

Schlussbericht

Projekt SPICY

Stressresistenz von Mikroorganismen im Weltraum und in der Antarktis, als terrestrisches Analog Kurztitel: 'SPICY'

Zuwendungsempfänger Universitätsklinikum der RWTH Aachen	Förderkennzeichen 50 WB 2038
Ausführende Stelle Medizinische Fakultät Institut für Pharmakologie und Toxikologie	Projektleiter und Bearbeitung Dr. Corinna Panitz
Vorhabensbezeichnung Stressresistenz von Mikroorganismen im Weltraum und in der Antarktis, als terrestrisches Analog Kurztitel: 'SPICY'; Fondsnummer des Klinikums Aachen 360874 Bundesministerium für Wirtschaft und Technologie, BMWi, Förderkennzeichen 50 WB 2038	
Laufzeit des Vorhabens 01.08.2020– 31.07.2023	

Uniklinikum der RWTH Aachen

Projektleitung und Bearbeitung: Dr. Corinna Panitz

I.1. Aufgabenstellung des Vorhabens

Übergeordnete Aufgabenstellung des Vorhabens „Stressresistenz von Mikroorganismen im Weltraum und in der Antarktis, als terrestrisches Analog Kurztitel: 'SPICY'“ ist es die Grenzen von Leben am Beispiel unterschiedlicher Mikroorganismen im extremen Umfeld des Weltraums oder von Planeten, oder seinem terrestrischen Analog, der Antarktis zu untersuchen. Im Fokus sind dabei vor allem Vakuum, simulierte Marsatmosphäre, terrestrische- und extraterrestrische UV-Strahlung einschließlich ionisierender Strahlung, und extreme Temperaturen sowie der mögliche natürliche Schutz der Testorganismen vor diesen Parametern. Dies wird in den Teilprojekten **MEXEM** (Mars Analogues and Specialized Extremophiles in Space ILSRA-2014-0025, ehemals MASE-in-Space) und **IceCold** (Investigating cold-adapted organisms as model

organisms for a EUROPA ocean environment in Cube Sat-based Hardware ILSRA-2014-0049) im Weltraum, sowie bei **ICE_xPOSE** (Icy exposure of microorganisms, Short Title: ICEXPOSE AO-2017-CONCORDIA-003) in der Antarktis mit verschiedenen Schwerpunkten und Mikroorganismen näher untersucht. Die genaue Kenntnis der Diagnostik des Raumschiffmilieus mit hochspezifischen Biosensoren steht im Experiment **Lux- in-Space** im Mittelpunkt des Interesses. Damit werden auch zusätzliche Grundlagen geschaffen für weitere Experimente auf frei fliegenden Satelliten oder außerhalb der ISS installierten Experimentplattformen. Rationale für das SPICY Projekt waren die von ESA aktualisierten Zeitpläne für Flugmöglichkeiten der Teilprojekte LUX-in-Space und der Experimente IceCold und MEXEM (zu Beginn des SPICY Projektes in der Definitionsphase bei ESA) und die Implementierung von ICE_xPOSE außerhalb der Concordia Station. Alle Ergebnisse wurden auf Tagungen und Kongressen und in referierten Journals regelmäßig vorgestellt.

Der Bezug des Vorhabens zu den förderpolitischen Zielen ist die Vorbereitung, Optimierung und Durchführung der Experimente MEXEM, IceCold, ICE_xPOSE und LUX-in-Space. Diese Weltraumexperimente und Experimente unter extremen Umweltbedingungen liefern wichtige Ergebnisse zu dem nationalen Forschungsprogramm Forschung unter Weltraumbedingungen, da sie experimentelle Daten:

- zur möglichen Entstehung, Entwicklung und Ausbreitung des Lebens in unserem Sonnensystem beisteuern (IceCold, MEXEM, ICE_xPOSE)
- zur Frage der Strahlenexposition/ des Strahlenschutzes der Astronauten auf der ISS (Lux-in-Space) und zum Raumschiffmilieu, besonders für Langzeitmissionen wichtig bereitstellen.

Für die Teilprojekte handelte es sich um folgende Aufgabenstellungen und Arbeitshypothesen:

- Weltraumexperiment **MEXEM** für die Bartolomeo-Plattform auf der ISS

Aufgabenstellung: In dem Weltraumexperiment MEXEM (ILSRA-2014-0026, Mars Analoges and Specialized Extremophiles in Space (MASE-in-Space) werden, zusammen mit elf europäischen Partnern, ausgewählte terrestrische Organismen, Anreicherungskulturen und Original-Proben aus extremen Mars-Analog-Umgebungen der Erde unter anaeroben Bedingungen bezüglich ihrer Widerstandsfähigkeit gegenüber Marsbedingungen untersucht.

Die Fragen, die beantwortet werden sollen, sind:

1. können diese Mikroorganismen (aerobe und anaerobe), aufgrund ihrer hochwirksamen zellulären und molekularen Anpassungs- und Reparaturmechanismen, auch den Mars-Umweltstressfaktoren standhalten
2. eignen sich künstlich fossilisierte und gealterte Isolate aus Marsanalog-Umgebungen auf der Erde für die Biosignaturidentifikation, um zu ermitteln, wie diese „Biosignaturen“ heute aussehen würden und wie sie „altern“ können.

Das Experiment wird Antworten zur Diskussion geben, ob Mikroorganismen aus extremen terrestrischen Habitaten fähig sind, Marsbedingungen zu überstehen oder sogar unter diesen zu leben und ob Leben oder Spuren der Existenz dieses Lebens auf dem Mars konserviert sein könnte. Dafür werden Proben in ausgewählten Mars analogen Umgebungen wie die Boulby Mine in Großbritannien, der See Grænavatn in Island und das Sippenauer Moor in Deutschland, Proben aus Permafrost (Russland, Kanada) und aus dem Rio Tinto (Spanien) zur Verfügung gestellt. Zur Vorbereitung des Weltraumexperiments und zur Auswahl der für die Mission geeigneten Mikroorganismen wurden im Rahmen des Projektes weitere Vorexperimente mit von der ISS isolierten Mikroorganismen zur Ermittlung der Trocknungstoleranz einzeln und in Kombination durchgeführt. Dabei wurden vor allem weitere Versuche mit moderneren Mars Regolith Standards durchgeführt.

- Weltraumexperiment **IceCold** für die Bartolomeo-Plattform auf der ISS

Aufgabenstellung: Der Hintergrund des Experiments IceCold (Untersuchung von an Kälte angepasste Mikroorganismen als Modell für mögliches Leben im Ocean auf Europa in einer CubeSat Hardware, ILSRA-2014-0049) sind Überlegungen, dass der Jupiter Mond Europa und andere ähnliche eisigen Monde einer der wenigen außerirdischen Orte in unseres Sonnensystems sind, die theoretisch bewohnbar sind. Es soll die Hypothese getestet werden, ob die, für die drei Domänen des Lebens, auf der Erde ausgewählten extremophilen Mikroorganismen überleben und sich in einer zeitweise kalten (unter 0 ° C), salzigen, flüssigen Umgebung vermehren, selbst wenn sie wiederholt mit extraterrestrischem UV und ionisierender Strahlung niedriger Intensität ausgesetzt werden. Untersucht werden Archaeen, *Halorubrum lacusprofundi*, der halophile Modellorganismus *Halobacterium (Hbt.) salinarum* NRC-1, Bakterien, *Planococcus halocryophilus* (wächst bei -15 ° C, 18% Salz) und eine kälteangepasste, eukaryotische Hefe (*Rhodotorula* sp. wächst -10 °C, 15% NaCl, 12% Perchlorat). Als strahlungsresistenter Referenzorganismus für höhere Strahlenbelastung werden im Rahmen des Projekts *Deinococcus radiodurans*, *Deinococcus geothermalis* und der „Weltraumveteran“ *Bacillus subtilis* näher untersucht. *B. subtilis* Sporen werden hierbei nur als eine Referenzprobe in Bezug auf das Gesamtüberleben dienen. Als Erweiterung der Aufgaben wurde das halophile Modell-Archaeon *Halobacterium salinarum* NRC1 durch Wegfall eines CoIs im Projekt übernommen. Zur Realisierung eines erfolgreichen Weltraumexperiments sind auch für IceCold vorbereitende Tests vor der Mission notwendig. Durch die besonderen Bedingungen, die zur Integration des Experiments auf der Bartolomeo Plattform auf der ISS, bei der kurzzeitige Temperaturpeaks von ca. 60°C erreicht werden können, wurden im Berichtszeitraum die Versuche zur entsprechenden Temperaturtoleranz mit allen verwendeten Bakterienstämmen gegenüber 60°C im getrockneten und flüssigen Zustand wiederholt und statistisch abgesichert. Da die Proben, im Gegensatz zu den bisherigen Plänen zu Beginn des Experiments im Weltraum in getrocknetem Zustand

befinden, wurden im Berichtszeitraum umfangreiche Experimente zum Wachstumsverhalten nach unterschiedlich langen Trocknungszeiten und bei verschiedenen Verdünnungen getestet.

- Experiment ICE_xPOSE

Aufgabenstellung: Im Rahmen des ICE_xPOSE-Experiments wird die kalte, trockene, abgelegene und ständig mit Eis bedeckte Umgebung außerhalb der Antarktis-Concordia-Station als astrobiologisches Testfeld genutzt, um die Überlebensfähigkeit ausgewählter Mikroorganismen in einer Umgebung extremer Kälte mit Temperaturschwankungen um den Gefrierpunkt und einer variablen UV-Strahlung zu untersuchen. Dazu wird eine Vielzahl von ruhenden, getrockneten Menschen- (ICE- μ HUMAN), Weltraumflug- (ICE-SPACE) und extrem-Umwelt (ICE-EXTREMO) assoziierten Mikroorganismen aus allen drei Domänen des Lebens in der geschlossenen Expositionseinrichtung EXPOSE, die bereits erfolgreich außerhalb der ISS für Weltraum-Expositionszeiten von bis zu 2 Jahren eingesetzt wurde, getestet. In ICE_xPOSE werden neben noch genau zu definierenden Mikroorganismen die mikrobiologischen Reaktionen gegenüber einzelnen und kombinierten Bedingungen der Antarktis, einschließlich Simulation astrobiologisch relevanter Marsatmosphäre, auch mit den Referenzorganismen *Deinococcus radiodurans*, *D. geothermalis* und *Bacillus subtilis* ergänzt. Nach Beendigung der Exposition wird ihre Überlebensfähigkeit nach verschiedenen Aspekten untersucht. Die gewonnenen Ergebnisse sollen Erkenntnisse liefern, wie Leben in der gefrorenen Landschaft auf dem Mars oder dem vereisten Mond Jupiters, Europa, entstanden sein und weiterbestehen könnte. ICE_xPOSE dient aber auch dazu Vorversuche für geplante Weltraumexperimente durchzuführen und ergänzende Erkenntnisse zu bereits durchgeführten zu gewinnen. Als Analogon für astrobiologische Studien bietet die antarktische Umgebung zusammen mit der Wiederverwendung einer im Weltraum bewährten Hardware-EXPOSE (Rabbow, 2017) eine wertvolle Gelegenheit, um i) frühere Weltraumexperimente zu validieren; ii) geplante Einsatzszenarien vorab zu testen; und iii) Informationen über neue Kandidatenorganismen mit Auswirkungen auf die Bereiche extremophile Biologie und Astrobiologie bereitzustellen. Die Ergebnisse könnten auch Informationen bei der Suche nach außerirdischem Leben liefern und Maßnahmen zum Planetenschutz definieren. Um die Überlebensfähigkeit zu dokumentieren und die Fähigkeit terrestrischer Mikroorganismen zu verstehen, die die analoge Oberflächenumgebung des Mars oder Jupiters eisigem Mond Europa überleben, ist es für die Suche nach Leben jenseits der Erde von größter Bedeutung. Gleichsam dient das Experiment dazu eine Kontamination durch Mikroorganismen bei Roboterexplorationen (Landermission) einzugrenzen (Cavicchioli, 2002; Horneck et al., 2010; Marion et al., 2003; Nicholson et al., 2009). Darüber hinaus ist die Untersuchung der Eigenschaften von Mikroorganismen in beengten Lebensräumen wie der Concordia-Station oder der Internationalen Raumstation (ISS), sowie ihrer Auswirkungen auf die menschliche Gesundheit, den Materialabbau und die Integrität der gesamten Station für den Erfolg von

Forschungs- und Erkundungsexpeditionen von entscheidender Bedeutung (Horneck et al., 2010). In dieser Hinsicht müssen resistente Mikroorganismen, die mit der Anwesenheit von Menschen oder der Umgebung im Weltraum (Flug) in Verbindung stehen, kontinuierlich überwacht, Sterilisationsverfahren bewertet und die Kontamination minimiert werden (Nicholson et al., 2009; Van Houdt et al., 2012). Die extrem rauen klimatischen Bedingungen wirken als extremer ökologischer Filter für alle eingewanderten und ansässigen Organismen und stellen das beste Analogon auf der Erde für die Suche nach außerirdischem Leben dar (Jakosky et al., 2003). Die Wiederverwendung einer im Weltraum erprobten Einrichtung für ein Überlebensexperiment in einer extrem kalten Umgebung, um ein besseres Verständnis der Anpassungsstrategien des Lebens an extreme Bedingungen zu erreichen. Diese Studien werden laufende, von der ESA gewählte und geplante Weltraumexperimente (MEXEM (ILSRA-2014-0025 Mars EXposed Extremophiles Mixture), IceCold (ILSRA-2014-0049) unterstützen und ergänzen, weil sie eine Reihe von Studien unter kontrollierten Bedingungen, Anwendung von Antarktis-Parametern in verschiedenen Kombinationen und Ergänzung durch simulierte außerirdische Parameter wie z. B. Niederdruckgas und atmosphärisches Marsgas ermöglichen. Sie werden auch dazu dienen, Phänomene, die nach der Expositionszeit in der Antarktis im Weltraum beobachtet wurden, genauer zu untersuchen und zu vergleichen. Einzelne Zellen, ruhende Formen, z. B. Bakterien-sporen, mikrobielle Gemeinschaften, Eukaryoten, Pilze und Viren, sind die Versuchsproben. Die erwarteten Ergebnisse werden dazu beitragen, die Wahrscheinlichkeit eines interplanetaren Transfers von Leben, die Überlebensfähigkeit resistenter terrestrischer Organismen im Weltraum, die Rolle der Ozonschicht beim Schutz unserer Biosphäre und die Erfordernisse des Planetenschutzes zu verstehen. Eine solche Kontamination mit irdischen Mikroorganismen gefährdet die wissenschaftliche Integrität von Weltraummissionen zur Lebenserfassung. Rückkontamination bedroht die Gesundheit und Sicherheit des Lebens auf der Erde. Für ICE_xPOSE wurde zu Projektbeginn 2020 von ESA noch kein Zeitpunkt für die Implementierung des Experiments außerhalb der Concordia Station genannt. Stattdessen wurde das Proposal umstrukturiert und der Schwerpunkt mehr auf humanassoziierte Themen ausgerichtet und im Rahmen des AO-2021-Concordia im Mai 2021 erneut eingereicht. Im Berichtszeitraum 2022 wurde das ICE_xPOSE-Proposal von der ESA leider abgelehnt, sodass es für diesen Schlussbericht keine Ergebnisse liefern konnte.

- Weltraumexperiment **LUX in Space**

Aufgabenstellung: Im Weltraumexperiment *LUX in Space*- Kinetik der enzymatischen Reparaturreaktionen nach Bestrahlung in der Schwerelosigkeit mit Hilfe eines Biolumineszenz basierten Genotoxizitätsassays“ der ILSRA-2014-0026 (Heritage Tripl Lux) werden die biologischen Effekte von Strahlung unter Mikrogravitation mit einem einfachen, wohldefinierten Bakterienmodellsystem untersucht. Die Ergebnisse werden unentbehrlich sein für 1) die

Bewertung der Stabilität und Integrität von Bakterien in Raumfahrzeugen mit Relevanz für bioregenerative Lebenserhaltungssysteme, bei denen Bakterien eine wichtige Rolle spielen, 2) die Entwicklung von Bakterienbiosensoren für die In-situ-Weltraumfahrzeug Milieu-Untersuchung und 3) das Bioburden-Controlling in bemannten Weltraumfahrzeugen, wo Mikroorganismen Biokorrosion verursachen können und sie gesundheitliche Risiken für die Astronauten, die in solchen beschränkten Lebensräumen leben, darstellen können. Darüber hinaus werden die Ergebnisse die Interpretation der Reaktion von komplexeren multizellulären Organismen auf Weltraumbedingungen unterstützen, bei denen andere Effekte, die sich aus zusätzlichen enzymatischen Systemen und regulatorischen Wegen sowie aus Zell-zu-Zell-Interaktionen ergeben, zur Gesamtreaktion beitragen. Das Experiment wird mit dem SOS-Lux-Assay durchgeführt. *LUX-in-Space* wird das erste Experiment im Weltraum sein, bei dem der gesamte Weg von der Strahlungsschadensinduktion bis zur enzymatischen Schädigungserkennung zur Reparaturinduktion durchgeführt wird und die Reparaturkinetik unter kontinuierlichen Mikrogravitationsbedingungen analysiert wird. Die Ergebnisse werden mit denen aus dem identischen Experiment verglichen, das im Weltraum unter 1g-Bedingungen durchgeführt wurde, um die Auswirkungen der Strahlungsexposition in Schwerelosigkeit von denen zu trennen, die sich möglicherweise aus der gesamten Ereigniskette aus Proben-transport, Lieferung, Anpassung, Speicherung und Start, bis zur eigentlichen Experimentausführung im Weltraum ergeben. Zusätzlich wird ein paralleles Boden-Referenz Experiment durchgeführt.

Im Berichtszeitraum wurden weitere Experimente zur Durchführung des Flugexperiments (Hardware-tests mit dem bereitgestellten Science Review Modell), sowie Anpassung des SOS-Lux-Tests durchgeführt.

I.2. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

Die aufgeführten Weltraumexperimente des BMWi-geförderten Vorhabens Stressresistenz von Mikroorganismen im Weltraum und in der Antarktis, als terrestrisches Analog Kurztitel: 'SPICY' wurden in Kooperationen mit internationalen Wissenschaftlerteams durchgeführt. Die Projektleiterin verfügt über umfassende Kenntnisse zur Vorbereitung und Auswertung von Weltraumexperimenten und mit den ausgewählten Testorganismen. Die missionssimulierenden Vakuum-, Marsgas- und die entsprechenden Bestrahlungsexperimente wurden in den Planeten- und Weltraumsimulationsanlagen und an den Röntgenanlagen am Deutschen Zentrum für Luft- und Raumfahrt des DLR Köln durchgeführt.

I.3. Planung und Ablauf des Vorhabens

Das Vorhaben betrug eine Projektlaufzeit von 36 Monaten (01.08.2020-31.07.2023). Die Planung und der Ablauf der einzelnen Teilprojekte gliederten sich in die im Folgenden genannten Arbeitspakete:

MEXEM

- Vorbereitung des Weltraumexperiments durch Auswahl missionsgeeigneter Mikroorganismen aus den oben genannten extremen Standorten
- Durchführung verschiedener Stresstest, wie Trocknungsversuche unter oxidischen und anoxischen Bedingungen mit oder ohne Zusatz verschiedener Schutzmaterialien zu verschiedenen Zeitpunkten der Bakterienanzucht
- Bestrahlungsversuche mit UVC_{254nm} und Röntgenstrahlen

IceCold

- Missionsvorbereitende Test - Temperaturpeaks und Trocknung
- Biokompatibilitätstests mit allen Stämmen und allen mit den Kulturen in Verbindung kommenden Materialien
- Aufnahme von Sporen des „Weltraumveteran“ *Bacillus subtilis* als strahlungsresistenter Referenzorganismus für höhere Strahlenbelastungen in Bezug auf das Überleben bei IceCold
- Weiterbearbeitung des halophilen Modell-Archaeon *Halobacterium salinarum* NRC1 durch Wegfall eines Cols im Projekt

LUX in Space

- Abstimmung der Experimentparameter, Probenart und –exposition, „up und download“ Bedingungen für die Definitionsphase des ESR für LUX in Space mit dem LUX in Space Team.
- Hardware Tests mit dem bereitgestellten Science Review Modell zur Durchführung des Flugexperiments (Reinigung, Sauerstoffversorgung, optimale Befüllungsstrategien) und zur abschließenden Anpassung der Parameter des SOS-Lux-Tests.

I.4. Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

Extreme Umgebungen haben immer extreme wissenschaftliche Neugier geweckt. Sie können von beliebiger Art sein, wie extreme Temperatur, Druck, Strahlung, Austrocknung, Salinität, pH-Wert oder das Redoxpotential (Rothschild und Mancinelli 2001). Physikalische und chemische Barrieren für Leben, die zuvor unüberwindbar schienen, werden heute als Nischen angesehen,

die sogenannte „Extremophile“ beherbergen können, die verschiedene Stressanpassungsmechanismen besitzen, die es ihnen ermöglichen, mehrere physische und chemische Barrieren für das Überleben zu überwinden. Auf der anderen Seite gibt es immer wieder Berichte über flüssiges Wasser, das an anderer Stelle im Sonnensystem existiert. In Verbindung mit der Tatsache, dass dort, wo Wasser auf der Erde ist, Leben ist, wird vermutet, dass es möglicherweise auch auf anderen Planeten und Monden im Universum Lebensformen gibt oder gab. Antworten auf diese Fragen liefern die Aktivitäten auf dem Gebiet der Astrobiologie, die versuchen, die Prozesse, die zur Entstehung, Evolution und Ausbreitung des Lebens auf der Erde oder anderswo im Universum führen, besser zu verstehen (Horneck, 1995). Da der Weltraum auch als eine weitere extreme Umwelt mit einer einzigartigen Mischung von Stressfaktoren betrachtet werden kann, wird die Auswirkung dieser Parameter auf die Überlebensfähigkeit an resistenten Lebensformen der Erde, sogenannten Extremophilen, getestet. So können in der astrobiologischen Forschung neue Überlebensdaten von Mikroorganismen unter diesen Bedingungen gewonnen werden. Darüber hinaus hat die Theorie einer möglichen Übertragung von Leben zwischen Himmelskörpern und das Ausstoßen von Meteoriten in den Weltraum die Wahrscheinlichkeit eines interplanetaren Transfers von Mikroorganismen innerhalb der Meteoritenhypothese, der Lithopanspermie, gestützt (Nicholson, 2009; Horneck, 2010). Diese Erkenntnisse legen nahe, dass das Leben häufiger sein könnte als bisher angenommen.

MEXEM

Die Beurteilung der Bewohnbarkeit des Mars und die Entdeckung von Leben, wenn es jemals dort war, hängt davon ab, ob die kombinierten Umweltbelastungen auf dem Mars mit dem Leben vereinbar sind und ob eine Aufzeichnung dieses Lebens jemals erkannt werden könnte (Westall et al., 2013). Dies einzuschätzen wird zurzeit durch einen Mangel an Kenntnis darüber, wie die kombinierte Wirkung unterschiedlicher Umweltbelastungen das Überleben und das Wachstum von Mikroorganismen beeinflusst. Insbesondere wurden viele Kombinationen von Stress, wie z. B. hohe Strahlungsbedingungen in Verbindung mit hohem Salz, niedriger Temperatur und Austrocknung, die für den Mars relevant sind, nicht untersucht. Besonders fehlen experimentelle Untersuchungen darüber, wie anaerobe Mikroorganismen auf Stress reagieren (im Gegensatz zu aeroben Organismen, die vergleichsweise gut untersucht wurden) und über geologische Zeiträume erhalten bleiben können. Das schränkt bisher unsere Fähigkeit ein, den Mars als Lebensstandort zu beurteilen. Im Experiment MEXEM werden erstmals Mikroorganismen aus ausgewählten Gebieten auf der Erde, deren Umgebungsbedingungen Mars-analog sind. Allen diesen Standorten ist gemeinsam der Mangel an Sauerstoff und die geringe Nährstoffverfügbarkeit, während die Temperatur, die Wasserverfügbarkeit, der Salzgehalt und die Säure zwischen den einzelnen Standorten von moderaten bis zu extremen Werten reicht und so eine spezifische Anpassung der darin lebenden Organismen erfordern. Aus diesen Mars-Analogorten

werden mehrere Mikroorganismen angereichert und isoliert. Die Untersuchungen konzentrieren sich auf anaerobe und mikroaerophile Organismen, da die Marsatmosphäre nur eine sehr geringe Sauerstoffkonzentration enthält (0,13% O₂, Mahaffy et al., 2013). Zum ersten Mal werden die Toleranz und der Widerstand dieser Isolate gegen Mars relevante Stressfaktoren, z.B. Austrocknung, Niederdruck, Mars-Atmosphäre, UV- und ionisierende Strahlung, Nährstoffarmut und hohe Salzkonzentrationen untersucht. Darüber hinaus werden ausgewählte Isolate künstlich versteinert, Mars- relevanten Stressfaktoren ausgesetzt und als Testobjekte für Biosignatur-Nachweismethoden verwendet. In der Literatur gibt es nur wenige Studien an anaeroben Mikroorganismen die unter Mars-Analogumgebungen getestet wurden (Bauermeister et al., 2014;). Bestehende Studien konzentrierten sich in der Regel auf Stämme aus Stammsammlungen. Bei MEXEM werden erstmalig anaerobe, extremotolerante, mikrobielle Isolate, d.h. Bakterien, Archaeen, Ciliaten und Viren, untersucht werden. Der direkte Vergleich der Überlebensstrategien von phylogenetisch unterschiedlichen mikrobiellen Spezies wird auch neue Einblicke in die aktuellen Fragen zu Planetenschutzmaßnahmen geben und die Entwicklung neuer „Life Detection“ Technologien für die Raumfahrt unterstützen. Wenn wir wissen, welche terrestrischen Mikroorganismen die Marsbedingungen überleben oder sogar unter diesen Bedingungen leben können, können wir unsere Anstrengungen weiter verbessern, dass diese Organismen während einer Mission dahin keine anderen Planeten, wie z.B. den Mars, verunreinigen können. Die Untersuchung der Erhaltung von künstlich versteinerten Mikroorganismen ermöglicht außerdem die gezielte Suche nach Biomarkern. Zum ersten Mal wird die Toleranz und Resistenz dieser Isolate gegen Mars-relevante Stressfaktoren, z.B. Austrocknung, niedriger Druck, Marsatmosphäre, UV- und ionisierende Strahlung, Nährstoffmangel und hohe Salzkonzentrationen untersucht. Bestehende Studien haben sich im Allgemeinen eher auf Stämme aus Kultursammlungen, als auf anaerobe und fakultativ anaerobe Organismen, direkt isoliert aus anaeroben analogen Standorten. Darüber hinaus wurden verschiedene extremophile Mikroorganismen direkt von der Internationalen Raumstation im Rahmen eines anderen Weltraumexperiments untersucht. Diese stammen nicht aus natürlichen Umgebungen, sondern sind in den extremen Bedingungen der Internationalen Raumstation gewachsen oder haben sich an diese angepasst, um zu überleben. Diese Form der „weiterentwickelten“ Anpassung an die Weltraumbedingungen kann diesen Mikroorganismen bei einem "Wiederflug" -Prozess und der anschließenden Exposition gegenüber verschiedenen raumfahrtrelevanten Bedingungen einen Vorteil bringen. Um diese Anpassungsprozesse zu verstehen, wird eine Auswahl von anaeroben Isolaten der genannten extremen Umweltstandorte der Erde und die ISS Isolate untersucht. Dies gibt einen Einblick, ob das Risiko der „Kontamination“ einer außerirdischen Umwelt mit terrestrische Umweltmikroorganismen höher ist, als die mit Mikroorganismen einer typischen Raumschiff-Mikroben Gemeinschaft oder nicht. Die Ergebnisse von MEXEM werden zu unserem Verständnis der Lebensfähigkeit in extremen

Umgebungen der Erde und auf anderen Planeten und Monden unseres Sonnensystems beitragen.

IceCold

Jupiters Mond Europa und andere ähnliche eisige Monde gehören zu den wenigen möglichen außerirdischen bewohnbaren Planeten in unserem Sonnensystem (Greenberg et al., 1999; Pappalardo et al., 1999). Der Fokus auf Jupiters Europa als möglicherweise bewohnbaren Mond hat sich erneut verstärkt, als im November und Dezember 2012 das Hubble-Weltraumteleskop (HST) große Flächen mit Wasser- dampf zeigte, die vom Eismond an seinem Südpol erzeugt wurden, ähnlich wie bei Saturn's Enceladus. Man kann deshalb davon ausgehen, dass für einen begrenzten Zeitraum Organismen überleben und möglicherweise im Untergrund auf Europa wachsen können (Greenberg et al., 2002). Um diese Hypothese zu testen, wird im Experiment IceCold vorgeschlagen, ausgewählte kryohalophile Organismen ((*Planococcus halocryophilus* Or1 (Mykytczuk et al., 2012; Mykytczuk et al., 2013), *Halorubrum lacusprofundi* (Bowman et al., 2000) und *Rhodoturula* sp.) und entsprechende Referenzorganismen (*Deinococcus geothermalis*, *Deinococcus radiodurans* (Zimmermann et al., 1994; White et al., 1999), beide besonders UV- resistent und der Weltraumveteran *Bacillus subtilis* (Horneck et al., 1994)) einzelnen und kombinierten Umgebungsbedingungen, die für bewohnbare Oberflächen auf Europa erwartet werden, in LEO (Low Earth Orbit) zu exponieren. Dazu gehören Temperaturschwankungen durch den Gefrierpunkt, verschiedene Salzgehalte, volles Spektrum extraterrestrischer UV-Strahlung und eine komplexe ionisierende Strahlungsumgebung. Die Cube Sat Hardware wird dazu außerhalb der ISS angebracht und das Überleben und Wachstum der unterschiedlichen Mikroorganismen in situ, gleichzeitig und automatisch mit Hilfe von photometrischen Messungen getestet. Diese werden getrocknet zur ISS geflogen und im Weltraum mit Kulturmedium versehen. Von nun an besteht jede Probe aus einer winzigen flüssigen Kultur, in der aktive Mikroorganismen vorhanden sind. Während des Orbitalfluges sollen diese Kulturen durch Vollspektrum-Sonnen-UV bestrahlt werden, wobei die Temperaturen zwischen -25 und +30 ° C (insbesondere sind die niedrigen Temperaturen relevant), sowie der kosmischen Strahlung und der Mikrogravitation ausgesetzt. Das Wachstum jeder Probe wird durch periodische Messungen der optischen Dichte (OD) überwacht. Die Entwicklung der optischen Dichte pro Probe und den dazugehörigen Verlauf der physikalischen Parameter (UV, Temperatur, ionisierende Strahlung) wird an Bord erfasst und auf den Boden übertragen. Ein Referenzsatz von Kulturen unterliegt den gleichen Umgebungsbedingungen im Weltraum, bleibt aber gegen Sonnenlicht geschützt. Die OD dieser Dunkelkulturen soll auch periodisch gemessen werden. Um die Oberflächenbedingungen auf Europa genau nachzuahmen, wird die natürliche Bestrahlung durch kosmische Partikel in LEO durch winzige β -Quellen ergänzt, die den Testproben beigelegt sind. Eine optimale Simulation der Bedingungen auf Europa könnte erreicht

werden, indem die Proben ca. 0,13 g ausgesetzt werden, was der Schwerkraft an der Oberfläche von Europa entspräche. Am Ende der Expositionszeit werden die Organismen fixiert und zur Auswertung zur Erde zurückgebracht. Das Experiment soll nach der Inbetriebnahme automatisch laufen, aber mit der Möglichkeit, die Sonnenbestrahlung jeder einzelnen Kultur durch Telemetrie zu beginnen oder zu beenden. Ein Referenz- Experiment (MGR, voraussichtlich in den Planeten- und Raumsimulationsanlagen des DLR in Köln) identisch mit dem Flugversuch mit Ausnahme der kosmischen Strahlung, UV-C <200nm und der Mikrogravitation, wird auf dem Boden durchgeführt. Zur Realisierung eines erfolgreichen Weltraumexperiments sind auch für IceCold vorbereitende Tests vor der Mission notwendig. Zu diesem Zweck wurde für alle beteiligten Organismensysteme ein Probenplan für die von allen am Experiment beteiligten Partner durchzuführenden Vorexperimente ausgearbeitet (siehe Zwischenbericht 2020). Als Erweiterung der Aufgaben im Projekt SPICY wurde das halophile Modell-Archaeon *Halobacterium salinarum* NRC1 durch Wegfall eines Cols im Projekt übernommen.

ICE_xPOSE

ICE_xPOSE erforscht die Umweltgrenzen des Lebens. die Suche nach bewohnbaren Orten außerhalb der Erde; die molekularen Mechanismen der Anpassung an extreme Umgebungen; und dient als ein Testfeld für bevorstehende Weltraum- (Flug-) Experimente. Als Analogon für astrobiologische Studien bietet die antarktische Umgebung zusammen mit der Wiederverwendung einer im Weltraum bewährten Hardware-EXPOSE (Rabbow, 2017) eine wertvolle Gelegenheit, um i) frühere Weltraumexperimente zu validieren; ii) geplante Einsatzszenarien vorab zu testen; und iii) Informationen über neue Kandidatenorganismen mit Auswirkungen auf die Bereiche extremophile Biologie und Astrobiologie bereitzustellen. Die Ergebnisse könnten auch Informationen bei der Suche nach außerirdischem Leben liefern und Maßnahmen zum Planetenschutz definieren (Cavicchioli, 2002; Gilichinsky et al., 2007). Um die Überlebensfähigkeit zu dokumentieren und die Fähigkeit terrestrischer Mikroorganismen zu verstehen, die die analoge Oberflächenumgebung des Mars oder Jupiters eisigem Mond Europa überleben, ist es für die Suche nach Leben jenseits der Erde von größter Bedeutung. Gleichsam dient das Experiment dazu eine Kontamination durch terrestrische Mikroorganismen bei Roboterexplorationen (Landermission) einzugrenzen (Cavicchioli, 2002; Horneck et al., 2010; Marion et al., 2003; Nicholson et al., 2009). Darüber hinaus ist die Untersuchung der Eigenschaften von Mikroorganismen in beengten Lebensräumen wie der Concordia-Station oder der Internationalen Raumstation (ISS), sowie ihrer Auswirkungen auf die menschliche Gesundheit, den Materialabbau und die Integrität der gesamten Station für den Erfolg von Forschungs- und Erkundungsexpeditionen von entscheidender Bedeutung (Horneck et al., 2010). In dieser Hinsicht müssen resistente Mikroorganismen, die mit der Anwesenheit von Menschen oder der Umgebung im Weltraum (Flug) in Verbindung stehen, kontinuierlich überwacht,

Sterilisationsverfahren bewertet und die Kontamination minimiert werden (Nicholson et al., 2009; Van Houdt et al., 2012). Die extrem rauen klimatischen Bedingungen wirken als schwerwiegender ökologischer Filter für alle eingewanderten und ansässigen Organismen und stellen das beste Analogon auf der Erde für die Suche nach außerirdischem Leben dar (Jakosky et al., 2003). Das übergeordnete Ziel des vorgeschlagenen Projekts ist die Wiederverwendung einer im Weltraum erprobten Einrichtung für ein Überlebens-experiment in einer extrem kalten Umgebung, um ein besseres Verständnis der Anpassungsstrategien des Lebens an extreme Bedingungen zu erreichen. Diese Studien werden laufende, von der ESA gewählte und geplante Weltraumexperimente (MEXEM (ILSRA-2014-0025 Mars EXposed Extremophiles Mixture), IceCold (ILSRA-2014-0049) unterstützen und ergänzen, weil sie eine Reihe von Studien unter kontrollierten Bedingungen, Anwendung von Antarktis-Parametern in verschiedenen Kombinationen und Ergänzung durch simulierte außerirdische Parameter wie z. B. Niederdruckgas und atmosphärisches Marsgas ermöglichen. Sie werden auch dazu dienen, Phänomene, die nach der Expositionszeit in der Antarktis im Weltraum beobachtet wurden, genauer zu untersuchen und zu vergleichen. Einzelne Zellen, ruhende Formen, z. B. Bakteriensporen, mikrobielle Gemeinschaften, Eukaryoten, Pilze und Viren, sind die Versuchsproben. Die erwarteten Ergebnisse werden dazu beitragen, die Wahrscheinlichkeit eines interplanetaren Transfers von Leben, die Überlebensfähigkeit resistenter terrestrischer Organismen im Weltraum, die Rolle der Ozonschicht beim Schutz unserer Biosphäre und die Erfordernisse des Planetenschutzes zu verstehen. Eine solche Kontamination mit irdischen Mikroorganismen gefährdet die wissenschaftliche Integrität von Weltraummissionen zur Lebenserfassung. Rückkontamination bedroht die Gesundheit und Sicherheit des Lebens auf der Erde.

LUX-in-Space

Für die zunehmende Anzahl von Astronauten die entweder auf der Internationalen Raumstation (ISS) oder für längere Zeit im All zum Mars oder zum Mond reisen ist es von größter Wichtigkeit, notwendige Grundkenntnisse über die Risiken für ihre Gesundheit und ihre Arbeit an der ISS und bei außerirdischen Aktivitäten (EVA) zur Verfügung zu stellen. Es ist das Ziel von LUX in Space eine Einschätzung des Gesundheitsrisikos durch die Strahlenexposition von Astronauten im Weltraum zu ermöglichen. Das Projekt wird (1) ein umfassendes Wissen über die biologische Wirkung der Weltraumstrahlung und die enzymatische Reparatur von DNA-Schäden liefern, (2) zelluläre Mechanismen der synergistischen Wechselwirkung von Mikrogravitation und extra-terrestrischer Strahlung aufdecken und (3) das ISS-Milieu mit hochspezifischen Biosensoren untersuchen. Dazu wird der Bakterien-Biosensor SOS-LUX-Toxizitätstest verwendet (Rabbow et al., 2003). Der SOS-LUX-Test umfasst genetisch veränderte Bakterien, die mit dem pBR322-abgeleiteten Plasmid pPLS-1 transformiert wurden. Dieses Plasmid trägt das promoterlose Lux-

Operon von *Photobacterium leiognathi* als Reporter-Element unter der Kontrolle des DNA-schadenabhängigen SOS-Promotors von ColD als Sensorelement. Dieses System reagiert auf Strahlung, die DNA-Schäden mit einer dosisabhängigen messbaren Emission von Biolumineszenz der transformierten Bakterien induzieren. Die ständig steigende Nachfrage nach einfachen und schnellen Test von Umwelt- (Luft, Wasser) und industriellen Proben (Abwasser, pharmazeutische Produkte, Chemikalien) auf eventuelle genotoxische Eigenschaften führte zu der Entwicklung von bakteriellen Genotoxizitätstests. Diese Tests wie der SOS- Chromotest (Quillardet et al., 1993). oder der UMU-Test (Yasunaga et al., 2004) werden standardmäßig zur Untersuchung von Agenzien mit potentiell genotoxischem Potential eingesetzt. LUX in Space ist ein Projekt in dem über die Induktion des bakteriellen SOS- Systems der Einfluss von Weltraumbedingungen z.B. Schwerelosigkeit, auf die DNA-schadens-induzierte Transkription in Prokaryonten gemessen wird. Induzierte DNA-Schäden führen zu einer Expression der lux-Gene und damit zu einer messbaren Lumineszenz der Bakterienkultur. Auf der Internationalen Raumstation werden die DNA-Schäden durch eine ausgewählte Strahlenquelle induziert und ihre Wirkung unter Schwerelosigkeit untersucht. Lux-in-Space ist von der ESA zum Flug im BIOLAB auf der ISS ausgewählt.

I.5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Alle im Rahmen dieses Projektes erwähnten Experimente wurden in Kooperation mit dem Deutschen Zentrum für Luft- und Raumfahrt in Köln durchgeführt. Weitere Zusammenarbeit und Wissensaustausch bestand mit den Projektpartnern der jeweiligen Teilprojekte von SPICY und den an den anderen Experimenten der durchgeführten und angestrebten Missionen beteiligten internationalen Wissenschaftlerteams. Außerdem fanden gemeinsame Präsentationen (Poster, Vorträge) der Forschungsergebnisse auf nationalen Veranstaltungen statt (siehe II.6.2)

II.1. Verwendung der Zuwendung und des erzielten Ergebnisses im Einzelfall mit Gegenüberstellung der vorgegebenen Ziele

Die in I.1 aufgezählten Ziele konnten im Rahmen dieses Projekts größtenteils erreicht werden. Im Folgenden werden die erzielten Ergebnisse im Verhältnis zu den vorgegebenen Zielen detailliert dargestellt.

II.1.1. MEXEM

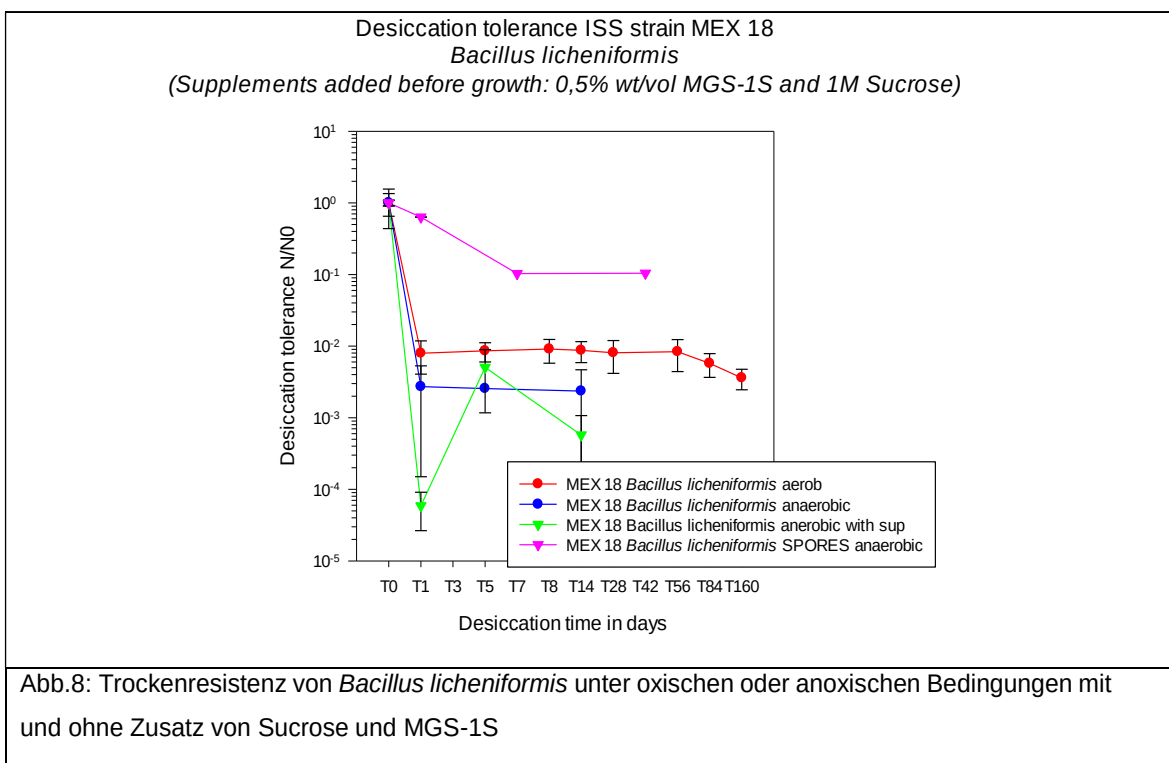
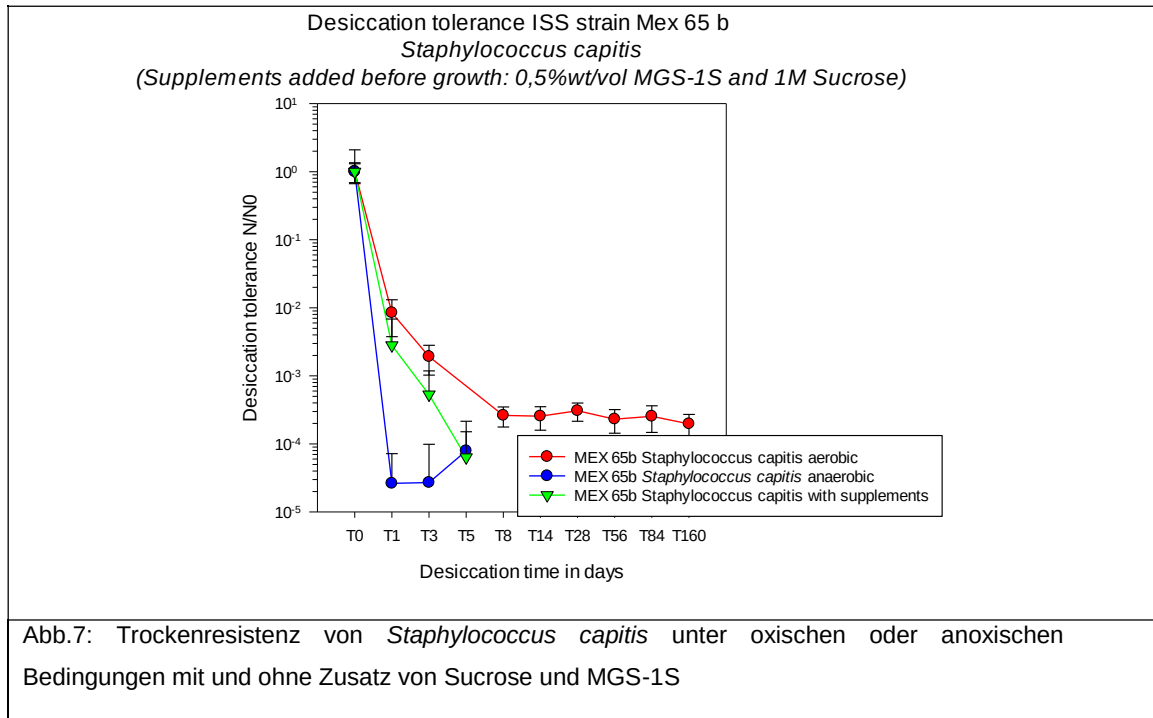
Vorexperimente mit isolierten Mikroorganismen unterschiedlicher Standorte zur Ermittlung der Toleranz gegenüber verschiedenen Missionsparametern einzeln und in Kombination unter oxischen und anoxischen Bedingungen zur Vorbereitung der MEXEM Mission

Erreichte Ziele:

- Ermittlung der Toleranz gegenüber verschiedenen Missionsparametern einzeln und in Kombination unter oxidischen und anoxischen Bedingungen mit isolierten Mikroorganismen unterschiedlicher Standorte (hier mit von der ISS isolierten Mikroorganismen).
- Inaktivierungsversuche mit UVC_{254nm} in Flüssigkultur oder auf Quarzplättchen getrocknet
- Trocknungsversuche auf Quarzplättchen mit ohne Schutzwirkung von Naturmaterialien des Isolationsorts (Ziel: min. 6 Monate trockentolerant, mit einer nachweisbaren Inaktivierung)

Im Verlauf des Projektes wurden vor allem Versuche mit moderneren Mars Regolith Standards mit den MEXEM Organismen in diesem Fall den ISS Stämmen (Mora, 2019) geplant. Die von der ISS isolierten und zur Verfügung gestellten Mikroorganismen zeigten die bereits im letzten Schlussbericht gezeigten Charakteristika. Im Berichtszeitraum 2020-2023 wurden Vorexperimente der MEXEM Mission mit den beschriebenen ISS Mikroorganismen mit moderneren Mars Regolith Standards durchgeführt. Grundlage hierfür bilden die Entwicklung und Beschreibung eines offenen Standards für ein Mars-Regolith Simulans (Mars Global Simulant, MGS-1) mit hoher Wiedergabetreue in Bezug auf mineralische, chemische, flüchtige und spektrale Eigenschaften im Vergleich zu einem geeigneten Referenzmaterial, in diesem Fall dem windkorrodierten Boden Rocknest des Gale Kraters auf dem Mars. Das Rocknest Material wurde vom Curiosity-Rover untersucht, ist der bislang am besten charakterisierteste Marsboden (Bish et al., 2013; Blake et al., 2013; Leshin et al., 2013; Minitti et al., 2013; Archer et al. 2014; Sutter et al., 2017; Achilles et al., 2017; Cannon et al., 2019, for regolith composition). Der MGS-1-Standard ist früheren Mars-Simulanzien überlegen und erfasst präzise die Fortschritte beim Verständnis von realem Mars-Regolith in den 10 Jahren seit der Beschreibung von MMS (Peters et al., 2008) und den 20 Jahren seit der Veröffentlichung von JSC Mars-1 (Allen et al., 1998), wo quantitative mineralogische Analysen nicht verfügbar sind oder außerhalb der NASA nicht mehr verfügbar sind. Geringe Mengen an Simulantien werden vom Exolith Lab des Zentrums für Mond- und Asteroid Oberflächen-forschung (CLASS) produziert, um es an andere Forscher zu verteilen. Jeweils 1 kg MGS-1 Mars Global Simulant, MGS-1S Sulfate ISRU und MGS-1C Clay ISRU wurden für die Trocknungs- versuche mit den ausgewählten MEXEM Organismen beim Department of Physics der University of Central Florida geordert. Im Einzelnen wurden mit den ISS-Stämmen Trocknungsversuche auf Quarzplättchen mit und ohne Schutzwirkung durchgeführt. Als Beispiel ist in Abbildungen 7 und 8 die Trockentoleranz der ausgewählten Organismen dargestellt. Die Abbildungen zeigen die Trockenresistenzen der beiden ISS Stämme in Abhängigkeit des Milieus: oxidisch oder anoxisch getrocknet und mit oder ohne Zusatz von 0,5 % wt/vol MGS-S und 1MSucose. Neben den Versuchen zur Erhöhung der Trockentoleranz waren weiterhin Bestrahlungsversuche mit UVC_{254nm}, polychromatischer UV- und ionisierender

Strahlung in Flüssigkultur oder auf Quartzplättchen getrocknet geplant. Im Berichtszeitraum 2021 bis zum Projektende wurden jedoch im Rahmen des SPICY Projektes, bedingt durch die Dringlichkeit anderer Teilprojekte (IceCold und Lux in Space) keine weiteren Vorexperimente der MEXEM Mission mit von der ISS isolierten Mikroorganismen durchgeführt.



II.1.2. *IceCold*

Fertigstellung und Ergänzung der Labortests zur Toleranz der Mikroorganismen gegenüber verschiedenen Missionsparametern einzeln und in Kombination mit *den IceCold* Missionskandidaten, missionsvorbereitende Tests am BB und SRM, Durchführung und Auswertung des Flugexperiments und der Bodensimulation

Kinetik Lagertemperatur 4°C, -20°C, -80°C - mit allen Mikroorganismen

Wachstumskurve niedrig Temperatur und Oszillation um den Gefrierpunkt, Korrelation OD_{600nm} zu OD_{495nm}, als Laborkontrolle und in BB Modell– mit allen Mikroorganismen

Inaktivierungsversuche mit polychromatischer UV_{200-400nm} Strahlung in Flüssigkultur oder auf Quartzplättchen getrocknet mittels OD_{600nm} Messung und Lebendzellzahlbestimmung in Medium bei Wachstumstemperatur

Test des BB und Bestimmung der Parameter für die Flug- und Bodenprobenvorbereitung

Erstellung von Referenzdaten und Kalibrierungskurven mit IceCold EXPO HW sobald verfügbar

Bereitstellung der Proben für das Flugexperiment und das flugbegleitende Bodenexperiment

Begleitung und Unterstützung der Durchführung des Flugexperiments

Durchführung des Bodenexperiments

Entsprechend der Planung zu Beginn des SPICY Projektes (Ref. ESA-HRE-RS-LE-0160 December 2019) sollte IceCold in 2023 im Orbit sein. Mit einer erwarteten Missionsdauer von mindestens 6 Monaten lagen einige geplanten Aktivitäten nach dem hier beschriebenen Projektzeitraum voraussichtlich im 2. Halbjahr 2023 und 2024:

Auswertung der Proben des Flugexperiments nach Rückkehr

Auswertung der Proben des Bodenexperiments

Veröffentlichungen der Ergebnisse

Durch die besonderen Bedingungen, die zur Integration des Experiments auf der Bartolomeo Plattform zur Zeit voraussichtlich 2025 auf der ISS, bei der kurzzeitige Temperaturpeaks von ca. 60°C erreicht werden können, wurden im Verlauf des Projektes SPICY die Versuche zur entsprechenden Temperaturtoleranz mit allen verwendeten Bakterienstämmen gegenüber 60°C im getrockneten und flüssigen Zustand durch Bestimmung der Koloniebildungsfähigkeit auf Agarplatten wiederholt und statistisch abgesichert. Es zeigte sich, dass die verwendeten Stämme generell im flüssigen Zustand empfindlicher reagieren, als im getrockneten Zustand.

Ab dem Berichtszeitraum 2021 wurde eine Langzeit Trocknungstest mit anschließendem Wachstum für zwei Teststämme, der IceCold Mission durchgeführt und der Biokompatibilitätstest mit den unterschiedlichen H/W Materialien gestartet.

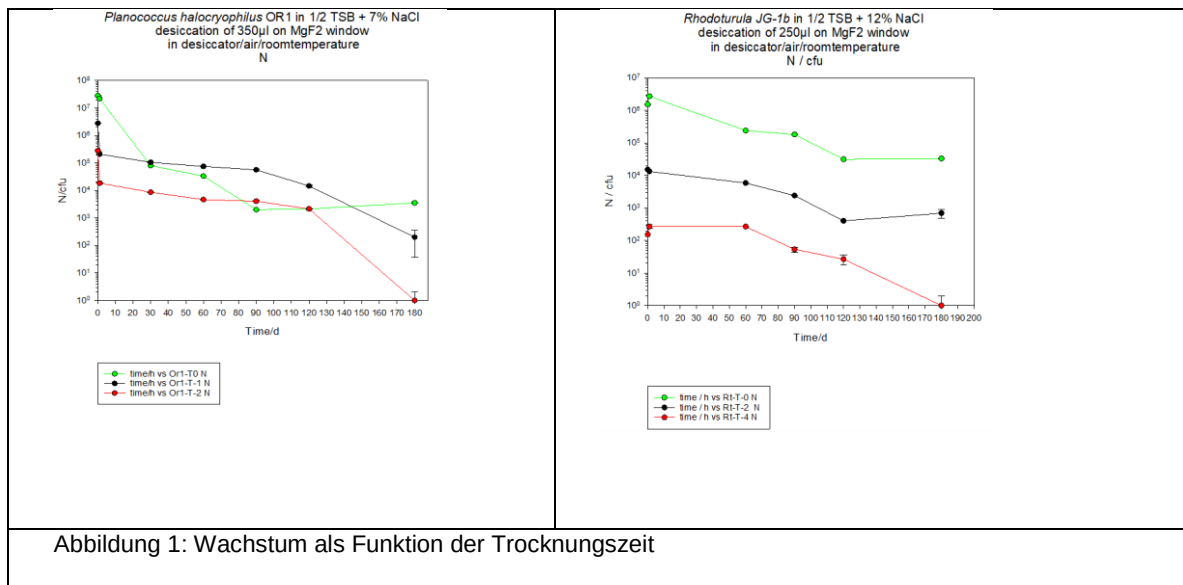
Trocken-upload Test

Das IceCold -Upload-Szenario von Probenupload in flüssiger Form, d.h. Kulturen in Kulturmedien bei einer Temperatur $< 6\text{ }^{\circ}\text{C}$, wurde zu Probenupload in trockener Form geändert, was höhere Temperaturen während des Transports vor dem Flug, bei der Integration, zum Startzeitpunkt und Transfer auf die Outsight-Exposure-Plattform von Bartolomeo auf der ISS mit sich bringt. Das Design der Hardware erfordert, dass die Proben auf den MgF_2 -Fenstern der bestrahlten "UV exponierten" Kulturkammern (CC) aufgetrocknet werden. Während der Überführung der Exobio-Anlage auf die Außenseite der ISS nach Bartolomeo, kann die Temperatur unter den Gefrierpunkt fallen. Für salzreiche und damit hydrophobe Proben, wie die meisten IceCold-Mikroorganismen, die in ihrem Medium auf das MgF_2 -Fenster getrocknet werden, besteht ein hohes Risiko, dass Feuchtigkeit in der Gasphase bei niedrigeren Temperaturen auf die Proben kondensiert. Dies würde zu einer Teillösung des Salzmediums führen. Eine wenn auch nur kurz andauernde Veränderung des getrockneten zu einer Sole Form der Mikroorganismenumgebung können eine Erhöhung ihrer Stoffwechselaktivität auslösen. Diese stressbedingten Veränderungen führen oft zu einer Inaktivierung der Organismen. Die Gasphasenumgebung sollte daher so trocken wie möglich sein, um jegliche Wasserkondensation auf die Proben zu vermeiden. Alle IceCold-Organismen sind aerob. Während des aktiven Stoffwechsels und der Proliferation Phase benötigen sie Sauerstoff. Weil die Gasphase während der Mission nicht ausgetauscht werden kann ist die einfachste Lösung für diese Anforderungen alle IceCold-Proben in trockener Luft hochzuladen.

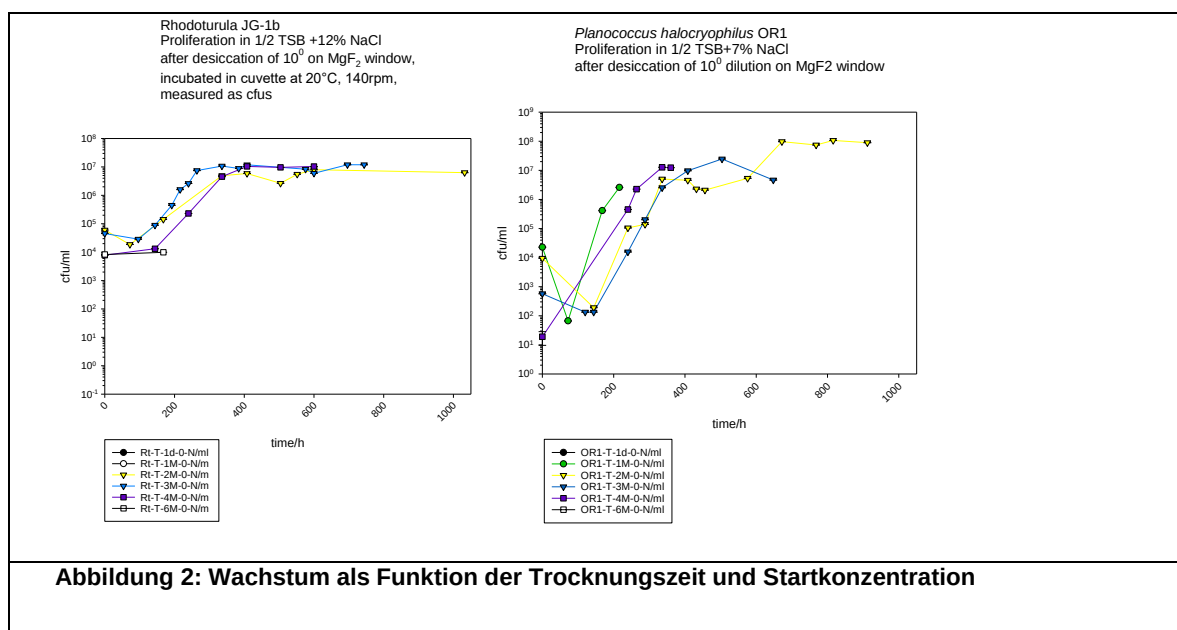
Trocken-upload mit anschließendem Wachstum

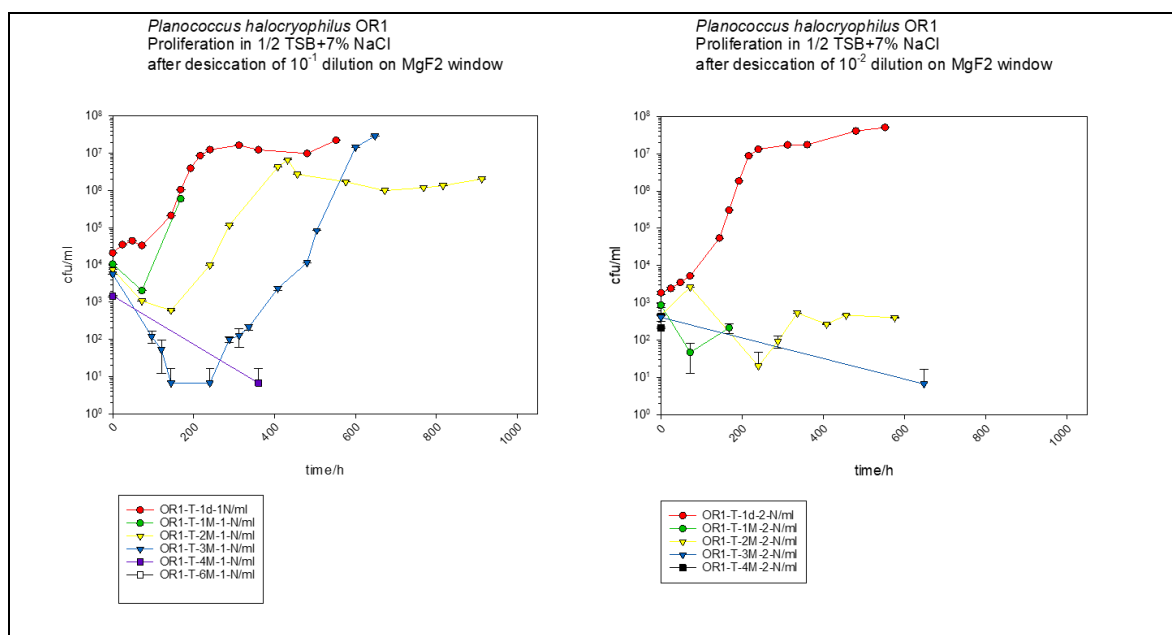
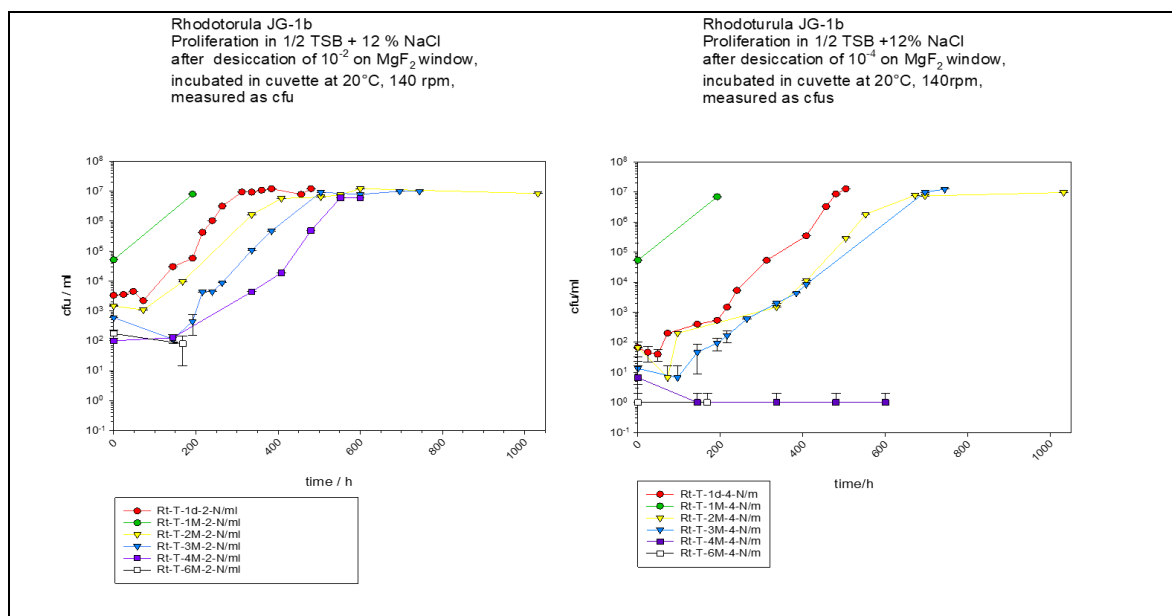
Im Verlauf des Projekts wurden verfeinerte Tests zur Trockenlagerung mit anschließender Medienzugabe und Wachstumsüberwachung nach trockener Lagerung bis zu 6 Monaten durchgeführt. Diese Tests sollen eine ideale Ausgangssituation für das Experiment definieren (d.h. die Konzentration der Zellen zu Beginn des Expositionsexperiments; unverdünnt oder verdünnt, um so einen genau definierten dynamischen Bereich, 2-3 Zehnerpotenzen, für die Überwachung des Wachstums zu haben). Zu diesem Zweck wurde ein zeitversetzter Ansatz in Bezug auf das Timing, abhängig von der Wachstumsgeschwindigkeit der einzelnen Organismen durchgeführt. Zum Ende des Berichtszeitpunkts waren die Langzeittrocknungstests von 2 der 8 Teststämme fast abgeschlossen. Erste Tests wurden mit *Rhodotorula* JG-1b und *Planococcus halocryophilus* OR1 durchgeführt. Diese wurden für 1 d, 1M, 2M, 3M, 4M und 6M, getrocknet und anschließend wurde bei 20°C das Wachstum via OD und Transmission bei 490nm und 600nm und die Koloniebildungsfähigkeit erfasst. Bei diesem ersten Testlauf wurde zunächst nur jeweils

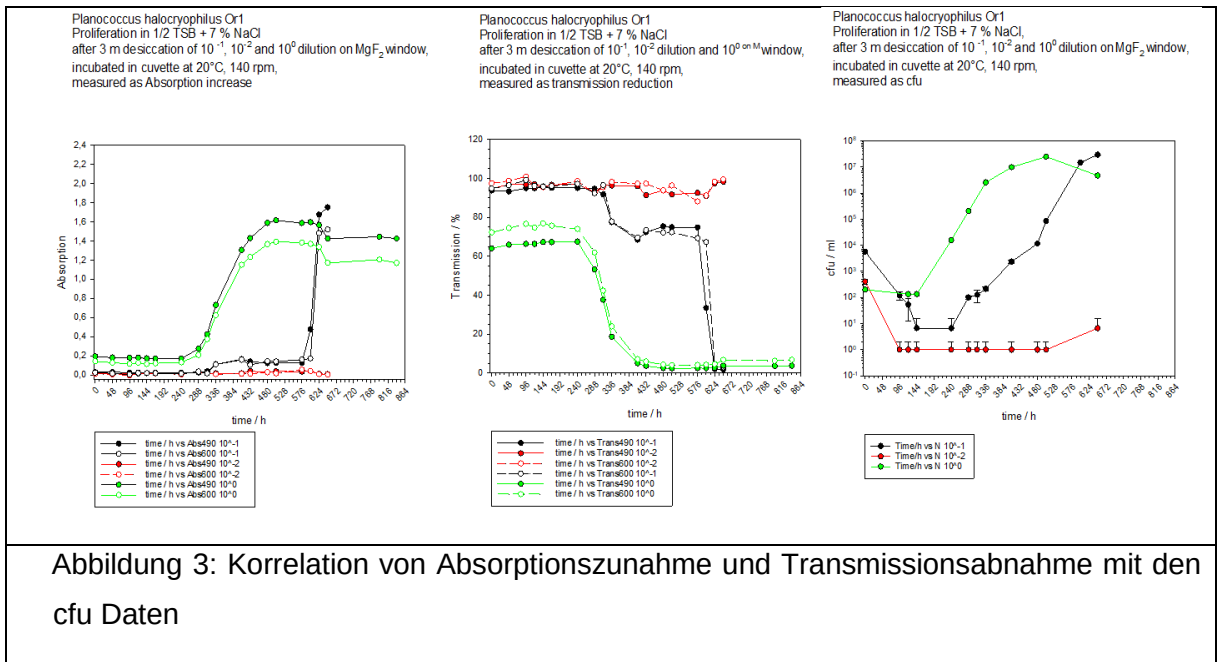
eine Probe entweder unverdünnt oder in je 2 Verdünnungsstufen beobachtet, jedoch jeweils nur eine Probe. Die Wachstumsdauer betrug jeweils ca. 1 Monat, geschuldet der suboptimalen Temperatur von 20 °C, in Näherung an die während der Mission erwartete Temperatur. Neben der Bestimmung der Wachstumskinetik nach trockener Lagerung wurde auch die Wachstumsverzögerung ermittelt. Ein Überleben nach Trocknung bis zu 6 Monaten konnte so bereits für *Rhodotorula* und *Planococcus* bestätigt werden. Die Daten zeigen die Korrelation zwischen der Absorptionszunahme und Transmissionsabnahme mit den cfu Daten. Ein möglicher Einfluss auf die cfu gegen Od Korrelation hat dabei die Bildung verschiedener Farbstoffe der beteiligten



Teststämme. Alle Stämme müssen deshalb individuell, in Bezug auf Trocknungsdaten und UV Bestrahlungsdaten, betrachtet werden. Erste Ergebnisse deuten auf Unterschiede bei den verschiedenen Wellenlängen hin.







Mit einigen Stämmen wurde bereits mit Versuchen zur Bestrahlung mit UVC $254nm$ und polychromatischem UV $200-400nm$ begonnen, diese müssen jedoch noch bestätigt werden.

IceCold BCT

Der Biokompatibilitätstest dient dazu die Biokompatibilität zwischen den H/W-Materialien, die für die Herstellung der H/W benutzt werden und der biologischen Proben in ihrem jeweiligen Medium zu ermitteln. Dieser sogenannte biologische Verträglichkeitstest (BCT- biocompatibility test) sieht die Exposition der beteiligten biologischen Teststämmen in den Materialien der einzelnen Komponenten der H/W nach dem Missionsprotokoll vor. Parallel wurden die biologischen Proben auch ohne die Materialbestandteile der H/W kultiviert: N0-Wert. Die Exposition der biologischen Proben (Inkubationsprofil) gegenüber den H/W-Materialien basiert auf dem Missionsszenario in Bezug auf Zeit (maximale Dauer) und Temperatur (optimal Temperatur) und umfasst nur die Zeit, in der die biologischen Proben sich bei der Wachstumstemperatur in einem metabolisch aktiven Zustand befinden.

Das IceCold-Experiment besteht aus einer Sammlung von Mikroorganismen im Ruhezustand. Im Weltraum wird den biologischen Proben Kulturmedium zugesetzt und die Vermehrung wird gestartet. Während des IceCold Mission werden die exponierten Kulturen mit dem vollständigen, solaren UV Spektrum bestrahlt, schwankende Temperaturen (von -25 bis $+30^{\circ}C$), kosmische Strahlung und Schwerelosigkeit ausgesetzt. Die Kulturen werden, im Gegensatz zu früheren Missionsszenarien, trocken hochgeladen und vor Sonneneinstrahlung mit Kulturmedium hydratisiert. Das Wachstum der Zellkulturen wird von periodischen Messungen der optischen Dichte (OD), begleitet von Protokoll der anderen Missionsparameter verfolgt. Parallel dazu befindet sich

ein paralleler Probensatz vom Sonnenlicht abgeschirmt. In Tabelle 1 sind die biologischen IceCold-Proben zusammen mit ihren passenden Kulturmedien aufgeführt, die am BCT beteiligt sind. In Tabelle 3 sind die H/W-Materialien aufgeführt, die am BCT beteiligt sind. Das H/W Materialien (3 Repliken für jedes Material ×8 biologische Proben) wurden in Autoklavierbeuteln sterilisiert. Für die meisten Teile wurde anstelle der eigentlichen Teile das gleiche Material der eigentlichen HW-Komponenten verwendet.

Tabelle 1: Biologische Proben

Sample ID#	Biological samples	Culture Medium
A	Halorubrum lacusprofundi	DSM Medium 589
B	Planococcus halocryophilus	½ TSB Tryptic Soy Broth+7% NaCl
C	Rhodotorula sp strain JG-1	½ TSB Tryptic Soy Broth+12% NaCl
D	Rhodococcus sp strain JG-3	½ TSB Tryptic soy Broth+7% NaCl
E	Halobacterium salinarum	DSM Medium 97
F	Deinococcus radiodurans	NB Nutrient Broth Medium
G	Deinococcus geothermalis	NB Nutrient Broth Medium or TSB or ½ TSB
H	Bacillus subtilis	NB Nutrient Broth Medium



Abbildung 4: Alle verwendeten Teststämme im IceCold BCT Experiment

Das Zeit- und Temperaturprofil für die Inkubation der H/W-Materialien mit den biologischen Proben basiert auf dem Missionsprofil, das für das IceCold-Experiment geplant ist. Da der BCT die Auswirkungen der H / W-Materialien auf die biologischen Proben in einem aktiven Zustand behandelt, werden für die abschließende Beurteilung nur die Schritte von der Zufuhr von Medium bis zum Ende der Kultivierungsperiode berücksichtigt. Die Temperatur der Inkubation muss die optimale Temperatur für das Wachstum der biologischen Proben sein. Die zu prüfenden H/W-Materialien wurden in 50-ml-Standard-Laborreagenzgefäßen (z. 50 ml Falcon konische Röhrchen) inkubiert. Die Gesamttestdauer beträgt bis zu 12 Monate. Der erste Schritt inkubiert die Testitems mit den Kulturmedien (ohne die Zellen) für 4 Monate (120 Tage) und simuliert den Zeitraum von der Lagerung bis zum Start des Experiments durch Zugabe der biologischen Proben. Dieser Teil des BCT Test wurde am 27.09.2021 begonnen. Der zweite Schritt beginnt durch die Zugabe der Kulturen und wird maximal 6 Monate dauern. Er wurde am 31.01.2022 begonnen. Das Ende ist abhängig von den jeweiligen Bakterienart und dem Erreichen der stationären Phase, und simuliert den Zeitraum von der Bereitstellung von Kulturmedium bis zum Ende der Strahlungsexposition. Es wird erwartet, dass die meisten Kulturen unter Laborbedingungen die stationäre Phase früher erreichen, als im All, d.h. in weniger als 4 Monaten, aber sicher in weniger als 8 Monaten. Aliquots werden nicht nur am Ende des Tests, sondern in regelmäßigen Abständen, jeweils abhängig vom Ergebnis der vorherigen Analyse genommen und die OD und cfu-Zahl ermittelt. Dies wird es ermöglichen, entweder die stationäre Phase zu sehen, oder eine Abnahme der Proliferation als Folge einer toxischen Verbindung in der jeweiligen H/w Materialien.

Tabelle 2: Inkubationsprofil

Schritt #	Simulierte Phase	Zeit	Temperatur
1	Inkubation der H/W Materialien mit den Kulturmedien ohne die jeweiligen Zellen. Dieser Schritt simuliert die Zeitspanne der Lagerung bis zum Start des Experiments im Weltraum durch Zugabe des Kulturmediums zu den biologischen Proben.	Minimum 120 Tage (4 Monate)	$\leq +20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$
2	Zugabe der Zellkulturen zu den Medien mit den einzelnen H/W Komponenten Dieser Schritt simuliert die Zeitspanne bis zum Ende der Strahlungsexposition.	Maximum 240 Tage (8 Monate)	$\leq +20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$

Zusammenfassung:

- 12 Testmaterialien + 1 Kontrolle
- MgF_2 (11) stand nur für die aktive Phase zur Verfügung
- 8 Testkandidaten
- 4 Monate H/W Testmaterial Inkubation im Wachstumsmedium (passive Phase) Start 27.09.2021
- 6 Monate H/W Testmaterial Inkubation im Wachstumsmedium und Mikroorganismen (aktive Phase) Start 31.01.2022
- 3 unabhängige Testläufe
- Analyse: Wachstums Monitoring durch cfu und OD

Ice Cold Experiment-Prinzip

Die HW für das IceCold-Experiment in der Exobiologie-Anlage wurde im Verlauf des Berichtsjahres 2022 entwickelt und die in diesen Medien kultivierten Mikroorganismen in direktem Kontakt mit einer Vielzahl von HW-Materialien. Während der gesamten Vorbereitungs- und Hochladephase bis zum Beginn des aktiven Teils des Experiments können flüssige Wachstumsmedien bis zu 4 Monate lang mit dem HW in Kontakt sein, gefolgt von bis zu 6 Monaten Kontakt zwischen den proliferierenden Kulturen in den Medien und den Materialien. Es ist nicht bekannt, ob während dieser Zeiträume chemische Verbindungen von den Kulturen passiv ausgelaugt oder aktiv in das Medium freigesetzt werden könnten, und wenn ja, ob diese Verbindungen eine toxische, inaktivierende Wirkung auf die kultivierten Mikroorganismen haben. Um dies zu testen, werden alle verwendeten Materialien, die möglicher-weise mit Wachstumsmedien und/oder Kulturen in Kontakt kommen, zu allen verwendeten Medien hinzugefügt und bei einer erwarteten Durchschnittstemperatur von 20 °C und einer Rotation von 120 U/min inkubiert. Dies erfolgt in einer passiven Inkubationsphase von 4 Monaten, um ein mögliches „Auslaugen“

von Chemikalien oder Verbindungen aus den Materialien in das Medium zu gewährleisten. Nach dieser Inkubationszeit werden Proben aller Testmaterialien im Kulturmedium der jeweiligen Organismen in einer Konzentration zugesetzt, die eine mindestens 100-fache Erhöhung der Zellzahl für bis zu 6 Monate (aktive Inkubationsphase) ermöglicht. Die Proliferation aller Kulturen wird regelmäßig durch Bestimmung der cfu (Colony forming units) und der optischen Dichte (OD) als Absorption bei 490 nm im Vergleich zu den jeweiligen Kulturen ohne Testmaterial (Kontrollen) getestet. Während der Mission werden MgF_2 -Fenster keinem Medium ohne Organismen ausgesetzt, da alle Organismen auf den MgF_2 -Fenstern trocknen, bis Medium hinzugefügt wird.

Daher werden MgF₂-Fenster nicht nur in Wachstumsmedien inkubiert (passive Inkubationsphase), sondern direkt mit den jeweiligen Kulturen für die letzte bis zu 6 Monate dauernde aktive Inkubationsphase versetzt.

Testaufbau

Am 13. September 2021 gingen Testmaterialproben beim DLR ein. Am 17.09.2021 wurden die Proben besichtigt. Insgesamt wurden 11 verschiedene Testmaterialien versendet, nummeriert gemäß Tabelle 2. Testmaterial Nr. 11 MgF₂ war nur zweite aktive Inkubationstestphase der Inkubation mit Kulturen am 9. Februar gemäß der angegebenen Begründung verfügbar. In Tabelle 2 sind alle für den Test verwendeten Materialien aufgezählt. Die Organismen und die jeweils erforderlichen Kulturmedienvolumina, sowie die Kennzeichnungs-codes für alle Testmaterial- und Kulturkombinationen wurden bereits erläutert. Zum Zeitpunkt der Vorbereitung war noch nicht klar, ob *Bacillus subtilis* in ½ TSB-Medium ausreichend wachsen würde. Daher wurden aus Ersatzmaterialien zusätzliche Falcons für *B. subtilis* in NB hergestellt und mit „I“ bezeichnet. Alle Wachstumsmedien wurden in ausreichender Menge vorbereitet. Für jede Stamm-Medium-Kombination (9, zwei verschiedene Medien für *B. subtilis*) und jedes Testmaterial inklusive der Kontrolle (13) wurden drei parallele Proben mit jeweils 25 ml für das jeweilige Wachstumsmedium hergestellt. Insgesamt 351 50-ml-Falcon-Röhrchen wurden gemäß beschriftet und aufgelistet und unter sterilen Bedingungen mit jeweils 25 ml Wachstumsmedium gefüllt. Ein Stück Testmaterial wurde unter sterilen Bedingungen in jedes Falcon-Röhrchen gegeben, wie auf dem Etikett angegeben. Jedes Medium, jede Kultur und jedes Testmaterial wurden dreifach getestet. Jedes Rack für 24 Falcons wurde mit 3 Replikaten jeder Stamm-Medium-Kombination A-H (8) in Kontakt mit demselben Testgegenstand für die passive Inkubationszeit ausgestattet. *B. subtilis* in NB (I) wurde in einem separaten Gestell hinzugefügt. Alle Falcon-Röhrchen mit demselben Testmaterial wurden in einem entsprechend beschrifteten Ständer vereinigt.

Testdurchführung - Passive Inkubationsphase

Aufgrund der hohen Anzahl der Falcon-Röhrchen wurden diese vier Monate lang in zwei Schüttelinkubatoren von Infors bei 20 °C und 120 U/min untergebracht.

Alle Falcon-Röhrchen mit ihrem Wachstumsmedium und der Materialprobe wurden regelmäßig überprüft, um die Sterilität zu gewährleisten und mögliche Kontaminationen so früh wie möglich zu erkennen. Bis zum Ende der passiven Inkubationsphase am Januar 2022 wurde keine Kontamination festgestellt.

Testdurchführung - Aktive Inkubationsphase

Stationäre Kulturen aller 8 IceCold Testorganismen wurden in ihren jeweiligen Medien angezüchtet. Am 31. Januar 2022 wurde die aktive BCT-Inkubationsphase für die 11

Testmaterialien und die Kontrollkulturen gestartet, indem 25 µl jedes IceCold-Stammes in das erste der drei parallelen Test-Falcon-Röhrchen jedes Stamms und Testmaterials einschließlich der Kontrolle gegeben wurden um eine 10⁻³- Verdünnung der Mikroorganismen zu erhalten.

Tabelle 3 Liste der Testmaterialien

n #	Commercial Identification or standardized designation	Use and location	pieces in test	
1	Silicone SL600W	EU O-rings, gaskets	24	
2	Silicone LSR (XIAMETER RBL-2004-60) for injection molding	CC membrane	24	
3	Silicone FDA	EU O-rings, gaskets	24	
4	Silicone VMQ 80	EU O-rings, gaskets	24	
5	Silicone VMQ 80 + lubricant Vaseline grease	EU O-rings, gaskets	24	
6	Viton	EU O-rings, gaskets	24	
7	Ethylene-Propylene Diene Monomer (EPDM)	EU O-rings, gaskets	24	
8	Ethylene-Propylene Diene Monomer (EPDM) + lubricant Lubricant: Silicone grease	EU O-rings, gaskets	24	
9	Ethylene-Propylene Diene Monomer TA 50-60 (EPDM TA 50-60)	EU O-rings, gaskets	24	
10	Polyetheretherketone (PEEK 1000)	EU Body	24	
11	Magnesium Fluoride (MgF2)	Window	0	Avai 09.02
12	AISI 316 Stainless steel	Valves	24	
13	Controls (no material)	Valves	0	

Die Inkubation wurde bei 20 °C und 120 U/min fortgesetzt, mit Ausnahme von *Deinococcus geothermalis*, *Deinococcus radiodurans* und *Halobacterium salinarum*. BCT-unabhängige Tests mit diesen Stämmen bei Inkubationstemperaturen von 20 °C zeigten inzwischen, dass die

Proliferation bei 20 °C zu langsam ist, um im Test innerhalb des Zeitfensters aussagekräftige Ergebnisse zu erzielen. Daher wurden die mit diesen Stämmen beimpften Falcon-Röhrchen zusammensortiert und bei 37 °C und 120 U/min für die aktive Phase inkubiert. Die zweiten parallelen Testkulturen wurden aus logistischen Gründen entsprechend zwischen dem 8. und 15. Februar angeimpft, die dritten parallelen Testkulturen am 01. März 2022. Da *B. subtilis* (H) in Parallelexperimenten in ½ TSB nicht wuchs, wurden nur die Falcons, die im BCT enthalten waren und parallel mit den Reserven aller Materialien und NB-Medium für *B. subtilis* vorbereitet wurden, mit der Anmerkung „I“ versehen, untersucht. Für „H“ vorbereitete Materialien in ½ TSB wurden nicht beimpft und bei Raumtemperatur gelagert. Die Gesamtzahl der Stämme wurde daher auf 8 reduziert.

Kulturwachstumsmessungen

Während der aktiven Testphase wurde die optische Dichte als Indikator für die Proliferation regelmäßig für jedes beimpfte Reagenzglas mit oder ohne Testmaterial, d. h. für jede Kultur, als Absorption bei 490 nm im Spektralphotometer Jenway 7315 bestimmt. 1-ml-Aliquote der Kulturen wurden in Einwegküvetten überführt und im Jenway 7315-Spektrophotometer bei 490 nm mit der jeweiligen Mediumkontrolle verglichen. Die CFU wurden für jedes Reagenzglas, d. h. für jede Kultur, wiederholt während der aktiven Testphase bestimmt, mit Ausnahme des Stammes *Halobacterium salinarum* (E).

Zur cfu-Bestimmung der Kulturen B (*P. halocryophilus*), C (*Rhodotorula* JG-1b), D (*Rhodococcus* JG-3), F (*D. radiodurans*), G (*D. geothermalis*) und I (*B. subtilis*), wurden Aliquots aus der jeweiligen Kultur entnommen, seriell verdünnt und 50 µl der Verdünnungen wurden auf ausgewählte, für jeden Stamm geeignete Medienagarplatten ausplattiert. Nach einer Inkubationszeit von mindestens 48 Stunden, je nach Stamm, wurden die Kolonien gezählt und die ursprüngliche Anzahl an cfu/ml berechnet. Die cfu der Kultur A (*H. lacusprofundi*) kann auf diese Weise nicht bestimmt werden, da einzelne Zellen nicht zu zählbaren Kolonien heranwachsen. Daher wurden entsprechende 1:10-Reihenverdünnungen in 96 Multiwell-Platten (MWP) hergestellt und in MWP (Multiwellplatten) überführt, die 200 µl pro Well des Wachstumsmediums mit Agar enthielten, um die wahrscheinlichste Zahl (mpn: most probable number) für die Zellkonzentration nach Inkubation bei 20 °C für mindestens 3 Wochen zu bestimmen. *H. salinarum* NRC1 (E) wuchs unter den Testbedingungen unerwartet überhaupt nicht auf Agarplatten. Für diesen Stamm wurden nur die OD-Daten analysiert, um die Biokompatibilität der Materialien zu bestimmen. Da nur zwei oder drei der Teststämme E, F, G, I als Referenzstämme für die Mission als temperaturtolerante Kontrollen gegenüber möglichen erhöhten Missionstemperaturen ausgewählt werden, könnte dieser Test zu einem Abwahlkriterium für *H. salinarum* werden.

MgF₂-Fenster

Die MgF₂-Fenster sind zu Beginn 2022 beim DLR eingetroffen.

Nach kurzer Klärung des Verfahrens einigte man sich auf Folgendes: Da die Magnesiumfluorid (MgF₂)-Fenster, die als Material-ID 11 identifiziert wurden, nur dann mit dem Kulturmedium in Kontakt kommen, wenn das Medium in die Kulturkammer injiziert wird, wird der biologische Kompatibilitätstests mit MgF₂-Fenstern, Medien und Zellkulturen direkt mit Schritt 2 beginnen, ohne dass Schritt 1 nur mit Fenstern und Medien ausgeführt werden muss.

Ergebnisse

Der Hauptaspekt der BCT besteht darin, zu verstehen, ob das ausgewählte HW-Material in irgendeiner Weise toxisch ist oder die Vermehrung der ausgewählten mikrobiellen Kulturen im Laufe der Zeit beeinträchtigt.

Um etwaige Hemmwirkungen festzustellen, wurde die Proliferation der Kulturen A–G und I in Kontakt mit den Materialien Nr. 1 bis Nr. 12 durch OD-Messungen und Ausplattieren zur Ermittlung der CFUs überwacht. Als Kontrolle für die Proliferation wurden Kulturen aller Stämme ohne zusätzliches Material parallel inkubiert und analysiert (Nr. 13).

Das BCT wurde Mitte 2022 mit der letzten OD-Messung abgeschlossen.

Einhaltung der Erfolgskriterien aus OD-Messungen und CFU-Bestimmungen

Die optische Dichte wurde für alle Kulturen während der aktiven Phase regelmäßig gemessen. Die Ergebnisse werden als Absorption % (Abs %) im Verhältnis zum Zeitraum ab der Inokulation der Kulturen aufgetragen. Der CFU für 1 ml Kultur wurde für alle Kulturen regelmäßig während der aktiven Phase wie oben beschrieben bestimmt. Für jeden Zeitpunkt wurde der Anstieg der CFUs im Vergleich zum Zeitpunkt 0 der Inokulation als N/N_0 bestimmt. Diese relativen Proliferationszuwächse werden im Verhältnis zum Zeitraum ab der Inokulation der Kulturen aufgetragen. Zur einfacheren und klareren Darstellung der Ergebnisse für jedes Material werden nur die Mittelwerte der 3 ohne entsprechende Fehlerbalken angezeigt. Für jedes Material werden das durch den CFU als N/N_0 bestimmte Wachstum und das durch OD bestimmte Wachstum angezeigt. Vom Wissenschaftsteam wurden die folgenden Erfolgskriterien identifiziert:

1. Vermehrung von Kulturen im Kontakt mit den einzelnen Testmaterialien im Vergleich zu Proliferation der jeweiligen Kontrollen ohne Material, bestimmt durch CFU am Ende des Tests. Am Ende des Tests müssen die in Kontakt mit Testmaterial gewachsenen Kulturen mindestens einen endgültigen CFU/ml von 10^{-1} CFU/ml der jeweiligen Kontrollkultur ohne Testmaterial erreichen.
2. Vermehrung von Kulturen im Kontakt mit den einzelnen Testmaterialien bestimmt durch CFU am Ende des Tests zu CFU, ermittelt am Anfang (T_0) des Tests. CFU/ml Am Ende des Tests wird

für jede Kultur, die mit dem Testmaterial in Kontakt kommt, ermittelt und muss mindestens das 10-fache der zu Beginn (T_0) des Tests ermittelten KBE betragen. Kultur E *H. salinarum* konnte zur CFU-Bestimmung nicht angezüchtet werden.

3. Beide Kriterien (1. und 2.) müssen bei mindestens 2 der 3 parallelen Prüfmuster erfüllt sein.

Einhaltung der Erfolgskriterien 1 und 3:

Die Kulturen wurden unter nicht optimalen Bedingungen, wie im Weltraum gezüchtet. Insbesondere bei den schneller wachsenden Kontrollkulturen F, G und I ist die Gesamtwachstumsphase des BCT ziemlich lang, was an einem Rückgang der CFU-Zahl gegen Ende des BCT nach Erreichen eines Maximums erkennbar ist. Für die Berechnung der erreichten CFU-Werte jeder Kultur/Material-Kombination im Vergleich zu den für die jeweilige Kulturkontrolle Nr. 13 erreichten CFU-Werten wurden in diesen Fällen maximale CFU-Werte vor dem Rückgang für die Berechnungen in Tabelle 4 verwendet.

Die CFU der proliferierten Kulturen in Kombination mit oder ohne Testmaterialien wurden als N/N_0 bestimmt, d. h. als die für die proliferierte Kultur ermittelten CFU dividiert durch die CFU der jeweiligen Kultur zu Beginn des Tests. N/N_0 für alle Parallelkulturen für alle Kultur-/Materialkombinationen wurden berechnet. Um das Compliance-Kriterium 1 zu testen, wurden alle N/N_0 jeder Kultur/Material-Kombination durch die N/N_0 dividiert, die für die jeweiligen Kulturen ohne Testmaterial ermittelt wurden. Für eine erforderliche Abweichung von nicht mehr als 1×10^{-1} wurden alle Werte $< 1 \times 10^{-1}$ ermittelt. Sechs Kultur-/Materialkombinationen zeigten Werte $< 1 \times 10^{-1}$ (Erfolgskriterium 1), wobei sich drei Kultur-/Materialkombinationen in mehr als einer Parallelkultur befanden (Erfolgskriterium 3) und daher nicht mit Erfolgskriterium 3 konform waren: Material Nr. 3 mit Kultur F *Deinococcus radiodurans* in zwei von drei Parallelkulturen Material Nr. 9 mit Kultur A *Halorubrum lacusprofundi* in allen drei Parallelkulturen Material Nr. 11 mit Kultur G *Deinococcus geothermalis* in zwei von drei parallelen Kulturen. Leider waren die Kulturen von *Deinococcus radiodurans* kontaminiert und ihre Überlebensrate bei Austrocknung ist nicht immer zuverlässig (gilt hier nicht). *D. radiodurans* wird höchstwahrscheinlich nicht für den Flug ausgewählt. Die Kulturen von *Deinococcus geothermalis* waren sehr schnell im Anwachsen, obwohl sie nicht unter optimalen Bedingungen angezüchtet wurden. Wie aus den Grafiken hervorgeht, stammten die hier verwendeten Daten bereits aus der Abnahmephase, frühere Daten waren nicht verfügbar. Aus vielen früheren Labor- und EXPOSE-R2-Weltraumexperimenten ist die Kompatibilität von MgF₂-Fenstern mit *D. geothermalis* nachgewiesen. Die – im Vergleich sehr hohe – Inkompatibilität von Material Nr. 9 mit A *Halorubrum lacusprofundi* wurde bereits diskutiert, als erste Ergebnisse verfügbar waren. Endergebnis: Die Inkompatibilität von Material Nr. 3 mit *D. radiodurans* ist höchst fraglich und nicht relevant, da *D. radiodurans* höchstwahrscheinlich aufgrund anderer Laborprobleme vom Flug ausgeschlossen ist. Die Unverträglichkeit von Material Nr. 11 mit *D. geothermalis* kann derzeit nicht erklärt werden, da sie bereits zuvor

nachgewiesen wurde. *D. geothermalis* wird im Rahmen der SRM-Tests getestet. Die Kombination von Material Nr. 9 und *H. lacusprofundi* ist viel offensichtlicher und wird zusätzlich in 14.1 Material Nr. 9 besprochen. Mit Ausnahme von Material Nr. 9 EPDM TA 50-60 gelten alle anderen Material-Kultur-Kombinationen als den Erfolgskriterien 1 und 3 entsprechend.

Einhaltung der Erfolgskriterien 2 und 3:

Die Kulturen werden unter nicht optimalen Bedingungen, wie im Weltraum gezüchtet. Insbesondere bei den schneller wachsenden Kontrollkulturen F, G und I ist die Gesamtwachstumsphase des BCT ziemlich lang, was an einem Rückgang der CFU-Zahl gegen Ende des BCT nach Erreichen eines Maximums erkennbar ist. Für die Berechnung des Anstiegs der CFU gegenüber dem Start-N/No wurden für diese Fälle maximale CFU-Werte vor dem Rückgang für die Berechnungsergebnisse verwendet. Der am Ende des Tests ermittelte CFU der proliferierten Kulturen N wurde durch den zu Beginn des Tests bestimmten CFU N=dividiert. Für eine erforderliche Proliferation von mindestens 10 x der CFU zu Beginn muss $N/N_0 > 1 \times 10^1$ sein. Alle Kulturen, einschließlich aller Parallelkulturen, erfüllen das Erfolgskriterium 2. Erfolgskriterium 3 ist daher nicht anwendbar. Dennoch muss festgestellt werden, dass die maximale Genauigkeit für CFU und damit für Wachstum für Stamm A *Halorubrum lacusprofundi* 10^1 beträgt. Im Vergleich zu allen anderen Materialkombinationen mit diesem Stamm ist die endgültige N/No von maximal 10^2 , die mit Material Nr. 9 erreicht wird, sehr niedrig.

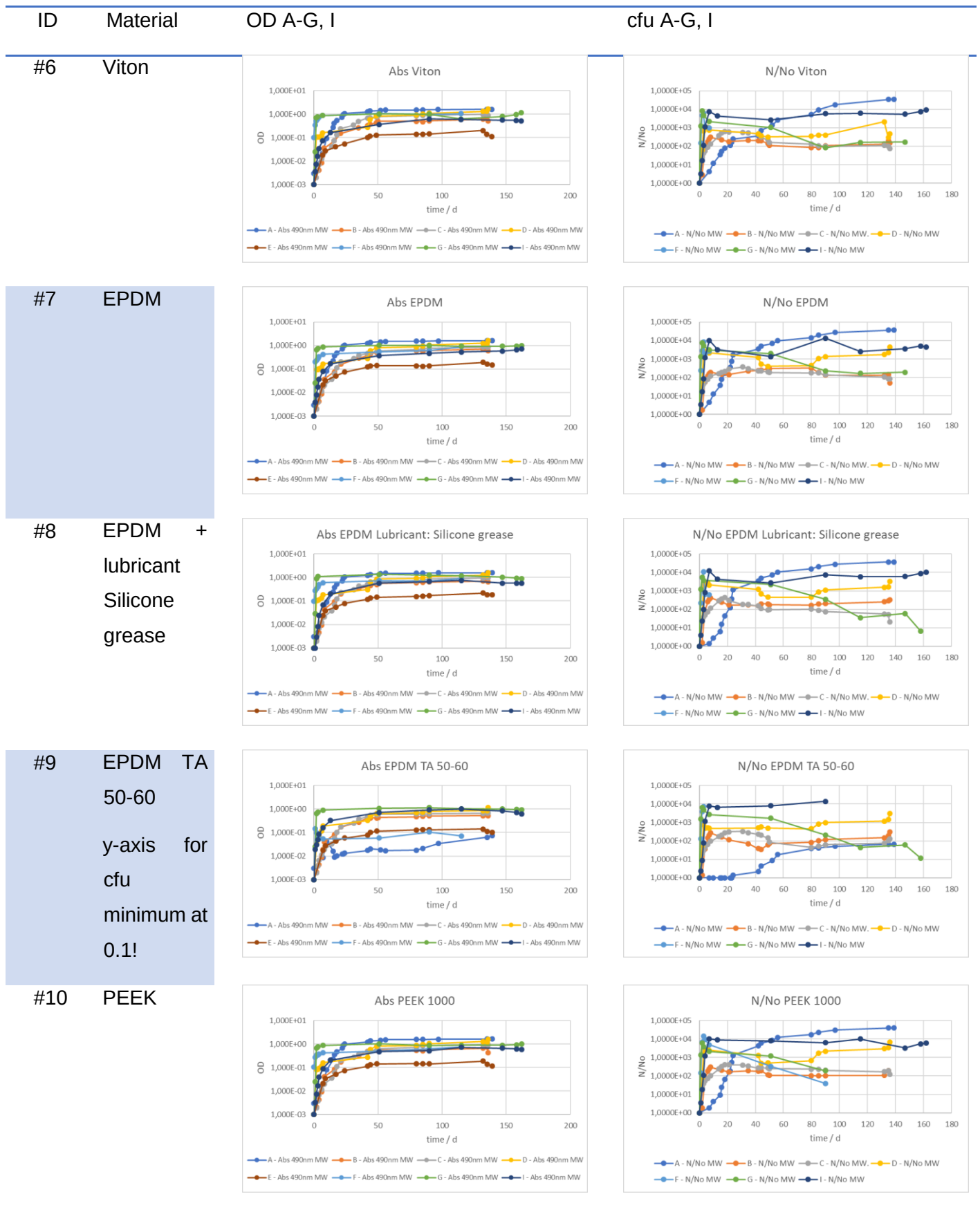
Die ID #13-Diagramme der Kontrollkulturen A-G und I sind in Abbildung 11 dargestellt, die aller Material-Kultur-Kombinationen in Abbildung 12. Alle Wachstumskurven sind als N/No dargestellt, d. h. das relative Wachstum im Vergleich zum Startpunkt der Animpfung. Hier die logarithmische Darstellung.

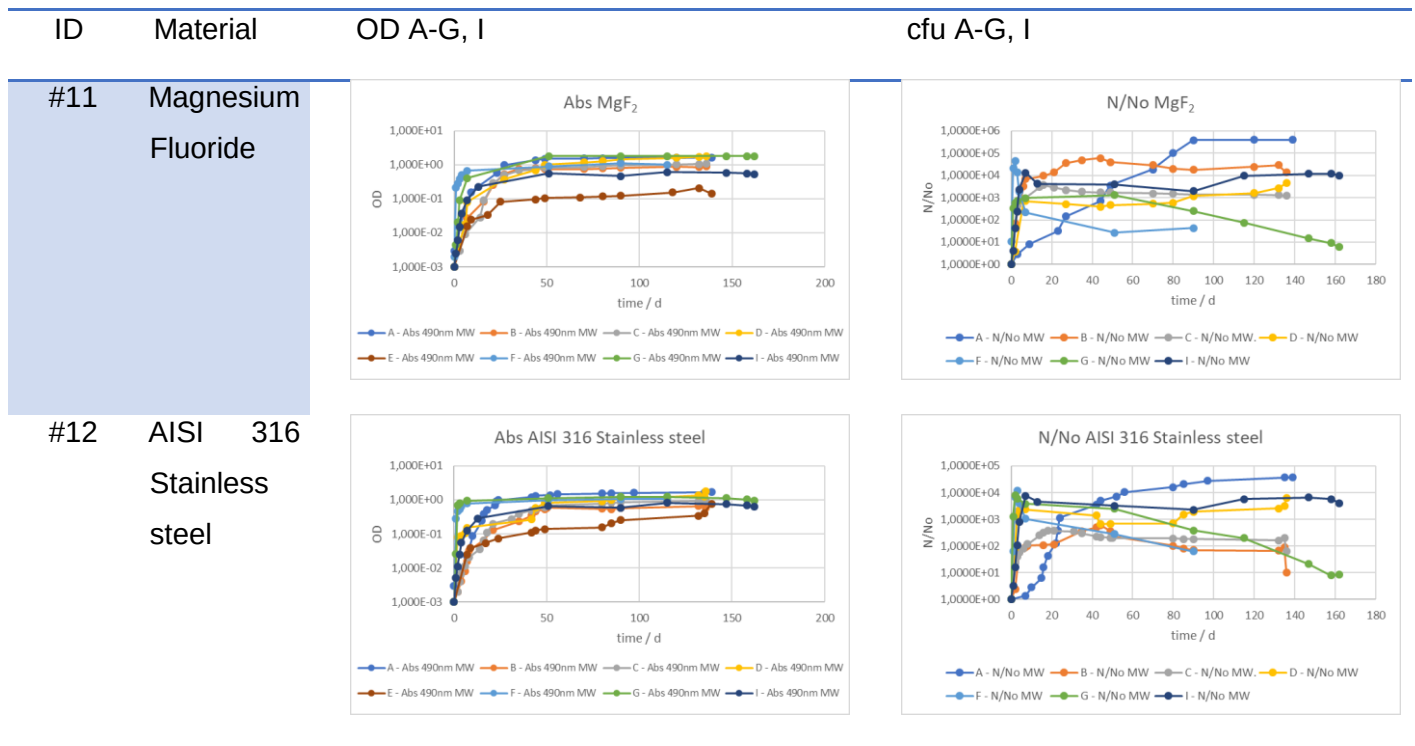
Tabelle 4 Diagramme von OD und CFU als N/No, bestimmt für Nr. 13 Kontrollmaterial ohne Material unterstützt

ID	Material	OD A-G, I	Cfu (N/No) A-G, I
#13	Control no material		

Tabelle 5 Diagramme der OD und der Mittelwerte der cfu als N/No (y-Achsen, logarithmische Skala) als Funktion der Zeit in Tagen (x-Achsen), ermittelt für alle 12 Testmaterialien in Kontakt mit allen 8 Kandidatenteststämmen A bis I.

ID	Material	OD A-G, I	cfu A-G, I
#1	Silicone SL600W		
#2	Silicone LSR for injection molding		
#3	Silicone FDA		
#4	Silicone VMQ 80		
#5	Silicone VMQ 80 + lubricant Vaseline grease		





Es ist festzuhalten, dass die Bestimmung der cfu von A - *H. lacusprofundi* mit der mpn-Methode zu einer maximalen Genauigkeit von Faktor 10 führt. Daher liegt hier der systematische Fehler im gleichen Bereich. Bei allen CFU-Angaben mit der Angabe „N/N₀“ gilt, dass N/N₀ = 1 (100) keinen Anstieg der CFU und somit kein Wachstum der Kultur bedeutet. Die logarithmische Skalierung wurde ausgewählt, um die visuelle Erkennung des Schwellenwerts des CFU-Anstiegs/Wachstums der Kultur um mindestens eine Größenordnung zu unterstützen, der als Erfolgskriterium Nr. 1 festgelegt wurde. Abnahme von N/N₀ nach Erreichen eines Maximums, wie z.B. für G - *D. geothermalis* zu sehen ist, wird erwartet (vergleiche auch mit der #13-Kontrolle kein Material), hauptsächlich aufgrund der suboptimalen Kulturbedingungen für die Stämme und insbesondere für diesen Stamm. Hier kann der vermutlich positive Effekt des Materials Nr. 1 Silikon SL600W derzeit nicht erklärt werden. Einige Materialien können einen positiven Effekt haben, indem sie einfach die Turbulenzen im Medium während der Inkubation bei 140 U/min erhöhen und so die Nährstoff- und Sauerstoffverfügbarkeit sowie die Verdünnung von zellbedingten Stoffwechselabfällen verbessern. Es liegt außerhalb des Rahmens dieses Projekts, dieses Phänomen weiter zu analysieren. Die Ergebnisse zeigen deutlich den Anstieg der OD, was auf eine Proliferation der Zellen in allen Kulturen in Kontakt mit den Testmaterialien hinweist, die denen der jeweiligen Kontrollkulturen ähnelt – mit Ausnahme des Testmaterials Nr. 9 EPDM TA 50-60 in Kontakt mit Kultur A – *Halorubrum lacusprofundi*. Für diese Kombination stiegen die OD-Daten kaum um eine Größenordnung und die CFU zeigten nach 100-tägiger Inkubation keinen Anstieg der Zellzahl. Erst danach kann eine geringe Proliferation festgestellt werden. Noch überzeugender, dass das Material Nr. 9 EPDM TA 50-60 in irgendeiner Weise nicht mit *H.*

lacusprofundi biokompatibel ist, ist die Farbe der Kulturen, wie sie mit dem Auge beobachtet wird, was die gemessenen Daten eindeutig unterstützt (siehe Abbildung 6 unten).

Optische Demonstration der Kulturproliferation während der aktiven Phase

Die verschiedenen in diesem BCT untersuchten Kulturen wachsen in unterschiedlichen Farben. Abbildung 5 zeigt ein Bild aller 8 Teststämme des ersten der drei parallelen Läufe, inkubiert mit Testmaterial Nr. 1 Silicone SL600W. Während A – *H. lacusprofundi* in einem eher rosafarbenen Farbton wächst, zeigt C – *Rhodotorula* JG-1b ein schwaches Rosa, F – *D. radiodurans* einen eher orangen Ton und G – *D. geothermalis* ein schwaches Orange, die anderen Kulturen B – *P. halocryophilus*, D – *Rhodococcus* JG-3 und I – *B. subtilis* wachsen in verschiedenen Gelbtönen. Dabei werden alle Kulturen außer E undurchsichtig. Kultur E – *Halobacterium salinarum* wurde hier unter zu kalten Kulturbedingungen inkubiert, was zu einem sehr langsamen Wachstum führte. Eine KBE-Bestimmung unter diesen Bedingungen war so nicht möglich. Das Wachstumsmedium DSM97 selbst ist hellbraun, daher ist die Farbe von E die des Mediums und nicht die der Kultur. Alle Kulturen von A – *H. lacusprofundi* wuchsen im ansonsten farblosen Wachstumsmedium DSM589+ zu einem deutlich erkennbaren Rosa, mit Ausnahme der bereits oben erwähnten Kultur, die Material Nr. 9 EPDM AT 50-60 enthielt. Wie bereits OD-Messungen zeigten, kam es zu keinem (rosafarbenen) Kulturwachstum. Der schwarze Materialschlauch ist in der Kultur A-9-1 gut zu erkennen.



Abbildung 5 Repräsentative Kulturen aller 8 Stämme des ersten BCT-Parallellaufs mit Material Nr. 1 Silicone SL600W während der aktiven Phase. Deutlich zu erkennen sind die unterschiedlichen Farben und Trübungen der Medien aufgrund einer hohen Zelldichte.



Diskussion

In [1] wurden Erfolgskriterien für die Bewertung eines Materials als nicht toxisch definiert:

1. Vermehrung von Kulturen im Kontakt mit den einzelnen Testmaterialien im Vergleich zu Proliferation der jeweiligen Kontrollen ohne Material, wurden am Ende durch CFU Bestimmung des Tests ermittelt. Das Wachstum der Kulturen in Kontakt mit Testmaterial muss mindestens eine endgültige CFU/ml von 10^{-1} der CFU/ml der jeweiligen Kontrolle erreichen, also der Kultur ohne Testmaterial.
2. Vermehrung von Kulturen im Kontakt mit den einzelnen Testmaterialien bestimmt durch CFU am Ende des Tests zu CFU, ermittelt am Anfang (T_0) des Tests. CFU/ml am Ende des Tests wird für jede Kultur, die mit dem Testmaterial in Kontakt kommt, ermittelt muss mindestens das 10-fache der zu Beginn (T_0) des Tests ermittelten CFU betragen.
3. Beide Kriterien (1. und 2.) müssen bei mindestens 2 der 3 parallelen Prüfmuster erfüllt sein. Jede Kultur wurde mit einer 10^{-3} -Verdünnung begonnen und inkubiert, um in Gegenwart des jeweiligen Testmaterials zu einer stationären Kultur zu wachsen. Die gesamte Inkubationszeit mit den jeweiligen Materialien betrug 6 Monate. Die drei parallelen Proben wurden mit etwa zweiwöchiger Verzögerung zu den zuvor beimpften Kulturen beimpft, um drei unabhängige Tests durchzuführen und das Kontaminationsrisiko zu verringern. Schwankungen der ermittelten CFU/ml zwischen den drei Paralleltests bis zu einem Faktor 10 der Testkulturen im Vergleich zu den Kontrollen gelten als biologische und handhabungsnormale technische Abweichung. Die lange Dauer des Tests sollte der Missionsdauer ähneln. Am Ende des Tests werden die CFU-Konzentrationen aller Kulturen definiert. Testmaterialien, die die oben genannten Erfolgskriterien

erfüllten, gelten auch dann noch als biokompatibel, wenn der endgültige CFU abnimmt. Eine längere Inkubation in einer begrenzten Menge an Wachstumsmedien und damit verbundener Ernährung und zunehmenden Stoffwechselabfallprodukten kann zu einer langsamen Inaktivierung der Zellen aufgrund von Hunger und „Selbstvergiftung“ führen. Alle Kombinationen aus Material und Teststämmen mit Ausnahme des Kombinationsstamms A: *H. lacusprofundi* mit Material Nr. 9 EPDM TA 50-60 erfüllten alle drei Erfolgskriterien des Wachstums, bestimmt durch CFU und OD. Der pH-Wert blieb bei allen getesteten Kulturen im Toleranzbereich und es wurde kein signifikanter Einfluss des Materials festgestellt.

Material Nr. 9

Wie in Tabelle 5 dargestellt, war Material Nr. 9 nur, aber stark inkompatibel mit Stamm A: *Halorubrum lacusprofundi*. Diese Inkompatibilität wurde frühzeitig erkannt und das Ergebnis diskutiert. Laut PD wurden im BCT auch andere Materialien für die gleiche Funktion getestet. Da kein anderes Material eine Bioinkompatibilität aufwies, kann Material Nr. 9 problemlos ersetzt werden. Dennoch wäre es interessant, die Ursache für die Inkompatibilität von EPDM TA 50-60 mit diesem Stamm weiter zu analysieren, insbesondere da das ähnliche Material EPDM im gleichen Test vollständig biokompatibel war.

Abschließendes Fazit:

Mit Ausnahme von Material Nr. 9 EPDM TA 50-60 haben alle getesteten Materialien den BCT bestanden und können für IceCold HW verwendet werden.

Für das Anschlussprojekt SPICE sind bis zur Fluggelegenheit voraussichtlich 2025 vor allem Experimente zur Strahlentoleranz der ausgewählten Bakterienstämme, wie: Inaktivierungsversuche mit Röntgenstrahlung, mit UVC_{254nm}, mit polychromatischer UV Strahlung, jeweils in Flüssigkultur oder auf Quartzplättchen getrocknet mittels OD_{600nm} Messung und Lebendzellzahl Bestimmung jeweils in Medium auf Eis, in Puffer auf Eis und getrocknet in Medium und weitere Tests mit den einzelnen EU des SRM von IceCold, sowie die Probenbereitstellung zur Durchführung des Flugexperiments auf der ISS und die Bearbeitung und Auswertung der Flug- und Bodenkontroll-Experiment Daten nach Erhalt geplant.

-Lux in Space

- Abstimmung der Experimentparameter, Probenart und –exposition, „up und download“ Bedingungen für die Definitionsphase des ESR für LUX in Space mit dem LUX in Space Team.
- Hardware Tests zur Durchführung des Flugexperiments und zur abschließenden Anpassung des SOS-Lux-Tests.

In der Projektlaufzeit wurden weitere Experimente zur Vorbereitung und Durchführung des Flugexperiments, sowie zur abschließenden Anpassung des SOS-Lux-Tests durchgeführt.

pH und Biokompatibilitätstest

Das Experimentdesign LUX in Space (LiS) nutzt eine *Salmonella typhimurium* pPLS-1-Kultur in Nährstoffbrühe (NB) Medium mit Ampicillin, die in Kontakt mit Teilen des Lux in Space HW kommen. Es stellte sich die Frage, ob und inwieweit sich der pH-Wert des Kulturmediums während einer 3-monatigen Lagerung bei 6°C, gefolgt von einer Inkubationszeit bei 30 °C für 10 Tage, verändert. Da dies in der Mikrobiologie kein allgemeines Problem darstellt, waren keine Daten verfügbar. Es wurden 1,5 l der Testkultur 90 Tage bei 6 ° C gelagert und anschließend 10 Tage bei 30 ° C inkubiert, wie für weitere HW-Tests angefordert. Aus Gründen der biologischen Sicherheitsvorschriften, musste diese Kultur frei von lebenden genetisch veränderten Organismen sein. Der Hauptkandidat für LiS ist *Salmonella enterica* subsp. *enterica* TA1535 (*Salmonella typhimurium*) TA1535 (DSM9274, jedoch ohne das Plasmid pSK1002) transformiert mit dem Plasmid pPLS-1. Er wird in NB-Medium mit Ampicillin gelagert und gezüchtet, Kontakt mit einigen HW-Materialien treten auf während

- der Transport- und Lagerphase für bis zu 3 Monaten bei 6 ° C -bei reduziertem Stoffwechsel
- der Inkubationsphase an Bord für bis zu 3 Tagen bei 30 ° C-mit Proliferation der wachsenden Kulturen
- der Versuchsphase für bis zu 1 Tag bei 30 ° C -mit fortgesetzter Proliferation und Reparaturstoffwechsel und zusätzlich mit der enzymatischen Lumineszenz Reaktion.

Eine mögliche Änderung des pH-Werts auf basische oder saure Werte können die HW-Verbindungen im Kontakt mit der Bakterienkultur beeinflussen. Zum Zeitpunkt der Bestimmung möglicher pH-Änderungen der Kultur liefen auch zwei weitere Langzeittests mit der Kultur.

S. typhimurium pPLS-1-Kulturen wurden 1. in einen CC-Behälter gefüllt, der in einem Biolab EC-Simulationssystem mit geschlossenem Luftvolumen untergebracht war und 97 Tage bei 6 ° C zusammen mit den Kontrollkulturen in 10 ml Falcon® Röhrchen. Der komplette Aufbau wurde für 40 h bei 30 ° C inkubiert. In den 50 ml Falcon®-Röhrchen waren die Kulturen in Kontakt mit 11 verschiedenen zu testenden HW Materialien und ein 50 ml Falcon®-Röhrchen ohne Testmaterial dienten als Kontrolle. Die Falcon®-Röhrchen waren für 90 Tage bei 6 ° C. Aus beiden Testproben wurde am Ende der Tests der pH-Wert der Kulturen bestimmt. Zusätzlich wurde ein spezieller pH-Test gestartet, um die Änderung des pH-Werts des zu bestimmen Bakterienkultur mit der Zeit, wenn sie 10 Tage bei 30 ° C inkubiert oder 90 Tage bei 6 ° C gelagert wird, gefolgt von 10 Tagen Inkubation bei 30 ° C. Die extremsten pH-Werte waren während der ersten 4 Tage der Inkubation bei 30 ° C des Wachstums und die Kultur von *S. typhimurium* reichte von pH 6,4 des reinen Wachstumsmediums bis pH 7,9. Variation zwischen den beiden getesteten Kulturen während der folgenden 7 Tage Inkubationsbereiche von einer Abnahme auf pH 7,3 bis zu einem endgültigen Maximalwert von 8,8. Alle gemessenen Chargen von Wachstumsmedien waren leicht sauer. Mit

der Zugabe von *S. typhimurium*, stellten sich die pH-Werte auf Werte nahe neutral (6,7, 30 ° C Test) und leicht basische Werte (7,3, 6 ° C) ein. Wie erwartet wurde nach 28 Tagen kein weiterer Anstieg des pH-Werts bei der Kultur, die bei 6 ° C mit geringer Stoffwechselaktivität gelagert war, gemessen. Im Gegensatz dazu steigt der pH-Wert der stoffwechselaktiven und bei 30 ° C inkubierten Proliferationskultur auf Grundwerte von bis zu pH 8,8 nach 11 Tagen an. Dieser pH-Wert kommt dem pH-Wert der Seife nahe (9,0 bis 10,0). Interessanterweise war der pH-Wert der Nacht Kulturen nur 6,0 und 6,4, obwohl diese Kulturen hoch metabolisch aktiv waren und sich auch vermehrten. Alle hier gemessenen Chargen von Wachstumsmedien waren leicht sauer. Mit der Zugabe von *S. typhimurium* änderten sich die pH-Wert auf Werte nahe neutral (6,7, 30 ° C Test) und leicht basische Werte (7,3, 6 ° C). Wie erwartet wurde nach 28 Tagen kein weiterer Anstieg des pH-Werts gemessen.

Kulturkammer (Culture Chamber CC) -Temperatur und Gas Bläschen Test

Das LUX in Space (LiS) -Experiment hängt von der Sauerstoffversorgung ab, z.B. wie in der ISS Luft verfügbar. O₂ wird einerseits für das Wachstum der Bakterienkultur, d. h. die Proliferation, der Bakterien und auf der anderen Seite für die Lumineszenzreaktion des Reportersystems des Experiments benötigt. Für das Experiment im Weltraum wird eine von *Salmonella typhimurium*-Kultur hochgeladen und bei 6 ° C gelagert, gefolgt von einer Inkubation in der Kulturkammern (CC) und Experiment Phasen in der Messkammern (Measuring Chamber: MC) bei 30 ° C. Messungen der optischen Dichte (OD) werden sowohl in der Kulturkammer (CC) als auch in der Kulturkammer (CC) durchgeführt. Auftretende Luftblasen stören die optische Messung. Entsprechende Tests auf eine mögliche Austrocknung und den Sauerstoffverbrauch der Kultur wurden bereits durchgeführt und es wurde am Ende des Tests eine Luftblase innerhalb des CC erkannt. Es wurde deshalb die Hypothese getestet, dass die Blase gebildet wurde, weil die CCs den Übergang von 6 ° C Lagerung bis 30 ° C Inkubation durchliefen. Die Löslichkeit von Gas im Wasser hängt von Temperatur und Druck ab. Die in Wasser gelöste Luftmenge nimmt mit dem Druck zu und mit der Temperatur ab. Theoretisch werden die CCs zu Beginn bei 30 ° C mit Medium / Kultur ohne gefüllt Blase, dann kalt bei 6 ° C und später beim erneuten Erhitzen auf 30 ° C für die Inkubation verstaut. Die Blase sollte nicht erscheinen, weil die ursprüngliche Löslichkeit zurückgesetzt wird. Im Gegensatz zu den Tests mit der CC, wurden die MCs während der Tests erwartungsgemäß immer bei 30 ° C gehalten für den Flug. Sie zeigten keine Blasen. Der Test wurde durchgeführt, um festzustellen, ob die Luftblase vermieden werden kann, indem vorgewärmte Kultur (30 ° C) in eine vorgewärmte CC in einer 30 ° C-Umgebung gefüllt wird. Nach Fertigstellung war der CC gründlich durch Membran und Fenster untersucht, aber es konnte keine Luftblase dokumentiert werden. Es war das Ziel des Temperatur- und Gasblasentests zu zeigen, dass das die Blasenbildung durch eine gleichmäßige Erhöhung der Fülltemperatur auf 30 ° C, der maximalen Temperatur der Inkubation, vermieden werden kann, um die Gesamtgaslöslichkeit im

Wachstum auf einer mittleren Konstante zu halten. Da dieses Ziel nicht erreicht wurde und sich eine eher größere, ausgeprägte Gasblase entwickelte, müssen der Grund und mögliche Vermeidungsstrategien (falls vorhanden) untersucht werden. Eine Erhöhung der Fülltemperatur allein reicht nicht aus.

Ein neues Verfahren zum Befüllen und Aufrechterhalten des CC mit Wasser zeigte keine Blasenbildung. Das von der Industrie vorgeschlagene CC-Füllverfahren wurde unter Verwendung einer aktiven *S. typhimurium* Kultur wie beschrieben getestet. Der beschriebene Test bestätigte das Füll- und Inkubationskonzept als erfolgreich. Keine Gasblase wurde nach Lagerung und Inkubation des mit einer aktiven *S. typhimurium* Kultur gefüllten CC nachgewiesen.

Zur Vorbereitung und Durchführung des Flugexperiments, sowie zur abschließenden Anpassung des SOS-Lux-Tests wurde ein H₂O₂ Sterilisationstest durchgeführt. Wiederholte Preflight-Tests werden im measuring chamber (MC) und der culture chamber (CC) mit aktiven Bakterienkulturen durchgeführt. Bei jedem Test müssen diese vollständig von den vorherigen Testkulturen und alle mögliche Kontamination durch andere Mikroorganismen befreit, also autoklaviert werden. Wiederholtes Autoklavieren führte zu einem Verlust der Flexibilität der zu- und abführenden Schläuche zu MC und CC. Deshalb wurde ein neues Sterilisationsverfahren von der Industrie zur Prüfung vorgeschlagen. Die für den Test verwendete Hardware wurde von der Industrie zur Verfügung gestellt und bestand aus dem MC mit kleinen Schlauchanschlüssen. Für die Anwendung des Tests wurde eine stationäre hochkonzentrierte *S. typhimurium*-Kultur (maximale Zellzahl) verwendet. Die vorgeschlagene Reihenfolge des Sterilisationsprozesses besteht darin, die Hardware in all ihren Flüssigkeitsleitungen (einzeln) mit folgenden Flüssigkeiten zu durchspülen:

- Sterilisiertes Wasser bei 60 ° C für mindestens 30 Minuten durch jede Flüssigkeitsleitung
- 7% Wasserstoffperoxid Lösung für 30 Minuten durch jede Flüssigkeitsleitung
- Sterilisiertes Wasser bei 60 ° C für mindestens 30 Minuten durch jede Flüssigkeitsleitung

Mit der zur Verfügung stehenden HW konnte das Verfahren wie vorgeschlagen nicht durchgeführt werden, da "Spülen"– verstanden als kontinuierlicher Durchfluss der Schläuche und Kammern – innerhalb einer Inkubationskammer bei 60 °C ohne ein automatisiertes System nicht möglich war. Darüber hinaus konnten die erforderlichen Mengen an sterilem Wasser und H₂O₂ nicht bereitgestellt werden. Stattdessen wurde ein Worst-Case-Szenario getestet: Eine Messkammer mit angeschlossenen Schläuchen wurde mit der *S. typhimurium* TA1535 pPLS-1 Kultur gefüllt und 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Kultur wurde entfernt und durch Plattieren und Koloniezählung die Zellkonzentration NO bestimmt.

- Der komplette MC mit angeschlossenen Schläuchen wurde mit 60 °C vorgewärmtem, sterilisiertem

- Wasser gefüllt, die Schläuche verschlossen und der komplette Aufbau bei 60 °C für 30 Minuten inkubiert.
- Das sterilisierte Wasser wurde entfernt und die koloniebildenden Einheiten (cfus) bestimmt. Die Hardware (HW) wurde mit 60 °C vorgewärmter 7%iger Wasserstoffperoxid Lösung gefüllt und weitere 30 Minuten bei 60 °C inkubiert.
- Die Wasserstoffperoxid Lösung wurde entfernt und die HW wieder mit 60 °C vorgewärmtem, sterilisiertem Wasser gefüllt und der komplette Aufbau bei 60 °C für 30 Minuten inkubiert.
- Das Wasser wurde entfernt und die cfus bestimmt, um zu beurteilen, wie erfolgreich das Sterilisationsverfahren war.

Im Gegensatz zum Spülen wurde ein kleineres Volumen von H₂O₂ für die Sterilisation verwendet und diese wurde nicht kontinuierlich durch frische Lösung ersetzt.

- Die vorgeschlagene Erwärmung auf 60 °C wurde durch die Handhabung selbst unterbrochen, d. h. die Befüllung und Entleerung des MC, die bei RT durchgeführt wurde, was nicht so schädlich ist, wie eine kontinuierliche Temperatur von 60 °C.

Parallel dazu wurde die H₂O₂-Sterilisationseffizienz in 15 ml Falcon-Reagenzgläsern mit verschiedenen endgültigen Wasserstoffperoxid Konzentrationen bei 37 °C ermittelt:

- *S. typhimurium* TA1535pPLS-1 Kulturen wurden in 15 ml Falcon Reagenzgefäßen angezüchtet, die Zellzahl für das Endvolumen, einschließlich H₂O₂ für N0 ermittelt und berechnet.
- Das entsprechende Volumen einer 30 % frischen H₂O₂-Lösung wurde hinzugefügt, um das Endkonzentration von 1 % bis 15 % zu erreichen.
- Nach kurzem Mischen wurde das Überleben durch cfu (Reaktionszeit 0 min) für alle H₂O₂ Konzentrationen bestimmt.
- Die Kulturen wurden bei RT für Zeiträume zwischen 5 und 45 Minuten inkubiert.
- Das Überleben wurde durch die CFU bestimmt und die Effizienz des H₂O₂ wurde bestimmt.

Dieses Verfahren wurde zusätzlich durchgeführt, um ein besseres Verständnis der Zeit-, Temperatur- und Konzentrationsabhängigkeit der Sterilisationswirkung von Wasserstoffperoxid zu erlangen.

Prüfergebnisse des H₂O₂-Sterilisationstests in Falcon-Reagenzgefäßen

Überleben von *S. typhimurium* inkubiert mit unterschiedlichen H₂O₂-Konzentrationen für die aufgeführten Inkubationszeiten bei RT in Falcon-Reagenzgefäßen, ermittelt durch Cfu-Zählung

des gewonnenen sterilisierten Wassers nach H₂O₂-Sterilisation, sowie entsprechend berechnete Sterilisationseffizienz in % sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Tabelle 6: H₂O₂-Sterilisationseffizienz in Abhängigkeit von Endkonzentration und Reaktionszeit

H ₂ O ₂ final concentration	Reaction time/ min	Start culture concentr ation No N/ml	Survival N/ml	Survival N/No	Sterilization efficiency
1%	0	3,4x10 ⁸	1,5x10 ⁸	4,41 x 10 ⁻¹	55,88 %
5	3,4x10 ⁸	0	0	100 %	
10	3,4x10 ⁸	0	0	100 %	
15	3,4x10 ⁸	0	0	100 %	
3,5%	0	4,2x10 ⁸	3,2x10 ⁶	7,62 x 10 ⁻³	99,24 %
5	4,2x10 ⁸	0	0	100 %	
10	4,2x10 ⁸	0	0	100 %	
15	4,2x10 ⁸	0	0	100 %	
7%	0	7,3x10 ⁸	0	0	100 %
5	7,3x10 ⁸	0	0	100 %	
10	7,3x10 ⁸	0	0	100 %	
15	7,3x10 ⁸	0	0	100 %	
7%	0	1,04x10 ⁹	0	0	100 %
15	1,04x10 ⁹	0	0	100 %	
30	1,04x10 ⁹	0	0	100 %	
45	1,04x10 ⁹	0	0	100 %	
10%	0	1,04x10 ⁹	0	0	100 %
15	1,04x10 ⁹	0	0	100 %	
30	1,04x10 ⁹	0	0	100 %	
45	1,04x10 ⁹	0	0	100 %	
15%	0	1,04x10 ⁹	0	0	100 %
15	1,04x10 ⁹	0	0	100 %	
30	1,04x10 ⁹	0	0	100 %	

45	1,04x10 ⁹	0	0	100 %	
----	----------------------	---	---	-------	--

Wasserstoffperoxid Konzentrationen von 7% und höher führen sofort zu einer Inaktivierung von 100%. 1 % und 3 % H₂O₂-Endkonzentration war nach 5 min Reaktionszeit 100 % wirksam bei RT.

Testergebnisse des H₂O₂-Sterilisationstests im MC

Inaktivierung der Bakterienkultur in der MC-Hardware nach Durchführung des Tests wie beschrieben mit Inkubation bei 60 °C ist in Tabelle 7 dargestellt. Zellenzahlen, in Form von CFUs, wurden für die individuell getesteten Schritte ermittelt.

Tabelle 7 Cfus der getesteten Schritte des Sterilisationsverfahrens von MC mit H₂O₂, wie in 2.2 beschrieben, Inkubation bei 60 °C

Start culture in CC cfu N/ml	Step 2 H2O before H2O2 sterilization, cfu N/ml	Step 4 H2O after H2O2 sterilization, cfu N/ml	Survival N/No	Sterilization efficiency
4,3 x 10 ⁸	3,9 x 10 ⁴	0	0	100 %

Unter Berücksichtigung aller oben beschriebenen Testergebnisse wurde der Test in der MC-Hardware wiederholt, aber mit a) alle Schritte und Inkubationen wurden bei RT durchgeführt und b) mit kurzen Inkubationszeiten von max. 5 min für das sterile Wasserwasserstoffperoxid. Dieser Test wurde durchgeführt, um ein schnelleres Sterilisationsverfahren zu testen, das einfach durchzuführen ist, falls es benötigt wird.

Nach dem zweiten Test bei RT wurde der MC mit Wachstumsmedium gefüllt und 2 Tage lang inkubiert bei 37 °C, um auf Wachstum zu prüfen. Nach dem Ausplattieren des Mediums wurde keine CFU festgestellt.

Alle Testergebnisse zeigen eine starke Inaktivierungswirkung von Wasserstoffperoxid auf den getesteten LiS Bakterienstamm *Salmonella typhimurium* TA1535pPLS-1. Das vorgeschlagene Sterilisationsverfahren wurde in einem MC mit leichten Abänderungen aufgrund von technischen Einschränkungen, die als weniger effektiv eingeschätzt werden, durchgeführt. Daher suggeriert das positive Ergebnis des Sterilisationsprozesses einen noch stärkeren Sterilisationseffekt als der des Originalverfahrens. Die mit dem MC HW durchgeführten Tests haben die Wirksamkeit der vorgeschlagenen Sterilisationsverfahren bewiesen. Die Ergebnisse des zweiten Tests mit dem

MC, der bei RT durchgeführt wurde, zeigen, dass nach Entfernung einer hoch konzentrierten Bakterienkultur, es sogar ausreicht, den MC zu reinigen, indem man ihn für 5 min mit sterilem H₂O, gefolgt von 5 min 7 % igem H₂O₂ und erneut 5 min sterilem H₂O bei RT einwirken lässt, um einen 100 % ige Reduktion der Zellen, d.h. eine Sterilisation von 100 % zu erreichen. Dies wird durch die Ergebnisse, die man mit verschiedenen H₂O₂-Konzentrationen und Inkubationszeiten in den Falcon-Reagenzgefäßen erhalten hat, stark unterstützt.

Das vorgeschlagene Sterilisationsverfahren ist hochwirksam und ausreichend, um die LiS HW zwischen den Experimenten zu reinigen.

LiS SRM UND EGSE TEST

Der Lux in Space-Teststamm *Salmonella enterica subsp. enterica* TA1535 (*Salmonella typhimurium*) TA1535 (DSM9274, aber ohne das Plasmid pSK1002), das mit dem Plasmid pPLS-1 transformiert ist, wird im Weltraum voraussichtlich

- bis zu 3 Monaten bei 6 °C bei niedriger Stoffwechselaktivität transportiert und gelagert
- an Bord bis zu 3 Tage bei 30 °C mit Proliferationsstoffwechsel der wachsenden Kulturen inkubiert
- mit kurzzeitigem UV-Strahlung bestrahlt
- bis zu 1 Tag bei 30 °C mit fortgesetztem Proliferations- und Reparaturstoffwechsel und zusätzlich mit der enzymatischen Lumineszenz Reaktion weiter inkubiert.

Lumineszenz und optische Dichte werden gemessen und die Daten analysiert.

Die Test-HW bestehend aus (Science Reference Modul) SrM, 8Electronic Ground Support Equipment) EGSE inklusive Laptops und Zusatzausrüstung, ist 2021 beim DLR eingetroffen. Als erstes wurde ein Test zum Sauerstoffverbrauch bei Langzeitlagerung gestartet. Nach erfolgreicher Installation der Proben und Medienbeutel in die hardware wurde das geschlossene SrM 1 Monat lang bei 6 °C im DLR gelagert

SrM-Test – aktive Phase

Der LiS EGSE wurde in der Nähe eines Infors HT pro Inkubator- bei 32 °C installiert. Der SrM wurde aus dem 6 °C gekühlten Kühlschrank in den Infors HT Inkubator überführt und an den EGSE angeschlossen. Im Anschluss wurde die automatische Testsequenz des aktiven Teils des SrM-Tests entsprechend der erwarteten Experimentsequenz im Weltraum gestartet. Der IAEC wurde in den Inkubator für den Temperatenausgleich gegeben. Die innere Behältertemperatur wurde von der EGSE überwacht Nach diesem Zeitraum wurde die durchgeführte Sequenz geschlossen, das SrM geöffnet und gereinigt. Die Daten wurden extrahiert und analysiert. Leider

waren die Daten nicht konsistent, um mit Sicherheit sagen zu können, dass die OD und Lumineszenz korrekt gemessen wurde. Die Rohdaten deuten auf ein Problem mit Dezimaltrennzeichen hin. Wenn Größenordnungen revalidiert worden sind, könnten die Werte konsistent sein. Darüber hinaus werden Hk-Daten des Ventil- und Pumpenstatus erneut untersucht. Die Daten wurden erneut analysiert und berechnet. Die von der IAEC gemessenen OD-Werte mussten noch mit den Laborwerten kalibriert werden, daher war nicht klar, bei welcher OD die Bestrahlung durchgeführt werden sollte. Die Entscheidung wurde getroffen, die Bestrahlung mit 100 und 250 Jm⁻² zu starten. Bei einer Leistung von 0,4 mW der LED betrugen die Bestrahlungszeiten für MC2 und MC3 250 bzw. 625 Sekunden. Für jeden Test werden frische Übernachtskulturen der Kulturen hergestellt, um die Identität und Funktionalität der *S.typhimurium* TA1535 pPLS-1 Kulturen zu bewerten.



SrM-Laborkontrolltest-Durchführung

Die o/N-Kultur wurde 1:20 verdünnt und auf ein OD490nm von 0,214 anwachsen gelassen. 150 µl der Kultur wurden in jede Vertiefung der Reihen A bis C und der Spalten 1 bis 12 einer schwarzen 96-Well-Mikrotiterplatte mit transparentem flachem Boden pipettiert. Um die DNA-Schäden und die Lumineszenz-reaktion zu induzieren, wurden alle Vertiefungen mit Ausnahme von Spalte 12, der unbestrahlten Negativkontrolle, mit einer UVC-Niederdruck-Quecksilberlampe bei 100 Wm⁻² mit bis zu 500 Jm⁻² bestrahlt. Das Mikrotiterplatten Layout mit den UVC-Fluenzen ist in Abbildung 10 dargestellt.

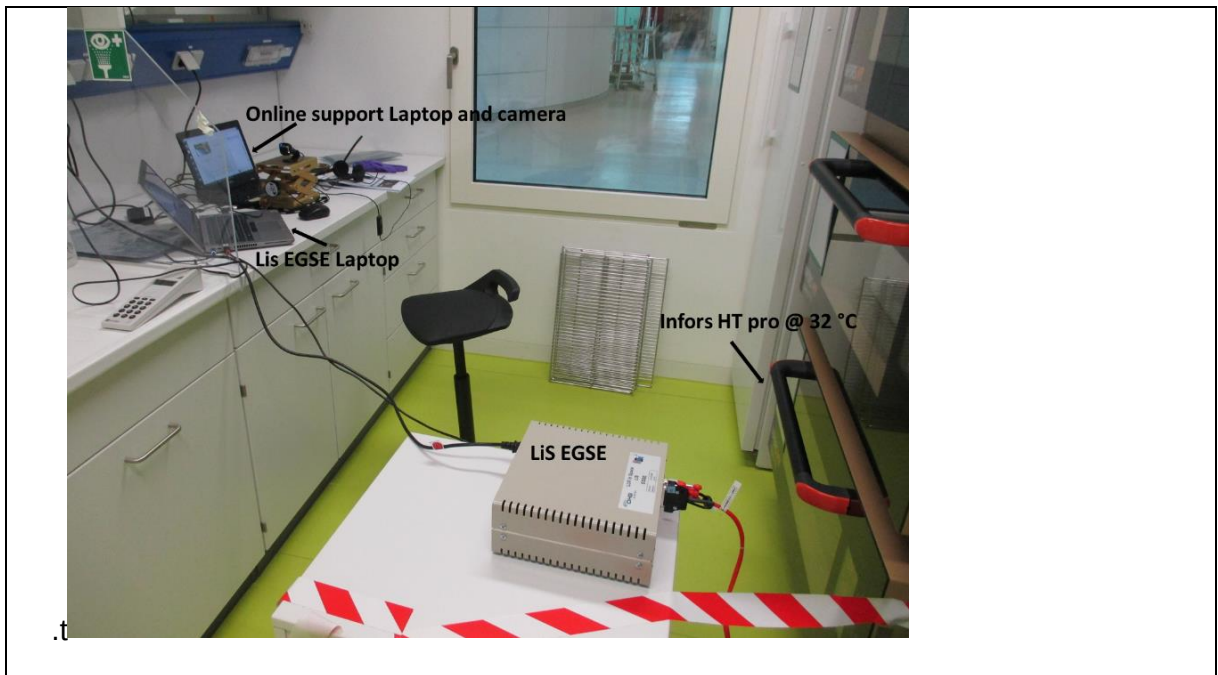


Abbildung 8: LiS SrM test -Aktive Phase

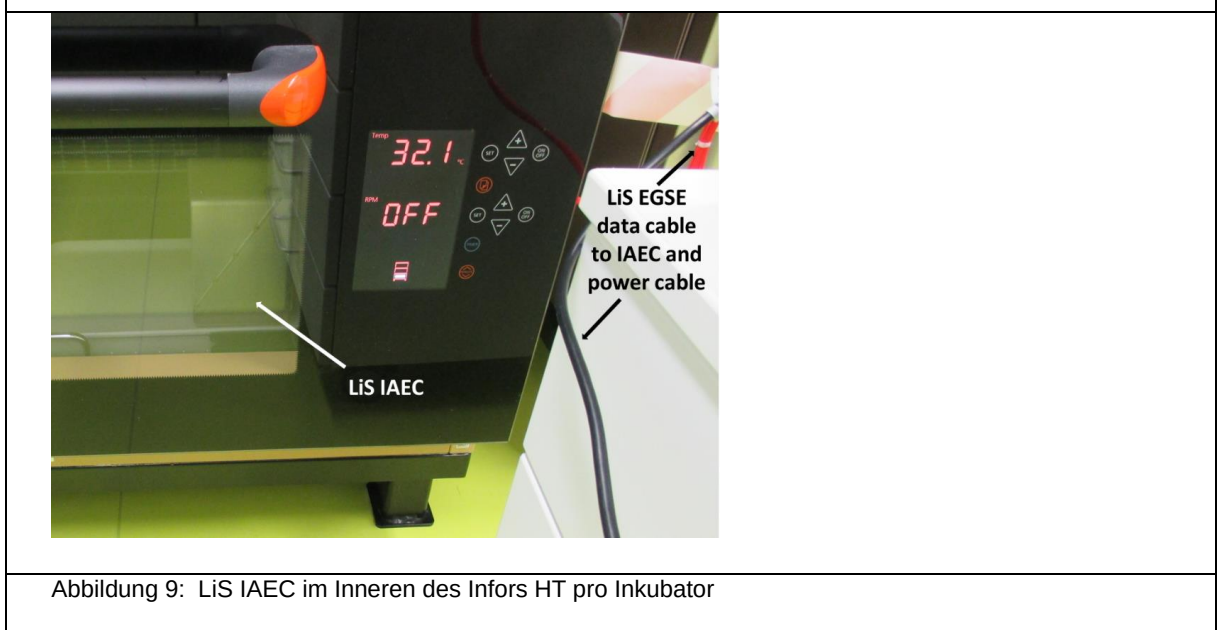
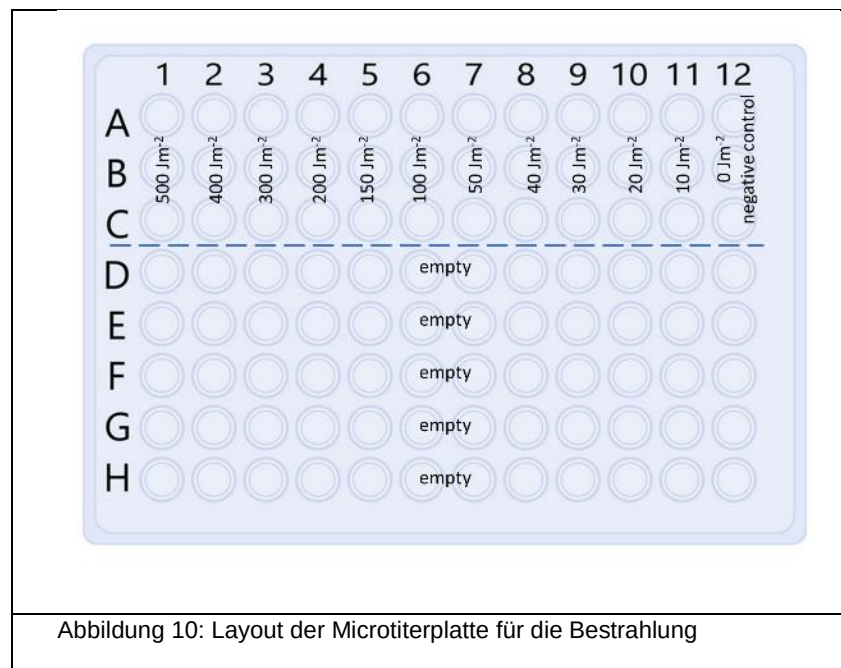


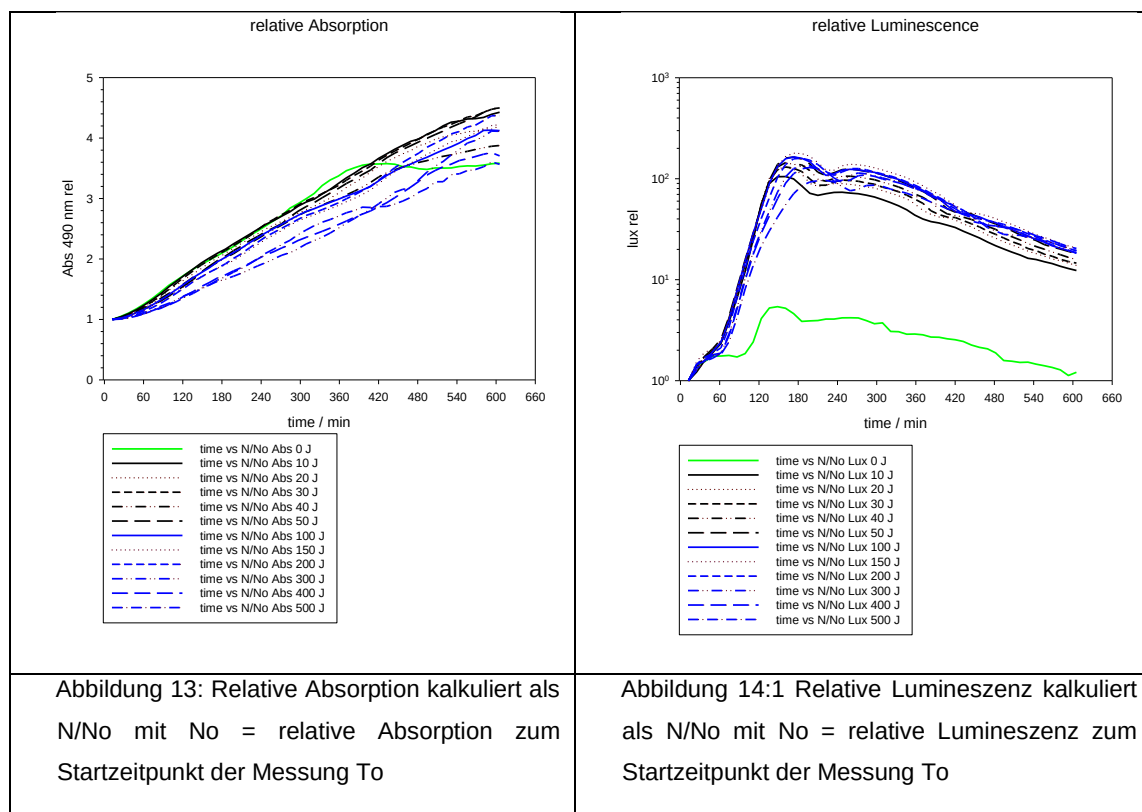
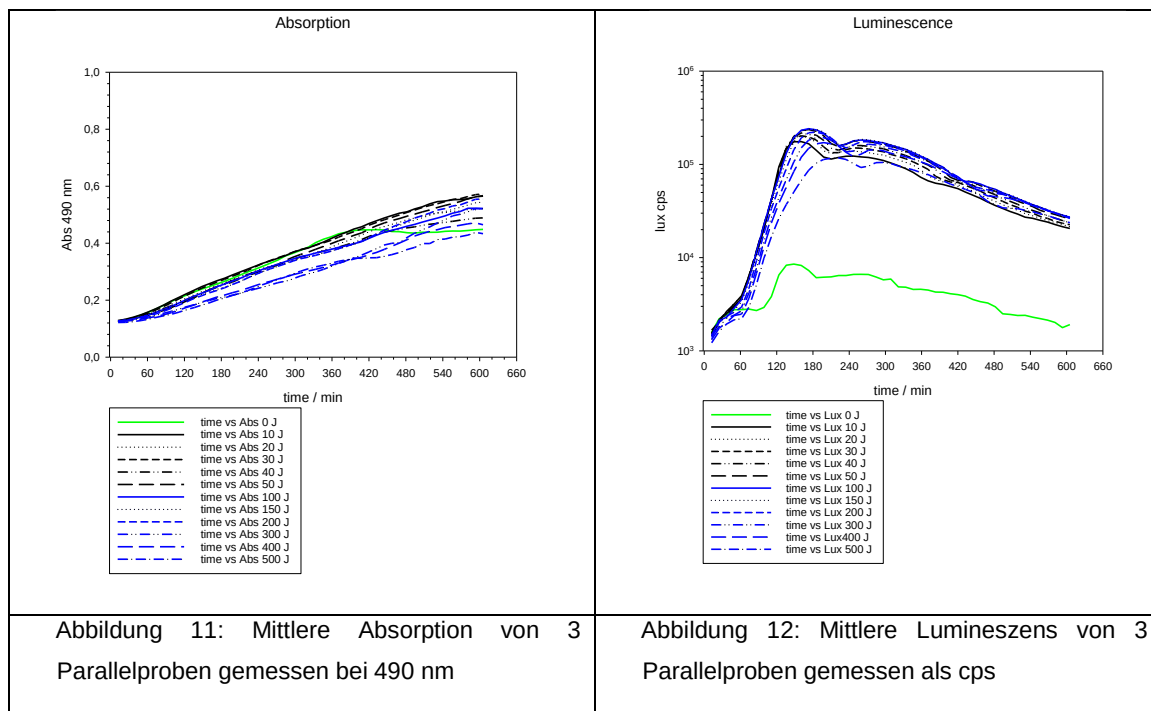
Abbildung 9: LiS IAEC im Inneren des Infors HT pro Inkubator

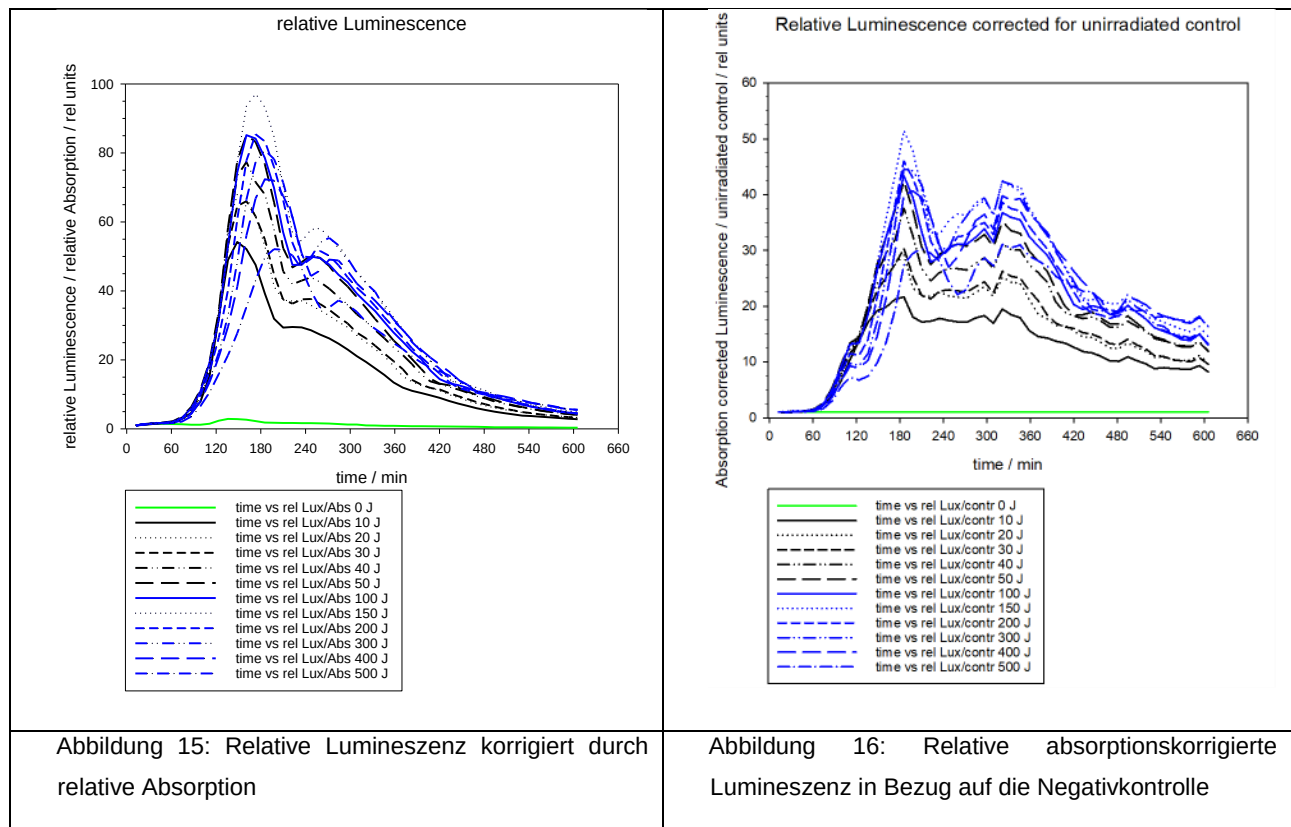
Nach der Bestrahlung wurde die Mikrotiterplatte in den Tecan infinite 200Pro überführt und die programmierte Messung gestartet. Am Ende des Messlaufs wurden die Daten ausgelesen und analysiert. Die Rohdaten der Lumineszenz Messungen in Abhängigkeit von Zeit und werden mit der exprimierten Hintergrundlumineszenz korrigiert, die sich aus einem niedrigen Niveau der konstitutiven Expression des LUX-Gens zum Zeitpunkt 0 und der Absorption ergibt. d.h. die Zellmenge, die zu Beginn der Messungen zum Zeitpunkt 0 zur Lumineszenz beiträgt. Schließlich wird die resultierende relative Lumineszenz Kinetik durch die jeweilige Zellzahlerhöhung korrigiert, was zu den Lumineszenz Werten aufgrund der Proliferation beiträgt. Drei parallele Proben, d.h. 3 parallele Vertiefungen, wurden gleichzeitig bestrahlt und die Daten gemittelt. Die Ergebnisse für jeden Analyseschritt sind unten dargestellt: Die resultierenden Daten sind in

Abbildung 11 für die Absorptionskinetik und in Abbildung 12 für die Lumineszenz Kinetik dargestellt. Um den relativen Anstieg von Absorption und Lumineszenz zu bestimmen, wurde der Mittelwert jedes Bestrahlungszeitwerts durch den entsprechenden Mittelwert zum Zeitpunkt 0 dividiert. Die resultierende Kinetik ist für Absorption bzw. Lumineszenz in Abbildung 15 bzw. Abbildung 16 dargestellt. Schließlich wurde die relative Lumineszenz Kinetik durch die jeweilige Absorptionskinetik korrigiert, um den Lumineszenz Anstieg aufgrund der Zellproliferation zu eliminieren.



Für die Lumineszenz Reaktion des *S. typhimurium* TA1535 pPLS-1 Stammes ist eine Faktor 2 Erhöhung der relativen Lumineszenz nach Behandlung im Vergleich zur relativen Lumineszenz ohne Behandlung (Negativkontrolle) wurde als Schwellenwert für die Induktion des Lux-Operons oberhalb der Hintergrundlumineszenz aufgrund induzierter DNA-Schädigung bestimmt, hier durch Anwendung von UVC-Strahlung im Bereich von 10 bis 500 Jm⁻². Die resultierende Kinetik relativ zur Negativkontrolle ist in Abbildung 16 dargestellt.





Der früheste mehr als 2-fache Anstieg der induzierten Lumineszenz in Bezug auf die negative unbestrahlte Kontrolle wurde nach 3707 sec (1 h 1 min 47 sec) für alle Bestrahlungen mit 10 Jm⁻² bis 200 Jm⁻² gemessen.

Die erfolgreiche Lumineszenzinduktion der für den SrM-Test verwendeten Kultur identifiziert den Stamm als das Plasmid pPLS-1 tragend, das die DNA-schädigenden induzierbaren Lumineszenzgene und -eigenschaften auf den Salmonella-Stamm überträgt, und zeigt die ordnungsgemäße Funktionalität dieser Gene und eine erforderliche (definierte) mehr als 2-fache Zunahme der relativen korrigierten Lumineszenz über die Hintergrundlumineszenz der unbestrahlten Proben als positives Ergebnis.

Lux in Space-LiS SRM und EGSE Test Bestrahlungstest

Dieser Bericht konzentriert sich auf den, der am 20.01.2022 nach dem SrM-Test mit den aus dem SrM entnommenen Proben durchgeführt wurde. Drei Übernachtskulturen (o/N) von *S. typhimurium* TA1535 pPLS-1 wurden in 15-ml-Falcon-Röhrchen in NB mit Ampicillin bis zur stationären Phase gezüchtet. Eine Kultur wurde für den SrM-Test Nr. 2 ausgewählt. Ein verbleibender Teil der Kultur wurde nach jeweils 16-stündigem Wachstum bei 30 °C wie im SrM zweimal 1:100 und ein drittes Mal 1:20 verdünnt, jedoch ohne Schütteln aufgrund des Mangels an Rotationsinkubatoren.

Das SrM wurde durch Befüllung und Installation der Mediumbeutel, Installation des Abfallbeutels und Befüllung der Kulturkammer CC vorbereitet. Dieser Test wurde ohne Kühlung

durchgeführt, beginnend mit der Temperaturäquilibration des SrM auf 30 °C, gesteuerten automatischen Verdünnungs- und Inkubationsschritten, Verteilung auf die 3 MC, Bestrahlung mit 100 Jm⁻² der Kultur in MC1 und 250 Jm⁻² in MC2, keine Bestrahlung in MC3 und schließlich der Biolumineszenztest. Während der einzelnen Phasen wurden Daten erhoben und analysiert. Die absoluten Absorptionswerte des SrM unterschieden sich von denen, die mit dem Laborfotospektrometer Jenway 7315 erhalten wurden, es wurden jedoch Wachstumskurven nach den Verdünnungsphasen verfolgt. Die Lumineszenzsignale waren ambivalenter, insbesondere der späte Anstieg der cps, gemessen in MC3, der unbestrahlten und daher nicht durch Lumineszenz induzierten Kontrolle. Daher wurde die Messung nach mehreren Stunden abgebrochen und das SrM geöffnet. Um zu berechnen, ob die Verdünnungen und Verteilung der Kultur korrekt durchgeführt wurden, muss Folgendes berücksichtigt werden: Das Volumen des Mediums und der Kulturen in den einzelnen Beuteln wurden nach der Extraktion nach Gewicht geschätzt. Aufgrund der ambivalenten Lumineszenzmessungen wurden die aus dem CC, dem Abfallbeutel und den drei MC1, MC2 und MC3 entnommenen Proben direkt für a verwendet, um die Daten besser zu verstehen und zu überprüfen, ob die Lumineszenz der Bakterienkultur durch UVC induzierbar war Lux-Assay mit der Laborausrüstung.

150 µl jeder Probe wurden in eine Mikrotiterplatte pipettiert. CC- und Abfallproben wurden in dreifacher Ausfertigung für zwei Bestrahlungsdosen von 100 und 250 Jm⁻² mit einer 254-nm-UVC-Lampe und einer unbestrahlten Kontrolle pipettiert. Proben aus dem MC wurden jeweils unverdünnt und in einer 1:1-Verdünnung pipettiert und mit 100 Jm⁻² bestrahlt. Darüber hinaus wurden sie parallel zur CFU-Zählung und zur Bestimmung der Überlebensrate ausplattiert.

Ergebnisse des Labor LiS Assays

Alle unbestrahlten Proben zeigen nur die Hintergrundlumineszenz, während die mittleren Proben und die 1:100-Verdünnung der MC1- und MC2-Proben keine O-Lumineszenz zeigen, was darauf hindeutet, dass die 1:100-MC1- und MC2-Proben entweder zu stark verdünnt oder inaktiviert waren in Bezug auf die Lumineszenz. Dieses Ergebnis wird auch durch die Absorptionsdaten gestützt, die keinen Anstieg und daher keine Proliferation dieser Proben zeigen.

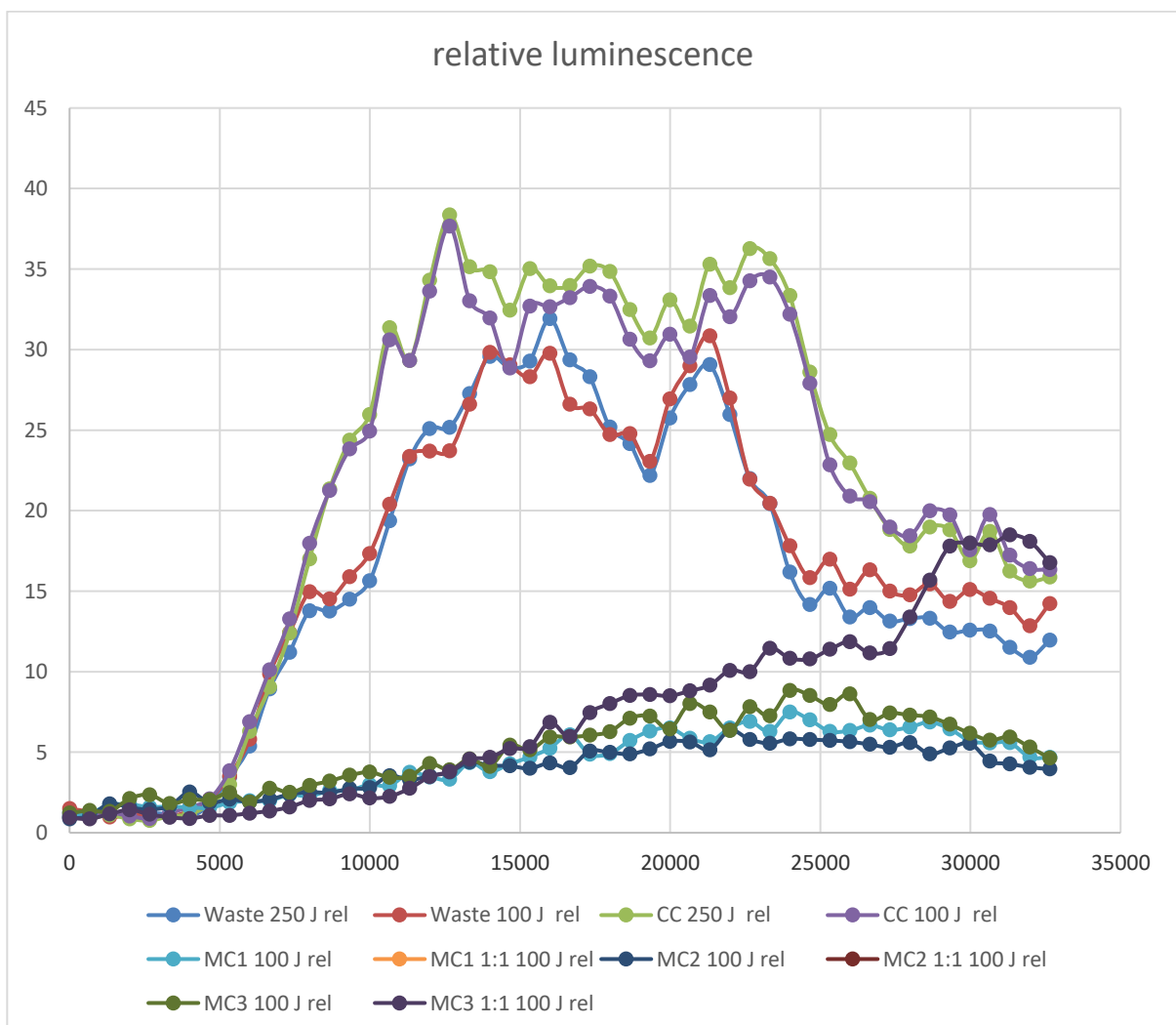
Die UV-induzierte Lumineszenz begann bei diesen Kulturen nach ca. 80 Minuten und eine „Spitzen-lumineszenz“ von 56893 cps wurde nach 12657 Sekunden (210 Min. 57 Sekunden oder 3 Stunden, 30 Minuten und 57 Sekunden) durch CC-Kulturen erreicht, die mit 100 Jm⁻² UVC-Bestrahlung induziert wurden, gefolgt von CC-Kulturen, die mit 250 Jm⁻² bestrahlt wurden nach 13323 Sekunden (222 Minuten 3 Sekunden oder 3 Stunden 42 Minuten 3 Sekunden) mit 56272 cps.

Ergebnisberechnung relative (korrigierte) Lumineszenz

Kulturen, die mit der Zeit eine zunehmende Absorption zeigen, d. h. wachsende Kulturen, erzeugen aufgrund der zunehmenden Zellzahl offensichtlich eine zunehmende Lumineszenz. Unterschiedliche Lumineszenzwerte zwischen Wells oder Kulturen können auch auf unterschiedliche Zellzahlen zurückzuführen sein. Daher wird die relative Lumineszenz berechnet, um die gemessene Lumineszenz mit der gemessenen Absorption zu korrigieren, um die durch DNA-Schäden induzierte Lumineszenz zu erreichen, und zwar unter Verwendung der Formel:

$$\text{Luxrel} = \text{Luxi} \times \text{Abs0} / \text{Lux0} \times \text{Absi}$$

wobei Luxi und Absi gemessene Werte induzierter, d. h. bestrahlter Proben sind, Lux0 und Abs0 sind Hintergrundwerte unbestrahlter Kontrollproben. Hier wurden keine unbestrahlten Werte für den MC angegeben, stattdessen wurde der Zeitpunkt 0 der Messungen für die Berechnungen verwendet. Die resultierenden Diagramme sind in untenstehender Abbildung 17 dargestellt. Die Lumineszenz- und Absorptionsdaten der Proben MC 1 1:100 und MC2 1:100 schwankten um Null mit häufigen negativen Werten, was zu keinen aussagekräftigen Berechnungen führte. Sie werden daher hier nicht dargestellt.



Bereinigt um die relativ geringe Proliferation und die daraus resultierende Zellzahl der MC1- und MC2-Proben erhöht sich die resultierende relative Lumineszenz nach etwa 15.000 Sekunden (250 Minuten oder 4 Stunden und 10 Minuten) auf eine fünffache Induktion. Diese ungewöhnlich langsam ansteigende Lumineszenz Induktion, die mit den anderen Ergebnissen interpretiert wird, könnte auf die geringe Zellzahl und die langsame Proliferation der Proben zurückzuführen sein.

Ergebnisse

Aliquote der gewonnenen Proben von MC1, MC2 und MC3 wurden seriell verdünnt und auf NB-Agarplatten ausplattiert. Nach der Inkubation wurden die resultierenden Kolonien gezählt und die CFU pro ml in den ursprünglich gewonnenen Proben berechnet.

Diskussion

- Absorption: Alle Proben mit Ausnahme der 1:100-Verdünnung mit frischem Medium der von MC1 und 2 abgeleiteten Proben erhöhten die Absorption während der 8-stündigen Messung, was auf wachsende lebende und Kulturen hinweist. MC1- und MC2-Proben zeigten nach einer 1:100-Verdünnung eine sehr geringe Absorption ähnlich dem Medium und kein Wachstum. Es ist sehr wahrscheinlich, dass die Verdünnung zu einer zu geringen Anzahl lebensfähiger Zellen geführt hat. Im Gegensatz dazu zeigten von MC3 abgeleitete Proben nach der Verdünnung eine höhere Absorption und eine ähnliche Wachstumskurve wie die drei unverdünnten MC-Proben, die auch eine ähnliche Start-OD aufwiesen. Der Grund für den Unterschied zwischen den verdünnten Proben ist unklar, ein Pipettierfehler kann nicht ausgeschlossen werden, obwohl MC3 1:100 offensichtlich im Vergleich zur unverdünnten MC3-Probe verdünnt war. Während die MC1- und MC3-Proben ein ähnliches Wachstum zeigten, wuchs MC2 viel schneller und erreichte einen höheren Endabsorptionswert. Im Gegensatz zu den MC-Proben zeigten die aus CC und Abfallbeuteln stammenden Proben alle einen steileren Anstieg der Absorption, was auf ein stärkeres Wachstum hin zu ähnlichen Endwerten hindeutet, allerdings beginnend bei einer geringeren Absorption, daher höchstwahrscheinlich eine geringere Zellzahl, die eher der des verdünnten MC3 1:100 entspricht. Die Absorptionskurven zeigen zumindest eine gewisse Lebensfähigkeit der Zellen aller entnommenen Proben nach dem SrM-Test. Sie zeigen auch, dass die MC-Proben im Vergleich zu den CC- und Abfall-Proben am Anfang alle eine Verzögerungsphase benötigen und langsamer wachsen. Warum das unverdünnte bestrahlte MC2 schneller wächst als das unbestrahlte MC3, bleibt unklar, insbesondere da das verdünnte unbestrahlte MC3 im Vergleich zu den verdünnten bestrahlten MC1 und MC2 ein besseres Wachstum zeigt.

- Lumineszenz: In Übereinstimmung mit den Absorptionsmessungen zeigten die CC-Proben und Abfallbeutelproben im Vergleich zu den unbestrahlten Proben eine starke Lumineszenzinduktion mit einer typischen Lumineszenzkurve. Ob die MC1-, MC2- und MC3-Proben durch die Bestrahlung induziert wurden oder nicht, ist schwer zu sagen. Mit der Zeit steigt die Lumineszenz über die relativen Lumineszenzwerte der unbestrahlten CC- und Abfallbeutelproben an. Absorptionskorrigierte Werte unterstützen die späte Lumineszenzinduktion.

- CFUs: Die gewonnenen lebensfähigen Zellen, die aus MC3 zählbare Kolonien bildeten, waren etwa 10.000 bzw. 1.000 Mal höher als die aus MC1 bzw. MC2 gewonnenen. Das könnte daran liegen, dass

- Bestrahlung, die die Zellen in MC1 und MC2 während des SrM-Tests Nr. 2 stark inaktiviert. MC 3 war im SrM unbestrahlt, daher wurden mehr lebensfähige Zellen gezählt
- Ungleichmäßige Verteilung der verdünnten Kultur vom CC auf die 3 MC.

Generell kann festgestellt werden, dass die für den SrM-Test #2 verwendete Kultur für den Test geeignet war. Der letzte Grund, warum während und nach dem Test in den gewonnenen Proben kein erwartetes Lumineszenzsignal vom MC beobachtet wurde, bleibt unklar.

Weitere Tests müssen durchgeführt werden, insbesondere mit einer definierten Zellzahl lumineszenzinduzierter Kulturen im MC sowie „off-line“ mit einer UV-LED ähnlich der im SrM.

Hier sind nur einige der im Projektzeitraum durchgeführten SrM Tests dargestellt, um den Rahmen dieses Schlussberichtes nicht zu sprengen. Für das SPICY Projekt sind bis zur Fluggelegenheit momentan voraussichtlich 2025 weitere Experimente zur abschließenden Anpassung des SOS-Lux-Tests, sowie zur Probenbereitstellung zur Durchführung des Flugexperiments auf der ISS und die Bearbeitung und Auswertung der Flug- und Bodenkontroll-Experiment Daten nach Erhalt geplant.

II.2. Eingehende Darstellung der wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Der Finanzierungsplan wurde während des Projektes eingehalten. Die Gesamtkosten im Projekt sind in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt.

Kostenart	Ausgaben (Euro)
Personalausgaben	233.209,71
Verbrauchsmaterial	8.551,92
Reisen Inland/Ausland	0,00
Gesamtausgaben Zuwendung	241.761,63

Detaillierte Angaben befinden sich im rechnerischen Teil des Verwendungsnachweises.

II.3. Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Zum Erreichen der innerhalb des Projektes geplanten Ziele war die geleistete Arbeit sowohl notwendig, als auch angemessen. Trotz der im Projekt aufgetretenen experimentellen und organisatorischen Verzögerungen und Veränderungen (Startterminverschiebungen der Missionen) konnte das Projekt fristgerecht beendet werden, oder wird zum Teil im Folgeprojekt SPICE weiterbearbeitet.

II.4. Eingehende Darstellung des voraussichtlichen Nutzens, insbesondere der Verwertbarkeit des Ergebnisses im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans

Das Teilprojekt *MEXEM*, das im Rahmen der Untersuchungen zu Planetary Protection und Extremophilen für künftige Weltraumprojekte und hier insbesondere für solche mit Landern auf anderen terrestrischen Planeten, z.B. dem Mars, wird wichtige Daten sowohl für die ESA, als auch für andere Wissenschaftler liefern. Hierunter fallen auch die allgemeine Entwicklung und Untersuchung von Schutzmaßnahmen für Mensch und Testsysteme im Weltraumeinsatz. Damit helfen die im Rahmen von SPICY erhaltenen Ergebnisse die Gefahr der Kontamination fremder Planeten und anderer Himmelskörper durch irdische Lebewesen besser einschätzen und vermeiden zu können. Nach Abschluss des Vorhabens sollen die gewonnenen Erkenntnisse weiterhin für die Personendosimetrie verwendet werden, d.h. zur Ermittlung der UV-Belastung als auch für die Belastung durch andere Strahlung bei langfristigen Aufenthalten im Weltraum oder den geplanten mehrjährigen Missionen z.B. zum Mars. Außerdem dienen sie dem Umwelt Monitoring z.B. von geschlossenen Systemen (*Lux in Space*). Darüber hinaus ist der im Rahmen des Projekts *Lux in Space* entwickelte Bioassay für pharmazeutische Firmen für die

genotoxische und zytotoxische Prüfung neu entwickelter Produkte oder auch zur allgemeinen Gewässerbeurteilung von Interesse.

II.5. Eingehende Darstellung des während der Durchführung des Vorhabens dem Zahlungsempfänger bekannt gewordenen Fortschritts auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

Der Zahlungsempfängerin sind im Verlauf des Bewilligungszeitraumes keine neuen Erkenntnisse zur Thematik der Toleranz gegenüber Weltraum-relevanten Stressfaktoren bei den getesteten Mikroorganismen bei anderen Stellen bekannt geworden.

II.6. Erfolgte oder geplante Veröffentlichungen des Ergebnisses nach Nr. 6.

Sowohl für IceCold, als auch für Lux in Space sind Veröffentlichungen geplant.

II.6.1 Publikationen

Im Rahmen dieses Projekts wurden keine Ergebnisse in Fachzeitschriften publiziert.

II.6.2 Vorträge und Poster

Im Rahmen dieses Projekts wurde das Poster mit dem Titel: Is the repair kinetics of radiation induced DNA damages influenced by microgravity? Preparation of the space experiment LUX-in-Space auf der DGLRM Tagung präsentiert. <https://orcid.org/0000-0002-6740-761X>

Literatur

- Achilles, C.N., Downs, R.T., Ming, D.W., Rampe, E.B., Morris, R.V., Treiman, A.H., Morrison, S.M., Blake, D.F., Vaniman, D.T., Ewing, R.C., Chipera, S.J., Yen, A.S., Bristow, T.F., Ehlmann, B.L., Gellert, R., Hazen, R.M., Fendrich, K.V., Craig, P.I., Grotzinger, J.P., Des Marais, D.J., Farmer, J.D., Sarrazin, P.C., Morookian, J.M. (2017) Mineralogy of an active eolian sediment from the Namib dune, Gale crater, Mars. J. Geophys. Res. 112, 2344–2361. <https://doi.org/10.1002/2017JE005262>.
- Allen, C., Morris, R.V., Jager, K.M., Golden, D.C., Lindstrom, D.J., Lindstrom, M.M., Lockwood, J.P. (1998) Martian regolith simulant JSC Mars-1. In: Proceedings of the Lunar and Planetary Science Conference, XXIX, 29 Abstract #1690.
- Archer Jr., P.D., Franz, H.B., Sutter, B., Arevalo Jr., R.D., Coll, P., Eigenbrode, J.L., Glavin, D.P., Jones, J.J., Leshin, L.A., Mahaffy, P.R., McAdam, A.C., McKay, C.P., Ming, D.W., Morris, R.V., Navarro-González, R., Niles, P., Pavlov, A., Squyres, S.W., Stern, J.C., Steele, A., Wray, J.J. (2014) Abundances and implications of volatilebearing

- species from evolved gas analysis of the Rocknest Aeolian deposit, Gale Crater, Mars. *J. Geophys. Res.* 119, 237–254. <https://doi.org/10.1002/2013JE004493>
- Bauermeister, A., Rettberg, P., Flemming, HC. (2013) Growth of the acidophilic iron–sulfur bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans* under Mars-like geochemical conditions, *Planetary and Space Science*, DOI: 10.1016/j.pss.2013.09.009. ISSN 0032-0633.
- Bish, D.L., Blake, D.V., Vaniman, D.T., Chipera, S.J., Morris, R.V., Ming, D.W., Treiman, A.H., Sarrazin, P., Morrison, S.M., Downs, R.T., Achilles, C.N., Yen, A.S., Bristow, T.F., Crisp, J.A., Morookian, J.M., Farmer, J.D., Rampe, E.B, Stolper, E.M., Spanovich, N., MSL Science Team. (2013) X-ray diffraction results from Mars science laboratory: mineralogy of rocknest at Gale Crater. *Science* 341, 1238932. <https://doi.org/10.1126/science.1238932>.
- Blake, D.F., Morris, R.V., Kocurek, G., Morrison, S.M., Downs, R.T., Bish, D., Ming, D.W., Edgett, K.S., Rubin, D., Goetz, W., Madsen, M.B., Sullivan, R., Gellert, R., Campbell, I., Treiman, A.H., McLennan, S.M., Yen, A.S., Grotzinger, J., Vaniman, D.T., Chipera, S.J., Achilles, C.N., Rampe, E.B., Sumner, D., Meslin, P.-Y., Maurice, S., Forni, O., Gasnault, O., Fisk, M., Schmidt, M., Mahaffy, P., Leshin, L.A., Glavin, D., Steele, A., Freissinet, C., Navarro-González, R., Yingst, R.A., Kah, L.C., Bridges, N., Lewis, K.W., Bristow, T.F., Farmer, J.D., Crism, J.A., Stolper, E.M., Des Marais, D.J., Sarrazin, P., MSL Science Team. (2013) Curiosity at Gale Crater, Mars: characterization and analysis of the rocknest sand shadow. *Science* 341, 1239505. <https://doi.org/10.1126/science.1239505>.
- Bowman, J. P., McCammon, S. A., Rea, S. M. and McMeekin, T. A. (2000). The microbial composition of three limnologically disparate hypersaline Antarctic lakes. *FEMS Microbiol Lett* 183(1): 81-88
- Cavicchioli, R. (2002) Extremophiles and the search for extraterrestrial life. *Astrobiology* 2:281-292.
- Cavicchioli, R. (2006) Cold-adapted archaea. *Nat Rev Microbiol* 4:331-443.
- Cannon KM, Britt DT, Smith TM, et al. Mars global simulant MGS-1: A Rocknest-based open standard for basaltic martian regolith simulants. *Icarus* 2019; 317:470–478
- de Vera J.-P. and the BIOMEX team. (2019) Limits of Life and the Habitability of Mars: The ESA Space Experiment BIOMEX on the ISS *Astrobiol*, 19 (2), DOI: 10.1089/ast.2018.1897
- Fairén AG, Davila AF, Lim D, Bramall N, Bonaccorsi R, Zavaleta J, Uceda ER, Stoker C, Wierzchos J, Dohm JM, Amils R, Andersen D, McKay CP (2010) Astrobiology through the ages of Mars: the study of terrestrial analogues to understand the habitability of Mars. *Astrobiology* 10:821-843
- Greenberg, R., G. V. Hoppa, B. R. Tufts, P. Geissler and J. Riley (1999). Chaos on Europa. *Icarus* 141(2): 263-286

- Greenberg, R.B., R. Tufts, P. Geissler and G. V. Hoppa (2002). Europa's Crust and Ocean: how Tides Create a Potentially Habitable Physical Setting. In: Gerda Horneck, Christa Baumstark-Khan (eds.), *Astrobiology, the Quest for the Conditions of Life*, 2002,
- Horneck, G. (1995) Exobiology, the study of the origin, evolution and distribution of life within the context of cosmic evolution: a review *Planetary and Space Science*, Volume 43, Issue 1, p. 189-217
- Horneck, G., Klaus, D. M. & Mancinelli, R. L. (2010) Space microbiology. *Microbiol Mol Biol Rev* 74 (1), 121-156
- Horneck, G., Bücker, H. and Reitz, G. (1994). Long term survival of bacterial spores in space. *Adv Space Res* 14(10): 41-45
- Jakosky, B.M. (2003) Subfreezing activity of microorganisms and the potential habitability of Mars' polar regions. *Astrobiology* 3:343-350.
- Jones EG, Lineweaver CH, Clarke JD (2011) An extensive phase space for the potential martian biosphere. *Astrobiology* 11:1017-1033
- Leshin, L.A., Mahaffy, P.R., Webster, C.R., Cabane, M., Coll, P., Conrad, P.G., Archer Jr., P.D., Atreya, S.K., Brunner, A.E., Buch, A., Eigenbrode, J.L., Flesch, G.J., Franz, H.B., Freissinet, C., Glavin, D.P., McAdam, A.C., Miller, K.E., Ming, D.W., Morris, R.V., Navarro-González, R., Niles, P.B., Owen, T., Pepin, R.O., Squyres, S., Steele, A., Stern, J.C., Summons, R.E., Sumer, D.Y., Sutter, B., Szopa, C., Teinturier, S., Trainer, M.G., Wray, J.J., Grotzinger, J.P., MSL Science Team. (2013) Volatile, isotope, and organic analysis of martian fines with the Mars curiosity rover. *Science* 341, 1238937. <https://doi.org/10.1126/science.1238937>.
- Mykytczuk, N. C., R. C. Wilhelm and L. G. Whyte (2012). *Planococcus halocryophilus* sp. nov., an extreme sub-zero species from high Arctic permafrost. *Int J Syst Evol Microbiol* 62(Pt 8): 1937-1944
- Mykytczuk, N. C., Foote, S. J., Omelon, C. R., Southam, G., Greer, C. W. and Whyte, L. G. (2013). Bacterial growth at -15 degrees C; molecular insights from the permafrost bacterium *Planococcus halocryophilus* Or1. *ISME J* 7(6): 1211-1226
- Mahaffy PR, Webster CR, Atreya SK, Franz H, Wong M, Conrad PG, Harpold D, Jones JJ, Leshin LA, Manning H, Owen T, Pepin RO, Squyres S, Trainer M; MSL Science Team (2013) Abundance and isotopic composition of gases in the Martian atmosphere from the Curiosity rover. *Science* 341:263-266
- Marion, G.M. et al. (2003) The search for life on Europa: limiting environmental factors, potential habitats, and Earth analogues. *Astrobiology* 3:785-811.
- Minitti, M.E., Kah, L.C., Yingst, R.A., Edgett, K.S., Anderson, R.C., Beegle, L.W., Carsten, J.L., Deen, R.G., Goetz, W., Hardgrove, C., Harker, D.E., Herkenhoff, K.E., Hurowitz, J.A., Jandura, L., Kenney, M.R., Kocurek, G., Krezoski, G.M., Kuhn, S.R., Limonadi,

- D., Lipkaman, L., Madsen, M.B., Olson, T.S., Robinson, M.L., Rowland, S.K., Rubin, D.M., Seybold, C., Schieber, J., Schmidt, M., Sumner, D.Y., Tompkins, V.V., Van Beek, J.J., Van Beek, T. (2013) MAHLI at the Rocknet sand shadow: science and scienceenabling activities. *J. Geophys. Res.*, 118, 2338–2360. <https://doi.org/10.1002/2013JE004426>.
- Mora, M., Wink, L., Kögler, I., Mahnert, A., Rettberg, P., Schwendner, P., Demets, R., Cockell, Ch., Alekhova, T., Klingl, A., Krause, R., Zolotariof, A., Alexandrova, A. & Moissl-Eichinger Ch. (2019). Space Station conditions are selective but do not alter microbial characteristics relevant to human health, *Nature Communications* volume 10, Article number: 3990
- Nicholson Wayne L. Fajardo-Cavazos P., Langenhorst F., Jay Melosh H. (2009) Bacterial Spores in Granite Survive Hypervelocity Launch by Spallation: Implications for Lithopanspermia. *Astrobiology*, 9(7), 647-657.
- Pappalardo, R. T., M. J. S. Belton, H. H. Breneman, M. H. Carr, C. R. Chapman, G. C. Collins, T. Denk, S. Fagents, P. E. Geissler, B. Giese, R. Greeley, R. Greenberg, J. W. Head, P. Helfenstein, G. Hoppa, S. D. Kadel, K. P. Klaasen, J. E. Klemaszewski, K. Magee, A. S. McEwen, J. M. Moore, W. B. Moore, G. Neukum, C. B. Phillips, L. M. Prockter, G. Schubert, D. A. Senske, R. J. Sullivan, B. R. Tufts, E. P. Turtle, R. Wagner and K. K. Williams (1999). Does Europa have a subsurface ocean? Evaluation of the geological evidence. *Journal of Geophysical Research-Planets* 104(E10): 24015-24055
- Rabbow, E., Parpart, A., and Reitz, G. (2016). The planetary and space simulation facilities at DLR Cologne. *Microgr. Sci. Technol.* 28, 215–229. doi: 10.1007/s12217-015-9448-7
- Rabbow, E., Rettberg, P., Baumstark-Khan, C., Horneck, G. (2003) The SOS-LUX-LAC-FLUORO-Toxicity-test on the International Space Station (ISS). *Adv Space Res.* 2003;31(6):1513-24
- Rabbow, E., Rettberg, P., Parpart, A., Panitz, C., Schulte, W., Molter, F., et al. (2017). EXPOSE-R2: the astrobiological ESA mission on board of the international space station. *Front. Microbiol.* 8:1533. doi: 10.3389/fmicb.2017.01533
- Rothschild, LJ, Mancinelli RL. (2001). Life in extreme environments. *Nature*. Feb 22; 409(6823), 1092-101.
- Sutter, B., McAdam, A.C., Mahaffy, P.R., Ming, D.W., Edgett, K.S., Rampe, E.B., Eigenbrode, J.L., Franz, H.B., Freissinet, C., Grotzinger, J.P., Steele, A., House, C.H., Archer Jr., P.D., Malespin, C.A., Navarro-González, R., Stern, J.C., Bell III, J.F., Calef, F.J., Gellert, R., Glavin, D.P., Thompson, L.M., Yen, A.S. (2017) Evolved gas analyses of sedimentary rocks and eolian sediment in Gale Crater, Mars: results of the curiosity

- rover's sample analysis at Mars (SAM) instrument from Yellowknife Bay to the Namib Dune. J. Geophys. Res. 122, 2564–2609. <https://doi.org/10.1002/2016JE005225>.
- Tamaru, Y., Takani, Y., Yoshida, T., & Sakamoto, T. (2005). Crucial role of extracellular polysaccharides in desiccation and freezing tolerance in the terrestrial cyanobacterium *Nostoc commune*. Appl Environ Microbiol, 71 (11), 7327-7333
- Taylor FW (2011) Comparative planetology, climatology and biology of Venus, Earth and Mars. Planet Space Sci 59:889-899
- Van Houdt, R. et al. (2012) Microbial contamination monitoring and control during human space missions. Planetary and Space Science 60:115-120.
- Westall F, Loizeau D, Foucher F, Bost N, Bertrand M, Vago J, Kminek G (2013) Habitability on Mars from a microbial point of view. Astrobiology 13:887-897
- Yasunaga, Kiyonari, Oikawa, Abe, Yoshikawa (2004). Evaluation of the Salmonella umu test with 83 NTP chemicals. Environ Mol Mutagen. 44 (4): 329–45. doi:10.1002/em.20053

III. Kurzfassung

Berichtsblatt (deutsch)

1. ISBN oder ISSN	2. Berichtsart (Schlussbericht oder Veröffentlichung) Schlussbericht, Projektstart 01.08.2020		
3. Titel Projekt: Stressresistenz von Mikroorganismen im Weltraum und in der Antarktis, als terrestrisches Analog Kurztitel: 'SPICY'; Fondsnummer des Klinikums Aachen 360874, Bundesministerium für Wirtschaft und Technologie BMW, Förderkennzeichen 50 WB 2038			
4. Autor(en) [Name(n), Vorname(n)] Dr.C.Panitz		5. Abschlussdatum des Vorhabens 31.07.2023	
		6. Veröffentlichungsdatum	
		7. Form der Publikation	
8. Durchführende Institution(en) (Name, Adresse) Uniklinik/RWTH Aachen Institut für Pharmakologie und Toxikologie Wendlingweg 2 52074 Aachen		9. Ber. Nr. Durchführende Institution Uniklinik/RWTH Aachen	
		10. Förderkennzeichen 50WB 2038, BMWi	
		11. Seitenzahl 51	
12. Fördernde Institution (Name, Adresse) Raumfahrtmanagement des Deutschen Zentrums für Luft- und Raumfahrt e.V. Königswinterer Str. 522-524 53227 Bonn		13. Literaturangaben 38	
		14. Tabellen 7	
		15. Abbildungen 19	
16. Zusätzliche Angaben Keine			
17. Vorgelegt bei (Titel, Ort, Datum)			
18. Kurzfassung Für das <i>MEXEM</i> konnten neue Erkenntnisse zur Trocknungs- und Strahlenresistenz der untersuchten aeroben und anaeroben Mikroorganismen gewonnen und somit erste für die Mission geeignete Kandidaten ermittelt werden. Für <i>IceCold</i> wurden Missionsvorbereitende Tests durchgeführt. Die Trocknung -und Temperaturreistenz der für die <i>IceCold</i> Mission ausgesuchten und getesteten Organismen erwiesen sich als Missionsgeeignet. Für <i>Lux in Space</i> konnte die abschließende Anpassung des SOS-Lux-Tests zur Durchführung und Auswertung von Flug- und Bodenexperiment und umfangreiche Tests mit dem Science Review Modell durchgeführt und diese angepasst werden. Nach Abschluss des Vorhabens sollen die gewonnenen Erkenntnisse weiterhin für die Personendosimetrie verwendet werden, zusätzlich zur UV-Belastung auch für die Belastung durch andere Strahlung, sowie für Umwelt Monitoring z.B. von geschlossenen Systemen.			
19. Schlagwörter Astrobiologie, Resistenz von Organismen und Organismensystemen gegenüber extraterrestrischer UV-Strahlung im Weltraum und unter Marsbedingungen, Anaerobe Mikroorganismen, Resistenz gegen Austrocknung mit anschließendem Wachstum nach langen Zeiträumen, Personendosimetrie			
20. Verlag		21. Preis	

Berichtsblatt (englisch)

1. ISBN or ISSN	2. type of document (e.g. report, publication) Final report. Project Start: 01.08.2020	
3. title Project: Stress resistance of microorganisms in space and Antarctica, as a terrestrial analogue Short title: 'SPICY'; Fund number of the Aachen Clinic 360874, Federal Ministry of Economics and Technology BMWi, funding code 50 WB 2038		
4. author(s) (family name, first name(s)) Dr.C.Panitz	5. end of project 31.07.2023	
	6. publication date	
	7. form of publication	
8. performing organization(s) (name, address) Uniklinik/RWTH Aachen Institut für Pharmakologie und Toxikologie Wendlingweg 2 52074 Aachen	9. originator's report no.	
	10. reference no. 50WB 2038, BMWi	
	11. no. of pages 51	
12. sponsoring agency (name, address) Raumfahrtmanagement des Deutschen Zentrums für Luft- und Raumfahrt e.V. Königswinterer Str. 522-524 53227 Bonn	13. no. of references 38	
	14. no. of tables 7	
	15. no. of figures 19	
16. supplementary notes		
17. presented at (title, place, date)		
18. abstract For <i>MEXEM</i> , new insights into the drying and radiation resistance of the aerobic and anaerobic microorganisms examined were gained and the first candidates suitable for the mission were identified. Mission preparatory testing was conducted for <i>IceCold</i> . The drying and temperature resistance of the organisms selected and tested for the <i>IceCold</i> Mission proves to be suitable for the mission. For <i>Lux in Space</i> , the final adaptation of the SOS-Lux test to carry out and evaluate flight and ground experiments and extensive tests with the Science Review model were carried out and adapted. After completion of the project, the knowledge gained will continue to be used for personal dosimetry, in addition to UV exposure, also for exposure to other radiation, as well as for environmental monitoring, e.g. of closed systems.		
19. keywords Astrobiology, resistance of organisms and organism systems to extraterrestrial UV radiation in space and under Martian conditions, anaerobic microorganisms, resistance to desiccation with subsequent growth after long periods of time, personal dosimetry		
20. publisher	21. price	

Anhang 1: Erfolgskontrollbericht

1. Beitrag des Ergebnisses zu den förderpolitischen Zielen

Das Vorhaben leistet einen Beitrag zum Projekt „, Kurztitel:“SPICY“ des Bundesministeriums für Wirtschaft und Technologie, BMWi, Förderkennzeichen 50 WB 2038, welches vom Deutschen Zentrum für Luft- und Raumfahrt koordiniert wird. Generell steht dabei die Bestimmung der Grenzen für Leben in einer extremen Umwelt, im Weltraum oder auf Planeten, unter besonderer Berücksichtigung der Parameter Vakuum, Marsatmosphäre und -UV Strahlung, extraterrestrische Strahlung, inklusive ionisierender Strahlung, sowie dem möglichen natürlichen Schutz vor diesen Faktoren im Mittelpunkt (MEXEM, ICE_xPOSE, IceCold). Die genaue Kenntnis der biologisch/ medizinischen Wirksamkeit der Weltraumstrahlung und die Erforschung der zellulären Ursachen der beobachteten synergistischen Wechselwirkung von Mikrogravitation und Weltraumstrahlung und deren enzymatischer Reparatur wird z.B. im Teilprojekt *Lux in Space* näher untersucht. Durch die verstärkten Weltraumaktivitäten staatlicher und privater Einrichtungen in verschiedenen Ländern wird eine zunehmende Zahl von Astronauten für längere Zeit im Weltraum leben und arbeiten. Daher ist es von größter Bedeutung, die notwendigen Grundkenntnisse über die Sicherheit ihrer Gesundheit und die Aufrechterhaltung ihrer Arbeitskraft auf Raumstationen und bei Aktivitäten im freien Weltraum zu vermitteln. Strahlung und Mikrogravitation sind Umweltfaktoren im Weltraum, die alle lebenden Organismen beeinflussen und am Boden nicht simuliert werden können. Das Experiment LUX-in-Space wird in der BIOLAB-Anlage auf der ISS durchgeführt, um den Einfluss der Mikrogravitation auf die DNA-Reparatur anhand eines einfachen, gut definierten bakteriellen Modellsystems aufzuklären

2. Wissenschaftlich-technisches Ergebnis des Vorhabens, die erreichten Nebenergebnisse und die gesammelten wesentlichen Erfahrungen

Am Ende des Förderzeitraums wurden durch diese Studie neue wissenschaftliche und technische Ergebnisse erreicht. Die im Rahmen dieses Berichts (Berichtsjahre 2020-2023) vorgestellten Ergebnisse lieferten Erkenntnisse zu:

Die folgenden wesentlichen Erfahrungen konnten im Verlauf des Projekts gewonnen werden:

- Für *MEXEM* konnten neue Erkenntnisse zur Trocknungs- und Strahlenresistenz der untersuchten Mikroorganismen gewonnen und somit erste für die Mission geeignete Kandidaten ermittelt werden.
- Für *IceCold* wurden weitere Versuche zur Vorbereitung der Mission zur Temperaturresistenz, Langzeitrocknung mit anschließendem Wachstum und Biokompatibilität der getesteten Organismen gegenüber den Materialien der verwendeten Hardware durchge-

führt. So konnten Ergebnisse zu den Missionskandidaten und der Inkompatibilität einzelner Hardware-materialien gewonnen werden. Außerdem konnten neue Erkenntnisse zu den neuen upload Bedingungen gewonnen werden.

- Für *Lux in Space* konnten die abschließende Anpassungstests des SOS-Lux-Tests zur Durchführung und Auswertung von Flug- und Bodenexperiment weitergeführt und damit die Missionsparameter optimiert werden.

3. Fortschreibung des Verwertungsplans

3.1 Erfindungen und Schutzrechtsanmeldungen

Erfindungen oder Schutzrechtsanmeldung fanden durch die Uniklinik/RWTH Aachen nicht statt.

3.2 Wirtschaftliche Erfolgsaussichten

Im Rahmen des Teilprojektes *Lux in Space* wurde in Zusammenarbeit mit der Industrie ein kleines, ISS-taugliches kombiniertes Luminometer und Photometer für die automatische Messung der Biolumineszenz in kleinen Volumina entwickelt. Ein derartiges Gerät kann zum einen auch für andere Anwendungen auf der ISS verwendet werden, zum anderen auch als kleines und damit transportables Gerät für Messungen der Lumineszenz und optischen Dichte in Freilandversuchen eine Anwendung finden, zum Beispiel bei Toxizitätsmessungen im Umwelt Monitoring (z.B. Gewässerbeurteilung) mit Leuchtbakterien. Die Ergebnisse dieses Projekts füllen darüber hinaus Kenntnislücken im Bereich der Identifizierung von Resistenz-mechanismen von Mikroorganismen gegenüber Austrocknung und ionisierender Strahlung. Generell bewegt sich dieses Projekt jedoch im Bereich der wissenschaftlichen Grundlagenforschung. Wirtschaftliche Erfolge sind daher zunächst nicht zu erwarten.

3.3 Wissenschaftliche und/oder technische Erfolgsaussichten nach Projektende

Innovative Schritte zur erfolgreichen Umsetzung der Vorhabens Ergebnisse werden im Bereich der Umweltforschung insbesondere im Hinblick auf Extremgebiete, in der Weltraumforschung für zukünftige Flugexperimente und zum besseren Schutz der Astronauten auf Langzeit-missionen z.B. zum Mars oder zum Mond erwartet.

3.4 Wissenschaftliche Anschlussfähigkeit für eine mögliche notwendige nächste Phase bzw. die nächsten innovatorischen Schritte zur erfolgreichen Umsetzung der Ergebnisse

Für das 21. Jahrhundert wird mit einer zunehmenden Zahl an Astronauten auf Langzeit-missionen z.B. zum Mars oder zum Mond gerechnet, die unter den Bedingungen der Schwerelosigkeit und der erhöhten Strahlenexposition arbeiten und leben werden. Für die Sicherheit

und den besseren Schutz dieser Astronauten, aber auch für die zu Forschungszwecken in den Weltraum transportierten lebenden Systeme muss die biologisch/ medizinische Wirksamkeit der Weltraumstrahlung unter Schwerelosigkeit und ihr Einfluss auf enzymatische Reparatursysteme aufgedeckt und erforscht sein. Die im Rahmen des Projekts SPICY erstellten Daten haben hierfür einen erheblichen Beitrag leisten können und sind damit von grundlegender wissenschaftlicher, als auch von wirtschaftlicher Bedeutung. Die genaue Definition der Einflüsse von Weltraumbedingungen ist notwendig für die Interpretation der Daten anderer unter diesen Bedingungen durchgeführter Arbeiten. Durch die Kooperation mit dem DLR Köln sowie internationalen Projektpartnern und dem damit verbundenen intensiven Austausch von Wissen ist die Möglichkeit zur wissenschaftlichen Anschlussfähigkeit gegeben.

4. Arbeiten, die zu keiner Lösung geführt haben

Es wurden keine Arbeiten, die zu keiner Lösung geführt haben durchgeführt.

5. Präsentationsmöglichkeiten für mögliche Nutzer

Die Ergebnisse dieses Projekts wurden bisher in mehrere Publikationen (siehe anhängende Publikationsliste) veröffentlicht. Interessierte Nutzer können die darin vorgestellten Daten für Präsentationen nutzen.

6. Einhaltung der Ausgaben- und Zeitplanung

Auch mit den Verschiebungen der Starttermine konnte der Zeitplan weitestgehend eingehalten werden. Zur Einhaltung der Ausgabenplanung siehe auch entsprechende Unterlagen der Drittmittelverwaltung der Uniklinik/RWTH Aachen.

Document Control Sheet

1. ISBN or ISSN	2. type of document (e.g. report, publication) Publication	
3. title Is the repair kinetics of radiation induced DNA damages influenced by microgravity? Preparation of the space experiment LUX-in-Space		
4.author(s) (family name, first name(s)) Petra Rettberg Kristina Beblo-Vranesetic Jens Hauslage Christine Hellweg Ruth Hemmersbach Corinna Panitz Johanna Piepjohn Elke Rabbow	5. end of project 31.07.2023	6. publication date 2023
	7. form of publication Poster	
	8. performing organization(s) (name, address) Uniklinik/RWTH Aachen Institut für Pharmakologie und Toxikologie Wendlingweg 2, 52074 Aachen, Germany	
	10. reference no. 50 WB 2038	11. no. of pages 1
12. sponsoring agency (name, address) Raumfahrtmanagement des Deutschen Zentrums für Luft- und Raumfahrt e.V. Königswinterer Str. 522-524 53227 Bonn	13. no. of references no	
	14. no. of tables n	
	15. no. of figures 6	
16. supplementary notes		
17. presented at (title, place, date) DGLRM Conference, Cologne,2023-- https://orcid.org/0000-0002-6740-761X		
18. abstract With the intensified space activities of governmental and private entities in different countries an increasing number of astronauts will live and work in space for prolonged times. Therefore, it is of uttermost importance to provide necessary basic knowledge concerning the safety of their health and the maintenance of their working power on space stations and during extravehicular activities in free space. Radiation and microgravity are environmental factors in space which influence all living organisms and which cannot be simulated on ground. The experiment LUX-in-Space will be performed in the BIOLAB facility on the ISS to elucidate the impact of microgravity on DNA repair using a simple well-defined bacterial model system.		
19. keywords LUX-in-Space, BIOLAB facility, ISS, impact of microgravity. DNA repair		
20. publisher	21. price	