

ЦЕЛОСТНОСТЬ ГЕНОМА *Bacillus velezensis* ПОСЛЕ ДВУХЛЕТНЕГО ЭКСПОНИРОВАНИЯ В ОТКРЫТОМ КОСМОСЕ

© 2024 г. С. В. Фялкина^{a, b, *}, Е. А. Дешевая^a, А. Л. Ракитин^c, О. И. Орлов^a

^a Государственный научный центр Российской Федерации — Институт медико-биологических проблем Российской академии наук, Москва, 123007 Россия

^b Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика Н.Ф. Гамалеи, Москва, 123098 Россия

^c Институт биоинженерии им. К.Г. Скрябина, Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Москва, 119071 Россия

*e-mail: fialkina-fsv@mail.ru

Поступила в редакцию 30.03.2023 г.

После доработки 12.05.2023 г.

Принята к публикации 30.05.2023 г.

Спорообразующие бактерии обладают уникальной устойчивостью к негативным условиям окружающей среды, включая агрессивные факторы космического пространства, и являются прекрасной моделью для изучения молекулярных механизмов адаптации и стратегий выживания. Проведен анализ генома бактерий *Bacillus velezensis*, оставшихся жизнеспособными после двухлетнего экспонирования в открытом космосе на внешней поверхности Международной космической станции в рамках космического эксперимента “Тест”. Сравнительный анализ черновых версий геномов опытного штамма и наземного контрольного штамма не выявил крупных перестроек генома, средняя нуклеотидная идентичность составила 99.98%, что свидетельствует о способности микроорганизмов поддерживать стабильность генома в условиях космоса, что обусловлено как повышенной стрессоустойчивостью бактериальных спор, так и эффективной работой системы репарации повреждений ДНК. Сравнение геномов опытного и контрольного штаммов *B. velezensis* выявило девять точечных замен, три из которых находятся в межгенных участках, шесть в белоккодирующих генах, из них три миссенс-мутации, две делеции нуклеотидов, приводящие к сдвигу рамки считывания, одна синонимическая замена. Определены профили генов “домашнего хозяйства”. При проведении типирования MLST, установлено, что аллельные профили штаммов *B. velezensis* T15.2 и 924 не соответствуют ни одному из описанных ранее типов нуклеотидной последовательности. Представленные результаты свидетельствуют о способности бактерий *B. velezensis* длительное время сохранять жизнеспособность спор и целостность генома в экстремальных условиях открытого космоса, что важно для проблемы планетарной защиты, а также возможности осуществления биотехнологических процессов на основе *B. velezensis* при освоении космоса.

Ключевые слова: космический эксперимент “Тест”, *Bacillus velezensis*, космические факторы, низкая околоземная орбита, бактериальные споры, международная космическая станция

DOI: 10.31857/S0026898424010047, **EDN:** OHOJPL

ВВЕДЕНИЕ

Агрессивные факторы космического пространства негативно влияют на любые формы жизни. Однако многие экстремофильные виды микроорганизмов обладают способностью противостоять неблагоприятным условиям космоса и сохранять жизнеспособность даже при длительном нахождении в подобных условиях. Космическая среда имеет целый набор стрессовых факторов, в их числе солнечное УФ-излучение, галактическое космическое излучение, солнечное космическое излучение, высокий космиче-

ский вакуум, экстремальные колебания температур и микрогравитация [1].

Проведены эксперименты, направленные на изучение влияния отдельных факторов космического пространства на живые организмы. Так, споры *Bacillus subtilis* сохранили жизнеспособность на установке длительного воздействия НАСА (LDEF) в течение 6 лет [2]. Бактериальные и грибные споры, цианобактерии, лишайники выжили в течение 15 мес. на платформах EXPOSE-E и EXPOSE-R на Международной космической станции (МКС) [3]. Споры бакте-

рий и грибов изучали в эксперименте “Биориск” [4]; цианобактерии и лишайники пережили 10-дневную космическую экспозицию в рамках космического эксперимента *Lithopanspermia* [5]; *Deinococcus radiodurans* выжил после 1 г экспонирования в миссии “Танпопо” [6].

В нашем космическом эксперименте “Тест-экспонат” суспензию спор бактерий вносили в толщу ваты, накрученной на металлический тампонодержатель, а космонавт при внешнекорабельной деятельности размещал этот прибор на внешней поверхности МКС.

Важной задачей остается изучение реакций микроорганизмов на воздействие факторов космического пространства на молекулярном уровне, выявление механизмов сохранения жизнеспособности и адаптации к условиям космоса, влияние на генетический аппарат клетки, метаболизм, биохимическую и физиологическую активность. Исследования в этом направлении позволили выявить влияние космических условий на геном, протеом и транскриптом микроорганизмов, скорость их пролиферации, подвижность, формирование биопленок, патогенность и устойчивость к антибактериальным препаратам [7–12].

Однако существующих данных недостаточно для детального понимания многофункциональной молекулярной структуры клеток, претерпевших стресс космического воздействия, поэтому необходим всесторонний и детальный анализ молекулярных реакций биологических систем.

Грамположительные аэробные или факультативно-анаэробные, образующие перитрихальные жгутики, бактерии рода *Bacillus* способны формировать эндоспоры, обеспечивающие их выживание в самых экстремальных условиях, поэтому они представляют собой прекрасные модели для астробиологических исследований.

В нашем космическом эксперименте “Тест-экспонат” бактериальные споры *B. velezensis*, споры гриба *Aureobasidium pullulans* и археи *Methanosarcina mazei* S-6T экспонировались в течение 2 лет на низкой околоземной орбите на установке, закрепленной с внешней стороны поверхности МКС, в условиях открытого космоса. После возвращения на Землю образцы были доставлены в лабораторию, и количество жизнеспособных клеток определено культуральным методом. Дальнейшие исследования были направлены на молекулярно-биологические свойства выживших микроорганизмов. Исследования свойств жизнеспособных клеток *M. mazei* S-6T описаны ранее [13], изучение *A. pullulans* еще не завершено, молекулярно-генетические исследования *B. velezensis* описаны в данной работе.

В представленной работе проведен сравнительный анализ геномов штамма-экспоната *B. velezensis* T15.2 и штамма наземного контроля *B. velezensis* 924, который служил референсным штаммом при изучении влияния стрессовых факторов открытого космоса на целостность молекулярно-генетических структур жизнеспособных клеток.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Бактериальные штаммы. В работе исследовали штамм *B. velezensis* T15.2, который экспонировали в течение 2 лет (2017–2019 гг.) на внешней поверхности МКС в рамках космического эксперимента “Тест-экспонат”. Этот штамм является производным штамма *B. velezensis* 924, использованного нами в качестве наземного контроля и референсного штамма. Штамм *B. velezensis* 924 был выделен ранее в космическом эксперименте “Тест” из космической пыли, отобранной с поверхности иллюминатора на МКС на границе стекла и обоймы при внешнекорабельной деятельности (ВКД-35) в 2013 г. [14].

Выделение геномной ДНК и секвенирование. Жидкие культуры выращивали в 5 мл бульона Лурия–Бертани (LB) при 30°C и активном перемешивании в течение 24 ч. Осадок биомассы получен при центрифугировании (15 мин, 8228 g, центрифуга Eppendorf 5810R).

Геномную ДНК выделяли с использованием набора DNeasy PowerSoil Pro Kit (“QIAGEN”, Германия) по протоколу, рекомендованному фирмой. Количество выделенной ДНК определяли флуориметрическим методом с использованием наборов Qubit dsDNA HS Assay Kit (“Thermo Fisher Scientific”, США) по протоколам фирмы. ДНК секвенировали с использованием технологии Illumina. Для приготовления библиотек ДНК фрагментировали в ультразвуковом аппарате Bioruptor UCD 200 (“Diagenode”, США) в течение 10 мин при минимальной мощности (5 циклов 30 с вкл. и 90 с выкл.). Парные библиотеки ДНК (300 × 2) получены с использованием набора NEBNext® Ultra™ II DNA Library Prep Kit for Illumina (“NEB”, США) в соответствии с условиями производителя. Количество и качество библиотек определяли с использованием системы капиллярного электрофореза Bioanalyzer 2100 (“Agilent”, США). Библиотеки ДНК секвенировали с использованием прибора MiSeq (“Illumina”, США) и набора реагентов MiSeq Reagent Kit v3 (600 циклов; “NEB”).

Биоинформатические методы. Полученные в результате секвенирования парные пересекающиеся чтения объединяли с помощью программы flash [15], затем последовательности низкого качества удаляли с использованием программы

Sicklev.1.33 ($q = 30$). В результате получили не менее чем 30-кратное покрытие каждого генома.

Идентификацию белоккодирующих генов и генов рРНК, а также теоретическое предсказание их функций проводили с использованием сервера RAST [16].

Для нахождения однонуклеотидных замен и делеций чтения штамма *B. velezensis* T15.2 были выравнены с контигами штамма *B. velezensis* 924 программой Bowtie2 [17], контиги собраны программой Spades [18]. Поиск мутаций выполняли с помощью программы FreeBayes. В качестве референсного штамма использовали *B. velezensis* 924.

Среднюю нуклеотидную идентичность ANI (average nucleotide identity) оценивали с использованием программных продуктов, представленных на сайте http://fbac.dmicrobe.cn/tools/ANI_calculator [19].

MLST-типирование и филогенетический анализ. Типирование на основе мультилокусных последовательностей (MLST) для анализа аллелей проведено в соответствии с сервисом базы данных PubMLST (<https://pubmlst.org>), основанной на анализе семи генов домашнего хозяйства: *glpF*, *ilvD*, *pta*, *purH*, *pusA*, *rpoD*, *tpiA*, кодирующих дегидратазу дигидроксикислот (*ilvD*), белок, вовлеченный в поглощение глицерина (*glpF*), фосфоацетилтрансферазу (*pta*), фосфорибозиламиноимидазолкарбоксамид-формилтрансферазу (*purH*), пируваткарбоксилазу (*pusA*), субъединицу D РНК-полимеразы (*rpoD*), триозофосфатизомеразу (*tpiA*).

Полученным последовательностям локусов присваивали номера в соответствии с сервисом базы данных PubMLST. На основе комбинации номеров аллелей используемых локусов определяли тип нуклеотидной последовательности

(ST) штаммов в соответствии с сервисом указанной базы данных.

Филогенетический анализ слитых *in silico* последовательностей семи локусов генов домашнего хозяйства проводили методом связывания ближайших соседей (neighbour-joining) [20] в программном обеспечении MEGA 11 [21]. Для анализа и сборки последовательностей использовали программу Vector NTI 9.0. Нуклеотидные последовательности родственных штаммов *B. velezensis* загружены из базы данных PubMLST.

гMLST-анализ. Рибосомное мультилокусное типирование последовательностей (гMLST) выполнено при анализе вариации 53 генов *rps*, кодирующих бактериальные рибосомные белки [22].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Секвенирование генома

В результате секвенирования геномов собрано 72 контига *B. velezensis* 924 со средней длиной прочтения 270 п.н. и 19 контигов *B. velezensis* T15.2 со средней длиной прочтения 261 п.н. Объем секвенирования составил 429129360 п.н. у штамма 924 и 382868730 п.н. у T15.2. Результаты секвенирования представлены в табл. 1. Черновые (драфт)-геномы *B. velezensis* T15.2 и *B. velezensis* 924 депонированы в базу данных GenBank под номерами JARIYD000000000 и JARIYE000000000 соответственно; Bioproject – PRJNA942592.

Аннотация собранных драфт-геномов

В собранных геномах *B. velezensis* 924 и *B. velezensis* T15.2 обнаружены 4063 последовательности, кодирующие полипептиды (CDS), 87 генов тРНК и восемь кластеров генов 16S рРНК (табл. 2).

Таблица 1. Результаты секвенирования геномов

Параметр	<i>B. velezensis</i> 924	<i>B. velezensis</i> T15.2
Объем секвенирования, п.н.	429129360	382868730
Число чтений	1589368	1466930
Средняя длина чтения, п.н.	270	261
Суммарная длина контигов, н.	3971083	3951523
Количество контигов	72	19
Длина контига N50, н.	2127125	2127125

Таблица 2. Результаты аннотации геномов

Параметр	<i>B. velezensis</i> 924	<i>B. velezensis</i> T15.2
Белоккодирующие гены (CDS)	4075	4075
в том числе с предсказанными функциями	3256 (79.9%)	3256 (79.9%)
Гены тРНК	87	87
Число рибосомных оперонов (16S)	8	8
Содержание GC, %	46.3	46.3

	<i>B. velezensis</i> s92	<i>B. velezensis</i> T15.2	
<i>B. velezensis</i> 924	100%	99.98%	<i>B. velezensis</i> 924
<i>B. velezensis</i> T15.2	99.98%	100%	<i>B. velezensis</i> T15.2
	<i>B. velezensis</i> s92	<i>B. velezensis</i> T15.2	

Рис. 1. Нуклеотидная идентичность (%) геномов *B. velezensis* 15.2 и референс-штамма *B. velezensis* 924.

Сравнительный анализ нуклеотидной идентичности генома, проведенный при помощи калькулятора ANI, штамма *B. velezensis* T15.2, экспонированного в открытом космосе, и наземного контроля (*B. velezensis* 924), выявил 99.98% сходства (рис. 1), что говорит о способности бактерий сохранять значительную стабильность генома в условиях космического пространства, вероятно, благодаря эффективным механизмам защиты и репарации молекул ДНК.

Исследование однонуклеотидного полиморфизма (SNP), вставок/делеций (InDel) в геноме *B. velezensis*

Сравнение геномов штаммов *B. velezensis* T15.2 и 924 выявило семь точечных замен и две делеции нуклеотидов. Три замены найдены в межгенных участках: между генами, кодирующими белок с неизвестной функцией и протеазу HtpX, соответственно, в позиции 1694814 (контиг 1) обнаружена замена С на Т; между геном, кодирующим β-1,4-глюканазу, и геном, кодирующим белок с неизвестной функцией, в позиции 1118526 (контиг 1) обнаружена замена G на C; между геном пермеазы и геном, кодирующим ADP-рибозопирофосфатазу, в позиции 21542 (контиг 3) обнаружена замена G на Т. В генах, кодирующих белки, обнаружено шесть SNP, три из которых миссенс-мутации, приводящие к несинонимичным заменам аминокислотных остатков в белках, одна синонимичная замена и делеции нуклеотидов в двух генах, вызывающие сдвиг открытой рамки считывания.

В гене *adhP*, кодирующем алкогольдегидрогеназу, в позиции 1172350 (контиг 1) най-

дена замена С на А; в гене *fumC*, кодирующем фумаратгидратазу, в позиции 196354 (контиг 2) обнаружена замена G на А; в гене, гомологичном *lolA*, кодирующем белок-переносчик липопротеинов наружной мембраны, в позиции 135281 (контиг 3) найдена замена А на Т. Мутации в указанных генах приводят к заменам аминокислотного остатка. Такие точечные замены могут быть причиной изменения активности ферментов, однако для точного понимания влияния этих замен на активность ферментов требуется их дальнейшее изучение. Замена А на Т в позиции 190499 (контиг 4) гена *gltB* (*yerD*), контролирующего синтез фермента глутаматсинтазы, является синонимической мутацией, которая не приводит к замене аминокислотного остатка.

В двух генах обнаружены делеции нуклеотидов, приводящие к сдвигу рамки считывания. В гене, кодирующем белок с неизвестной функцией, обнаружена делеция Т в позиции 384025 (контиг 2), а в гене *uvrY*, кодирующем регуляторный белок, найдена делеция G в позиции 398978 (контиг 3). Результаты представлены в табл. 3.

MLST и филогенетический анализ

С использованием MLST-типирования проанализированы локусы отдельных генов домашнего хозяйства и определен аллельный профиль штаммов *B. velezensis* 15.2 и *B. velezensis* 924, который полностью совпадал по следующим фрагментам генов: *glpF*, *ilvD*, *pta*, *purH*, *pycA*, *rpoD*, *tpiA* (табл. 4).

Таблица 3. SNP, обнаруженные в геноме *B. velezensis* T15.2, относительно *B. velezensis* 924

Кон- тиг	Пози- ция	Рефе- ренсный геном	<i>B. velezensis</i> T15.2	Тип мутации	Ближайший аналог гена, GenBank BLAST/ UniProt (по н.п.)	Покрытие/ идентичность, GenBank BLAST/ UniProt %/% (по н.п.)	Продукт
1	1694814	C	T	Межгенный участок			
1	1172350	C	A	Миссенс- мутация	<i>adhP</i> ¹ <i>B. velezensis</i> Hx05 (CP029473.2)	100/100 ¹	Алкогольде- гидрогеназа (WP_025851115.1) ¹
1	1118526	G	C	Межгенный участок			
2	384025	CTT	CA	Сдвиг рамки считывания	<i>B. velezensis</i> 8-2 ¹ (CP028439.1)	100/100 ¹	Гипотетиче- ский белок (WP_003151476.1) ¹
2	196354	G	A	Миссенс-му- тация	<i>fumC</i> ¹ <i>B. velezensis</i> штамм YC_89 (CP092499.1)	100/100 ¹	Фумаратги- дратаза класса II (WP_003151808.1) ¹
3	398978	CGA	CA	Сдвиг рамки считывания	<i>uvrY</i> ¹ <i>Bacillus</i> sp. ZY-1 (CP027061.1)	100/100 ¹	Регуляторный белок (AKL74816.1) ¹
3	135281	A	T	Миссенс- мутация	<i>lolA</i> ¹ <i>B. velezensis</i> Hx05 (CP029473.2) <i>ydcC</i> ² <i>B. subtilis</i> 168 (AB001488.1)	100/100 ¹ 88/82.69 ²	Белок-переносчик липопротеинов наружной мембраны (WP_003156191) ¹ . Белок, участвую- щий в споруляции (P96619) ²
3	21542	G	T	Межгенный участок			
4	190499	A	T	Синонимич- ная мутация	<i>gltB</i> ¹ <i>B. velezensis</i> Hx05 (CP029473.2) <i>yerD</i> ² <i>B. subtilis</i> (штамм 168)	100/99.94 ¹ 91/74.32 ²	Флавиномононукле- отид связывающая глутаматсинтаза (WP_275953733.1) ¹ Большая субъедини- ца глутамат синтазы (P39812) ²

¹ – GenBank BLAST, ² – UniProt.

Таблица 4. Аллельный профиль штаммов *B. velezensis* T15.2 и *B. velezensis* 924

<i>B. velezensis</i> T15.2/ <i>B. velezensis</i> 924	<i>glpF</i>	<i>ilvD</i>	<i>pta</i>	<i>purH</i>	<i>rusA</i>	<i>rpoD</i>	<i>tpiA</i>
Аллель	29	62	54	50	51	30	77
Длина, п.н.	384	471	414	399	399	384	420
Контиг	1	1	2	4	1	1	2
Идентичность, %	100	100	100	100	100	100	100

Основываясь на данных MLST-типирования, провели филогенетический анализ семи генов домашнего хозяйства методом связывания ближайших соседей (neighbour-joining). Слитые *in silico* нуклеотидные последовательности генов домашнего хозяйства штаммов T15.2 и 924 сравнивали с последовательностями 14 родственных штаммов *B. velezensis*, принадлежащих к разным

ST-типам, представленным в базе данных PubMLST.

На основе комбинации номеров аллелей используемых локусов не удалось отнести изучаемые штаммы ни к одному из существующих в базе данных ST-типов в соответствии с сервисом базы данных pubMLST, а проведенный филогенетический анализ показывает их связь с 13 родственными ST-типами *B. velezensis* (рис. 2).

Согласно комбинации номеров аллелей наиболее сходными оказались ST-71, ST-95 и ST-170 с несовпадением по двум аллелям. Отнести анализируемый штамм к типу ST-71 не позволяет отличие по аллелям *ilvD* и *tpiA*. ST-95 не включает аллели *rusA*-51 и *tpiA*-77, в ST-170 не совпадают аллели *ilvD* и *rusA* (табл. 5).

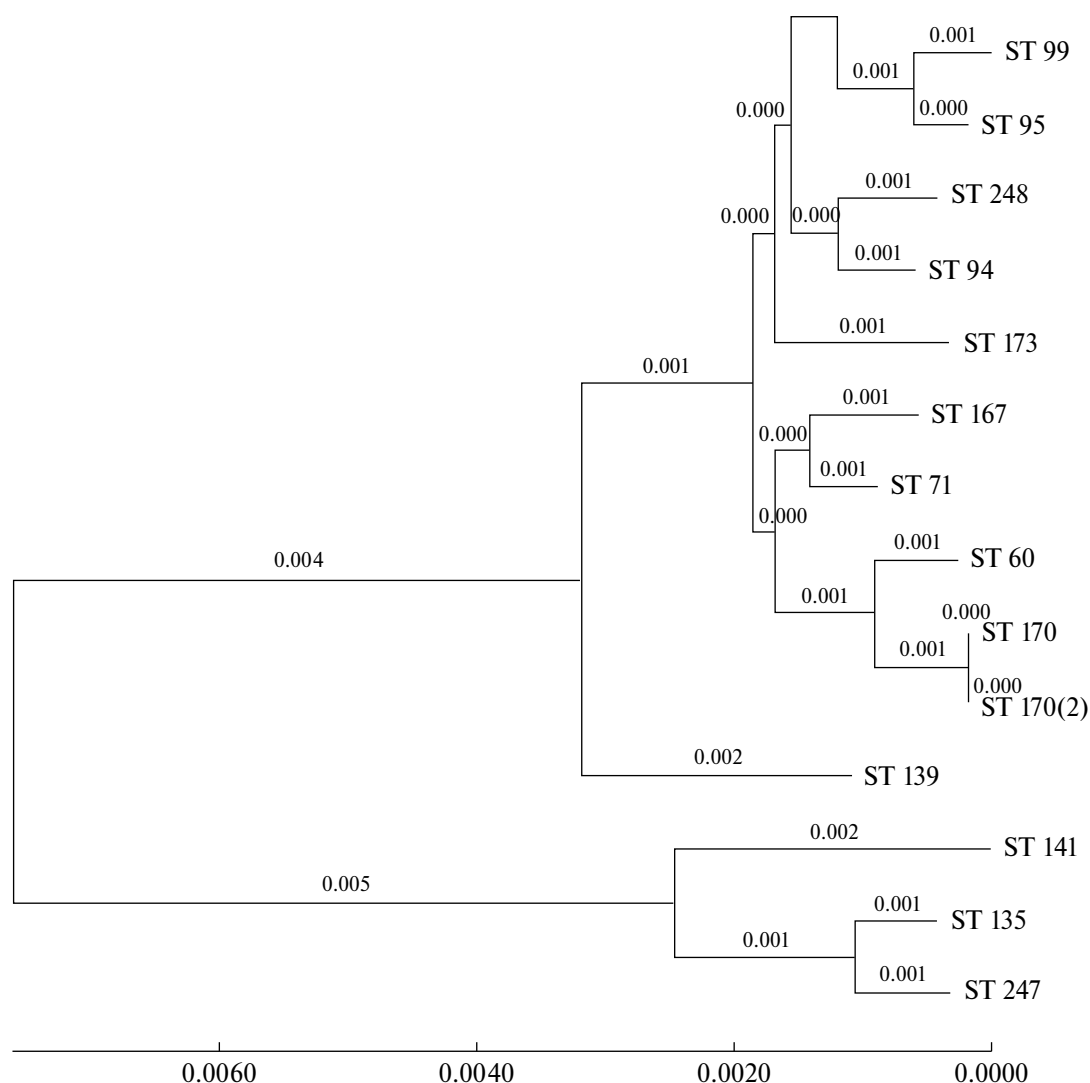


Рис. 2. Филогенетическое дерево изучаемых штаммов и родственных ST-типов *B. velezensis*, построенное методом связывания ближайших соседей с использованием слитых нуклеотидных последовательностей генов домашнего хозяйства. Эволюционные расстояния представлены в единицах количества замен оснований на сайт.

Таблица 5. Видовая идентификация штаммов 924 и T15.2 с использованием анализа нуклеотидных последовательностей генов домашнего хозяйства

Вид	Штамм	ST	<i>glpF</i>	<i>ilvD</i>	<i>pta</i>	<i>purH</i>	<i>pusA</i>	<i>rpoD</i>	<i>tpiA</i>
<i>Bacillus velezensis</i>	LFB112	71	29	—	54	50	51	30	—
	M27	95	29	62	54	50	—	30	—
	NBRC 3025	170	29	—	54	50	—	30	77
	T15.2/ 924	—	29	62	54	50	51	30	77

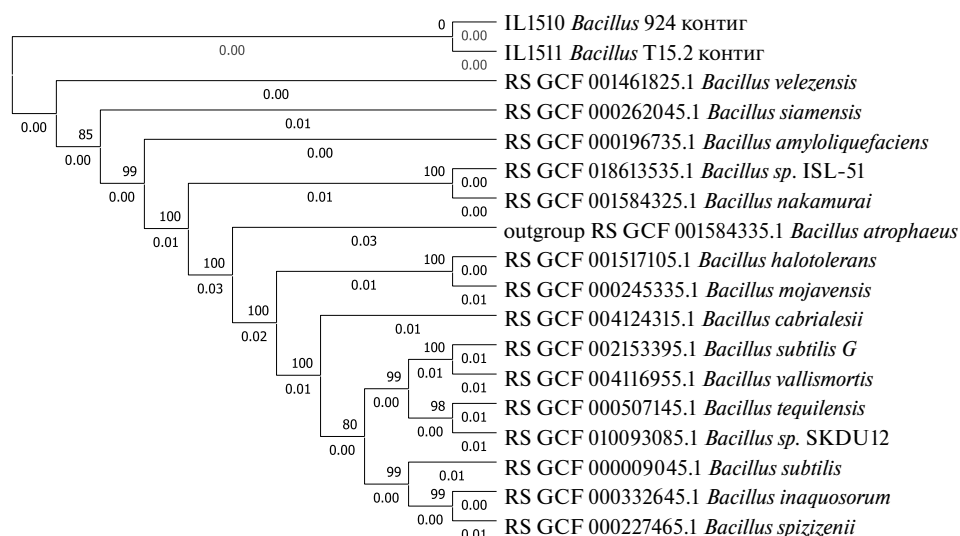


Рис. 3. Филогенетическое дерево, построенное на основании анализа 120 маркерных генов с использованием базы данных Genome Taxonomy Database. Дерево построено методом связывания ближайших соседей. Эволюционные расстояния представлены в единицах количества замен оснований на сайт.

Уточнение таксономической принадлежности

На основании биохимических характеристик и системы автоматизированной идентификации микробных штаммов Vitek-60 (“BioMerieux”, Франция), использованные в работе штаммы были первоначально идентифицированы как представители вида *B. subtilis*. Таксономическую принадлежность уточняли при помощи гMLST-анализа 53 генов *rps*, кодирующих белки бактериальных рибосомных субъединиц (см. Дополнительные материалы 1, 2), и 120 маркерных генов с использованием базы данных Genome Taxonomy Database (рис. 3) [23]. Результаты этих анализов показали, что штаммы *Bacillus* 924 и *Bacillus* T15.2 относятся к виду *B. velezensis*, который в 2005 году впервые был классифицирован как новый вид, входящий в группу *B. amyloliquefaciens* в составе группы *B. subtilis*. Типовой штамм (CR-502T=CECT 5686T=LMG 22478T) был выделен из пробы воды, взятой из реки Велес в Малаге на юге Испании [24].

Аллельный профиль семи генов домашнего хозяйства изучаемых штаммов также указывает на их принадлежность к виду *B. velezensis* (табл. 5), а проведенный филогенетический анализ выявил тесную связь с 13 ST-типами этого вида (рис. 2).

Анализ драфт-геномов на сайте <http://microbial-genomes.org/> также позволяет отнести наши штаммы к виду *B. velezensis* с наибольшей идентичностью геномов штаммов T15.2 и *B. velezensis* NZ CP031424 (99.33%), а также штамма 924 с *B. velezensis* NZ CP029473 (99.63%) (табл. 6).

Таблица 6. Идентификация штаммов на основании идентичности геномных нуклеотидных последовательностей

Штамм	Средняя нуклеотидная идентичность (ANI, %)		Покрытие, %	
	T15.2	924	T15.2	924
<i>Bacillus</i> sp. ZY 11 NZ CP027061	99.26	99.94	91.7	97.87
<i>Bacillus velezensis</i> NZ CP029473	99.26	99.63	94.74	96.57
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> NZ CP017953	99.25	99.5	95.2	95.81
<i>Bacillus velezensis</i> NZ CP010556	99.32	99.34	94.82	94.52
<i>Bacillus velezensis</i> NZ CP031424	99.33	99.34	94.44	94.44
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> NZ CP013727	99.31	99.34	96.19	95.89
<i>Bacillus subtilis</i> NZ CP009684	99.31	99.32	95.28	95.05
<i>Bacillus velezensis</i> NZ LN999829	99.31	99.31	94.82	94.74
<i>Bacillus velezensis</i> CP072310	99.30	99.31	94.67	94.82
<i>Bacillus velezensis</i> CAU B946 NC 016784	99.31	99.3	95.66	95.81
<i>Bacillus velezensis</i> NZ CP031880	99.31	99.3	94.90	95.05

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Экстремальные условия космического пространства оказывают комплексное негативное воздействие на клеточные структуры микроорганизмов, но живые организмы имеют ряд стратегий выживания, которые играют важную роль в поддержании целостности клеточных структур и молекул ДНК в условиях воздействия негативных экологических факторов.

В ходе изучения влияния космической среды на молекулярные структуры спорообразующих бактерий *B. velezensis* мы сравнили полные нуклеотидные последовательности геномов штаммов T15.2 и 924 (наземный контрольный референсный штамм) и выявили 99.98% идентичности, что указывает на возможность сохранения высокой стабильности генома после длительного пребывания во внесемных условиях, обусловленной действием механизмов защиты бактериальных клеточных структур и работой эффективной системы репарации.

Известно, что бактерии рода *Bacillus* способны предотвращать возникновение повреждений или эффективно восстанавливать клеточные структуры после негативного воздействия. Пути защиты спор от многих стресс-факторов включают: резкое снижение количества воды в клетке, уплотнение и утолщение оболочки споры, значительное накопление пиридин-2,6-дикарбоновой (дипиколиновой) кислоты (DPA), повышение уровня малых кислоторастворимых белков спор α/β -типа (SASP) концентрацию меланиноподобных пигментов [25–27]. Восстановление накопленных повреждений осуществляется при участии систем устранения окислительного стресса (каталаза, супероксид-дисмутаза), а также таких путей репарации ДНК, как гомологичная и негомологичная рекомбинация, эксцизионная репарация нуклеотидов (NER), сканирование целостности ДНК, репарация межцепочечных поперечных связей, эксцизионная репарация оснований (BER), репарация SP-лиазой фотопродуктов спор (Spl) [28, 29].

В ходе уточнения систематического положения штамма 924 и его производного T15.2 установлено, что идентичность нуклеотидных последовательностей геномов этих штаммов и большого количества геномов штаммов вида *B. velezensis*, депонированных в базу данных, превышает 99% (часть штаммов представлена в табл. 6), что может свидетельствовать о возможном занесении штамма 924 на МКС с Земли в результате деятельности человека, при транспортировке грузов, оборудования и т.д. Отличительной особенностью изучаемых штаммов является их аллельный профиль, так как на основе комбинаций номеров аллелей используемых

локусов не удалось определить принадлежность этих штаммов ни к одному из ST-типов, представленных в базе данных.

Сравнение нуклеотидных последовательностей штаммов *B. velezensis* T15.2 и референсного штамма выявило девять точечных замен, три из которых локализованы в межгенных областях и шесть в последовательностях, кодирующих белки, три гена несут миссенс-мутацию, приводящую к замене аминокислотного остатка, и две делеции нуклеотидов, результат которой – сдвиг рамки считывания. В частности, мутации обнаружены в генах ферментов, участвующих в биосинтезе глутамата, цикле трикарбоновых кислот, в гене оксидоредуктазы, катализирующей окисление спирта до ацетальдегида, а также в генетических детерминантах белка-переносчика липопротеинов наружной мембраны и регуляторного белка. Выявленные мутации не повлияли на жизнеспособность бактериальных клеток. Это можно объяснить тем, что многие гены, контролирующие ферменты клеточного метаболизма, присутствуют в нескольких копиях, например ген алкогольдегидрогеназы, или клетка может переключаться на другие пути метаболизма. Некоторые мутации могут быть позитивными для клетки. Так, изменение в гене регуляторной системы может приводить к активации защитных механизмов, направленных на борьбу с устранением последствий воздействия космических факторов. Белок LolA является специфичным шапероном граммотрицательных бактерий, который переносит липопротеины от внутренней мембраны к внешней. У бактерий рода *Bacillus* этот белок высокоомологичен белку YdcC, участвующему в спорообразовании. Возможно, мутация в этом белке может способствовать защите бактериальных спор путем формирования более плотных споровых покрытий. Для более точного понимания влияния обнаруженных мутаций на свойства *B. velezensis* требуются дополнительные исследования.

Опубликованы также сведения о точечных мутациях, обнаруженных в геноме цианобактерии *Nostoc* sp. CCCryo 231-06 после 23-месячного пребывания на МКС. Показана повышенная частота синонимичных замен в наиболее измененных локусах, связанных с формированием биопленок и функционированием фотосистемы [30].

Воздействие экстремальных условий, присутствующих на низкой околоземной орбите, негативно влияет на многие клеточные структуры, особенно на нуклеиновые кислоты – в структуре ДНК возникают одно- и двухцепочечные разрывы, накапливаются бипиримидиновые фотопродукты [31]. В нашем эксперименте “Тест-экспонат” выжившие клетки могли быть

экранированы волокнами ватного тампона или верхними слоями бактериальных спор, что могло защитить их от такого наиболее губительно-го космического фактора, как УФ-излучение. Повреждения в структуре ДНК, вызванные совместным воздействием стресс-факторов космического пространства, в большей степени могли быть восстановлены клеткой в результате эффективной работы систем репарации и ферментативного комплекса защиты от окислительного стресса. Это предположение подтверждают и результаты ряда работ, описывающих протеомные, транскриптомные и метаболические изменения, возникающие в клетке в ответ на стресс, вызванный влиянием космических условий [6–8, 32]. В клетках радиационно-устойчивой бактерии *Deinococcus radiodurans*, чтобы справиться с повреждением ДНК, индуцируется механизм эксцизионной репарации с участием эндонуклеазы UvrABC. Защита от активных форм кислорода связана с повышенным содержанием каталазы и путресцина, который действует как молекула, удаляющая активные формы кислорода. Повышенное содержание белков и мРНК, ответственных за регуляторные и транспортные функции, снижение первичных метаболитов указывает на изменение энергетического статуса, необходимого для восстановления поврежденных молекул [6]. Протеомный анализ вегетативных клеток первого пассажира *B. pumilus* SAFR-032 выявил различия в синтезе ряда белков. Отмечено снижение содержания белков, участвующих в транспорте/метаболизме углеводов и выработке/преобразовании энергии, повышение количества белков, связанных с выживанием, ростом и реакцией на стресс [32]. Транскриптомный анализ клеток *B. subtilis* 168 после 1.5-летнего воздействия космических факторов выявил повышение уровня транскриптов ряда связанных со стрессом генов, реагирующих на повреждение ДНК (SOS-реакция, индукция профага SP β), повреждение белков (система CtsR/Ctp), окислительный стресс (регулон PerR) и стресс клеточной оболочки (регулон SigV) [7]. Аналогичные результаты получены и при проведении сравнительного протеомного анализа клеток *B. pumilus* SAFR-032 после 18 мес. пребывания в космосе [8].

Важной задачей остается изучение влияния стресс-факторов космического пространства на стабильность генома не только покоящихся спор, но и в условиях метаболической активности клеток бактерий, позволяющее проследить накопление изменений в структуре ДНК и эффективность репарации в ряду поколений. Работы в этом направлении привели к созданию автоматизированной миниатюрной системы для оценки экспрессии генов *in situ* в микробных образцах, которая может использоваться при проведении биологических исследований на космических платформах [33].

Причины выявленных изменений и их влияние на эволюционный потенциал и адаптацию бактерий к условиям космического пространства требуют дальнейшего изучения. Отсутствие крупных перестроек генома позволяет предполагать достаточно высокую стабильность генома микроорганизмов в условиях длительного экспонирования в открытом космосе.

Полученные нами данные важны для решения проблем защиты планеты при планировании межпланетных экспедиций с целью поиска жизни, вероятности панспермии, а также использования микробных технологий для освоения человеком космического пространства. Важной задачей планетарной защиты является предотвращение связанного с космическими полетами биологического загрязнения космических тел земными биологическими структурами, которые могут поставить под сомнение эксперименты по поиску жизни, ее предшественников и остатков [34]. Наши данные подтверждают возможность длительного сохранения жизнеспособности бактериальных спор и целостности их генома во внеземных условиях, что предполагает вероятность переноса спорных форм на другие планеты.

Таким образом, нами подтверждено, что спорообразующие бактерии обладают уникальной устойчивостью к неблагоприятным факторам окружающей среды, включая агрессивные факторы космического пространства. Показана способность микроорганизмов сохранять стабильность генома в условиях космоса, что обусловлено как повышенной стрессоустойчивостью спор бактерий, так и эффективной работой систем репарации накопленных изменений.

Работа выполнена в рамках программы “МКС (Наука) (Наука-1) Тест_22” и контракта от № 2123730201782217000241851/22-12-640/(15–07001-2002)–07001/75–2022.

Представленная работа выполнена без привлечения людей или животных в качестве объектов исследования.

Авторы сообщают об отсутствии конфликтов интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Horneck G., Klaus D.M., Rocco L. (2010) Space Microbiology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **74**, 121–156.
2. Horneck G., Bucker H., Reitz G. (1994) Long-term survival of bacteria spores in space. *Adv. Space Res.* **14**, 41–45.
3. Rabbow E., Rettberg P., Barczyk S., Bohmeier M., Parpart A., Panitz C., Horneck G., Burfeindt J., Molter F., Jaramillo F. (2015) The astrobiological

- mission EXPOSE-R on board of the International Space Station. *Int. J. Astrobiol.* **14**, 3–16.
4. Баранов И.М., Новикова Н.Д., Поликарпов Н.А., Сычев В.Н., Левинских М.А., Алексеев В.Р., Окуда Т., Сугимото М., Гусев О.А., Григорьев А.И. (2009) Эксперимент “Биориск”: 13-месячная экспозиция покоящихся форм организмов на внешней стороне Российского сегмента Международной космической станции (предварительные результаты). *Доклады РАН.* **426**, 206–209.
 5. de La Torre R., Sancho L.G., Horneck G., de los Ríos A., Wierzchos J., Olsson-Francis K., Cockell C.S., Rettberg P., Berger T., de Vera J.P.P., Ott S., Frías J.M., Melendi P.G., Lucas M.M., Reina M., Pintado A., Demets R. (2010) Survival of lichens and bacteria exposed to outer space conditions – results of the Lithopanspermia experiments. *Icarus.* **208**(2), 735–748.
 6. Ott E., Kawaguchi Y., Kölbl D., Rabbow E., Rettberg P., Mora M., Moissl-Eichinger C., Weckwerth W., Yamagishi A., Milojevic T. (2020) Molecular repertoire of *Deinococcus radiodurans* after 1 year of exposure outside the International Space Station within the Tanpopo mission. *Microbiome.* **8**(1), 150.
 7. Nicholson W.L., Moeller R., Horneck G. (2012) Transcriptomic responses of germinating *Bacillus subtilis* spores exposed to 1.5 years of space and simulated martian conditions on the EXPOSE-E experiment PROTECT. *Astrobiology.* **12**(5), 469–486.
 8. Vaishampayan P.A., Rabbow E., Horneck G., Venkateswaran K.J. (2012) Survival of *Bacillus pumilus* spores for a prolonged period of time in real space conditions. *Astrobiology.* **12**(5), 487–497.
 9. Mastroleo F., Van Houdt R., Leroy B., Benotmane M.A., Janssen A., Mergeay M., Vanhavere F., Hendrickx L., Wattiez R., Leys N. (2009) Experimental design and environmental parameters affect *Rhodospirillum rubrum* S1H response to space flight. *ISME J.* **3**(12), 1402–1419.
 10. Wilson J.W., Ott C.M., Honer zu Bentrup K., Ramamurthy R., Quick L., Porwollik S., Cheng P., McClelland M., Tsapraillis G., Radabaugh T., Hunt A., Fernandez D., Richter E., Shah M., Kilcoyne M., Joshi L., Nelman-Gonzalez M., Hing S., Parra M., Dumars P., Norwood K., Bober R., Devich, J. Ruggles A., Goulart C., Rupert M., Stodieck L., Stafford P., Catella L., Schurr M.J., Buchanan K., Morici L., McCracken J., Allen P., Baker-Coleman C., Hammond T., Vogel J., Nelson R., Pierson D.L., Stefanyshyn-Piper H.M., Nickerson C.A. (2007) Space flight alters bacterial gene expression and virulence and reveals a role for global regulator Hfq. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **104**(41), 16299–16304.
 11. Klaus D.M., Howard H.N. (2006) Antibiotic efficacy and microbial virulence during space flight. *Trends Biotechnol.* **24**, 131–136.
 12. Su L., Chang D., Liu C. (2013) The development of space microbiology in the future: the value and significance of space microbiology research. *Future Microbiol.* **8**, 5–8.
 13. Ошуркова В.И., Дешева Е.А., Сузина Н.Е., Шубралова Е.В., Щербакова В.А. (2021) Метаногенные археи в условиях космоса. *Авиакосмическая и экологическая медицина.* **55**(1), 63–69.
 14. Deshevaya E.A., Shubralova E.V., Fialkina S.V., Guridov A.A., Novikova N.D., Tsygankov O.S., Lianko P.S., Orlov O.I., Morzunov S.P., Rizvanov A.A., Nikolaeva I.V. (2020) Microbiological investigation of the space dust collected from the external surfaces of the international space station. *BioNanoScience.* **10**, 81–88.
 15. Magoc T., Salzberg S. (2011) FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics.* **27**(21), 2957–2963.
 16. Aziz R.K., Bartels D., Best A.A., DeJongh M., Disz T., Edwards R.A., Formsma K., Gerdes S., Glass E.M., Kubal M., Meyer F., Olsen G.J., Olson R., Osterman A.L., Overbeek R.A., McNeil L.K., Paarmann D., Paczian T., Parrello B., Pusch G.D., Zagnitko O. (2008) The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. *BMC Genomics.* **9**, 75.
 17. Langdon W.B. (2015) Performance of genetic programming optimised Bowtie2 on genome comparison and analytic testing (GCAT) benchmarks. *BioData Min.* **8**, 1.
 18. Bankevich A., Nurk S., Antipov D., Gurevich A.A., Dvorkin M., Kulikov A.S., Lesin V.M., Nikolenko S.I., Pham S., Pribelski A.D., Pyshkin A.V., Sirotkin A.V., Vyahhi N., Tesler G., Alekseyev M.A., Pevzner P.A. (2012) SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J. Comput. Biol.* **19**(5), 455–477.
 19. Liang Q., Liu C., Xu R., Song M., Zhou Z., Li H., Dai W., Yang M., Yu Y., Chen H. (2021) fIDBAC: a platform for fast bacterial genome identification and typing. *Front. Microbiol.* **18**, 723577.
 20. Saitou N., Nei M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**, 406–425.
 21. Tamura K., Stecher G., Kumar S. (2021) MEGA 11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11. *Mol. Biol. Evol.* **25**, 3022–3027.
 22. Jolley K.A., Bliss C.M., Bennett J.S., Bratcher H.B., Brehony C., Colles F.M., Wimalaratna H., Harrison O.B., Sheppard S.K., Cody A.J., Maiden M.C.J. (2012) Ribosomal multilocus sequence typing: universal characterization of bacteria from domain to strain. *Microbiology* (Reading). **158**(Pt 4), 1005–1015.
 23. Chaumeil P.A., Mussig A.J., Hugenholtz P., Parks D.H. (2019) GTDB-Tk: a toolkit to classify genomes with the Genome Taxonomy Database. *Bioinformatics.* **36**(6), 1925–1927.
 24. Ruiz-García C., Béjar V., Martínez-Checa F., Llamas I., Quesada E. (2005) *Bacillus velezensis* sp. nov., a surfactant-producing bacterium isolated from the river Vélez in Málaga, southern Spain. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **55**(Pt 1), 191–195.
 25. Moeller R., Setlow P., Horneck G., Berger T., Reitz G., Rettberg P., Doherty A.J., Okayasu R., Nich-

- olson W.L. (2008) Roles of the major, small, acid-soluble spore proteins and spore-specific and universal DNA repair mechanisms in resistance of *Bacillus subtilis* spores to ionizing radiation from X rays and high-energy charged-particle bombardment. *J. Bacteriol.* **190**, 1134–1140.
26. Moeller R., Reitz G., Berger T., Okayasu R., Nicholson W.L., Horneck G. (2010) Astrobiological aspects of the mutagenesis of cosmic radiation on bacterial spores. *Astrobiology*. **10**(5), 509–521.
 27. Hullo M.F., Moszer I., Danchin A., Martin-Verstraete I. (2001) CotA of *Bacillus subtilis* is a copper-dependent laccase. *J. Bacteriol.* **183**, 5426–5430.
 28. Lenhart J.S., Schroeder J.W., Walsh B.W., Simmons L.A. (2012) DNA repair and genome maintenance in *Bacillus subtilis*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **76**, 530–564.
 29. Rebeil R., Sun Y., Chooback L., Pedraza-Reyes M., Kinsland C., Begley T.P., Nicholson W.L. (1998) Spore photoproduct lyase from *Bacillus subtilis* spores is a novel iron-sulfur DNA repair enzyme which shares features with proteins such as class III anaerobic ribonucleotide reductases and pyruvate-formate lyases. *J. Bacteriol.* **180**, 4879–4885.
 30. Liu Y., Jeraldo P., Herbert W., McDonough S., Eckloff B., de Vera J.P., Cockell C., Leya T., Baqué M., Jen J., Schulze-Makuch D., Walther-Antonio M. (2022) Non-random genetic alterations in the cyanobacterium *Nostoc* sp. exposed to space conditions. *Sci. Rep.* **12**(1), 12580.
 31. Setlow P. (2014) Spore resistance properties. *Microbiol. Spectr.* **2**(5), TBS-0003-2012.
 32. Chiang A.J., Mohan G.B.M., Singh N.K., Vaishampayan P.A., Kalkum M., Venkateswaran K. (2019) Alteration of proteomes in first-generation cultures of *Bacillus pumilus* spores exposed to outer space. *mSystems*. **4**(4), e00195-19. doi: <https://doi.org/10.1128/msystems.00195-19>
 33. Peyvan K., Karouia F., Cooper J.J., Chamberlain J., Suciu D., Slota M., Pohorille A. (2019) Gene expression measurement module (GEMM) for space application: design and validation. *Life Sci. Space Res.* **22**, 55–67.
 34. Olsson-Francis K., Doran P.T., Ilyin V., Raulin F., Rettberg P., Kminek G., Mier M.Z., Coustenis A., Hedman N., Shehhi O.A., Ammannito E., Bernardini J., Fujimoto M., Grasset O., Groen F., Hayes A., Gallagher S., Kumar K.P., Mustin C., Nakamura A., Seasley E., Suzuki Y., Peng J., Prieto-Ballesteros O., Sinibaldi S., Xu K., Zaitsev M. (2023) The COSPAR planetary protection policy for robotic missions to Mars: a review of current scientific knowledge and future perspectives. *Life Sci. Space Res.* (Amst). **36**, 27–35.

Genome Stability of *Bacillus velezensis* after Two-Year Exposure in Open Space

S. V. Fialkina^{1, 2, *}, E. A. Dshevaya¹, A. L. Rakitin³, and O. I. Orlov¹

¹ Institute of Biomedical Problems, Moscow, 123007 Russia

² Gamaleya Research Centre, Moscow, 123098 Russia

³ Institute of Bioengineering, Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

*e-mail: fialkina-fsv@mail.ru

Spore-forming bacteria have a unique resistance to negative environmental conditions, including aggressive space factors, and are an excellent model for studying adaptation mechanisms and survival strategies at the molecular level. The study analyzed the genome of *Bacillus velezensis*, which remained viable after a two-year exposure in outer space on the outer surface of the ISS as part of the Test space experiment. A comparative analysis of the draft genomes of the exhibit strain and the ground control did not reveal significant changes, the average nucleotide identity was 99.98%, which indicates the ability of microorganisms to maintain genome stability in space conditions, due to both increased stress resistance of bacterial spores and efficient operation of the system. repair of accumulated changes. The study of single nucleotide polymorphism in the genome of *Bacillus velezensis* revealed nine point substitutions, three of which are in intergenic regions, 6 in protein-coding genes, three of them are missense mutations, two nucleotide deletions leading to a shift in the reading frame, and one synonymous substitution. The profiles of the housekeeping genes were determined during MLST typing, and it was found that the allelic profiles obtained for *B. velezensis* T15.2 and 924 strains do not correspond to any of the previously described sequence types. The presented results indicate the ability of *Bacillus velezensis* bacteria to maintain the viability of spores and the integrity of the genome for a long time under extreme conditions of outer space, which is important for the problem of planetary protection, as well as the potential possibility of implementing biotechnological processes based on *Bacillus velezensis* during space exploration.

Keywords: space experiment “Test”, *Bacillus velezensis*, impact of cosmic factors, low earth orbit, bacterial spores, international space station