foi purificado através do *kit QIAquick Gel Extraction* (QIAGEN, USA) e quantificado por *Qubit 1.0* (Life Technologies, USA) com o *kit Qubit® dsDNA HS Assay Kit* (Life Technologies, USA). Após a purificação, aproximadamente 50 ng dos *amplicons* referentes a cada isolado foram enviados para sequenciamento através da técnica de terminação em cadeia ou técnica de Sanger, por terceirização de serviços (Genomic Engenharia Molecular, São Paulo). As reações de

sequenciamento foram realizadas usando o *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems, USA), com dois *primers*: 27F e 1401R. Os produtos de sequenciamento foram submetidos à eletroforese em um sequenciador modelo 3130xl da Applied Biosystems (USA).

A análise das sequências obtidas procedeu-se inicialmente utilizando *Software CodonCodeAligner* (CodonCode Corporation, Dedham, MA, USA). Através deste programa, as sequências foram verificadas quanto qualidade, foram tratadas e *contigs* foram formados para cada isolado, a partir da sobreposição das sequências amplificadas com os dois *primers* empregados. Após a obtenção das sequências *contigs* tratadas, foram utilizados os bancos de dados SILVA (High Quality Ribosomal RNA Databases) e *Greengenes* para o alinhamento das sequências obtidas com aquelas já presentes no banco de dados, visando identificação dos isolados.

O cultivo resultou no isolamento de 67 isolados na temperatura de 60°C e 80 isolados na temperatura de 4°C. Por esse motivo, foi realizada a técnica de BOX-PCR com a finalidade de selecionar somente filotipos diferentes para o sequenciamento do gene do RNAr 16S.

Após a análise dos perfis de *fingerprinting* gerados pelo BOX-PCR para os isolados a 4°C, os 80 isolados foram reduzidos a 42 filotipos diferentes. Os isolados referentes aos 42 filotipos distintos tiveram seu *amplicon* sequenciado para a identificação taxonômica. Contudo, somente 26 isolados exibiram sequências de qualidade para serem submetidos às análises taxonômicas.

Os 26 isolados que apresentaram sequências de boa qualidade foram classificados nos gêneros *Arthrobacter* (23%), *Psychrobacter* (11,5%), *Flavobacterium* (38,5%), *Pseudomonas* (23%) e *Sphingomonas* (4%). Algumas espécies destes gêneros são descritas como psicrófilas ou psicrotolerantes e muitas já foram isoladas de ambientes Antárticos (Mccammon & Bowman, 2000; Trappen et al., 2003; Yi et al., 2005).

Após a análise dos perfis de *fingerprinting* gerados pelo BOX-PCR para os isolados a 60°C, os 67 isolados foram reduzidos para 54 filotipos diferentes. Destes, 4 não apresentaram amplificação para o gene RNAr 16S de bactérias e por esse motivo foram eliminados do sequenciamento. Portanto, 50 isolados cultivados a 60°C tiveram seu *amplicon* sequenciado para a identificação taxonômica.

A maior parte dos isolados heterotróficos cultivados a 60°C (56%) é pertencente

ao gênero *Geobacillus* (28 isolados), 22% referem-se a espécie *Brevibacillus thermoruber* (11 isolados), 14% foram classificados como *Anoxybacillus kestanbolensis* (7 isolados), 6% foram relacionados somente a Ordem Bacillales (3 isolados) e 2% (1 isolado) pertencem a espécie *Thermus thermophilus*.

Feitas as devidas análises, as amostras foram armazenadas em ultrafreezer e solução de glicerol.

4.2 Tratamento das amostras para o presente trabalho

Para o presente trabalho, foram escolhidos aleatoriamente três isolados de cada gênero anteriormente identificado. Para *Thermus thermophilus* havia apenas um isolado disponível, então este foi o único selecionado. O mesmo ocorreu para *Sphingomonas sp.* O processo resultou na seleção em 23 isolados, que foram nomeados de 1 a 23 (Tabela 1).

Tabela 1. Códigos dos isolados.

Classificação biológica	Códigos dos isolados	Temperatura
<i>Geobacillus sp</i>	1,2,3	60°C
<i>Thermus thermophilus</i>	4	60°C
<i>Anoxybacillus kestanbolensis</i>	5,6,7	60°C
<i>Brevibacillus thermoruber</i>	8,9,10	60°C
<i>Arthrobacter sp</i>	11,12,13	4°C
<i>Psychrobacter sp</i>	14,15,16	4°C
<i>Sphingomonas sp</i>	17	4°C
<i>Flavobacterium sp</i>	18,19,20	4°C
<i>Pseudomonas sp</i>	21,22,23	4°C

A. Reativação das amostras

Todas as amostras obtidas do armazenamento em ultrafreezer e solução de glicerol foram reativadas em meios líquidos AM 10% e TSA 10%. Posteriormente, um repique de todas as amostras foi realizado, transferindo os isolados do meio líquido para o seu correspondente sólido, também a 10%. A diluição dos meios a 10%

foi novamente escolhida com o intuito de simular as condições oligotróficas encontradas no ambiente de estudo. As placas contendo os meios sólidos foram incubadas a 4°C e 60°C novamente durante 10 dias e 4 dias, para o isolamento de organismos psicrófilicos e termófilicos respectivamente.

Para os meios sólidos que foram incubados à 60°C, 8g/L de GelzanTM CM Gelrite[®] foi adicionado em substituição ao ágar, juntamente com 0,5g/L de CaCl₂, que atua como cátion divalente, necessário para a polimerização do Gelzan.

Após a verificação do crescimento dos isolados em meio sólido, os mesmos foram repicados novamente nos meios sólidos AM 10% e TSA 10% com o objetivo de criar um estoque de isolados frescos para os experimentos subsequentes bem como a fim de se testar quais dos dois meios ofereciam maior possibilidade crescimento para os isolados.

B. Realização de testes de estresse ambiental

a. Dessecação

I. Estresse hídrico e seus efeitos biológicos

A água é essencial para todas as formas de vida na Terra, e o mesmo aconteceria para qualquer possível organismo habitando Europa. Neste sentido, a dessecação, descrita como um processo que leva um meio poroso (para o contexto do presente trabalho, uma bactéria) à perda de água líquida (Horneck, 2011), é causadora de diversos danos em inúmeros componentes celulares, dentre os eles a inibição ou alteração de atividades enzimáticas, mudanças na permeabilidade de membranas e alteração do material genético. As mudanças finais, mais severas, podem resultar em morte celular e mutagênese (Munaka et al., 1997).

Alguns organismos apresentam estratégias para tolerar o estresse hídrico por habitarem ambientes áridos, onde podem ser frequentemente confrontados com o fenômeno da dessecação. No caso das bactérias, uma das estratégias mais estudadas é a formação de esporos, processo pelo qual células bacterianas se diferenciam ativamente em estruturas dormentes, capazes de persistir no meio ambiente por um grande período de tempo (Horneck, 2011).

Do ponto de vista astrobiológico, a sobrevivência de microrganismos no espaço e em superfícies planetárias extraterrestres, é de grande interesse, uma vez que eles estariam expostos a uma complexa matriz de parâmetros, incluindo o vácuo

espacial, com poder extremo de desidratação (Irvine et al., 2014). Assim sendo, a fim de avaliar a viabilidade e a taxa de sobrevivência dos isolados à dessecação o experimento seguinte foi realizado.

II. *Experimento: Sobrevivência à dessecação*

Neste experimento as 22 amostras efetivamente reativadas foram submetidas à um teste de dessecação, utilizando sílica-gel como elemento secante para levar a umidade relativa abaixo de 5%. Para tal, as amostras foram suspensas em solução salina 0,9% e tiveram suas densidades óticas (DO) padronizadas entre 0,5 e 1,5 para uma maior facilidade na contagem das unidades formadoras de colônia (UFCs) e para manter uniformidade nos resultados, uma vez que a DO está diretamente relacionada com o número de células (viáveis ou não) presentes na solução. Para cada amostra foram plaqueados controles diluídos para 10^{-4} e 10^{-5} vezes a concentração inicial.

Para a realização do experimento, volumes de 10 μ L foram retirados das amostras e depositados na parede interna de microtubos estéreis de 1,5 mL. Os microtubos com as gotas para dessecação foram passados para recipientes com sílica gel, lacrados para manterem umidades relativas de menos de 5%. As amostras foram mantidas dentro destes recipientes durante o período de nove dias. Ao fim, as gotas dessecadas foram ressuspensas em 1 mL de NaCl 0,9%, e, assim como os controles, diluídas e plaqueadas para determinação de UFCs. A sobrevivência dos organismos foi dada pela fração N/N_0 , sendo N_0 a concentração inicial de células viáveis e N as células viáveis após a dessecação.

b. Radiação UV-C

I. *Radiação UV-C e seus efeitos biológicos*

Os raios solares são compostos por diferentes radiações, dentre elas a radiação ultravioleta (UV). Esta, por sua vez pode ser dividida em três faixas de acordo com seus comprimentos de onda: radiação ultravioleta A (UV-A) - 400 a 320 nm, radiação ultravioleta B (UV-B) - 320 a 280 nm e radiação ultravioleta C (UV-C) - 280 a 100 nm. O ozônio, o oxigênio, os vapores de água e o dióxido de carbono presentes na atmosfera filtram parte da radiação ultravioleta que chega na superfície da Terra de maneira a impedir que praticamente toda a radiação UV-C chegue à superfície do nosso planeta.

Apesar da radiação UV-C ser eficientemente filtrada pela camada de ozônio da Terra e sua atmosfera, esta é uma das faixas do espectro de UV mais usadas para explorar as consequências de danos causados ao DNA, já que a letalidade induzida por este agente está relacionada aos danos diretos no genoma celular.

Assim sendo, para a simulação das condições espaciais, o estudo da radiação UV-C se torna imprescindível, uma vez que eventuais microrganismos presentes no espaço interplanetário, como por exemplo, na superfície Marciana, estariam sujeitos à exposição constante a grandes fluxos de luz UV-C altamente deletérios (COCKELL, 2001). Na superfície marciana, altos níveis de radiação UV-C atingem a superfície (SCHUERGER et al., 2003) afetando a estabilidade genética de possíveis organismos no planeta, levando a taxas de mutação aumentadas, danos ao DNA e inativação celular (HORNECK, 1999).

Embora em Europa a radiação ionizante jupiteriana apresente maior influência quando comparada à radiação UV-C solar, os danos causados por ambas as fontes são similares, o que permitiu, por praticidade e necessidades técnicas que os experimentos de sobrevivência à irradiação fossem feitos a partir da radiação UV-C solar. Desta forma, a fim de avaliar a viabilidade e a taxa de sobrevivência dos isolados à irradiação por UV-C, o experimento seguinte foi realizado.

II. Experimento: Sobrevivência à irradiação por UV-C

Os ensaios com UV-C foram realizados a partir de adaptações do trabalho de Pulschen e colaboradores (2015), e fizeram uso dos mesmos instrumentos e infraestrutura. Para este experimento utilizou-se uma caixa equipada com uma lâmpada tubular de mercúrio em baixa pressão Philips TUV-20W. Esta lâmpada, do mesmo tipo das lâmpadas instaladas para a realização limpeza de fluxos laminares, possuem emissão em linha com pico em 253,7 nm.

Devido ao fato de a comunidade científica assumir, atualmente, que a resistência à radiação é uma consequência da adaptação à dessecação (hipótese da adaptação à dessecação), uma vez que o principal tipo de dano celular provocado por estes dois tipos de estresses é o mesmo, ou seja, quebra de DNA (Sghaier et al., 2007), apenas os isolados que apresentaram uma taxa de sobrevivência significativa nos ensaios de dessecação, foram levados adiante nos testes de sobrevivência à radiação UV-C.

As colônias dos isolados termofílicos crescidas em meio AM 10% sólido foram raspadas com uma alça de platina flambada e suspensas em 500 µL de NaCl 0,9%. Os isolados tiveram DO padronizadas entre 0,5 e 1,5 e foram diluídos (10^{-1} à 10^{-5} vezes a concentração inicial) para a irradiação.

As irradiações foram realizadas em sucessivos intervalos de 60 J/m², sendo irradiadas nas doses 0 J/m² (controle), 60 J/m², 120 J/m², 180 J/m² e 240J/m² diretamente em gotas de 5 µL de amostra suspensa em NaCl 0,9% pingadas dentro de uma placa de petri (destampada) em meio AM 10% solidificado. Foram utilizadas placas de 7 cm de diâmetro para as irradiações com UV-C. As placas irradiadas foram incubadas à 60°C pelo período de 24h, e tiveram suas UFCs posteriormente contadas. A sobrevivência dos organismos foi dada pela fração N/N_0 , sendo N_0 a concentração inicial de células viáveis e N as células viáveis após a irradiação.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Reativação em meio líquido

O crescimento das amostras foi obtido a partir da turbidez dos meios, medida visualmente, após 14 dias de incubação. Pela turbidez, o crescimento foi classificado em intenso, médio e nulo (Figuras 6 e 7) (Tabelas 2 e 3).

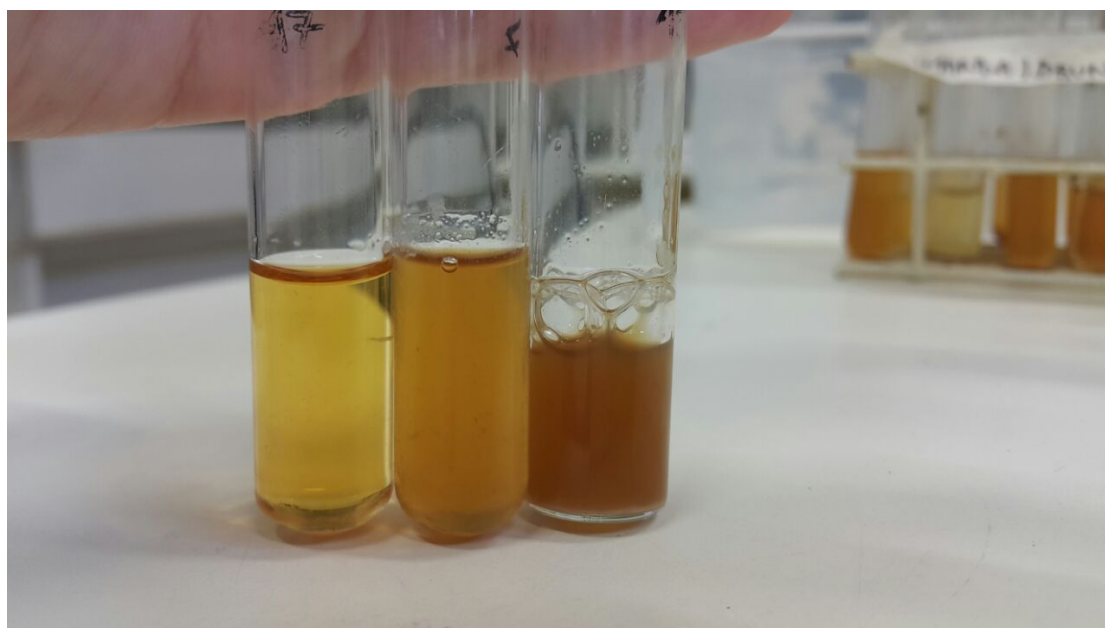


Figura 6. Crescimento em meio TSA 10% líquido. Da direita para a esquerda de acordo com a turbidez: muito, médio, nulo.



Figura 7. Crescimento em meio AM 10% líquido. Da esquerda para a direita de acordo com a turbidez: muito, médio, nulo.

Tabela 2. Turbidez dos meios após 14 dias, dos isolados a 60°C nos meios líquidos AM 10% e TSA 10%.

Isolados	TSA 10%	AM 10%
1	Médio	Médio
2	Intenso	Intenso
3	Intenso	Médio
4	Nulo	Médio
5	Intenso	Médio
6	Nulo	Intenso
7	Médio	Intenso
8	Médio	Nulo
9	Médio	Médio
10	Médio	Intenso

Tabela 3. Turbidez dos meios após 14 dias, dos isolados a 4°C nos meios líquidos AM 10% e TSA 10%.

Isolados	TSA10%	AM 10%
11	Médio	Médio
13	Intenso	Intenso
14	Médio	Intenso
15	Intenso	Intenso
16	Intenso	Intenso
17	Nulo	Médio
18	Médio	Médio
19	Médio	Intenso
20	Intenso	Intenso
21	Intenso	Intenso
22	Intenso	Intenso
23	Intenso	Intenso

5.2 Crescimento em meio sólido

Após a reativação em meio líquido, os isolados foram transferidos para meios sólidos. Os resultados obtidos indicaram um melhor crescimento dos organismos à 60°C em AM 10% e dos de 4°C em TSA 10% e para os demais testes e repiques (Figura 8), seguiu-se esta orientação. O isolado 12 não apresentou crescimento em nenhum meio sólido e, portanto, foi desconsiderado das demais análises.

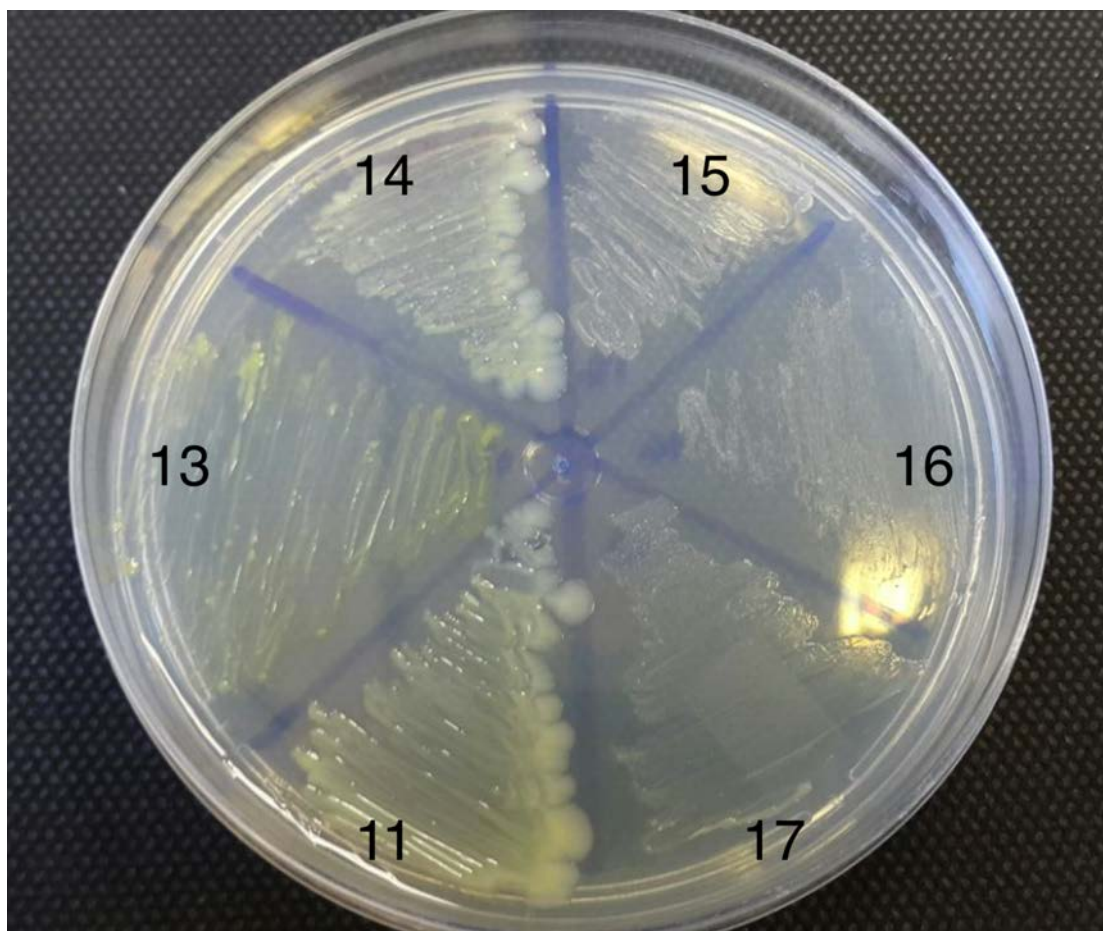


Figura 8. Um dos repiques realizados em TSA 10% para os isolados 11, 13, 14, 15, 16 e 17.

5.3 Dessecação

Após nove dias de dessecação, cada isolado dessecado foi ressuspenso em 1mL de NaCl 0,9%, e plaqueado novamente, no meio em que apresentou maior crescimento, nas diluições de 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} . Após o crescimento dos isolados, as UFCs dos ensaios de dessecação foram contadas (Gráficos 1 e 2). A sobrevivência dos organismos foi dada pela fração N/N_0 , sendo N_0 a concentração inicial de células viáveis e N as células viáveis após a dessecação.

Gráfico 1. Sobrevivência dos isolados à 60°C ao experimento de dessecação.

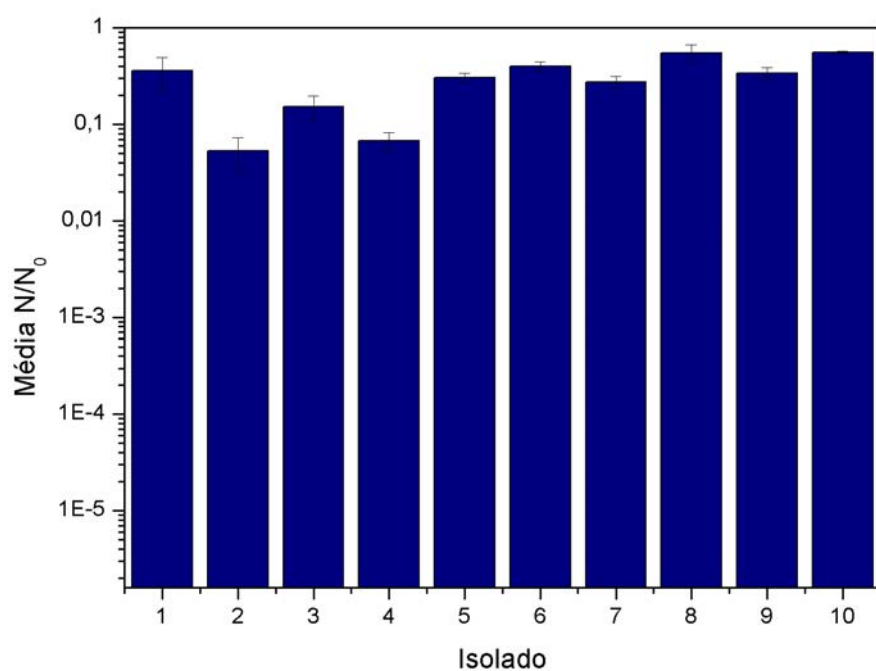
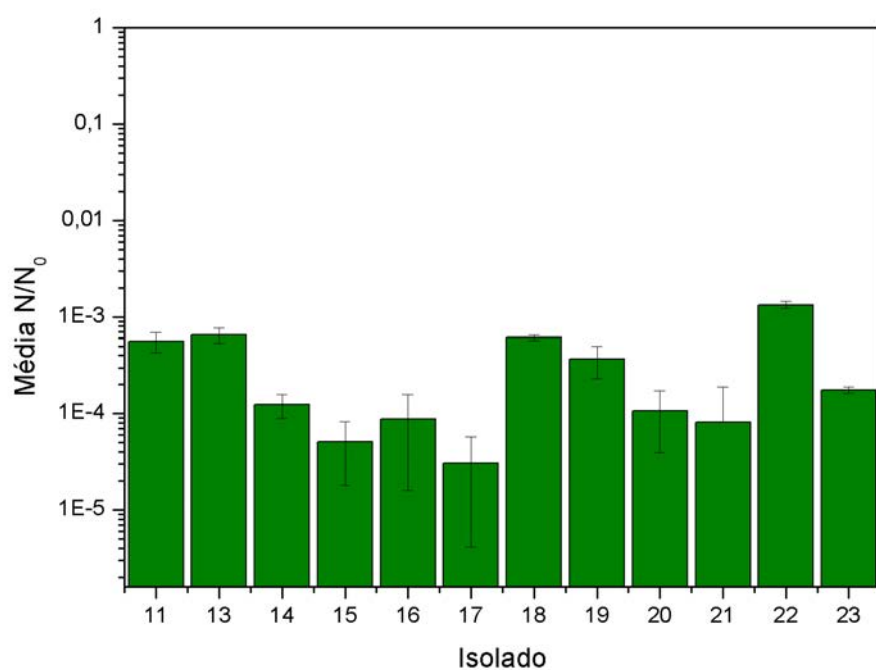


Gráfico 2. Sobrevivência dos isolados à 4°C ao experimento de dessecação.



Como pode ser observado, os isolados termofílicos apresentaram uma taxa de sobrevivência à dessecação significativamente superior quando comparados aos psicofílicos, corroborando com estudos apresentados por Beblo e colaboradores (2009), no qual a tolerância de células ao processo de dessecação é um fenômeno comum em microrganismos termofílicos, independente de onde tenham se originado.

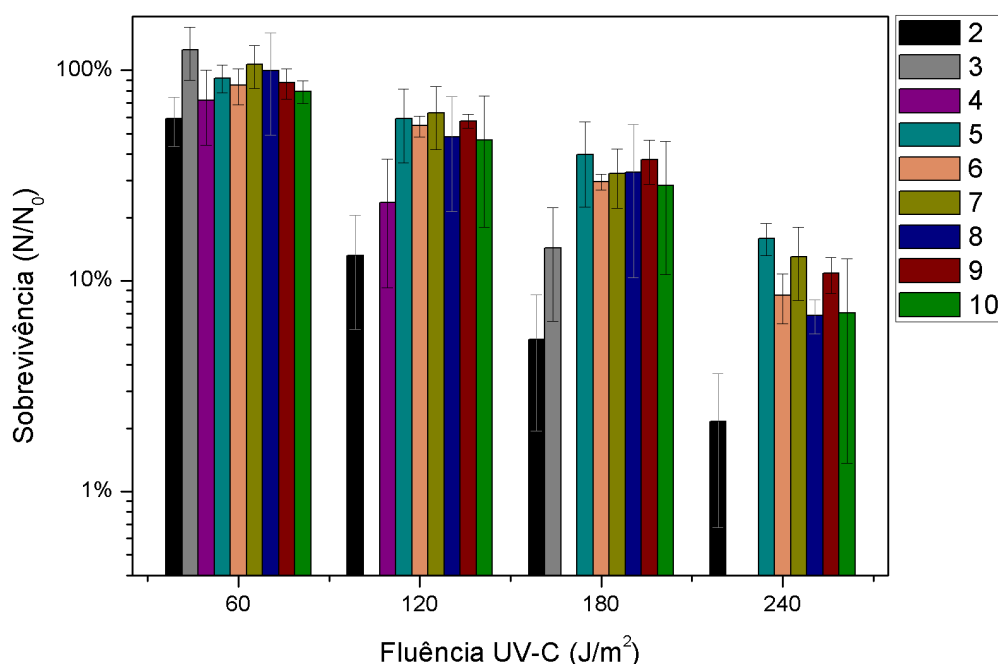
Tais resultados mostrando a sobrevivência de alguns organismos aos ensaios de dessecação, coloca os isolados termofílicos em destaque na busca por possíveis candidatos para estudos futuros sobre a habitabilidade nas luas geladas e em especial, em Europa.

Porém, é de extrema importância ressaltar que os testes e resultados apresentados no presente trabalho são apenas preliminares, e que a investigação destes microrganismos ainda passará por novas repetições com os métodos aprimorados, aumentando a qualidade da pesquisa.

5.4 Radiação UV-C

Após o período de incubação de 24h, as placas irradiadas tiveram suas UFCs contadas. A sobrevivência dos organismos foi dada pela fração N/N_0 , sendo N_0 a concentração inicial de células viáveis e N as células viáveis após a irradiação (Gráfico 3).

Gráfico 3. Sobrevivência dos isolados termofílicos após a irradiação por UV-C nas doses 0 J/m² (controle), 60 J/m², 120 J/m², 180 J/m² e 240 J/m². Não foram obtidos dados de 120 J/m² e 240 J/m² e 180 J/m² e 240 J/m² para os isolados 3 e 4, respectivamente.



Como pode ser observado pelo gráfico, a maior parte dos organismos termofílicos utilizados no presente trabalho mostrou uma tendência de sobrevivência e viabilidade mesmo após as irradiações por UV-C mais altas (240 J/m²). Os resultados obtidos vão de acordo com a hipótese da adaptação à dessecação, em que a resistência à radiação é uma consequência da adaptação à dessecação (Mattimore & Batista, 1996), uma vez que o principal tipo de dano celular provocado por estes dois tipos de estresses é o mesmo, ou seja, quebra de DNA (Sghaier et al., 2007).

Desta forma, a observação desta tendência, coloca os isolados termofílicos em destaque, quando comparados aos demais isolados do presente trabalho, na busca por possíveis candidatos para estudos futuros sobre a habitabilidade nas luas geladas e em especial, em Europa, uma vez que para sobreviverem em condições espaciais, microrganismos precisam ser tolerantes tanto à radiação quanto à dessecação.

Porém, como mencionado anteriormente, é de extrema importância ressaltar que os testes e resultados apresentados no presente trabalho são apenas preliminares, e que a investigação destes microrganismos ainda passará por novas repetições com os métodos aprimorados, aumentando a qualidade da pesquisa.

6 CONCLUSÃO

Apesar das dificuldades técnicas enfrentadas durante a execução dos ensaios e experimentos, os resultados obtidos até o presente momento demonstram o sucesso do projeto de iniciação científica, uma vez que grande parte dos objetivos propostos foram alcançados.

As principais conclusões do presente trabalho foram:

- Com exceção isolado de número 12 (*Arthrobacter sp*), todos os isolados foram reativados da solução de glicerol com sucesso.
- O mesmo foi verdadeiro para o cultivo dos 22 isolados restantes nas temperaturas 4°C e 60°C graus em diferentes meios. Estes testes indicaram uma melhor taxa de crescimento para os microrganismos de 4°C e 60°C nos meios TSA 10% e AM 10% respectivamente.
- Os organismos termofílicos selecionados do meio antártico apresentaram uma maior sobrevivência aos testes de estresse por dessecação corroborando com estudos apresentados por Beblo e colaboradores (2009), em que a tolerância de células ao processo de dessecação é um fenômeno comum em microrganismos termofílicos, independente de onde tenham se originado.
- Uma tendência à sobrevivência aos testes de estresse por radiação UV-C também pode ser observada nestes organismos, indicando, uma possível relação entre os estressores testados no presente trabalho. Tais resultados estariam de acordo com a hipótese da adaptação à dessecação, em que a resistência à radiação é uma consequência da adaptação à dessecação (Mattimore & Batista, 1996), uma vez que o principal tipo de dano celular provocado por estes dois tipos de estresses é o mesmo, ou seja, quebra de DNA (Sghaier et al., 2007).
- Os isolados termofílicos se destacaram, quando comparados aos demais isolados do presente trabalho, na busca de possíveis candidatos para estudos futuros sobre a habitabilidade nas luas geladas e em especial, em Europa, uma vez que para sobreviverem em condições espaciais, microrganismos precisam ser tolerantes tanto à radiação quanto à dessecação.
- Em especial, devido ao fato de, no presente momento, as tecnologias atuais não permitirem o estudo *in situ* desta lua, uma eficiente abordagem para a realização deste estudo se encontra no uso de ambientes análogos encontrados

na Terra. Desta forma, o ambiente antártico, e em especial a Ilha de *Deception*, se constituiu em um valioso ambiente análogo para o estudo de ambientes encontrados em Europa, devido às suas condições ambientais extremas e ao seu antigo isolamento dos demais continentes características particulares que somadas as pressões exercidas pela seleção natural, favoreceu a formação habitats capazes levar a vida conhecida aqui na Terra ao limite (Soo et al., 2009).

- Assim sendo, os resultados obtidos no presente trabalho indicaram que ambientes terrestres podem ser utilizados como análogos à ambientes extraterrestres, especialmente aos encontrados em Europa, uma vez que, somados aos experimentos laboratoriais, os microrganismos coletados na ilha de *Deception* se mostraram inicialmente resistentes aos principais fenômenos limitantes à vida em Europa, a radiação e a dessecação.
- A escolha da ilha somada aos trabalhos e ensaios realizados em laboratórios se complementaram fornecendo dados e resultados suficientes para uma discussão justa, do ponto de vista da astrobiologia, da importância do estudo de da possível habitabilidade de Europa a partir do uso de análogos terrestres.

Entretanto, devido à falta de tempo hábil e à existência problemas técnicos como a reforma do laboratório utilizado (Quimiosfera-IQU/SP) e a transferência da Câmara de Simulação de Ambientes Espaciais e Planetários de Valinhos para São Paulo, a realização de testes multiparamétricos a partir da utilização da AstroCam-1 planejados nos objetivos do presente trabalho, foi impossibilitada, permanecendo então como perspectivas futuras para uma eventual pós-graduação ou para trabalho de outros alunos do grupo de pesquisa.

Por fim, é de extrema importância ressaltar que os testes e resultados apresentados no presente trabalho são apenas preliminares, e a investigação destes microrganismos ainda passará por novas repetições com os métodos aprimorados, aumentando a qualidade da pesquisa.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSON, J. D. et al. Europa's differentiated internal structure: Inferences from four Galileo encounters. **Science**, v. 281, n. 5385, p. 2019-2022, 1998.

BEBLO, Kristina et al. Tolerance of thermophilic and hyperthermophilic microorganisms to desiccation. **Extremophiles**, v. 13, n. 3, p. 521-531, 2009.

BENDIA, A. G. Metagenoma de comunidades microbianas em ambientes com atividade geotermal na ilha vulcânica Deception, Antártica. **Tese (Doutorado em Microbiologia)** – Universidade de São Paulo, Brasil. 2016.

BONCH-OSMOLOVSKAYA, E. A. High-temperature deep-subsurface microbial communities as a possible equivalent of ancient ecosystems. **Paleontol J** 44, 2010, 9.

BROWN, Robert H.; CRUIKSHANK, Dale P. The moons of Uranus, Neptune and Pluto. **Scientific American**, v. 253, p. 28-37, 1985.

CANUP, R. M.; WARD, W. R. Formation of the galilean satellites: conditions of accretions. **The Astronomical Journal**, v. 124, n. 6, p. 3404-3423, 2002.

CARR, M. H. et al. Evidence for a subsurface ocean on Europa. **Nature**, v. 391, n. 6665, p. 363-365, 1998.

CASELLI, A.; SANTOS-AFONSO, M.; AGUSTO, M. (2004). Gases fumarólicos de la isla Decepción (Shetland del Sur, Antártida): Variaciones químicas y depósitos vinculados a la crisis sísmica de 1999. **Revista de la Asociación Geológica Argentina** 52, p. 291-302.

CHYBA, C. F. Energy for microbial life on Europa. **Nature**, v. 403, n. 6768, p. 381-382, 2000.

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

COUSTENIS, A.; ENCRENAZ, T. **Life Beyond Earth**. Cambridge University Press, 2013.

ESA. JUICE. Em: < <http://sci.esa.int/juice/>>. Acesso em: 15 de novembro de 2016.

FIGUEREDO, P. H.; GREELEY, R. Resurfacing history of Europa from pole- to-pole geological mapping. **Icarus**, v. 167, p. 287-312, 2004.

FILACCHIONE, G. et al. Saturn's icy satellites investigated by Cassini-VIMS: I. Full-disk properties: 350–5100 nm reflectance spectra and phase curves. **Icarus**, v. 186, n. 1, p. 259-290, 2007.

GALANTE, D. et al. **Astrobiologia [livro eletrônico]: uma ciência emergente**. Tikinet Edição: IAG/USP, São Paulo, 2016.

GREELEY, R.; SPUDIS, P. D. Volcanism on Mars. **Reviews of Geophysics**, v. 19, n. 1, p. 13-41, 1981.

HEAD, J. W., L. S. CRUMPLER, J. C. AUBELE, J. E. GUEST, AND R. S. SAUNDERS (1992), Venus volcanism: Classification of volcanic features and structures, associations, and global distribution from Magellan data, **J. Geophys. Res.**, 97(E8), 13153–13197.

HEAD III, J. W., AND L. WILSON (1986), Volcanic processes and landforms on Venus: Theory, predictions, and observations, **J. Geophys. Res.**, 91(B9), 9407–9446.

HEDMAN, M. M. et al. An observed correlation between plume activity and tidal stresses on Enceladus. **Nature**, v. 500, p. 182-184, 2013.

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

_____. Dessication. **Encyclopedia of Astrobiology**, p. 420-422, 2011.

_____. Spores. **Encyclopedia of Astrobiology**, p. 420-422, 2011.

IRWIN, L. N.; SCHULZE-MAKUCH, D. Assessing the plausibility of life on other

worlds. **Astrobiology**, v. 1, n. 2, p.143-160, 2001.

KARGEL, J. S. et al. Europa's crust and ocean: origin, composition and the prospects for life. **Icarus**, v. 148, 39, 2000.

MATTIMORE, Valerie; BATTISTA, John R. Radioresistance of *Deinococcus radiodurans*: functions necessary to survive ionizing radiation are also necessary to survive prolonged desiccation. **Journal of bacteriology**, v. 178, n. 3, p. 633-637, 1996.

MCCAMMON, S. A., & BOWMAN, J. P. (2000). Taxonomy of Antarctic *Flavobacterium* species: description of *Flavobacterium gillisiae* sp. nov., *Flavobacterium tegetincola* sp. nov., and *Flavobacterium xanthum* sp. nov., nom. rev. and reclassification of [*Flavobacterium*] *salegens* as *Salegentibacter salegens* gen. nov., comb. nov. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, 50, p. 1055-1063.

MCKAY, C. P. et al. Follow the plume: the habitability of Enceladus. **Astrobiology**, v. 14, p. 352-355, 2014.

MCKINNON, W. B.; ZOLENSKY, M. E. Sulfate content of Europa's ocean and shell: Evolutionary considerations and some geological and astrobiological implications. **Astrobiology**, v. 3, n. 4, p. 879-897, 2003.

MUNAKATA, N. et al. Induction of unique tandem-base change mutations in bacterial spores exposed to extreme dryness. **Mutat Res** 390:189-195, 1997.

MUÑOZ, P.; FLORES, P.; BOEHMWALD, F.; BLAMEY, J. Thermophilic bacteria present in a sample from Fumarole Bay, Deception Island. **Antarct Sci** 23, 2011, 7.

NASA. Europa Mission. Em: < <http://www.jpl.nasa.gov/missions/europa-mission/>> Acesso em 15 de novembro de 2016.

_____. NASA's Hubble Spots Possible Water Plumes Erupting on Jupiter's Moon Europa, 26 de setembro de 2016. Em: < <https://www.nasa.gov/press-release/nasa-s-hubble-spots-possible-water-plumes-erupting-on-jupiters-moon-europa>>. Acesso em:

15 de novembro de 2016.

NEUKUM, G. et al. Recent and episodic volcanic and glacial activity on Mars revealed by the High Resolution Stereo Camera. **Nature**, v. 432, n. 7020, p. 971-979, 2004.

PARANICAS, C.; CARLSON, R. W.; JOHNSON, R. E. Electron bombardment of Europa. **Geophys. Res. Lett**, v. 28, n. 4, p. 673-676, 2001.

PASACHOFF, Jay M.; FILIPPENKO, Alex. **The Cosmos: Astronomy in the new millennium**. Cambridge University Press, 2013.

PORCO, C. C. et al. Cassini observes the active south pole of Enceladus. **Science**, v. 311, p. 1419-1422, 2006.

POSTBERG, F. et al. A salt-water reservoir as the source of a compositionally stratified plume on Enceladus. **Nature**, v. 474, p. 620-622, 2011.

PULSCHEN, A. A. et al. UV-resistant yeasts isolated from a high-altitude volcanic area on the Atacama Desert as eukaryotic models for astrobiology. **MicrobiologyOpen**, v. 4, n. 4, p. 574-588, 2015.

SCHUBERT, G. et al. Interior composition, structure and dynamics of the Galilean satellites. **Jupiter: The planet, satellites and magnetosphere**, v. 1, 2004.

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

SCHULZE-MAKUCH, D. Io: Is life possible between fire and ice? **Journal of Cosmology**, v. 5, 8, 2010.

SCIENCEDAILY. Nasa's Galileo reveals magma 'ocean' beneath surface of Jupiter's moon. **ScienceDaily**, University of California, Los Angeles, 12 de maio de 2011. Em: www.sciencedaily.com/releases/2011/05/110512150723.htm. Acesso em: 15 de novembro de 2016.

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

SHOWMAN, A. P.; MALHOTRA, R. The Galilean satellites. **Science**, v. 286, p. 77-84, 1999.

SOO, R.M.; WOOD, S.A.; GRZYMSKI, J.J.; MCDONALD, I.R.; CARY, S.C. Microbial biodiversity of thermophilic communities in hot mineral soils of Tramway Ridge, Mount Erebus, Antarctica. **Environ Microb**, 2009, 14.

SQUYRES, S. (1983). Ganymede and Callisto: One of Jupiter's icy moons shows evidence of a period of intense geologic activity, whereas the other appears to have remained dormant. **American Scientist**, 71(1), 56-64.

VAN TRAPPEN, S., MERGAERT, J., & SWINGS, J. (2003). *Flavobacterium gelidilacus* sp. nov., isolated from microbial mats in Antarctic lakes. **International journal of systematic and evolutionary microbiology** 53, p. 1241-1245.

VERSALOVIC, J; KOEUTH, T; LUPSKI, JR. (1991). Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. **Nucleic Acids Res.**

VICKERS, C. Investigating the Physiological and Metabolic Requirements of the Tramway Ridge Microbial Community, Mt Erebus, Antarctica. **Thesis (Masters of Science in Biological Sciences)** - The University of Waikato, New Zealand. 2012.

WAITE, J. H. et al. Cassini ion and neutral mass spectrometer: Enceladus plume composition and structure. **Science**, v. 311, p. 1419-22, 2006.

WORTH, R. J.; SIGURDSSON, S.; HOUSE, C. H. Seeding life on the moons of the outer planets via lithopanspermia. **Astrobiology**, v. 13, p. 1155-1165, 2013.

YI, H., Oh, H. M., Lee, J. H., Kim, S. J., & Chun, J. (2005). *Flavobacterium antarcticum* sp. nov., a novel psychrotolerant bacterium isolated from the Antarctic. **International journal of systematic and evolutionary microbiology** 55, p. 637-641.

ZOLOTOV, Mikhail Y.; SHOCK, Everett L. Energy for biologic sulfate reduction in a hydrothermally formed ocean on Europa. **Journal of Geophysical Research: Planets**, v. 108, n. E4, 2003.