ИЗВЕСТИЯ РАН. СЕРИЯ БИОЛОГИЧЕСКАЯ, 2021, № 6, с. 565–587

## ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ЭВОЛЮЦИОННАЯ БИОЛОГИЯ

УДК 574.23:574.24:595.3

## ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОГО ПОКОЯ ВОДНЫХ ОРГАНИЗМОВ В УСЛОВИЯХ ОТКРЫТОГО КОСМОСА И КОСМИЧЕСКОГО ПОЛЕТА

© 2021 г. В. Р. Алексеев<sup>@</sup>

Зоологический институт РАН, С.-Петербург, 199034 Россия <sup>@</sup>E-mail: alekseev@zin.ru Поступила в редакцию 21.07.2020 г. После доработки 18.09.2020 г. Принята к публикации 18.09.2020 г.

В космическом пространстве ультрафиолетовое и космическое излучение, большой диапазон высоких и низких температур, измененная сила гравитации, электромагнитные поля, вакуум и их сочетание определяют повреждающее воздействие на живые организмы и выступают в качестве барьера для их межпланетного распространения. В то же время биологический покой, известный у широкого круга бактерий, грибов, животных и растений, позволяет сохранить жизнеспособность их покоящимся стадиям в экстремальных условиях в течение длительного времени. С 2005 по 2016 гг. на МКС наряду с низшими организмами были протестированы покояшиеся стадии (пропагулы) многоклеточных животных и растений для оценки их способности выживать после длительного воздействия условий открытого космоса и космического полета. Среди более чем 40 исследованных видов около трети составляли покоящиеся стадии водных организмов (икра карпозубых рыб, эмбрионы дафний, покоящиеся яйца листоногих раков, остракод, диапаузирующие личинки двукрылых насекомых). Эксперименты проводили в рамках четырех исследовательских программ: 1) внутри станции МКС (программа АКВАРИУМ) с ограниченным набором исследованных видов; 2) за пределами станции в космическом пространстве, но без воздействия ультрафиолетового излучения (программа BIOR-ISK); 3) в модифицированных космических условиях, имитирующих поверхность Марса (программа EXPOSE-R): 4) в наземных экспериментах, в которых проведена лабораторная оценка воздействия космических факторов на покоящиеся стадии, а также изучение некоторых отдельно взятых факторов космического полета (например, нейтронного излучения). Были получены принципиально новые данные об устойчивости покоящихся стадий земных организмов к факторам космической среды, что изменило представления о возможности заноса земных форм жизни на другие планеты с космическими аппаратами и космонавтами.

*Ключевые слова:* диапауза, факторы космического полета, Международная космическая станция, межпланетный карантин, астробиология, гидробиология, микрогравитация, космическая радиация, ультрафиолет, магнитное поле, температурное воздействие, поиск внеземных форм жизни **DOI:** 10.31857/S1026347021060032

Состояние биологического покоя, позволяющее особым стадиям (пропагулам, спорам, цистам) длительное время переносить условия, несовместимые с активной жизнедеятельностью, известны практически у всех исследованных в этом отношении организмов (Данилевский, 1961; Алексеев, 1990; Alekseev, Starobogatov, 1996). Было установлено, что обезвоженные покоящиеся стадии тардиград выживают после многомесячного нахождения в активной зоне атомного реактора, диапаузирующие яйца кладоцер и копепод сотни лет сохраняют жизнеспособность в лишенных кислорода седиментах озер (Katajisto, 1996), яйца суданского щитня переносят нагревание песка в пустынях свыше 100°С, сперма многих видов позвоночных животных и цисты артемий сохраняют активность после многолетнего хранения в жидком

вестные из собственных экспериментов примеры высокой устойчивости пропагул водных организмов приближаются к условиям открытого космического пространства, что и позволило предложить их к экспериментам по нескольким программам на международной космической станции МКС (Alekseev *et al.*, 2007) Биологический покой у организмов различной степени организации от бактерий до рыб (табл. 1)

азоте (-196°С) (Алексеев, 1990; Алексеев, 2010;

Ramirez-Reveco et al., 2016; Wakayama et al., 2017).

В совокупности, описанные в литературе и из-

степени организации от бактерий до рыб (табл. 1) активно исследовали в экспериментальных условиях на МКС с 2005 по 2016 гг. как российские ученые (эксперименты АКВАРИУМ, BIORISK), так и совместно с исследовательскими группами ученых из Евросоюза и Японии (EXPOSE-R и

#### АЛЕКСЕЕВ

	Вид	Программа	Состояние	Способность выживания в космосе
	Daphnia magna	АКВАРИУМ, BIORISK-MSN, EXPOSE-R	Покоящиеся эмбрионы (зимние)	+
	Daphnia pulicaria	BIORISK-MSN	Покоящиеся эмбрионы (летние)	—
Низшие ракообразные	Streptocephalus torvicornis	АКВАРИУМ, BIORISK-MSN, EXPOSE-R	Покоящиеся эмбрионы	+
	Artemia franciscana	EXPOSE-R	Покоящиеся эмбрионы	+
	Artemia salina	BIORISK-MSN	Покоящиеся эмбрионы	+
	Chirocephalus sp.	BIORISK-MSN	Покоящиеся эмбрионы (обводненные)	—
	Triops cancriformis	BIORISK-MSN	Покоящиеся эмбрионы	+
	Eucypris ornata	BIORISK-MSN, EXPOSE-R	Покоящиеся эмбрионы	+
Рыбы	Nothobranchius guentheri	BIORISK-MSN	Сухая икра	_
Насекомые	Polypedilum vanderplanki	BIORISK-MSN, EXPOSE-R	Криптобиот. личинки	+

Таблица 1. Список видов водных организмов, участвовавших в российских экспериментах на МКС

EXPOSE-R2). Уделение особого внимания водным организмам было обусловлено как их большей эффективностью в рециклинге кислорода и других биогенных элементов в сравнении с наземной биотой (Шепелев, 1975), так и их повышенной защищенностью от повреждающих факторов среды (множественные протекторные оболочки, биохимические перестройки клеток при высыхании и промерзании, остановка эмбриогенеза на стадиях развития с неспециализированными клетками и т.д.) (Алексеев, 1990). Основные направления этих исследований на МКС были связаны с оценкой возможностей переноса земных форм жизни на другие планеты – межпланетарный карантин (Novikova et al., 2014; Orlov et al., 2017; Alekseev et al., 2019), а также создания экологических систем обеспечения жизнедеятельности человека при межпланетных перелетах и создания внеземных поселений (Alekseev et al., 2007; Baranov et al., 2009).

В обзоре рассматриваются наиболее важные результаты, как опубликованные, так и доложенные автором на крупных международных и специализированных космических конференциях. Проведенными исследованиями и обзорными публикациями было очерчено довольно значительное поле новых знаний, в получении которых российские исследователи, прежде всего из научных учреждений РАН и Роскосмоса, сыграли ведущую роль. Анализ полученных в экспериментах данных был проведен в обзоре по следующей схеме:

1) исследование воздействия факторов космического полета внутри космической станции (программа АКВАРИУМ);

2) исследование воздействия факторов космического полета открытого космоса, которое также разделяется на две группы по уровню соответствия внешним условиям:

 – эксперименты BIORISK, в которых не учитывалось воздействие УФ солнечного излучения, но хорошо воспроизводились все остальные негативные факторы, включая температурные;

 – эксперименты EXPOSE, позволившие оценить воздействие прямых солнечных лучей, но несколько смягчившие диапазон воздействующих температур.

Одновременно в каждом из разделов описывали результаты лабораторных оценок воздействия космических условий на исследованные организмы после их реактивации.

# ОБЗОР ИССЛЕДОВАННЫХ ОРГАНИЗМОВ И МЕТОДОВ ИХ ИЗУЧЕНИЯ

По своему происхождению исследованные покоящиеся стадии можно разделить на три группы:

1. Собранные из естественных популяций:

– три вида ракообразных *Daphnia magna* (Straus, 1820) (Cladocera, Daphniidae), *Streptoceph*-

alus torvicornis (Waga, 1842) (Anostraca, Streptocephalidae), Eucypris ornata (Müller, 1776) (Ostracoda. Cvprididae) и один вид одноклеточной водоросли Pediastrum duplex (Meyen, 1829) (Sphaeropleales, Hydrodictyaceae) из дафниевых прудов осетрового рыбоводного завода "Трудфронт" (Астраханская область, юг Европейской России, 46°00' с.ш. 47°30′ в.д.). Материал прошел естественную терминацию на протяжении 8 месяцев в полотняных мешках, обеспечивающих хорошую сохранность, газообмен и следование сезонному ходу температуры и атмосферной влажности. Этот метод хранения принят в осетровом хозяйстве и обеспечивает высокий уровень реактивации всех исследованных организмов. Проведенные лабораторные испытания материала в мае 2005 г. показали высокий уровень реактивации, достигающий у некоторых видов (D. magna) 90% от числа исследованных эмбрионов. Покоящиеся стадии D. magna и S. torvicornis были использованы во всех космических экспериментах, как внутри станции, так и вне ее, периодически обновляясь накануне отправления в космос. Покоящиеся цисты водоросли были использованы при комплектации биологической части программы ФОБОС-ГРУНТ;

– цисты Artemia salina (L., 1758) (Anostraca, Artemiidae) собранные осенью 2004 г. на соленых озерах полуострова Крым (район курорта Саки, 45°07′ с.ш. 33°35′ в.д.); после дегидратации (до 40% от исходной массы) в соответствии с технологией длительного хранения цисты этого вида находились в емкости, предотвращающей дальнейшую потерю влаги, в морозильной камере холодильника при температуре –18°С. Использованы в экспериментах BIORISK и ФОБОС-ГРУНТ;

- *Chirocephalus* sp. (Anostraca, Chirocephalidae). Временные водоемы Словении близ Любляны. были использованы в экспериментах BIORISK.

2. Лабораторные культуры, длительное время поддерживаемые для проведения экспериментов:

 Daphnia pulicaria (Forbes, 1893) (Cladocera, Daphniidae), лабораторный клон, воспроизводящий покоящиеся стадии без самцов. Происхождение – коллекция Института лимнологии Макса Планка, г. Плоен, Германия;

– икра карпозубых рыб Nothobranchius guentheri (Pfeffer, 1893) (Cyprinodontiformes, Nothobranchiidae), полученная из аквариумной культуры этого вида, длительное время поддерживаемая в Зоологическом институте РАН, С-Петербург, Россия. Изначальное место происхождения – временные водоемы саванны Северной Африки;

– диапаузирующие личинки *Polypedilum vanderplanki* (Hinton, 1951) (Diptera, Chironomidae) из личной коллекции профессора Т. Окуда (Институт шелководства, Япония). Изначальное место происхождения – наскальные водоемы Северной Африки. 3. Покоящиеся стадии, происхождение которых точно не установлено (приобретены в зоологических магазинах):

– *Triops cancriformis* (Bosc, 1801) (Notostraca, Triopsidae). Приобретен в Японии. Использовали в экспериментах BIORISK;

— Artemia franciscana (Kellogg, 1906) (Anostraca, Artemiidae). Коммерческая партия, произведенная и герметично упакованная в США (г. Солт-Лейк-Сити) и приобретенная в С-Петербурге. Отличалась высоким процентом реактивации при контрольной оценке (87%). Использовали в экспериментах EXPOSE.

В лаборатории после наземной оценки их способности к реактивации покоящиеся стадии упаковывали особым образом в зависимости от эксперимента.

В эксперименте АКВАРИУМ сухие покоящиеся стадии размещали на клейкую прозрачную ленту, установленную в виде специальных окон в картонных блоках, с двух сторон закрывали защитным листом бумаги и помешали в пластиковые герметично закупоренные пакеты. Каждый вид помещали в картонные блоки с тремя окошками (каждое площадью 1 дюйм<sup>2</sup>), содержащими наклеенные стадии. Для каждого вида было приготовлено не менее пяти блоков, которые затем были случайным образом разделены на пять групп: 1) для экспонирования на МКС в течение 1 месяца; 2) для экспонирования на МКС в течение 8 месяцев; 3) для лабораторного контроля, содержашегося в условиях сходных по температуре и влажности с таковыми на борту МКС; 4) для лабораторного контроля, соответствующего плохим условиям хранения (18-24°С, переменная влажность 75-95%, естественный ход освещения для широты  $60^{\circ}$  в период с июня по октябрь) и 5) для лабораторного контроля, соответствующего оптимуму по хранению (4°С, влажность 60%, темнота). Количество покоящихся эмбрионов в каждом из вариантов в целом зависело от размеров покоящихся стадий и составляло у дафний не менее 30 эмбрионов на вариант (42, в среднем), а у артемий не менее 500 (720, в среднем).

Для эксперимента BIORISK сухие покоящиеся стадии водных организмов помещали в воздухопроницаемые полотняные мешочки, а те, в свою очередь, — в пластиковые чашки Петри, плотно заклеенные по окружности, но имеющие в центре крышки отверстие для выхода воздуха, на которое также приклеивали бактериальный фильтр с размером пор 0.5 мкм. Количество покоящихся стадий зависело от их размера и составляло для икры рыб — 50, для эфиппиев дафний и яиц стрептацефалов — 250—300, а для цист артемий — 10—12 тыс.

**В экспериментах EXPOSE** покоящиеся стадии помещали в пластиковые пакеты размером 7 × 7 мм и 10 × 10 мм. Количество эмбрионов составляло

для дафний — 90—100, для артемий и щитня — не менее 1000. Пластиковые пакеты в земных условиях освобождали от избытка воздуха и герметично запаивали.

Основным методом оценки негативных эффектов космического полета была реактивация диапаузирующих стадий (реактивацию оценивали по количеству вылупившихся жизнеспособных особей). Использованные схемы реактивации зависели от требований биологии вида:

1) реактивация пресноводных видов беспозвоночных: дафнии, Eucypris ornata, S. torvicornis, Chirocephalus sp. Покоящиеся яйца каждого вида подсчитывали в каждом образце, после чего их переносили из пластиковых пакетов в чашки Петри объемом 10 мл, заливали аэрированной в течение 1 ч охлажденной водой (10-12°С) и помещали на двое суток в темную комнату с температурой 10°C для обводнения эмбрионов и синхронизации эмбрионального развития. После этой предварительной подготовки эмбрионы переносили в термостат с изменяющейся температурой (14–16°С в темновой фазе и 24-26°С в световой) и фотопериодом долгого дня (14 : 10). Это имитировало естественный световой и температурный режим весны — наиболее активной части сезона для реактивации эмбрионов. Чашки Петри проверяли дважды в день и всех реактивированных животных отбирали, снимали под микроскопом цифровой камерой, а затем использовали для экспериментов по выращиванию или для взвешивания на весах Сарториус с разрешением 0.0001 мг новорожденных, для чего их высушивали (при 60°С в течение 24 ч) до постоянного веса. Тестирование реактивации продолжалось не менее 3 дней после появления последнего новорожденного (обычно через 2-4 недели). Покоящиеся яйца в той же посуде затем возвращали в холодное (10°С) и темное помещение на 2 недели. После холодной обработки повторяли тот же цикл реактивации, и общее время реактивации составляло не менее одного месяца. Скорость реактивации (количество молоди, вылупившейся в данный день) и общее количество вылупившихся новорожденных за весь период наблюдения были рассчитаны, исходя из общего количества эмбрионов или покоящихся стадий в 8—16 повторностях. Эти показатели в эксперименте затем сравнивали с аналогичными данными в контроле со статистической оценкой достоверности различий.

2) для реактивации артемий была использована среда с содержанием 15‰ NaCl при 25°C и фотопериоде 14:10. Оценка реактивации начиналась уже на следующий день. Общая продолжительность наблюдений составляла не менее 1 месяца.

 при реактивации икры рыб икринки помещали в небольшие стеклянные аквариумы объемом 0.5 л, заполненные подогретой дождевой водой, и выдерживали в термостате при 25°С. Начало эмбрионального развития отслеживали с помощью бинокулярного микроскопа МБС-9 дважды в сутки на протяжении месяца.

Размер выборки при реактивации составлял для крупных эмбрионов (дафнии, *S. torvicornis, Chirocephalus* sp., *Eucypris ornata, N. guentheri* и *P. vanderplanki*) не менее 30, а для мелких (артемии) — не менее 200 в каждых из вариантов.

В ряде экспериментов эффект факторов космического полета оценивали также на показателях жизненного цикла потомства, выведенного от экспонированных на МКС эмбрионов двух поколений. Эти эксперименты проводили на базе Института лимнологии Макса Планка, в котором контролировали температурные, газовые и пищевые условия.

Дафнии и жаброноги культивировали группами по 4–6 особей в проточных сосудах объемом 250 мл (Lampert *et al.*, 1988) при скорости потока воды, содержащей взвешенные водоросли, 1 л/сут в условиях постоянного питания и фотопериода при температуре 25°С. Ракообразных кормили зеленой водорослью *Scenedesmus obliquus* (линия SAG 276-3a, коллекция водорослей Goettingen), выращенной в хемостате с модифицированной средой CHU-12 (Muller, 1972) с постоянной скоростью 0.7 л/сут для поддержания одинакового качества пищи на протяжении всех экспериментов.

Эксперимент по выращиванию начинался с помещения новорожденных в условия высокой пищевой концентрации (1 мг С/л) с длинными фотопериодами (14 ч света) и короткими фотопериодами (10 ч света). Пищевую среду обновляли каждое утро, а животных проверяли дважды в день. После того как самки отложили свою первую кладку, было зарегистрировано время, подсчитано число новорожденных (размер первой кладки) и определена средняя сухая масса новорожденных. Самок культивировали в этих условиях до тех пор, пока они не откладывали вторую кладку яиц в выводковую сумку, затем их высушивали и взвешивали. Для расчета соматического роста использовали массу новорожденного и конечную массу самки. Несколько самок из контрольной группы и группы, подвергшейся воздействию факторов МКС, были использованы для получения третьей кладки, из которой новорожденных затем выращивали в тех же условиях, в которых их матери откладывали яйца. После созревания у них определяли пол. размер и сухую массу. Данные первоначально оценивались на нормальность распределения, а затем для оценки достоверности различий в зависимости от типа распределения использовались либо *t*-test, либо непараметрические индексы (Mann–Whitney test). Дисперсионный анализ результатов проводился с применением процедуры ANOVA. Оценка статистических параметров полученных результатов производилась на основе компьютерной программы Statistica-6.

Следует указать, что эксперименты BIORISK и EXPOSE оценивались только по параметрам реактивации. Сопоставление различных, использованных в эксперименте параметров жизненного цикла (количество новорожденной молоди, сухой вес самок, начало первого размножения и т.п.) показало, что реактивация является наиболее удобным и информативным индикатором негативного воздействия факторов космического полета на покоящиеся стадии водных организмов. Наряду с тем, что воспроизвести условия культивирования, аналогичные лаборатории Института лимнологии Макса Планка (проточные культуры со строго контролируемой калорийностью пищи) не представлялось возможным, реактивация покоящихся стадий оказалась оптимальным для исследования параметром и была использована для всех последующих экспериментов BIORISK и EXPOSE.

#### ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ВНУТРИКОРАБЕЛЬНЫХ ФАКТОРОВ КОСМИЧЕСКОГО ПОЛЕТА (ЭКСПЕРИМЕНТ АКВАРИУМ)

Эксперимент АКВАРИУМ – длительная экспозиция обезвоженных стадий покоя ракообразных внутри космической станции, — стал первым исследованием по оценке влияния факторов космического полета на протекание диапаузы и параметры жизненного шикла при культивировании в земных условиях животных организмов (Alekseev, Sychev 2006; Сычев и др., 2007). Это исследование было проведено с целью разработки новой технологии создания и транспортировки искусственной водной экосистемы для использования вне биосферы Земли (Alekseev et al., 2007). Поддержание жизнеспособности стадий покоя водных животных и растений в космических условиях должно стать важной частью такой биотехнологии. Исследовались реактивация эмбрионов и параметры жизненных цикла у двух видов ракообразных – Daphnia magna и Streptocephalus torvicornis – во время космического полета после 1, и 8-мес. экспозиции их высушенных покоящихся яиц в российском сегменте МКС. В служебном модуле МКС конверты с покоящимися стадиями помещались в прободержатель установки "Растения-2" в контролируемом световом, радиационном и температурном режимах вблизи микротеплицы "Лада" (рис. 1).

После 30 дней пребывания на орбите образцы первой группы были доставлены обратно на Землю и параллельно с контрольными образцами в течение трех дней доставлены в Лабораторию экологической физиологии Института лимнологии им. Макса Планка (Плоен, Германия) для де-

ИЗВЕСТИЯ РАН. СЕРИЯ БИОЛОГИЧЕСКАЯ № 6

2021

тального анализа реактивации и продуктивного потенциала этих двух видов. Все образцы находились в герметично упакованных полиэтиленовых пакетах, что исключало их обводнение за счет атмосферной влаги.

Оценка реактивации и параметров жизненного цикла Daphnia magna после космического полета. Выход молоди *D. magna* из обработанных на МКС эфиппиев и из контрольной группы начался одновременно, на третий день после их перемещения с 10 на 25°С (пятый день после начала активации) и на пятый день (седьмой день после начала активации) для эмбрионов, содержавшихся в заведомо неблагоприятных условиях (рис. 2). Средние показатели реактивации составили 39.6% у экспонированных на МКС эмбрионов и достоверно выше (51.8%) в контрольной группе при расчете на основе числа эфиппиев (Alekseev et al., 2019). Помимо различий в уровне реактивации и продолжительности этого процесса, испытуемые группы также различались по динамике сухой массы новорожденных (рис. 3). В контрольной группе (наземной) сухая масса новорожденных в начале периода вылупления (1-3 дни) была достоверно ниже, чем в середине процесса (4-5 дни). У экспонировавшихся на МКС эмбрионов обнаружилась противоположная динамика сухой массы новорожденных. Фактически, в контрольной группе первыми вылупились новорожденные с низкой сухой массой, т.е. более слабые  $(0.0046 \pm 0.00047 \text{ мг})$ , тогда как в группе, экспонировавшейся на МКС, первыми появлялись самые крупные эмбрионы (массой 0.0056 ± 0.00034 мг) – самые сильные. В середине периода вылупления в контрольной группе были обнаружены более крупные новорожденные особи (массой  $0.0061 \pm 0.000418$  мг), чем в группе, экспонированной на МКС (массой 0.0047 ± 0.000579 мг) (Alekseev et al., 2019). По-видимому, на МКС эмбрионы D. magna были подвержены воздействию негативного фактора или набора факторов, которые подавляли их жизненные способности (своего рода стресс, вызванный космическим полетом), поэтому самые слабые эмбрионы с меньшим весом не могли вылупиться первыми, и их место в группе МКС было занято крупными новорожденными, которые, возможно, также имели подавленную, но все еще достаточную жизненную способность вылупляться из своих оболочек.

При оценке воздействия факторов космического полета на параметры жизненного цикла *D. magna* (время выхода первой кладки, выживаемость до созревания, размер первой кладки, масса новорожденных первой кладки, сухая масса самок в возрасте выхода второй кладки, возможное влияние матери на пол у потомства) был обнаружен значительный эффект от пребывания покоящихся яиц в сухом состоянии на МКС на два из этих параметров (табл. 2). Размер первой кладки у са-







**Рис. 1.** Программа АКВАРИУМ. а – Искусственный пруд для выращивания дафний, откуда брался материал; б – картонные блоки с покоящимися эмбрионами, помещенные в герметичные пластиковые пакеты; в – прободержатель размещен рядом с блоком "Растения" (положение показывает стрелка); г – культивирование дафний в Институте лимнологии Макса Планка (Германия).

мок, рожденных от экспонированных на МКС эмбрионов (11.14  $\pm$  3.592 яйца на особь), был достоверно меньше, чем в контрольной группе (14.39  $\pm$  2.847 яйца на особь). Небольшое, но также значимое различие было обнаружено для времени созревания, которое было больше у самок, полученных из эмбрионов, подвергшихся воздействию факторов МКС (10.31  $\pm$  0.372 сут), чем у контрольных животных (9.95  $\pm$  0.284 сут) (Алексеев и др., 2011). Оба эти параметра очень важны для динамики популяции дафний (Lynch, 1980). Они в основном отвечают за приспособленность популяции или клонов к условиям окружающей среды, а также играют ключевую роль в их продуктивности, как в условиях культуры, так и в природе (Ebert, 1993). Не было обнаружено различий между группами с МКС и контрольной группой с точки зрения выживания до созревания, массы новорожденных и массы самок (Alekseev *et al.*, 2019).

Для оценки гипотезы о более низкой жизненной способности у эмбрионов *D. magna*, подвергшихся воздействию факторов MKC (по сравнению с контрольными эмбрионами) была исследована резистентность эмбрионов *D. magna*, экспонированных в космосе, (параллельно с кон-



**Рис. 2.** Реактивация *Daphnia magna* в контроле и после полета.

тролем) к инвазии грибкового паразита *Pythium daphnidarum* Petersen, 1910 (рис. 4). В качестве референтной внешней группы использовались эмбрионы *D. magna* с искусственно подавленным уровнем реактивации (т.е. сниженным процентом реактивированных эмбрионов в контрольных образцах). Эту контрольную группу содержали в неблагоприятных условиях (при высокой температуре, при постоянном освещении и сухом воздухе) в течение 6 мес. Для характеристики резистентности к паразиту использовались два параметра:

1) интенсивность заражения, рассчитываемая как число яиц, зараженных паразитом, выраженное в процентах; и 2) распространение инвазии, рассчитываемое как число повторностей, в которых наблюдалось заражение паразитом, выраженное в процентах (рис. 5). Две группы эмбрионов *D. magna*, подвергшихся воздействию экспонирования на орбите показали более высокую чувствительность к инвазии паразитов, чем эмбрионы из контрольной группы. Наименьшая резистентность обнаружена у эмбрионов с пониженной скоростью



Рис. 3. Сухой вес новорожденных дафний после полета и в контроле.

реактивации, вызванной неблагоприятными условиями хранения на Земле. Что касается интенсивности заражения, образцы, подвергшиеся воздействию факторов МКС, были ближе, чем контрольные образцы, к эмбрионам с подавленной скоростью реактивации. Устойчивость эмбрионов *D. magna* к инвазии паразитами была в 1.43 раза ниже в группе, экспонировавшейся на МКС, чем в контроле, что возможно, соответствует уровню снижения жизненной способности эмбрионов, вызванной космическим фактором (Alekseev *et al.*, 2019).

Были прослежены рост и развитие потомства (третьей кладки) самок *D. magna* из покоящихся яиц, подвергнутых воздействию космического полета, в сравнении с содержавшимися в лабораторных условиях в виде диапаузирующих эмбрионов. Обнаружилось радикальное различие в половой принадлежности у этих потомков между группой МКС и контролем. Все пять повторностей от потомства самок, подвергшихся воздействию факторов МКС, содержали высокую долю самцов от 30 до 78% (в среднем, 54.9 ± 25.94%) (рис. 6). Среди потомства

			-	-	·				
		Конт	гроль		МКС				
	эксперимент І		эксперимент II		эксперимент I		эксперимент II		
	μ	σ	μ	σ	μ	σ	μ	σ	
Сухая масса самок, мг	0.3837	0.0254	0.3366	0.0280	0.3918	0.0635	0.2549	0.0512	
Длина самок, мм	3.0937	0.1364	3.1307	0.1605	3.4970	0.1593	3.0560	0.0919	
Общий размер первой кладки	67.20	16.08	70.00	10.22	49.00	17.47	56.00	16.57	
у 5 самок, шт.									
Сухая масса новорожд., мг	0.0073	0.0005	0.0073	0.0006	0.0084	0.0016	0.0063	0.0006	
Выживание, %	96.00	8.94	96.00	8.94	90.00	11.55	100.00	0.00	
Время созревания, сут	9.80	0.27	10.10	0.22	10.63	0.25	10.00	0.00	

**Таблица 2.** Средние величины (μ) и стандартное отклонение (σ) параметров жизненного цикла у особей полученных от эмбрионов *D. magna* экспонированных на МКС и содержащихся в лаборатории (Алексеев и др., 2011)



572

**Рис. 4.** Паразитический гриб *Pythium daphnidarum*, поразивший экспонировавшийся на МКС эмбрион *Daphnia magna*.

контрольной группы, выращенного в тех же условиях, не появилось ни одного самца (Alekseev *et al.*, 2019).

Известно, что переход от партеногенеза к бисексуальному размножению, особенно у дафний, является реакцией на стрессовые факторы окружающей среды различного происхождения, такие как снижение доступности пищи, изменения фотопериода и сигнальных метаболитов, резкие колебания температуры (Glazier, 1992). В описанных выше экспериментах условия культивирования, используемые для групп с МКС и контрольных, были эквивалентными, стабильными и благоприятными для партеногенеза в течение, по меньшей мере, двух последующих поколений. Единственное отчетливо видимое различие между ними состояло в условиях нахождения диапаузирующих эмбрионов, экспонированных на МКС в течение 1 мес. Очевидно, что даже один месяц нахождения в условиях орбитальной станции был воспринят сухими диапаузирующими эмбрионами как сигнал стресса, и эта информация затем была передана посредством материнского эффекта их потомству, как было показано в отношении фотопериода и другой биологической информации у многих беспозвоночных, включая дафний (Mousseau, Fox, 1998; Alekseev, Lampert, 2001). Это дает вполне определенное основание утверждать, что стресс окружающей среды, испытываемый на космической станции, также может быть причиной других выявленных различий между группами, получившими воздействие факторов МКС, и контрольными группами, которые были обнаружены в вышеописанных экспериментах по реактивации, устойчивости к паразитам и анализу жизненного цикла D. magna.

Оценка реактивации и параметров жизненного цикла Streptocephalus torvicornis после космического полета. Вылупление S. torvicornis из экспонированных на МКС и контрольных яиц началось одновременно на следующий день после их перемещения в температурные условия 25°С (четвертый день от начала обводнения) (рис. 7). Отчетливая разница в общей продолжительности вылупления между этими вариантами (3 дня у экспонированных на МКС яиц против 9 дней у контрольных яиц) также сопровождалась значительной разницей в их общей скорости реактивации. Как и в случае D. magna, в экспонированных на МКС яйцах S. tor-



**Рис. 5.** Инфицирование покоящихся эмбрионов *Daphnia magna* паразитическим грибом *Pythium daphnidarum*. 1 – эмбрионы с подавленной скоростью реактивации; 2 – первая группа из космоса; 3 – вторая группа из космоса; 4 – контрольная группа. Красные столбцы обозначают процент распространения паразита (количество экспериментов с *P. daphnidarum*), синие столбцы обозначают процент заражения паразитом, а зеленая сплошная линия обозначает процент реактивации.



Рис. 6. Самец *Daphnia magna*, появившийся в потомстве дафний после космического полета.

vicornis реактивация была значительно меньше (всего около половины от контроля), чем в контрольных яйцах (Alekseev *et al.*, 2019). Яйца этого вида, содержавшиеся в неблагоприятных условиях на земле, обладали эффективностью реактивации, близкой к нулю.

S. torvicornis, выращенный из яиц, собранных в пруду, характеризуется очень высоким уровнем изменчивости в своем жизненном цикле, в связи с чем было обнаружено лишь несколько существенных различий в параметрах между образцами этого вида, подвергнутых космическому воздействию, и контролем (табл. 3). Единственным значимым эффектом, обнаруженным при анализе жизненного цикла S. torvicornis, стало влияние длины дня (фотопериода) на размер животных в возрасте 12 дней (время появления яиц в выводковом мешке самки). Размер животных различался между длинным днем (9.838  $\pm$  1.1546 мм) и коротким днем (8.676  $\pm$  1.9123 мм) в обоих вариантах, но был несколько меньше при условии экспозиции



**Рис.** 7. Реактивация *Streptocephalus torvicornis* в контроле и после полета.

яиц на МКС (Алексеев и др., 2011). Другие параметры, такие как длина самки/самца или размер кладки, также показали различия между результатами экспериментов в условиях длинного/короткого дня и в условиях МКС/контроля, но огромные популяционные полиморфизмы приводят к большим стандартным отклонениям и маскируют эти различия, лишая их достоверности.

#### Исследование стресс-сигналов и негативного воздействия отдельных внутрикорабельных факторов космического полета на покоящиеся стадии ракообразных в условиях земной лаборатории

Возможными негативными факторами окружающей среды при космическом полете на МКС, влияющими на биологические объекты, принято считать: невесомость (микрогравитацию), модифицированный газовый состав (например, повышенная доля этилена), космическую и индуцированную ею нейтронную радиацию, техногенные

		Конт	гроль		МКС			
	длинный день		короткий день		длинный день		короткий день	
	μ	σ	μ	σ	μ	σ	М	σ
Средняя длина в возрасте 12 сут, мм	9.93	1.52	8.71	2.90	9.77	0.96	8.64	0.34
Длина самок в 12 сут, мм		1.20	9.48	3.76	10.32	1.40	9.89	0.67
Длина самцов в 12 сут, мм		0.10	8.23	2.88	9.56	1.17	8.67	0.41
Кладка I (цист на особь)		3.32	8.88	11.68	2.50	1.87	11.04	12.04
Производство яиц за 3 недели (цист на особь)		5.38	8.88	11.36	11.80	6.29	14.04	10.43
Выживание, %		19.15	100.00	0.00	84.00	16.73	85.00	19.15
Время созревания, сут	16.50	1.00	17.25	1.50	15.60	1.67	16.00	0.00

**Таблица 3.** Средние величины (μ) и стандартное отклонение (σ) параметров жизненного цикла у особей полученных от эмбрионов *S. torvicornis* экспонированных на МКС и содержащихся в лаборатории (Алексеев и др., 2011)

#### АЛЕКСЕЕВ

Таблица 4. Характеристика окружающей среды экспериментов с покоящимися стадиями на МКС (по данным Thirsk *et al.*, 2009 – a; Rettberg *et al.*, 2004 – b; Matthia *et al.*, 2017 – c; Novikova *et al.*, 2014 – d; Rabbow *et al.*, 2015 – e; Zhou *et al.*, 2007 – f; Dachev *et al.*, 2012, Berger *et al.*, 2012 – g; Dachev *et al.*, 2015, Berger *et al.*, 2015 – h; NASA Mars Radiation Environment briefing, 2017 – i; Berces *et al.*, 2013 – j; Mo *et al.*, 2014 – k)

		Поверхность		
	внутри МКС снаружи МКС			Mapca (b, c, i, k)
Эксперимент	АКВАРИУМ	BIORISK-MSN	EXPOSE-R (IMBP)	
Продолжительность экспозиции, сут.	30 и 240	405–935 (d)	682 (e)	
Температура, °С	+17+28 (a)	-100+100 (a,d)	-24+49 (e)	-123+25
Давление, Ра	10 <sup>5</sup> (земное) (а)	~560		
Гравитация		0.38 g		
Магнитное поле, µТ		<5		
оздействие UV-В Отсутствует, прободержатель светонепроницаем		Отсутствует, контейнер светонепроницаем (d)	Присутствует, 2687 ч (100% прохождение λ > 170 nm) (e, j)	Присутствует $(\lambda > 200 \text{ nm})$
Средняя доза космической радиации в сут., µGy/day	180-360 (f)	320-408 (g)	323–381 (h)	200-300

электромагнитные поля, радио- и СВЧ-излучение, механическую вибрацию, включая ультразвук, скелетный ритм освещенности и спектрального состава света, обусловленный быстрым обращением станции вокруг Земли. Кроме этого, в начале полета и при приземлении на объекты краткосрочно воздействуют значительные перегрузки и шум от работы двигателей. Совокупное влияние этих элементов искусственной среды называется фактором космического полета (ФКП), соотносительная роль отдельных элементов которого в возникающих эффектах у биообъектов представляет большой интерес, как для науки, так и для практики космических полетов. При изучении воздействия ФКП на выживание покоящихся стадий модельного вида ракообразных (Daphnia magna) и параметры его жизненного цикла после реактивации и культивирования влияние отдельных факторов исследовалось также в земных условиях. При этом было принято, что невесомость (микрогравитация) не должна значительно влиять на водные организмы, которые в земных условиях при плотности тела равной воде обитают в планктоне и почти не имеют веса. В наземных условиях микрогравитация воспроизводилась (Trotter et al., 2015), и заметных воздействий на организм обнаружено не было. Второй важный фактор – состав газовой смеси на МКС, – также должен быть мало значим для диапаузирующих герметично упакованных эмбрионов, уровень дыхания которых при инструментальном контроле не отличим от нуля (Alekseev, Starobogatov, 1996).

В итоге были проведены наземные однофакторные эксперименты по выявлению четырех важнейших на наш взгляд компонентов космического полета на реактивацию диапаузирующих эмбрионов модельного вида ракообразных *D. magna*. Эти компоненты включали (табл. 4): измененное магнитное поле Земли и электромагнитные поля приборов и двигателей; ультразвук; СВЧ излучение; нейтронную радиацию, по типу и интенсивности эквивалентную таковой на МКС.

Воздействие отдельных факторов космического полета проводилось в наземных экспериментах с сухими эмбрионами *D. magna*. Главным оцениваемым параметром в этих экспериментах было определение уровня и темпа реактивации после длительного (до 1 мес.) воздействия отдельных факторов в сравнении с контролем. Эксперименты проводили при температуре 22–24°С (средняя температура на MKC (Thirsk *et al.*, 2009)).

Магнитное поле. Для оценки воздействия измененного магнитного поля Земли в экспериментальной установке Института геомагнетизма РАН (поселок Борок Ярославской обл.) покоящиеся стадии D. magna в течение 15 дней экспонировали в трех опытных вариантах и в контроле: 1 – отсутствие магнитного поля, 2 – удвоенное по напряжению магнитное поле Земли, 3 – переменное электромагнитное поле, имитирующее работу электротехнических приборов МКС. Контролем служили покоящиеся стадии D. magna, подвергающиеся естественному фону магнитного поля Земли в июне 2008 г. Каждый из экспериментальных вариантов проводили в трех повторностях, включавших не менее 50 эфиппиев данного вида. После окончания экспозиции покоящиеся яйца D. magna были реактивированы в соответствии с



Рис. 8. Воздействие нейтронной радиации на вылупление покоящихся стадий D. magna.

вышеуказанным протоколом, а результаты реактивации были сопоставлены с использованием статистического пакета Statistica 6 (Alekseev, Sychev, 2006; Alekseev *et al.*, 2009). Несмотря на некоторые вариации между результатами экспериментов, статистически достоверных различий не было установлено. Это позволяет исключить данный фактор космического полета из числа влияющих на космические эксперименты по экспонированию покоящихся стадий ракообразных.

Техногенные факторы космического полета: ультразвук и СВЧ. Шум (вибрация), радиоволны и высокочастотные излучения, связанные с работой механизмов и электротехнических устройств МКС, также следует отнести к возможным факторам, восприятию которых не препятствует изоляция покоящихся стадий в пластиковых пакетах. Из числа данных факторов были выбраны два энергетически наиболее сильных: ультразвук и СВЧ-излучение (Alekseev, Sychev, 2006; Alekseev et al., 2009). Было установлено, что даже длительное воздействие указанных факторов в рамках, обусловленных техническими характеристиками МКС, не оказывали заметного воздействия на реактивацию эмбрионов D. magna, в сравнении с контролем, однако уже двукратное превышение установленных технических нормативов по ультразвуку и СВЧ приводило к статистически достоверному снижению процента реактивированных эмбрионов. Дальнейшее повышение этих параметров, в особенности СВЧ-излучения, существенно влияло на выживание, приводя к гибели эмбрионов. Таким образом, техногенные факторы МКС в случае их даже непродолжительного возрастания в сравнении с нормативами способны снизить выживание покоящихся стадий ракообразных, что необходимо учитывать при планировании условий перевозки элементов экологической системы жизнеобеспечения при долгосрочных полетах и создании искусственных экосистем на других планетах.

Нейтронная радиация. Воссоздать космическую (корпускулярную) радиацию в наземных экспериментах весьма сложно. Для этого требуется экспериментальный разгон элементарных частиц в синхрофазотронах (коллайдере), что очень дорого. Обычно для воссоздания радиационной обстановки на МКС используют эквивалентное нейтронное излучение с помощью цезиевых изотопов. Данный подход был использован в эксперименте с оценкой воздействия этого фактора на реактивацию эмбрионов D. magna, который проводили на базе Института медико-биологических проблем РАН (Alekseev, Sychev, 2006; Alekseev et al., 2009). Имитацию космического излучения проводили на нейтронном радиоактивном источнике низкой энергии, аналогичном значению энергии внутри МКС (около 200 мкГр), в течение 1 мес. Реактивация экспонированных эмбрионов делилась на два этапа (рис. 8). На первом этапе реактивация была близка к показателям группы с МКС (первые 2 недели), а через 2 недели началась отложенная реактивация второй группы эфиппиев. Вероятно, воздействие радиации как стрессового сигнала вызвало заметную задержку реактивации у одной части популяции дафний. Как показали последующие исследования, эти две части популяции принадлежали к разным клонам (Abramson, Alekseev, 2009).

Заключение экспериментов на МКС. Для завершения этой части работы можно сформулировать следующие краткие обобщения:

1) эксперименты на космической станции МКС впервые показали, что обезвоженные диапаузирующие эмбрионы *D. magna* могут быть чувствительны к некоторым факторам окружающей среды, и эту стресс информацию через материнский эффект они передают уже следующему поколению, вызывая усиленное формирование самцов при благоприятных условиях культивирования. Подобная чувствительность, обнаруженная у неспециализированных клеток диапаузирующего эмбриона (гаструлы) представляет интерес для экологии не только экспонируемых в космосе ракообразных, но и для изучения находящихся в неблагоприятных земных условиях, что открывает новое направление исследований и явно требует тщательного изучения.

2) обнаружение аналогичных реакций у покоящихся стадий (пропагул) других животных или растений может иметь большое значение для транспортировки элементов искусственных экосистем во время длительных космических полетов и последующего культивирования на планетных станциях вне Земли.

3) из исследованных факторов космического полета наиболее глубокое стресс-влияние на живые системы (возможно, включая людей) оказывает слабое вторичное нейтронное излучение, которое не снижает выживаемость эмбрионов, но кардинальным образом меняет темп их реактивации, замедляя или откладывая выход из яиц слабых, и/или более чувствительных к радиационному состоянию среды организмов.

## ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ВНЕКОРАБЕЛЬНЫХ ФАКТОРОВ КОСМИЧЕСКОГО ПОЛЕТА

Межпланетарный карантин (программа BIOR-ISK). Защита планет от заноса иных форм жизни – одна из ключевых проблем освоения дальнего космоса человечеством. Крайне важно оценить риски, связанные с возможным переносом биологического материала через межпланетное пространство в ходе космических исследований.

Оборудование BIORISK было разработано в Институте медико-биологических проблем РАН (ИМБП) для проведения космических экспериментов по длительному воздействию условий открытого космоса на покоящиеся стадии прежде всего низших организмов (бактерий и грибов), как неизбежных спутников пилотируемой космонавтики (Novikova *et al.*, 2014). Устройство BIORISK-MSN состояло из трех металлических контейнеров, в которые помещали 24 пластиковые чашки Петри диаметром 65 мм с исследуемыми организмами внутри (рис. 9). Каждая чашка содержала бактериальный фильтр, проницаемый для воздуха, но не для микроорганизмов. Контейнеры крепили на специальной платформе на внешней стороне МКС (рис. 10). Доставленные на МКС герметично закрытыми, эти контейнеры открывались космонавтом непосредственно перед закреплением на корпусе станции.

В первом эксперименте BIORISK, который был начат в январе 2005 г., испытуемыми организмами были прокариоты (*Bacillus*) и эукариоты (грибы родов *Penicillium, Aspergillus и Cladosporium*) (Novikova *et al.*, 2011). Продолжительность пребывания в открытом космосе составляла 7, 12 и 18 месяцев. В этом эксперименте микроорганизмы, длительное время находившиеся на внешней поверхности МКС (1.5 года), в большинстве своем сохраняли жизнеспособность в условиях космической среды, но на значительно более низком уровне, чем в контроле.

Во втором эксперименте в рамках программы BIORISK биологическими тест-объектами служили стадии покоя различных таксономических групп (от бактерий до позвоночных животных и высших растений):

- бактерии рода Bacillus
- грибы родов Penicillium и Aspergillus
- семена Brassica rapa, Arabidopsis thaliana и др.
- покоящиеся эмбрионы Daphnia magna и D. pulicaria
- покоящиеся эмбрионы Streptocephalus torvicornis
  - покоящиеся эмбрионы Artemia salina
  - покоящиеся эмбрионы Triops cancriformis
  - покоящиеся эмбрионы Eucypris ornata
- криптобиотические личинки хирономиды вида *Polypedilum vanderplanki*

– икра карпозубых рыб вида Nothobranchius guentheri.

16 февраля 2007 г. испытуемые объекты были помещены в три контейнера оборудования BIORISK-MSN, причем количество и состав объектов во всех контейнерах были одинаковыми. Споры бактерий и плесневых грибов наносились на металлические пластины, изготовленные из материалов, аналогичных тем, которые использовались для конструирования оболочки РС МКС. Семена растений, покоящиеся яйца низших ракообразных, насекомых и обезвоженную икру рыб помещали в пакеты из хлопчатобумажной ткани, а затем в пластиковые чашки Петри (рис. 9в). После этого оборудованный Биориск-2 был помещен на блок "Энергия" для доставки на РС МКС 15 апреля 2007 г. на космическом корабле "Союз-ТМА-10". Устройство BIORISK-MSN было закреплено на внешней стороне МКС российскими космонавтами Ф.Н. Юрчишиным и О.В. Котовым 6 июня 2007 г. во время внекорабельной деятельности (ВКД). Из-за изменения плана работ на МКС первый контейнер был снят 15 июля 2008 г., т.е. через 13 мес., а не 6, как было



**Рис. 9.** Экспериментальный модуль BIORISK. а – Внешний вид контейнеров BIORISK; б – стопка чашек петри с биологическими образцами перед их установкой в контейнер; в – хлопчатобумажные пакеты с покоящимися эмбрионами водных организмов (ИМБП).

запланировано. Он был возвращен на Землю 24 октября 2008 г. и спустя несколько часов доставлен в ИМБП (Sychev, 2009). Осмотр металлического контейнера и изъятие чашек Петри, содержащих исследуемые объекты, были проведены незамедлительно. Внешний визуальный осмотр показал, что пластиковые чашки Петри были значительно деформированы нагреванием. Когда их вскрыли, оказалось, что металлические пластины с бактериальными и грибковыми спорами вплавлены в пластик, тогда как хлопчатобумажные матерчатые мешки, содержащие семена и покоящиеся яйца ракообразных и рыб, остались внешне неизменными (Alekseev *et al.*, 2009).

Покоящиеся яйца низших ракообразных и рыб исследовали в Зоологическом институте РАН



Рис. 10. Расположение экспериментального модуля BIORISK на корпусе MKC. а – Положение экспериментального модуля относительно MKC; б – положение контейнеров BIORISK на корпусе модуля "Пирс" российского сегмента MKC (NASA).

(Санкт-Петербург). Покоящиеся яйца всех видов листоногих раков остались жизнеспособными, хотя уровень реактивации яиц в эксперименте (на примере Artemia salina) был значительно ниже (примерно в пять раз), чем в контроле. Выживаемость покоящихся яиц щитней Triops cancriformis варьировала от 5 до 8%. Хотя лишь небольшая часть опытных яиц была способна к реактивации. рост вылупившихся щитней не отличался от такового в контрольной группе (Orlov et al., 2017, Alekseev et al., 2019). Было также показано, что остракода Eucypris ornata сохранила свою жизнеспособность и успешно размножалась в нескольких последовательных генерациях. Реактивация яиц D. magna началась после значительного запаздывания по сравнению с реактивацией яиц филлопод и остракод, чем напоминала реакцию эмбрионов этого вида на воздействие нейтронного излучения в однофакторном эксперименте, описанном выше. Полетный образец яиц *D. magna* после реактивации показал несколько типов повреждений у новорожденных, которых можно было разделить на три группы одинакового размера, различающиеся по степени повреждения: 1) особи, умершие сразу после рождения, 2) особи, дожившие до половой зрелости, но неспособные к размножению, и 3) особи, способные к воспроизводству нескольких поколений. Потомство, полученное от успешно переживших длительную экспозицию в открытом космосе, происходило от рачков с различными сроками начала реактивации. Они были исследованы биохимическими методами с целью выявления внутрипопуляционного полиморфизма по белковым локусам (Abramson, Alekseev, 2009). Оказалось, что особи, выходящие из яиц в начале и конце периода реактивации, не только различались по массе тела (первые были крупнее), но и относились к разным клонам, очевидно различавшимися по чувствительности к стрессфакторам космической среды. В контрольной группе эти клоны по срокам реактивации достоверно не различались. Среди высокочувствительных к космическому стрессу выделилась еще одна группа клонов с повышенным уровнем откладки покоящихся яиц, при тех же условиях, что и у остальных, что также можно интерпретировать как повышенную реакцию на стресс, сходную с ранее обнаруженным повышенным производством самцов при внутристанционном экспонировании яиц этого вида (см. выше программу АКВАРИУМ).

Интересные результаты были получены при сравнении выживания в открытом космосе в долгосрочных экспериментах у организмов с разным уровнем в теле полисахарида трегалозы, замещающего воду при высыхании клеток и являющимся протектором белковых соединений у многих беспозвоночных (Okuda, 2008; Gusev *et al.*, 2009).

В каждом из исследованных отрядов ракообразных и насекомых были получены достоверные данные по успешному переживанию их покоящимися стадиями многомесячного воздействия факторов открытого космического пространства (табл. 5). Наибольшая выживаемость была установлена для *Artemia salina и Eucypris ornata*. Вместе с тем, покоящиеся стадии некоторых видов не смогли пережить длительное нахождение в открытом космосе, что, по нашему мнению было связано:

– с высоким содержанием воды в покоящихся яйцах у ряда видов ракообразных, использованных в экспериментах. Реактивация среди обводненных эмбрионов рода *Chirocephalus* после 13 месячной экспозиции не была отмечена ни в одном из 6 вариантов. В то же время среди обезвоженных эмбрионов близкого вида *Streptocephalus tor*-

Вид	Размер	Состояние	% Реактивации от контроля
Dankuia waawa	Крупные		11
Daphnia magna	Мелкие	- Зимняя диапауза	35
Daphnia pulicaria	Смесь	Летняя диапауза	0
Stuanto contralus tovicomis	Крупные	Поридриророниций	42
Sirepiocephalus lovicornis	Мелкие	дегидрированный	14
Chirocephalus sp.	Смесь	Обводненный	0
Eucypris ornata	Смесь	Диапауза	7
Artemia salina	Смесь	Диапауза	60
Triops cancriformis	Смесь	Диапауза	14
Polypedium vanderplanki	Смесь	Диапауза	80
Nothobranchius guentheri	Смесь	Диапауза	0

Таблица 5.	Реактивация	покоящихся с	тадий водных	организмов	после 1	3-ти	месячной	экспозиции	в космиче-
ском прост	ранстве в апп	apare BIORIS	K-MSN-2						

vicornis реактивация составила от 14 до 42% от контроля;

- с различной глубиной диапаузы. У видов рода Daphnia глубокая зимняя диапауза вызывается сочетанием следующих факторов: высокая плотность популяции, короткий день (12 ч световой фазы), плохие условия питания и накопление биоинформации в ряду поколений путем материнской передачи (Alekseev, Lampert, 2001). У клона, использованного в нашем эксперименте Daphnia pulicaria, полученного из коллекции профессора Ламперта (институт лимнологии Макса Планка), поверхностная летняя диапауза была индуцирована единственным фактором - ухудшением трофических условий. В то же время фотопериод (длинный день с 16 ч световой фазы) и низкая плотность популяции не способствовали формированию сигнала для перехода к гаметогенезу (Alekseev, Lajus, 2009). Реактивация покоящихся яиц у дафний после экспонирования в космосе была достигнута только у эмбрионов с глубокой (зимней) диапаузой (D. magna) (см. табл. 5). Ни один эмбрион D. pulicaria с поверхностной летней диапаузой в 6 повторностях космического эксперимента не проявил признаков жизни;

– с тропическим происхождением вида. Диапауза высыхающей икры карпозубых рыб в природе длится несколько месяцев и не устойчива к низким температурам. Этим, видимо, объясняется их полная смертность в опыте и контроле через 13 месяцев. В 6 месячном эксперименте были реактивированы и успешно развивались только эмбрионы рыб контрольной группы, поскольку этот вариант Биориска не был своевременно доставлен на Землю, и разделить действие низких температур и длительности пребывания икры рыб в

лось невозможным (Alekseev *et al.*, 2009).

космосе на выживание по этой причине оказа-

Эксперимент "Биофобос-Анабиоз". Проект Роскосмоса ФОБОС-ГРУНТ изначально имел сугубо геологическую направленность. Он предполагал экспедицию возвращаемого аппарата к этому спутнику Марса, из которой он должен был доставить на Землю однометровую колонку грунта, высверленную с поверхности Фобоса (Зеленый, Захаров, 2011). По мере разработки исследовательской программы. по предложению В.Н. Сычева (ИМБП РАН, Москва), в возвращаемый на Землю блок были добавлены два небольших контейнера (11 × 35 мм) с покоящимися стадиями 50 видов организмов, включая цианобактерии, примитивные грибы, диапаузирующие яйца дафний, копепод, листоногих раков, остракод, личинок двукрылых насекомых, цисты одноклеточных зеленых водорослей и семена сосудистых растений (Novikova *et al.*, 2010; Орлов и др., 2011). Будучи элементами трех экосистем (почвенной. водной и наземной) в случае удачного перенесения длительного полета через открытый космос в слабо защищенном состоянии (устранен фактор  $V\Phi$ ) покоящиеся стадии этих видов могли стать осразработки технологии межпланетной новой транспортировки и создания искусственных биологических систем рециклинга кислорода и других жизненно важных компонентов на обитаемых станциях вне земной биосферы. В мае-июне 2009 г. биообъекты были размешены в запаянных пластиковых пакетах. В июне 2009 г. пластиковые пакеты были помещены в две "Фобос-капсулы" (по 66 в каждом) и установлены на возвращаемом модуле. По техническим причинам старт проекта был отложен. 15 апреля 2010 г. биологические образцы сняты с модуля. Извлеченные пакеты в марте 2011 г. вместе с вновь подготовленными пакетами семян сосудистых растений и диапаузирующими личинками двукрылых насекомых были размещены в оборудовании программы BIORISK, 27 апреля доставлены на МКС и 4 августа вынесены на внешнюю сторону в качестве орбитального (ближний космос) контроля эксперимента. Фобос-капсулы были заправлены партиями свежих образцов, но, к сожалению, по техническим причинам, выведенный на околоземную орбиту ракетный комплекс с аппаратом Фобос-Грунт не смог запустить разгонную систему для выхода на запланированную траекторию к Марсу. После нескольких месяцев вращения на околоземной орбите аппарат был утрачен, а вместе с ним – и столь важная возможность проведения долгосрочного эксперимента по влиянию глубокого космоса на выживание покоящихся стадий животных и растений.

В отличие от него орбитальный контроль BIORISK был благополучно доставлен на Землю после 31-месячной экспозиции на орбите. Полученные результаты в целом подтвердили уже установленные ранее данные по выживанию покоящихся стадий низших и высших организмов в vсловиях открытого космоса. Численные значения доли выживших эмбрионов водных животных оказались несколько ниже, чем на первых этапах эксперимента BIORISK-2, что неудивительно, учитывая сложную историю их предполетного хранения (почти 2 года в лабораторных условиях и на полетном модуле Фобос-Грунта). Тем не менее, среди всех изученных организмов были обнаружены успешно пережившие космическую экспедицию особи. Наивысший процент реактивации, а значит и наибольшую устойчивость, проявили покоящиеся стадии артемий, дафний и личинки двукрылых, которые и были рекомендованы в качестве оптимальных объектов для исследований в космическом пространстве. Это было учтено в последовавших экспериментах.

Заключение по экспериментам программы BIORISK. Целью экспериментов BIORISK в открытом космосе было накопление данных о потенциальных проявлениях или границах фенотипической адаптации и генотипических изменениях бактериально-грибковых ассоциаций, регулярно встречающихся на конструкционных материалах космических аппаратов. Основной целью первого эксперимента в серии была проверка жизнеспособности этих видов в конструкционных системах космических аппаратов после длительного воздействия (сравнимого с длительностью полета на Mapc) в открытом космосе (Alekseev et al., 2007, Novikova et al., 2011, Alekseev et al., 2019). Вторая цель состояла в том, чтобы оценить влияние космического полета на исследуемые биологические образцы. Как известно, не только микробы, но и

некоторые многоклеточные организмы обладают способностью переходить в состояние покоя при неблагоприятных условиях окружающей среды. Не будет преувеличением сказать, что многие живые существа могут достичь состояния, в котором их жизнедеятельность временно практически прекращается, чтобы пережить неблагоприятное воздействие окружающей среды, даже в условиях космического пространства. Эти состояния различаются по механизмам, позволяющим различным организмам достигать стадии покоя, а также по уровням покоя, обеспечивающим их выживание. При диапаузе и криптобиозе организмы могут выдерживать широкий спектр экстремальных химических и физических воздействий (Данилевский, 1961; Алексеев, 1990), что делает возможным их перенос через космическое пространство.

В связи с этим второй эксперимент BIORISK, включавший исследование многоклеточных животных (ракообразные, насекомые, рыбы, сосудистые растения), после их пребывания в открытом космосе в течение времени, аналогичного продолжительности полета на Марс, стал новым шагом в понимании пределов выживания земных организмов в экстремальных условиях (Alekseev et al., 2006). Из негативных факторов открытого космоса не оцененным вследствие конструктивных особенностей устройства BIORISK осталось лишь воздействие прямых солнечных лучей, с высокой долей ультрафиолетового спектра. Кроме этого среди полученных данных отсутствовали также количественные оценки температуры и уровня космической радиации, как накопленные дозы, так и максимальные ее значения, что затрудняло интерпретацию ряда наблюдаемых эффектов. Эти недостатки были во многом преодолены при реализации последовавших космических программ EXPOSE.

Имитация условий на Марсе и программа EX-**POSE.** Программа EXPOSE – космический биологический эксперимент на МКС в поддержку марсианской миссии. Многофункциональное устройство EXPOSE (рис. 11) было подготовлено для длительных астробиологических экспериментов в космосе на МКС. Оно было создано Европейским космическим агентством (ЕКА) для испытания деградации биологических материалов (аминокислот) и спор примитивных организмов (бактерий, грибов) в космосе (внутри метеоритов) и в условиях на поверхности Mapca (de Vera *et al.*, 2019). В отличие от аппаратуры программы BIORISK. аппарат EXPOSE был способен записывать или даже в ряде случаев регулировать различные типы экологических параметров (солнечное излучение, космическую радиацию, температуру) во время экспонирования биологических образцов в космосе, включая ультрафиолетовое излучение (Novikova et al. 2018; de Vera et al. 2019).



**Рис. 11.** Экспериментальный модуль EXPOSE-R. а – Заполненная кассета с биологическими образцами; б – конструкция модуля; в – герметичные пластиковые пакеты с биологическими образцами (ИМБП, Rabbow *et al.*, 2009).

Первый аппарат этой серии, EXPOSE-E, был подготовлен для доставки на МКС Национальным управлением по аэронавтике и исследованию космического пространства США (NASA), запущен 7 февраля 2008 г. и возвращен на Землю 12 сентября 2009 г. Аппарат был размещен на внешней стороне европейского лабораторного модуля "Коламбус" и содержал споры бактерий и грибов и семена растений (Rabbow *et al.*, 2009; Berger *et al.*, 2012).

Следующий проект ЕКА EXPOSE-R был разработан в содружестве с Роскосмосом и доставлен на МКС в составе российского груза транспортного комплекса Протон и размещен вне МКС на российском модуле "Звезда" (рис. 12). Среди новых конструктивных особенностей появилась возможность заменять индивидуальные емкости (подносы) с исследуемыми организмами в процессе полета. Наряду с вышеупомянутым набором биологических объектов, подготовленных ЕКА, он содержал российский блок с семенами высших растений и покоящимися стадиями нескольких водных беспозвоночных, выживших в космических экспериментах BIORISK (Baranov et al., 2009; Orlov et al., 2017). Все эти объекты были помещены в небольших пластиковых пакетах в экспозиционных гнездах в три слоя и отделены от космического пространства светофильтрами разной проницаемости, незначительно снизившими ультрафиолетовое воздействие на верхний слой (Rabbow *et al.*, 2009).

Эксперименты EXPOSE-R и EXPOSE-R2. После более чем 1.5-летнего пребывания в открытом космосе споры микроорганизмов и грибов, а также семена двух видов растений (Arabidopsis thaliana и томат Lycopersicum esculentum) и покоящиеся яйца ракообразных (Artemia franciscana, Eucypris ornata, Daphnia magna и Streptocephalus torvicornis) были проанализированы на жизнеспособность и некоторые параметры жизненного цикла. Практически все организмы, находящиеся в первом слое образцов, в эксперименте EXPOSE, погибли, что, очевидно, было связано с воздействием солнечного излучения, поскольку радиационный фон был аналогичен Биориску, а температурные условия, регулируемые прибором (см. табл. 4) были значительно мягче. Во втором слое и особенно в третьем последнем, часть организмов сохранила жизнеспособность (Alekseev et al., 2012; Novikova et al., 2015). Из водных организмов наибольшую устойчивость, как и предполагалось, проявили покоящиеся стадии артемий, защищенные несколькими оболочками и глубоким криптобиозом. Эксперимент показал, что не только бактериальные и грибковые споры, но также и покоящиеся стадии растений и ракообразных способны выдерживать длительное воздействие факторов открытого космического пространства,



**Рис. 12.** Расположение экспериментального модуля EXPOSE-R на корпусе MKC. Белая стрелка указывает на емкость с покоящимися стадиями водных организмов. а – Положение экспериментального модуля относительно MKC; б – положение аппарата на поверхности модуля "Звезда" российского сегмента MKC; в – положение кассеты с покоящимися эмбрионами водных организмов (NASA, Роскосмос).

в том числе ультрафиолетового излучения, но с некоторой зашитой, которой являлись поверхностные слои экспериментальных образцов. Покоящиеся яйца двух ракообразных (A. franciscana и E. ornate) показали увеличение процента выживших (реактивированных) эмбрионов по мере удаления от первого слоя, что совпадало с ослаблением ультрафиолета в этом направлении (рис. 13). Два других вида водных ракообразных (D. magna и S. torvicornis) гораздо хуже сохранились во всех образцах. Немногие из выживших D. magna демонстрировали разную степень повреждения эмбрионов от гибели их сразу после вылупления до достижения самками половозрелого возраста и установленной невозможности ими производить потомство.

Даже бактерии и грибы в первом слое, подвергшиеся воздействию прямого УФ излучения, погибли (de Vera et al., 2019). В то же время в третьем слое. где практически не отмечалось воздействие УФ, грибы проявили очень высокие показатели выживаемости (до 100% по сравнению с контрольными образцами) (Novikova et al., 2015). Такого высокого выживания никогда не было обнаружено в экспериментах Биориска, где некоторые виды грибов полностью погибли, а у переживших 18-месячный полет видов процент выживания не превышал 0.04% (Novikova et al., 2014). В эксперименте EXPOSE-R отдельные споры грибов смогли выжить даже в верхнем слое у тех видов, споры которых располагались более плотно и составляли некоторую защиту от  $У\Phi$ , а в нижних слоях выживание было сопоставимо с контролем (Novikova et al., 2015). Это показывает, на наш взгляд, роль температурного фактора в снижении жизнеспособности покоящихся стадий, поскольку в эксперименте BIORISK температура колебалась в интервале +100...-100, а в EXPOSE-R +49...-24°С (см. табл. 4). Смягчение амплитуды температур в эксперименте EXPOSE-R было почти трехкратным и не выходило за пределы колебаний этого фактора, наблюдаемых в земных условиях.

EXPOSE-R продемонстрировал, что жизнеспособность покояшихся яиц артемий и остракод увеличивается при уменьшении интенсивности ультрафиолетового излучения. Покоящиеся яйца Daphnia magna и Streptocephalus torvicornis практически не выдержали воздействия открытого космического пространства в условиях EXPOSE-R, со смягченными колебаниями температуры, но с проникающим ультрафиолетовым излучением высокой интенсивности (Novikova et al., 2014). Основным фактором, который был вреден для последних двух видов, стало ультрафиолетовое излучение. В отсутствии этого воздействия (программа BIORISK) ~30% покоящихся яиц этих видов выжили, успешно прошли эмбриональное развитие и создали нормальные размножающиеся популяции, по меньшей мере, в двух последующих поколениях (Alekseev et al., 2009).

Для преодоления столь вредного (зачастую для многих смертельного) воздействия солнечного света на живые организмы была изменена конструкция модуля EXPOSE-R2. Окна предусматривали создание различных уровней ультрафиолетового облучения требуемого спектра. Исследуемые образцы размещались в индивидуальные емкости в 2-3 слоя. Так же, как и в EXPOSE-R, максимальному воздействию ультрафиолетового излучения подвергался только верхний слой (Rabbow et al., 2017). У многих видов бактерий, грибов и растений было вновь показано, что выживаемость спящих стадий в космическом пространстве увеличивается по мере снижения уровня ультрафиолетового излучения (Novikova et al., 2018). В EXPOSE-R2 также участвовали покоящиеся стадии двух водных беспозвоночных (комара Polypedilum vanderplanki и щитня Triops cancriformis), но, к сожалению, результаты этих экспериментов до сих пор не опубликованы.

Использование модуля EXPOSE завершилось в 2016 г. Сейчас идет работа над новым модулем "Exobiology", который должен расширить возможности сбора данных "на месте" (Research in Space 2017 and Beyond, 2017).

Резюме экспериментов по покою в открытом космосе. Подводя итог, можно сказать, что исследование выживания покоящихся стадий организмов в космической среде имеет как теоретическое, так и практическое значение.

Исследование BIORISK впервые продемонстрировало, что бактериальные и грибковые споры, а также высшие растения и членистоногие могут выдерживать длительное (до 31 мес.) воздействие



**Рис. 13.** Вылупление покоящихся стадий Artemia franciscana: а – после 22 месяцев воздействия факторов космического полета внутри аппарата EXPOSE-R (слои 2 и 3); б – в условиях лабораторного контроля Земли. Каждый вариант был выполнен в трех повторностях (1, 2, 3); количество цист составляло 600 на образец в контроле и 150 на образец в группе МКС.

суровых условий открытого космического пространства. Это позволяет предположить, что наземные и водные организмы могут быть доставлены на другие планеты нашими космическими аппаратами, особенно пилотируемыми, несмотря на строгие процедуры обращения с отходами.

Сравнение результатов, полученных в экспериментах BIORISK и EXPOSE, в которых споры микроорганизмов и грибов (а также спящие стадии растений и водных животных) подвергались воздействию космических факторов в течение 31 и 22 мес. соответственно, позволяет сделать следующий вывод: космическое ультрафиолетовое излучение является наиболее мощным отрицательным фактором, влияющим на живую материю в космической среде. В эксперименте EXPOSE-R практически все организмы в верхнем слое устройства погибли.

Биологический покой у тропических организмов (высушенные яйца рыб-карподонтов) и эфиппиев дафний, образованных летом, оказались не способными защитить покоящиеся эмбрионы от повреждающих воздействий космического пространства. Покоящиеся яйца двух ракообразных (*D. magna* и *S. torvicornis*) были чувствительны к сигналам стресса внутри МКС, и не выдерживали солнечного излучения за ее пределами. Артемии и остракоды показали самую высокую устойчивость среди многоклеточных организмов и обладают хорошим потенциалом для проведения астробиологических экспериментов в условиях космического пространства.

Концепция покоя представляет большой интерес для поиска внеземной жизни. Установленные факты длительного выживания покоящихся стадий водорослей, бактерий, грибов и даже беспозвоночных в космическом пространстве вселяют надежду на то, что мы сможем найти жизнь за пределами Земли. Это подразумевает возможность межпланетной передачи форм жизни метеоритами, кометами и другими телами. С другой стороны, это допускает возможность транспортировки земной жизни автоматическими устройствами и непосредственно человеком при межпланетных перелетах.

Наконец, мы можем снова постулировать, что небесные тела, где земные формы едва ли могут существовать, могут быть населены организмами, которые остаются спящими в течение большей части их жизненного цикла. Условия на Марсе, которые были частично имитированы в программе EXPOSE, выявили довольно значительную вероятность (более 90% для грибов) выжить в защишенной от света среде (в земле или в постоянной тени), даже для земных организмов. С одной стороны, это увеличивает риск заноса земных форм жизни на интактные планеты и последующего нахождения на них живых существ, которые, на самом деле имеют земное происхождение. Но с другой стороны, это показывает, что есть шанс обнаружить местную жизнь на Марсе и других небесных телах со сходными условиями, где-то в постоянной тени (глубокие ямы, гроты и пещеры) или под поверхностью, вблизи полярной области таяния льда. Именно эти места должны стать, на наш взгляд, первоочередной целью при поиске жизни на Марсе.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Проведенные эксперименты с покоящимися стадиями гидробионтов в условиях космического полета позволили существенно расширить представление о способности живых организмов к выживанию в экстремальных условиях.

2. Эксперименты внутри космической станции установили, что покоящиеся стадии ракообразных даже в сухом состоянии способны воспринимать и реагировать на неблагоприятные условия (прежде всего на воздействия нейтронного излучения) как на стресс и отвечать на воздействие этого фактора изменением типа размножения с резким увеличением продуцирования самцов во втором поколении.

3. Длительные эксперименты в условиях открытого космоса допускают возможность переноса покоящихся стадий земных организмов на другие планеты при минимальной защите от ультрафиолетового излучения солнца.

4. Покоящиеся эмбрионы *D. magna* оказались чувствительны к воздействию радиации и ряда других внутрикорабельных факторов. Эмбрионы этого виды могут быть, вероятно, использованы для оценки кумулятивного эффекта внутрикорабельных слабых негативных факторов на биологические объекты, как своего рода индикаторы биологического стресса. Артемии, экстремофильный вид гиперсоленых озер, являются вероятным остатком фауны древнего моря Тетис. Цисты артемий проявили максимальную устойчивость к негативному воздействию условий открытого космоса и могут быть рекомендованы для экспериментов с биологическими объектами в открытом космосе.

5. Покоящиеся стадии большинства ракообразных, по-видимому, смогут сохранять жизнеспособность в условиях Марса, однако для завершения жизненного цикла им необходима, по меньшей мере, жидкая фаза воды для активной стадии развития. Возможность реализации такого цикла развития в условиях Марса требует специального изучения.

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает благодарность всем сотрудникам Института медико-биологических проблем РАН и членам экипажей МКС, участвовавших в подготовке и проведении экспериментов с покоящимися стадиями в космическом полете. Особую признательность выражаю сотрудникам ИМБП Н.Д. Новиковой и М.А. Левинских за консультации. При проведении экспериментов с измененным магнитным полем техническую поддержку оказал сотрудник Института биологии внутренних вод РАН В.В. Крылов. Автор также благодарен участникам международных проектов РФФИ-Япония, РФФИ-Тайвань за их помощь в выполнении исследований. Профессор В. Ламперт (W. Lampert, Плоен, Германия) оказал неоценимую помощь в обеспечении приборной базы Института Лимнологии Макса Планка, использованной при выполнении эксперимента внутри МКС, и обсуждении его результатов. Автор искренне благодарит анонимного рецензента за ценные замечания, несомненно способствовавшие улучшению восприятия текста обзора. Большую помощь в подготовке и оформлении рукописи статьи оказала О.А. Чабан.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ

Написание этого обзора было инициировано и поддержано грантом РФФИ Экспансия (19-14-50004). Работа выполнена при частичной поддержке Федеральной программы по изучению биоразнообразия животного мира (АААА-А19-119020690091-0) РАН. При ее подготовке была задействована Федеральная коллекция Зоологического института РАН и гранта РФФИ 20-04-00035.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы использования животных в экспериментах и условия ухода за ними были соблюдены. Люди в данном исследовании не участвовали в качестве объектов.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет, что какой-либо конфликт интересов отсутствует.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Алексеев В.Р. Диапауза ракообразных: эколого-физиологические аспекты. М.: Наука. 1990. 215 с.
- Алексеев В.Р. Физиологические и молекулярно-генетические основы механизма биологического покоя у водных беспозвоночных // Онтогенез. 2010. Т. 41. № 2. С. 83–93.
- Алексеев В.Р., Левинских М.А., Сычев В.Н. Влияние условий космического полета на покоящиеся стадии низших ракообразных. Эксперименты "Аквариум" // Космическая биология и медицина. Медико-биологические исследования на российском сегменте МКС. М.: Научная книга. 2011. Т. 2. С. 340–351.
- Данилевский А.С. Фотопериодизм и сезонное развитие насекомых. Л.: Наука. 1961. 243 с.
- Зеленый Л.М., Захаров А.В. Проект "Фобос-Грунт": приборы для научных исследований // Вестник НПО им. СА Лавочкина, 2011. Т. 3. С. 31–34.
- Орлов О.И., Дешевая Е.А., Левинских М.А., Новикова Н.Д., Поддубко С.В., Поликарпов Н.А., Сычев В.Н., Алексеев В.Р., Воробьева Е.А., Гальченко В.Ф., Захаров А.В., Муравенко О.В. Эксперимент "Биофобос/Анабиоз" // Фобос-Грунт. Проект космической экспедиции. ИКИ РАН, НПО им. А. Лавочкина, Москва. 2011. Т. 2. С. 483–493.
- Сычев В.Н., Левинских М.А., Подольский И.Г., Новикова Н.Д., Гостимский С.А., Алексеев В.А., Бингхем Г. Основные результаты экспериментов по изучению высших растений и покоящихся форм организмов на борту Российского сегмента Международной Космической Станции // Космонавтика и ракетостроение. 2007. Т. 4. № 49. С. 54–64.

- Шепелев Е.Я. Биологические системы жизнеобеспечения // Основы космической биологии и медицины. М.: Наука. 1975. Т. 3. С. 277–307.
- *Abramson N., Alekseev V.* Mechanisms and peculiarities of dormancy in vertebrates and invertebrates // Int. Conf. Use of Dormancy in Space Researches, St-Petersburg, Russia. 2009.
- Alekseev V.R., Lajus D.L. Maternal and direct effects of natural-like changes of photoperiod and food condition manipulation on life history parameters in *Daphnia* // Aquatic ecology. 2009. V.43. № 2. P. 415–421.
- Alekseev V., Lampert W. Maternal control of resting-egg production in Daphnia // Nature. 2001. V. 414. P. 899–901.
- Alekseev V.R., Levinskih M.A., Novikova N.D., Sychev V.N., Okuda T. Effects of some space flight factors on termination and survivorship in crustacean resting stages // Int. Conf. Use of Dormancy in Space Researches, St-Petersburg, Russia. 2009.
- Alekseev V.R., Levinskikh M.A., Novikova N.D., Sychev V.N. Studying Dormancy in Space Conditions // Dormancy in Aquatic Organisms. Theory, Human Use and Modeling. Springer. 2019. P. 97–119.
- Alekseev V., Novikova N., Levinskikh M., Sychev V., Yusoff F., Azuraidi O. Expose-R experiment on effects of open space condition on survivorship in dormant stages of aquatic invertebrates // 39th COSPAR Scientific Assembly, Mysore. 2012. V. 39. P. 36.
- Alekseev V.R., Starobogatov Y.I. Types of diapause in Crustacea: definitions, distributions, evolution // Hydrobiologia. 1996. V. 320. P. 15–26.
- Alekseev V., Sychev V. Effects of space station conditions on resting egg survivorship and life cycle parameters in D. magna // 36th COSPAR Scientific Assembly, Beijing. 2006.

http://www.meetings.copernicus.org/www.cosis.net/abstracts/COSPAR2006/00189/CO-SPAR2006-A-00189.pdf

- Alekseev V., Sychev V., Layus D., Levinsky M., Novikova N., Zakhodnova T. Perspectives of biotechnologies based on dormancy phenomenon for space researches // 36th COSPAR Scientific Assembly, Beijing. 2006.
- *Alekseev V.R., Sychev V.N., Novikova N.D.* Studying the phenomenon of dormancy: why it is important for space exploration // Diapause in Aquatic Invertebrates Theory and Human Use. Springer. 2007. P. 207–214.
- Baranov V.M., Novikova N.D., Polikarpov N.A., Sychev V.N., Levinskikh M.A., Alekseev V.R., Okuda T., Sugimoto M., Gusev O.A., Grigor'ev A.I. The Biorisk Experiment: 13-Month Exposure of Resting Forms of Organism on the Outer Side of the Russian Segment of the International Space Station: Preliminary Results // Doklady Biological Sciences. 2009. V. 426. P. 267–270.
- Berces A., Egyeki M., Fekete A., Kovacs G., Ronto G. Biological ultraviolet dosimetry in low-Earth's Orbit // Astrobiology & Outreach. 2013. V. 1. P. 104.
- Berger T., Hajek M., Bilski P., Körner C., Vanhavere F., Reitz G. Cosmic radiation exposure of biological test systems during the EXPOSE-E mission // Astrobiology. 2012. V. 12. № 5. P. 387–392.

ИЗВЕСТИЯ РАН. СЕРИЯ БИОЛОГИЧЕСКАЯ № 6 2021

- Berger T., Hajek M., Bilski P., Reitz G. Cosmic radiation exposure of biological test systems during the EXPOSE-R mission // International J. Astrobiology. 2015. V. 14. № 1. P. 27–32.
- Dachev T., Horneck G., Häder D.P., Schuster M., Lebert M. EXPOSE-R cosmic radiation time profile // International J. Astrobiology. 2015. V. 14. № 1. P. 17–25.
- Dachev T., Horneck G., H\u00e4der D.P., Schuster M., Richter P., Lebert M., Demets R. Time profile of cosmic radiation exposure during the EXPOSE-E mission: the R3DE instrument // Astrobiology. 2012. V. 12. № 5. P. 403– 411.
- *Ebert D.* The trade-off between offspring size and number in *Daphnia magna* the influence of genetic, environmental and maternal effects // Arch. Hydrobiol. Suppl. 1993. V. 90. P. 453–473.
- *Glazier D.S.* Effects of food, genotype, and maternal size and age on offspring investment in *Daphnia magna* // Ecology. 1992. V. 73. № 3. P. 910–926.
- *Gusev O., Kikawada T., Okuda T.* Biochemical and genetic mechanisms of survival of "sleeping chironomid" *Polypedilum vanderplanki* in extreme environments, including outer space // Int. Conf. Use of Dormancy in Space Researches, St-Petersburg, Russia. 2009.
- *Katajisto T.* Copepod eggs survive a decade in the sediments of the Baltic Sea // Hydrobiologia. 1996. V. 320. № 1–3. P. 153–159.
- Lampert W., Schmitt R.D., Muck P. Vertical migration of freshwater zooplankton: test of some hypotheses predicting a metabolic advantage // Bulletin of Marine Science. 1988. V. 43. № 3. P. 620–640
- Lynch M. The Evolution of Cladoceran Life Histories // The Quarterly Review of Biology. 1980. V. 55. № 1. P. 23–42.
- Matthiä D., Hassler D.M., de Wet W., Ehresmann B., Firan A., Flores-McLaughlin J., Guo J., Heilbronn L.H., Lee K., Ratliff H., Rios R.R., Slaba T.C., Smith M., Stoffle N.N., Townsend L.W., Berger T., Reitz G., Wimmer-Schweingruber R.F., Zeitlin C. The radiation environment on the surface of Mars – Summary of model calculations and comparison to RAD data // Life Sciences in Space Research. 2017. V. 14. P. 18–28.
- *Mo W., Liu Y., He R.* Hypomagnetic field, an ignorable environmental factor in space // Science China Life Sciences. 2014. V. 57. № 7. P. 726–728.
- *Mousseau T.A., Fox C.W.* Maternal effects as adaptations. Oxford University Press, New York. 1998. 375 p.
- Muller H. Wachstum und Phosphatbedarf von Nitzschia actinastroides (Lemm.) v. Goor in statischer und homokontinuierlicher Kultur unter Phosphatlimitierung // Archiv fur Hydrobiologie Suppl. 1972. V. 33. P. 206–236.
- NASA Mars Radiation Environment briefing, 2017. Briefing to NAC HEO/SMD Joint Committee Meeting "Mars Radiation Environment –what have we learned?". July 25 2017 https://www.nasa.gov/sites/default/files/atoms/files/mars\_radiation\_environment nac july 2017 final.pdf
- Novikova N., Deshevaya E., Levinskikh M., Polikarpov N., Poddubko S., Gusev O., Sychev V. Study of the effects of

the outer space environment on dormant forms of microorganisms, fungi and plants in the "Expose-R" experiment // Intern. J. Astrobiology. 2015. V. 14.  $\mathbb{N}$  1. P. 137–142.

- Novikova N., Gusev O., Polikarpov N., Deshevaya E., Levinskikh M., Alekseev V., Okuda T., Sugimoto M., Sychev V., Grigoriev A. Survival of dormant organisms after long-term exposure to the space environment // Acta Astronautica. 2011. V. 68. № 9–10. P. 1574–1580.
- Novikova N., Gusev O., Sugimoto M., Deshevaya E., Levinskikh M., Sychev V., Okuda T., Orlov O., Alekseev V., Poddubko S., Polikarpov N. Results of studies on longterm exposition of dormant forms of various organisms in outer space environment // 40th COSPAR Scientific Assembly, Moscow, Russia, 2014.
- Novikova N., Orlov O., Deshevaya E., Sychev V., Khamidullina N., Aleksashkin S., Martynov M. Phobos-Grunt Mission: Planetary Protection Issues and how to Solve Them (the Approaches Based on the Exobiological Experiments Results) // 38th COSPAR Scientific Assembly, Bremen, Germany, 2010. P. 8.
- Novikova N., Orlov O., Polikarpov N., Deshevaya E., Sychev V. The planetary quarantine problem and its substantiation on the basis of the results of exobiological experiments // J. Intern. Sci. Publications: Ecology Safety. 2014. V. 8. № 1000001. P. 111–119.
- Novikova N., Poddubko S., Deshevaya E., Sychev V. Survival of bacterial and fungal spores in the Expose-R2 experiment // Intern. J. Bioass. 2018. V. 7. P. 5616–5622
- *Okuda T.* Cryptobiosis // Encyclopedia of Entomology. Springer. 2008. P. 1128.
- Orlov O.I., Novikova N.D., Polikarpov N.A., Levinskikh M.A., Deshevaya E.A., Sugimoto M., Alekseev V.R., Okuda T., Gusev O.A., Sychev V.N. Planetary protection challenges in space exploration missions and ways of their resolution with account of Russian exobiology experiments // REACH. 2017. V. 6. P. 25–33.
- Rabbow E., Horneck G., Rettberg P., Schott J.U., Panitz C., L'Afflitto A., von Heise-Rotenburg R., Willnecker R., Baglioni P., Hatton J., Dettmann J., Demets R., Reitz G. EXPOSE, an astrobiological exposure facility on the International Space Station – from proposal to flight // Origins of Life and Evolution of Biospheres. 2009. V. 39. P. 581–598.
- Rabbow E., Rettberg P., Barczyk S., Bohmeier M., Parpart A., Panitz C., Horneck G., Burfeindt J., Molter F., Jaramillo E., Pereira C., Weiβ P., Willnecker R., Demets R., Dettmann J., Reitz G. The astrobiological mission EXPOSE-R on board of the International Space Station // Intern. J. Astrobiol. 2015. V. 14. № 1. P. 3–16.
- Rabbow E., Rettberg P., Parpart A., Panitz C., Schulte W., Molter F., Jaramillo E., Demets R., Weiß P., Willnecker R. EXPOSE-R2: The Astrobiological ESA Mission on Board of the International Space Station // Front. Microbiol. 2017. V. 8. № 1533. P. 1–14.
- Ramirez-Reveco A., Hernandez J.L., Aros P. Long-Term Storing of Frozen Semen at – 196 C does not Affect the Post-Thaw Sperm Quality of Bull Semen // Cryopreservation in Eukaryotes. 2016. P. 91.

- Research in Space 2017 and Beyond. https://www.nasa.gov/sites/default/files/atoms/files/np-2017-04-014-a-jsc\_iss\_utilization\_brochure\_2017\_web\_6-5-17.pdf
- Rettberg P., Rabbow E., Panitz C., Horneck G. Biological space experiments for the simulation of Martian conditions: UV radiation and Martian soil analogues // Adv. Space Res. 2004. V. 33. № 8. P. 1294–1301.
- *Sychev V.* The main results and perspectives of dormancy uses in space researches // Int. Conf. Use of Dormancy in Space Researches, St-Petersburg, Russia. 2009.
- Thirsk R., Kuipers A., Mukai C., Williams D. The spaceflight environment: the International Space Station and beyond // CMAJ. 2009. V. 180. № 12. P. 1216–1220.
- Trotter B., Otte K.A., Schoppmann K., Hemmersbach R., Fröhlich T., Arnold G.J., Laforsch C. The influence of simulated microgravity on the proteome of Daphnia magna // Microgravity. 2015. V. 1. № 15016. P. 1–10.
- Zhou D., Semones E., Gaza R., Johnson S., Zapp N., Weyland M. Radiation measured for ISS-Expedition 12 with different dosimeters // Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators,

Spectrometers, Detectors and Associated Equipment. 2007. V. 580. № 3. P. 1283–1289.

- de Vera J-P., Alawi M., Backhaus T., Baqué M., Billi D., Böttger U., Berger T., Bohmeier M., Cockell C., Demets R., Noetzel R.T., Edwards H., Elsaesser A., Fagliarone C., Fiedler A., Foing B., Foucher F., Fritz J., Hanke F., Herzog T., Horneck G., Hübers H-W., Huwe B., Joshi J., Kozyrovska N., Kruchten M., Lasch P., Lee N., Leuko S., Leya T., Lorek A., Martínez-Frías J., Meessen J., Moritz S., Moeller R., Olsson-Francis K., Onofri S., Ott S., Pacelli C., Podolich O., Rabbow E., Reitz G., Rettberg P., Reva O., Rothschild L., Sancho L.G., Schulze-Makuch D., Selbmann L., Serrano P., Szewzyk U., Verseux C., Wadsworth J., Wagner D., Westall F., Wolter D., Zucconi L. Limits of life and the habitability of Mars: the ESA space experiment BIOMEX on the ISS // Astrobiology. 2019. V. 19. N
  2. P. 145–157.
- Wakayama S., Kamada Y., Yamanaka K., Kohda T., Suzuki H., Shimazu T., Tada M.N., Osada I., Nagamatsu A., Kamimura S., Nagatomo H. Healthy offspring from freezedried mouse spermatozoa held on the International Space Station for 9 months // Proc. Nat. Acad. Sci. 2017. V. 114. № 23. P. 5988–5993.

# Study of Biological Dormancy of Aquatic Organisms in Open Space and Space Flight Conditions

## V. R. Alekseev#

Zoological Institute RAS, St. Petersburg, 199034 Russia

<sup>#</sup>e-mail: alekseev@zin.ru

In outer space, ultraviolet and cosmic radiation, a wide range of high and low temperatures, altered gravity, electromagnetic fields, vacuum and their combination determine the damaging effect on living organisms and act as a barrier to their interplanetary propagation. At the same time, biological dormancy, known in a wide range of bacteria, fungi, animals and plants, makes it possible to preserve the viability of their dormant stages under extreme conditions for a long time. From 2005 to 2016, along with lower organisms, resting stages (propagules) of multicellular animals and plants were tested on the ISS to assess their ability to survive after prolonged exposure to the conditions of open space and space flight. Among the more than 40 species studied, about a third were dormant stages of aquatic organisms (Cyprinodontiformes fish eggs, daphnia ephippii, resting eggs of phyllopods and ostracods, diapausing larvae of dipterans). The experiments were carried out in the framework of four research programs: 1) inside the ISS station (AKVARIUM program) with a limited set of investigated species: 2) outside the station in outer space, but without exposure to ultraviolet radiation (BIORISK programs); 3) in modified space conditions simulating the surface of Mars (EXPOSE-R program); 4) in ground-based experiments, in which a laboratory assessment of the impact of cosmic factors on resting stages was carried out, as well as the study of some separately taken factors of space flight (such as neutron radiation). Fundamentally new data were obtained on the stability of the resting stages of terrestrial organisms to the factors of the cosmic environment, which changed the idea of the possibility of bringing terrestrial life forms to other planets with spacecraft and astronauts.

*Keywords:* diapause, space flight factors, ISS, interplanetary quarantine, astrobiology, hydrobiology, microgravity, cosmic radiation, ultraviolet light, magnetic field, temperature effect, search for extraterrestrial life forms