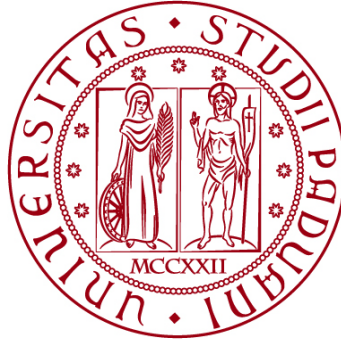


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea in Biologia molecolare



ELABORATO DI LAUREA

**L'impiego di cianobatteri del genere *Anabaena*
per l'“*In Situ Resources Utilization*” su Marte**

**Tutor: Prof. Livio Trainotti
Dipartimento di Biologia**

Laureanda: Desiree Maria Insalata

ANNO ACCADEMICO 2025/2026

INDICE

1. Abstract

2. Stato dell'arte

3. Approccio sperimentale

3.1 Ceppi e condizioni di crescita

3.2 Sequenziamento genomico di *Anabaena* sp. PCC 7938

3.3 Applicazione della genomica comparativa

3.4 Preparazione delle colture sulla regolite

3.5 Preparazione delle colture sul perclorato

3.6 Allestimento dell'esame di omogeneità colturale

3.7 Coltivazione di *E. coli* e *Lemna* sp. sui lisati cianobatterici

4. Risultati e discussione

4.1 Analisi genomiche

4.2 Crescita dipendente dalla regolite

4.3 Tolleranza al perclorato

4.4 Tendenza a formare aggregati

4.5 Sostenibilità della biomassa come risorsa nutritiva

5. Conclusioni

6. Bibliografia

1. Abstract

Lo straordinario successo della recente missione Artemis II, che ha riportato l'uomo sull'orbita lunare, ha ravvivato l'interesse verso le esplorazioni spaziali, rilanciando una nuova "corsa allo spazio".

Il ritorno sul suolo lunare e lo sbarco su Marte rappresentano i prossimi traguardi; entrambi perseguiti con l'ambizione di poter, un giorno, stabilirvi una presenza umana permanente.

Le missioni a lungo termine, però, implicano l'adozione di strategie di auto-sussistenza, che riducano i costi e i rischi dovuti ai continui rifornimenti dalla Terra. A fronte di questa necessità, trovano applicazione i Sistemi di Supporto Vitale Biorigenerativo (BLSS), i quali consentono di ricavare O₂ e biomassa da cianobatteri coltivati tramite una tecnica che sfrutta le risorse locali, denominata Biological In Situ Resource Utilization (Bio-ISRU).

I cianobatteri mostrano elevate efficienze fotosintetiche, spesso superiori a quelle delle piante [1], motivo per cui, negli anni, sono state indagate le potenzialità di generi e ceppi diversi.

D'altra parte, però, l'assenza di un organismo modello condiviso ha portato alla mancanza di coerenza nei risultati dei vari gruppi di ricerca.

Dunque, al fine di eleggere tale modello, si presenta un confronto tra cianobatteri della famiglia Nostocaceae, tra cui quattro ceppi di *Anabaena* spp. e *Nostoc* sp. PCC 7524, valutati sulla base della tolleranza al suolo marziano, dell'omogeneità culturale e dell'impiego della biomassa come nutrimento per *Lemna* sp. ed *Escherichia coli* W.

2. Stato dell'arte

L'esplorazione spaziale di Marte iniziò negli anni Settanta; nel 1997 Sojourner fu il primo rover operativo sulla superficie marziana.

Stando ai dati della ESA [2], ad oggi sono state tentate più di 40 missioni spaziali verso Marte, con sonde, lander e rover, aventi lo scopo di raccogliere campioni di roccia e cercare forme di vita.

Tuttavia, l'obiettivo finale rimane l'esplorazione fisica da parte dell'uomo e negli ultimi anni, grazie agli ingenti investimenti degli enti pubblici e privati, questa possibilità sta diventando sempre più concreta e vicina.

L'ambizione di stabilire una presenza umana sul pianeta rosso, al di là del valore sociale, rappresenta una sfida ingegneristica e un'opportunità senza precedenti per la ricerca scientifica sul campo: anche missioni di breve durata e con equipaggi ridotti potrebbero condurre a scoperte significative.

Il principale ostacolo a tale visione è rappresentato dalla drastica dipendenza della logistica marziana dalle risorse terrestri.

Infatti, la necessità di coniugare la strumentazione occorrente a schermare gli astronauti dalle radiazioni cosmiche e a fornire loro ossigeno, con i costi per chilogrammo di carico, uniti ai rischi intrinseci e alle finestre di lancio limitate per le missioni di rifornimento, rende totalmente insostenibile il modello basato esclusivamente sull'importazione di materiali dalla Terra.

Per far fronte a tale problema, un valido aiuto potrebbe derivare dall'impiego di sistemi biologici.

Si tratta di consorzi microbici capaci di resistere alle ostili condizioni marziane e, al contempo, di produrre O₂ e altri beni primari per la sopravvivenza di altre forme di vita.

L'efficacia di tali sistemi è, però, vincolata alla disponibilità di risorse nutritive. A questo proposito, per garantire la crescita e il mantenimento delle colonie batteriche nel tempo, si rivela necessario affiancare il riciclo dei rifiuti organici e delle materie prime importate dalla Terra allo sfruttamento sostenibile delle risorse locali, detto tecnicamente *In Situ Resource Utilization (ISRU)*.

In questo contesto, emerge la necessità di individuare organismi modello ottimizzati per sopravvivere alle condizioni di Marte.

Infatti, sebbene la maggior parte degli organismi non sia in grado di metabolizzare i nutrienti marziani allo stato grezzo, molteplici studi, tra cui quello oggetto di discussione, hanno dimostrato che alcuni cianobatteri della famiglia delle Nostocaceae possono crescere nelle particolari condizioni del suolo e dell'atmosfera marziani.

Per questo motivo, recentemente vari gruppi di ricerca hanno avanzato la proposta di realizzare, sul suolo marziano, infrastrutture, come il fotobioreattore rappresentato in Fig. 1, nelle quali la CO_2 e l' N_2 atmosferici, i depositi di ghiaccio e i minerali contenuti nella regolite, rendano possibile la coltivazione dei cianobatteri.

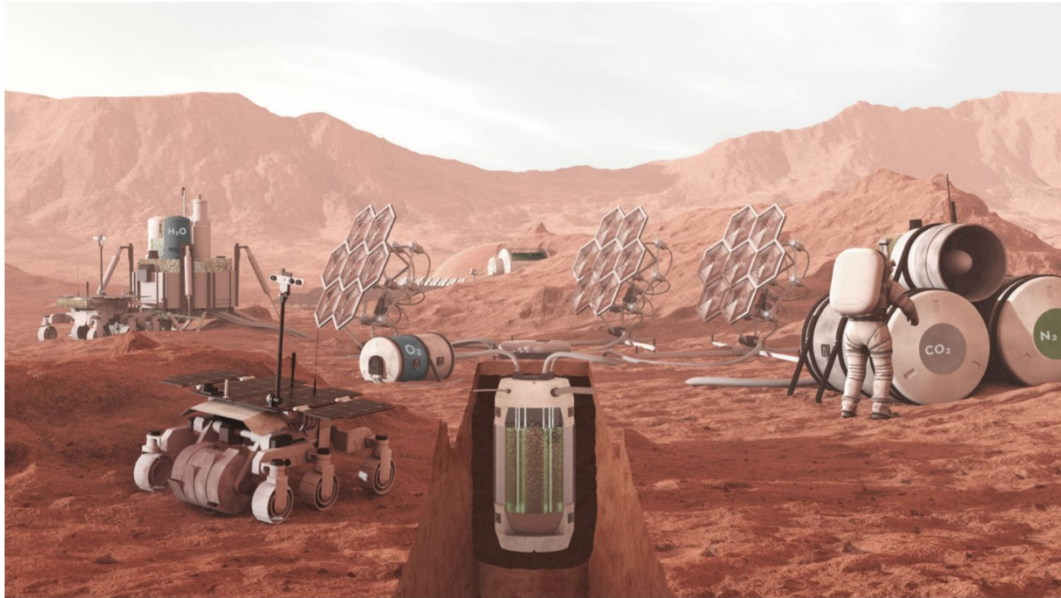


Fig. 1 Rappresentazione artistica di un sistema in cui vengono coltivati cianobatteri diazotrofi utilizzando materiali disponibili su Marte [3].

Il fotobioreattore è interrato al fine di proteggere le colture, l'hardware e gli operatori dalla polvere e dalle radiazioni, oltre che per migliorare la stabilità termica. Un modulo di separazione e compressione dei gas, sulla destra, simboleggia la fornitura di gas dall'atmosfera marziana. La luce proveniente dal Sole è convogliata da lenti di Fresnel e, quando necessario, integrata da luci LED.

Nella previsione che in futuro il sistema venga realizzato, i cianobatteri si inserirebbero all'interno di una catena trofica in cui, tramite la produzione di O_2 e proteine alimentari, potrebbero sostenere la crescita di produttori secondari che, a loro volta, potrebbero essere sfruttati per ottenere cibo, prodotti farmaceutici o carburanti, come schematizzato in Fig. 2.

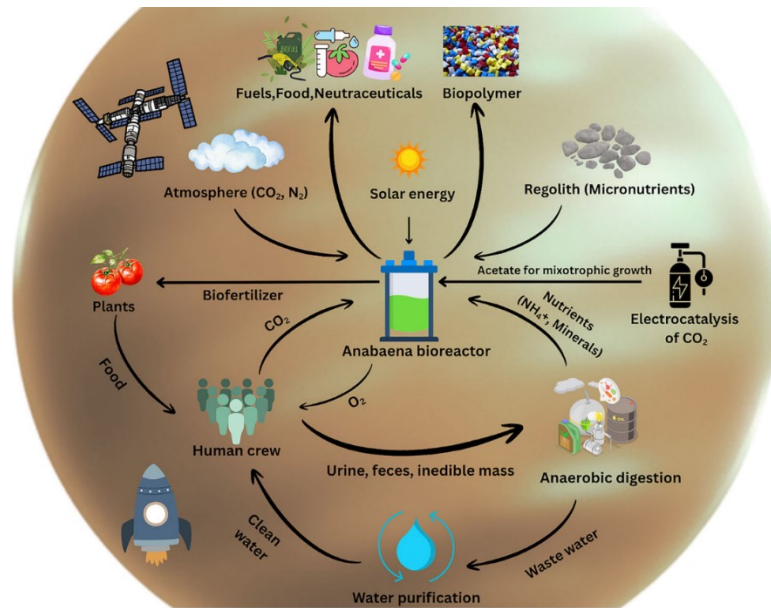


Fig. 2 Illustrazione del concetto di closed-loop cycling con *Anabaena* al centro delle funzioni biogenerative [1].

I primi studi riguardanti la crescita dei cianobatteri in condizioni di microgravità risalgono al 1987, nell'ambito del progetto MELiSSA: Micro-Ecological Life Support System Alternative, guidato dall'ESA (vedi Fig.3). Successivamente, nel 2014, si sono svolti esperimenti a bordo dell'Expose-R2 (facility dell'ESA installata all'esterno della Stazione Spaziale Internazionale) dove i campioni sono stati esposti al vuoto, alle radiazioni solari e cosmiche e a sbalzi termici estremi.

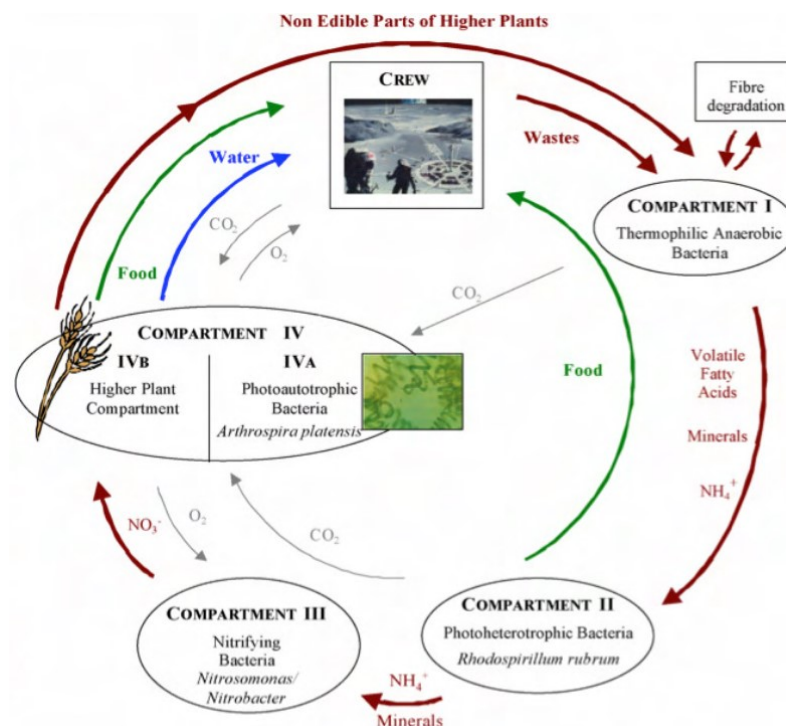


Fig. 3. MELiSSA – loop a cinque compartimenti [4].

Le notevoli differenze tra Marte e la Terra, riassunte in Fig. 4, potrebbero suggerire una totale inadeguatezza delle forme viventi terrestri all'ambiente marziano. Tuttavia, i cianobatteri apparvero sulla Terra circa 3,5-2,8 miliardi di anni fa, quando l'atmosfera terrestre era molto diversa da quella attuale e più simile a quella marziana. Inoltre, furono i primi organismi ad acquisire la capacità di effettuare la fotosintesi, facoltà che li rese protagonisti del Grande Evento di Ossidazione (GOE), verificatosi tra i 2,4 e i 2,1 miliardi di anni fa. Pertanto, gli scienziati concordano nel considerare i cianobatteri dei buoni candidati per la terraformazione.

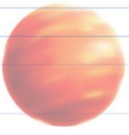
PARAMETER	EARTH	MARS
The main of atmosphere components	 N ₂ – 78 % O ₂ – 21 % Ar – 0.97 % CO ₂ – 0.03%	 CO ₂ – 96 % N ₂ – 1.9 % Ar – 1.9 %
Surface gravity	1 g	0.38 g
Surface pressure	101.3 kPa	0.5 – 1 kPa
UV light reach the planet's surface	> 300 nm	> 190 nm
Min / Max surface temperature	–80°C / +55°C	–145°C / +20°C
Average surface temperature	+15°C	–60°C

Fig. 4 Confronto tra le attuali condizioni ambientali della Terra e di Marte [5].

Attualmente, sono attivi quattro principali filoni di ricerca, volti ad indagare: i loro meccanismi di difesa contro i raggi UV [5], la dipendenza della crescita dalle condizioni di bassa pressione parziale di N₂ e alta di CO₂ [6], la tolleranza nei confronti dello ione perclorato e la capacità di sfruttare la regolite marziana come nutrimento [3].

In particolare, lo studio oggetto della presente discussione [7] si colloca all'interno delle ultime due macroaree elencate, focalizzandosi sulla ricerca e l'individuazione di un organismo modello, che mostri il miglior bilancio tra l'efficienza di crescita in presenza di regolite e ione perclorato e l'idoneità della biomassa come fonte nutritiva per altri organismi.

A questo scopo, sono stati esaminati cinque ceppi cianobatterici del genere *Anabaena* (PCC 7120, PCC 7122, PCC 7524, PCC 7937 e PCC 7938).

Si tratta di batteri filamentosi in grado di produrre amminoacidi fotoprotettivi simili alle micosporine (MAA), che conferiscono una buona tolleranza alle radiazioni UV, proprietà estremamente vantaggiosa nelle missioni spaziali.

Inoltre, in condizioni anossiche, le cellule vegetative si differenziano in eterocisti che fissano l'azoto atmosferico in ammoniaca.

La capacità di rendere il C e l'N₂ disponibili ad altri esseri viventi, unita ad un metabolismo adattivo, resistente ad alcuni importanti stressogeni ambientali, rendono *Anabaena* perfettamente adatto ai Sistemi di Supporto Vitale Biorigenerativo (BLSS) [1].

3. Approccio sperimentale

3.1 Ceppi e condizioni di crescita

Le colture di *Anabaena* spp. PCC 7120, 7122, 7937, e 7938, e *Nostoc* sp. PCC 7524, sono state fornite dal Pasteur Culture Collection of Cyanobacteria di Parigi, che rappresenta uno dei più completi e rinomati depositi di cianobatteri al mondo.

Il campione di *Lemna* sp., pianta acquatica fluttuante comunemente nota come "lenticchia d'acqua", dopo l'isolamento ambientale, è stato trattato con una soluzione di ipoclorito di sodio allo scopo di ottenere colture axeniche.

Il ceppo di *Escherichia coli* W utilizzato era conservato in stock di glicerolo al Leibniz-Institut DSMZ, il più grande e diversificato centro di risorse biologiche esistente.

3.2 Processamento genomico di *Anabaena* sp. PCC 7938

Una volta estratto, il DNA genomico di *Anabaena* sp. PCC 7938 è stato frammentato e sequenziato tramite la tecnologia paired-end di Illumina.

Le reads ottenute sono state sottoposte a controllo qualità e trimming degli adattatori; quindi, si è proceduto con l'assemblaggio de novo delle sequenze. Quest'ultimo è stato eseguito con il software SPAdes, che ha permesso di ottenere dei contigui di sequenza, minimizzando i mismatch e le indels.

Successivamente, ad ogni contiguo è stato attribuito un valore di coverage medio, sulla base del quale, si è svolto il binning, subito seguito dall'attribuzione dell'identità tassonomica ad ogni bin effettuata dal sistema Centrifuge.

Infine, i software Anvi'o e checkM, combinando le informazioni, quali il coverage, la frequenza dei tetranucleotidi, il contenuto in GC e la collocazione tassonomica, hanno condotto uno screening dei contaminanti e, quindi, valutato la qualità della sequenza genomica.

3.3 Applicazione della genomica comparativa

I genomi dei cinque ceppi di *Anabaena* sono stati processati da Prokka, pipeline bioinformatica di annotazione rapida che ha permesso di identificare la posizione precisa dei geni, prevederne le funzioni e mappare gli elementi regolatori.

Individuati i geni core, sono state ricostruite le relazioni evolutive tra i ceppi stimando le distanze di identità nucleotidica (ANI) tra le coppie di sequenze genomiche (risultati in Figura 5) e costruendo un albero filogenetico estremamente accurato e robusto, tramite il software RAxMLNG.

In aggiunta, sono stati condotti confronti tra i profili funzionali dei ceppi (Figura 6), grazie a MicrobeAnnotator, uno strumento di ricerca di omologia che si basa su database multipli (KOfam, Swissprot e trEMBL e RefSeq) per garantire ai geni un'attribuzione funzionale robusta.

Infine, con lo scopo di determinare se nei genomi dei cinque ceppi di *Anabaena* fossero presenti dei BGCs (Biosynthetic Gene Clusters) noti per la produzione di tossine, sono stati predetti i BGCs propri dei genomi in esame e li si è confrontati, in un'analisi diamond BLASTP all-against-all, con gli elementi di un database comprendente 94 BGCs, rinvenuti in cianobatteri e batteri associati. I risultati sono stati raccolti in una matrice presenza-assenza dei BGCs realizzata per ogni ceppo (Fig. 7).

3.4 Preparazione delle colture sulla regolite

I cinque ceppi cianobatterici sono stati coltivati in piastre da 24 pozzetti. Ogni ceppo è stato sottoposto a 7 diverse condizioni di crescita:

- acqua bidistillata e deionizzata (ddH₂O);
- BG11₀;
- ddH₂O addizionata con 200 kg m⁻³ di uno dei simulanti della regolite marziana (MGS-1, MGS-1S e MGS-1C) o lunare (LHS-1 e LMS-1).

Tutte le condizioni sono state preparate in triplicato; pertanto, in totale sono stati riempiti 105 pozzetti.

Le piastre sono state riposte per 28 giorni in incubatore, alla temperatura costante di 25° ed esposte, per 16 ore al giorno, alla luce LED.

Trascorso il tempo necessario, si è proceduto all'estrazione, con l'etanolo, della clorofilla *a*, la quale è stata successivamente quantificata allo spettrofotometro valutandone la densità ottica (OD) a 665nm.

Infine, dalla concentrazione di clorofilla *a*, usando un fattore di conversione determinato sperimentalmente (Tab. 1), si è inferita la biomassa di ogni campione.

Tab. 1 Fattori di conversione utilizzati per stimare le concentrazioni di biomassa a partire dalle concentrazioni di massa della clorofilla *a* (chl. *a*) [7].

PCC ID	Applied conversion factor (mass of chl. <i>a</i> / biomass)
PCC 7120	1.36%
PCC 7122	2.20%
PCC 7524	2.59%
PCC 7937	2.68%
PCC 7938	2.04%

La significatività delle differenze nella concentrazione di biomassa tra i ceppi di cianobatteri nelle sei diverse condizioni di crescita è stata valutata effettuando il test statistico ANOVA a due vie, seguito dal test di Tukey per i confronti multipli (*p*-value corretto < 0,05).

3.5 Preparazione delle colture sul perclorato

I ceppi di *Anabaena* sono stati coltivati in BG11₀ senza perclorati (condizione di controllo) e in BG11₀ arricchito con perclorato di calcio alle concentrazioni

crescenti di 3, 6 e 12 mM. Tali concentrazioni corrispondono a quelle che risulterebbero dall'impiego di rispettivamente 50, 100 e 200 kg m⁻³ di regolite contenente lo 0,6% in peso di ioni perclorato (una % tipica su Marte).

Inoltre, come per il test precedente, sono state realizzate tre repliche tecniche per ogni condizione ed è stata estratta la clorofilla *a* da ogni campione. Poi, le colture sono state riposte in incubatore e, dopo 3, 7, 10, 14, 21 e 28 giorni, è stata ripetuta l'estrazione. Infine, dai risultati si è stimata la concentrazione di biomassa e si è proceduto al confronto tra i ceppi.

3.6 Allestimento dell'esame di omogeneità colturale

Inizialmente, si è esaminata visivamente l'omogeneità delle colture di mantenimento dei cinque ceppi di *Anabaena*, nel terreno BG11₀.

Successivamente, per ogni ceppo è stata allestita una coltura in ddH₂O addizionata con 200 kg m⁻³ di MGS-1.

Le cinque colture e un controllo abiotico, costituito solo da MGS-1, sono stati riposti in incubatore per 28 giorni.

Dopo 14 giorni, si è proceduto con il prelievo e la fissazione in glutaraldeide (al 2%) di inoculi delle sei colture, per il conseguente esame al microscopio a fluorescenza. Al termine dei 28 giorni, i campioni sono stati trasferiti in eppendorf da 1,5mL, dove sono sedimentati. Quindi, le sei eppendorf sono state invertite 5 volte e, 30 secondi dopo, è stata valutata visivamente l'abbondanza del materiale sedimentato. Infine, da ogni sospensione è stato eseguito un prelievo, che, poi, è stato piastrato ed osservato al microscopio ottico invertito con lo scopo di ricercare gli aggregati di cianobatteri e regolite.

3.7 Coltivazione di *E. coli* e *Lemna* sp. sui lisati cianobatterici

A partire da 25g di biomassa secca per litro di soluzione, si sono ricavati i lisati filtrati per ogni ceppo di *Anabaena*. Poi, con lo spettrofotometro, se ne è stimata la concentrazione, in termini di carboidrati e proteine (Tab. 2).

Tab. 2 Concentrazione di carboidrati e proteine nei lisati (g/L). I valori rappresentano le medie e le deviazioni standard di tre repliche tecniche eseguite su ciascun ceppo tramite analisi spettrofotometriche [7].

PCC ID	Carbohydrates (g L ⁻¹)	Soluble proteins (g L ⁻¹)
PCC 7120	1.15 ± 0.30	0.44 ± 0.01
PCC 7122	0.50 ± 0.29	0.30 ± 0.01
PCC 7524	0.97 ± 0.05	0.32 ± 0.02
PCC 7937	1.10 ± 0.37	0.35 ± 0.01
PCC 7938	0.76 ± 0.25	0.28 ± 0.02

Una coltura cellulare di *E. coli* W, della quale è stata misurata la densità in cfu/mL, è stata distribuita in 7 provette, corrispondenti alle seguenti condizioni di crescita:

- LB;
- Soluzione salina;
- uno fra i cinque lisati filtrati di *Anabaena*.

Quindi, sempre tramite il metodo della conta delle Unità Formanti Colonia (CFU), si è rimisurata la densità cellulare raggiunta da *E. coli* nelle diverse condizioni.

Infine, applicando il test statistico ANOVA a una via, seguito dal test di confronto multiplo di Tukey (p -value corretto $< 0,05$), è stata valutata la significatività delle differenze tra le concentrazioni cellulari.

In un secondo momento, delle fronde di *Lemna* sp., sterilizzate in ddH₂O, sono state trasferite in una piastra da 24 pozzetti, contenenti, alternativamente:

- acqua distillata;
- terreno Hoagland;
- uno tra i lisati filtrati dei cinque ceppi di *Anabaena*.

Quindi, la piastra è stata riposta in incubatore ed ogni 2/3 giorni si è contato il numero di fronde individuabili, in ogni pozzetto, all'ingrandimento 10x.

Dopo 14 giorni di coltivazione, le fronde sono state lavate in ddH₂O, essiccate a 60°C e pesate.

Infine, tramite il test statistico ANOVA a una via e il test di confronto multiplo di Tukey (p -value corretto $< 0,05$) si sono confrontati i sette diversi valori di peso secco che le fronde hanno raggiunto nelle diverse condizioni.

4. Risultati e discussione

4.1 Analisi genomiche

Dalle comparazioni genomiche tra i cinque ceppi di *Anabaena*, riportate in Fig. 5, emerge che:

- PCC 7938 e PCC 7122 mostrano un'identità superiore al 99,9%, costituendo un unico cluster;
- PCC 7120 e PCC 7937 formano un secondo cluster, mostrando una similarità genica sopra il 95-96% (indicata dal colore giallo chiaro/bianco);
- il ceppo PCC 7524, sebbene mostri una certa parentela con il cluster 7120/7937 (colore rosso/arancio, indicativo dell'80-85% di identità), si distanzia significativamente da tutti i ceppi.

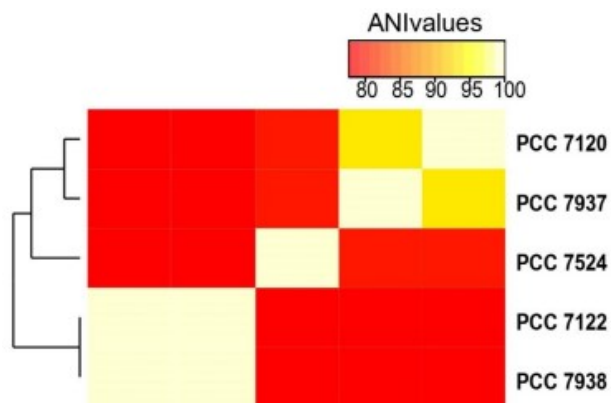


Fig. 5 Distanze di identità nucleotidica media (ANI) tra i cinque genomi, rappresentate in forma di heatmap [7].

Un'ulteriore conferma alla strutturazione dell'albero filogenetico deriva dai confronti tra le potenzialità metaboliche dei vari ceppi.

L'analisi dei risultati illustrati in Fig. 6, porta a concludere che il profilo metabolico più vasto e diversificato appartenga a PCC 7937, il quale mostra un grado di completezza superiore anche a PCC 7120, nonostante la loro notevole similarità genomica (ANI). Al contrario, PCC 7524 presenta un repertorio di funzioni leggermente ridotto, a dimostrazione della sua distanza evolutiva dagli altri ceppi, evidenziata anche nella heatmap soprastante. Infine, PCC 7122 e PCC 7938 sono rappresentati da due barre perfettamente identiche, per cui hanno lo stesso numero di pathway metabolici completi e profili funzionali molto simili, a riprova dell'elevato valore ANI.

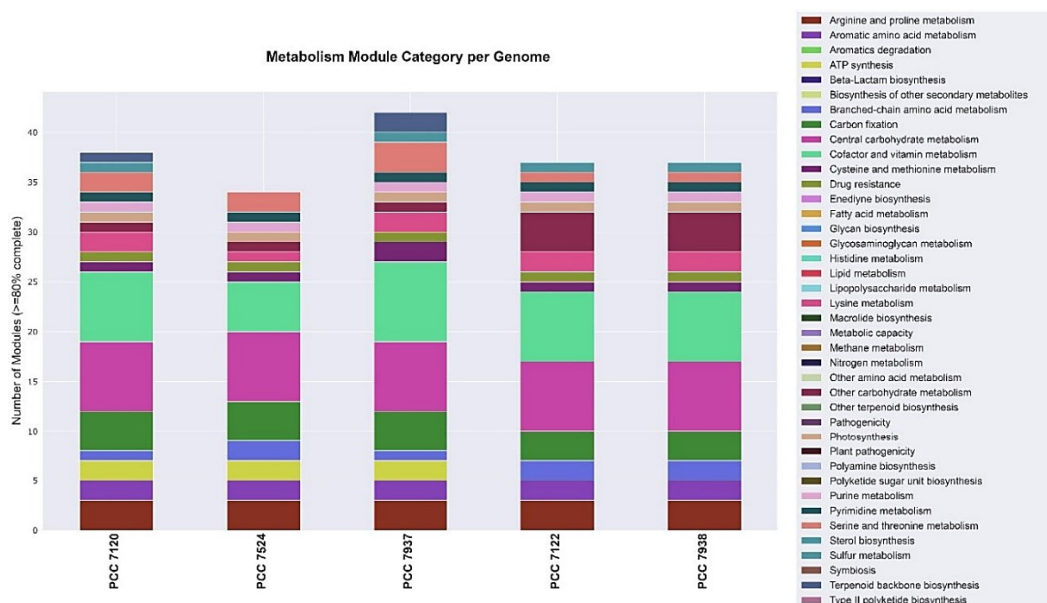


Fig. 6 Confronto tra le diverse funzioni metaboliche dei cinque ceppi, basato solo sui moduli KEGG aventi una completezza di almeno l'80% [7].

Le cellule vegetative di *Anabaena* sp. hanno dimostrato tassi di fissazione della CO₂, che in condizioni ottimali, raggiungono gli 1,45 gCO₂L⁻¹giorno⁻¹, paragonabili a quello di alcune alghe verdi, come *Chlorella vulgaris* e *Spirulina platensis*, che, rispettivamente, si attestano intorno ai 2,2 gCO₂L⁻¹giorno⁻¹ e ad 1,1 gCO₂L⁻¹giorno⁻¹ [1].

Inoltre, come si evince dalla Fig. 6, *Anabaena* sp. presenta pathway operanti la riduzione dei nitrati, dei solfati, e la biosintesi di una vasta gamma di composti organici, tra cui proteine, carboidrati (ad es. glicani) e lipidi.

L'insieme di queste sue potenzialità metaboliche le conferisce un grande valore aggiunto, sfruttabile in svariate applicazioni nell'ambito delle missioni spaziali.

Tuttavia, occorre tenere in considerazione che *Anabaena*, come tutti i membri della famiglia delle Nostocaceae, può sintetizzare cianotossine, tra cui l'anatossina-a (una neurotossina a rapida azione) e varie microcistine (epatotossine), che potrebbero compromettere l'idoneità della biomassa cianobatterica come fonte di nutrienti per i produttori secondari. Malgrado ciò, però, la loro espressione varia a seconda del ceppo e delle condizioni ambientali [1].

In Fig. 7, si osserva che in tutti e cinque i ceppi nessuno dei BGCs associati alla sintesi delle cianotossine (Microcystin, Cylindrospermopsin e Saxitoxin), è completo e a mancare sono perlopiù i geni core.

Di conseguenza, stando al confronto genico effettuato, non si prevede la produzione di alcuna tossina da parte dei ceppi esaminati; anche se, soltanto future analisi sperimentali potranno escludere con certezza la tossicità.

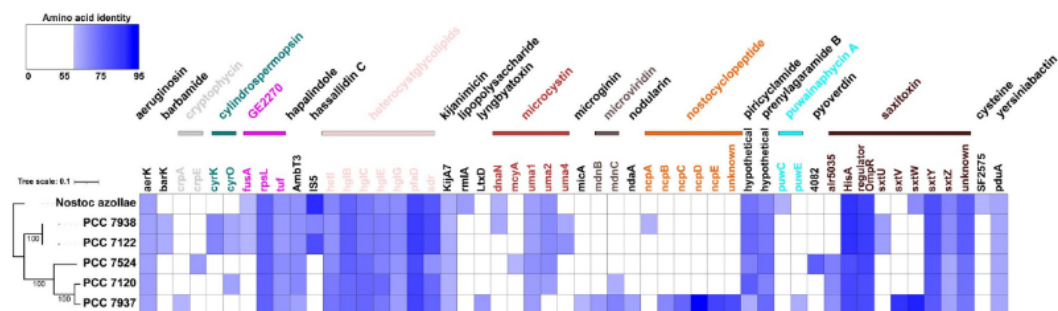


Fig. 7 Mappatura del potenziale tossicologico e biochimico dei ceppi. La presenza di un BGC è indicata dal colore blu; mentre la sua assenza dal colore bianco [7].

4.2 Crescita dipendente dalla regolite

Marte è noto con l'appellativo di "pianeta rosso", per via degli ossidi di ferro, abbondantemente presenti nella regolite marziana, strato di polvere e frammenti eterogenei che costituisce la superficie del pianeta.

La composizione della regolite marziana è prevalentemente basaltica [3] e, oltre al ferro, contiene silicati, solfati, nitrati, cloruri e perclorati. Questi ultimi, in particolare, sono caratterizzati da una tossicità elevata.

Nonostante ciò, però, diverse Nostocaceae sono in grado di utilizzare minerali di composizione simile come fonti di nutrienti [3].

Ad esempio, in uno studio del 2008 [8] è stato possibile coltivare *Nostoc* sp. HK-01 su un simulante di regolite marziana per circa 140 giorni.

Tuttavia, sono disponibili poche informazioni sulle dinamiche di crescita in funzione della concentrazione di regolite, su quali meccanismi vincolino tali dinamiche e su come la crescita possa essere potenziata [3].

Nel presente studio, allo scopo di assestare le capacità dei cinque ceppi batterici di utilizzare la regolite come sorgente di nutrienti minerali, è stata quantificata la biomassa prodotta.

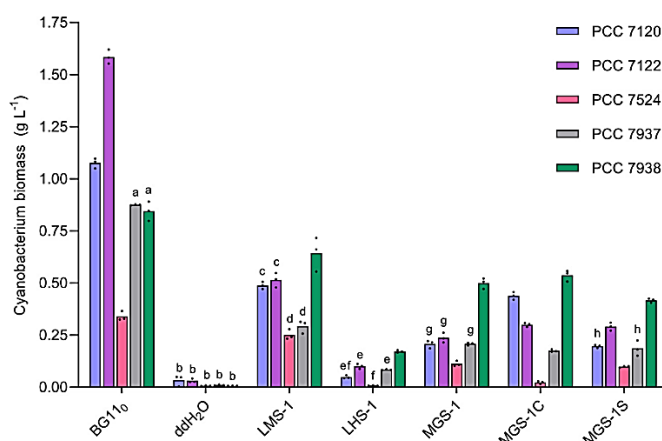


Fig. 8 Biomassa ottenuta dopo 28 giorni di coltivazione in BG110, in ddH2O, o ddH2O addizionata con simulanti della regolite lunare (LMS-1, LHS-1) e marziana (MGS-1, MGS-1C, MGS-1S) [7].

Sono stati inclusi anche simulanti di regolite provenienti dai mari e dagli altopiani lunari (LMS-1 e LHS-1), per due ragioni. In primo luogo, essi hanno fornito ulteriori punti di confronto, aiutando a valutare le capacità di crescita su regolite di diverse composizioni. In secondo luogo, i cianobatteri sono presi in considerazione anche per applicazioni sulla Luna: sebbene il nostro satellite sia privo di un'atmosfera sostanziale, i nutrienti minerali (così come l'acqua) potrebbero essere estratti dalla regolite e contribuire a ridurre la dipendenza dalla Terra.

In Fig. 8 emerge chiaramente come per tutti i ceppi, la crescita sia stata maggiore in presenza di LMS-1 e minore in presenza di LHS-1. Valori intermedi sono stati ottenuti con i simulanti della regolite marziana, cioè MGS-1 e suoi derivati.

Il ceppo più produttivo, indipendentemente dal tipo di regolite, si è dimostrato essere PCC 7938. In particolare, a contatto con MGS-1, ha prodotto più del doppio della biomassa di qualsiasi altro ceppo ($0.5 \pm 0.02 \text{ g L}^{-1}$).

PCC 7120 e PCC 7122 hanno prodotto la seconda e terza biomassa complessiva, con ordine variabile a seconda del simulante.

Questi ultimi hanno raggiunto valori di biomassa molto prossimi a quello di PCC 7937, in presenza di LHS-1, MGS-1 e MGS-1S.

PCC 7524 ha prodotto la minor quantità di biomassa in tutte le condizioni.

4.3 Tolleranza al perclorato

Nel 2008 il lander Phoenix ha, per la prima volta, riscontrato la presenza dell'anione perclorato sul suolo marziano.

La concentrazione rilevata nei campioni di suolo si aggira intorno allo 0,5-0,7% in peso.

Dunque, l'uso della regolite per la coltivazione dei cianobatteri, comporterà anche la loro esposizione ai perclorati, che, quindi, inciderà sull'efficienza dell'ISRU.

Inoltre, data l'elevata solubilità dello ione, se si trovasse dell'acqua liquida su Marte, questa sarebbe necessariamente ricca di perclorato in quanto esso è responsabile dell'abbassamento del punto di congelamento fino a -70° .

Purtroppo, però, l'anione perclorato è tossico per gli animali e nuoce alla crescita delle piante.

Inoltre, costituisce un pericolo anche sulla Terra, dove, oltre ad essere presente nei depositi naturali di nitrato di sodio, viene anche prodotto dall'uomo. Infatti, i suoi sali di ammonio e potassio sono forti agenti ossidanti utilizzati principalmente come propellenti per razzi, missili, esplosivi e fuochi d'artificio o, anche, in alcuni fertilizzanti a base di nitrati.

Proprio il largo impiego, però, lo ha reso un contaminante dell'acqua potabile e degli alimenti.

A partire dai primi anni 2000, sono iniziati, negli USA, i monitoraggi ambientali che hanno portato, l'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (EFSA), a stabilire,

nel 2014, una Dose Massima Giornaliera Tollerabile (DGT) pari a $0,3\mu\text{g/kg}$ di peso corporeo, aggiornato nel 2025 a $1,4\mu\text{g/kg}$ peso corporeo/giorno.

Nello specifico, il perclorato è classificato come interferente endocrino perché è in grado di interferire con l'assorbimento dello ioduro nella tiroide (tramite competizione a livello del trasportatore sodio-ioduro, causando ipotiroidismo e interferendo con il corretto sviluppo del sistema nervoso centrale dei feti e dei neonati.

Tuttavia, nonostante la sua notevole tossicità, ceppi cianobatterici appartenenti a diversi ordini (Chroococcales, Chroococcidiopsidales, Nostocales, Oscillatoriales, Pleurocapsales e Synechococcales) hanno manifestato un certo grado di tolleranza [9].

In particolare, lo studio in oggetto, si pone l'obiettivo di individuare il ceppo di *Anabaena* più resistente sulla base del rapporto tra i valori di biomassa raggiunti dopo 28 giorni di coltivazione in presenza di ioni perclorato e in loro assenza (situazione di controllo).

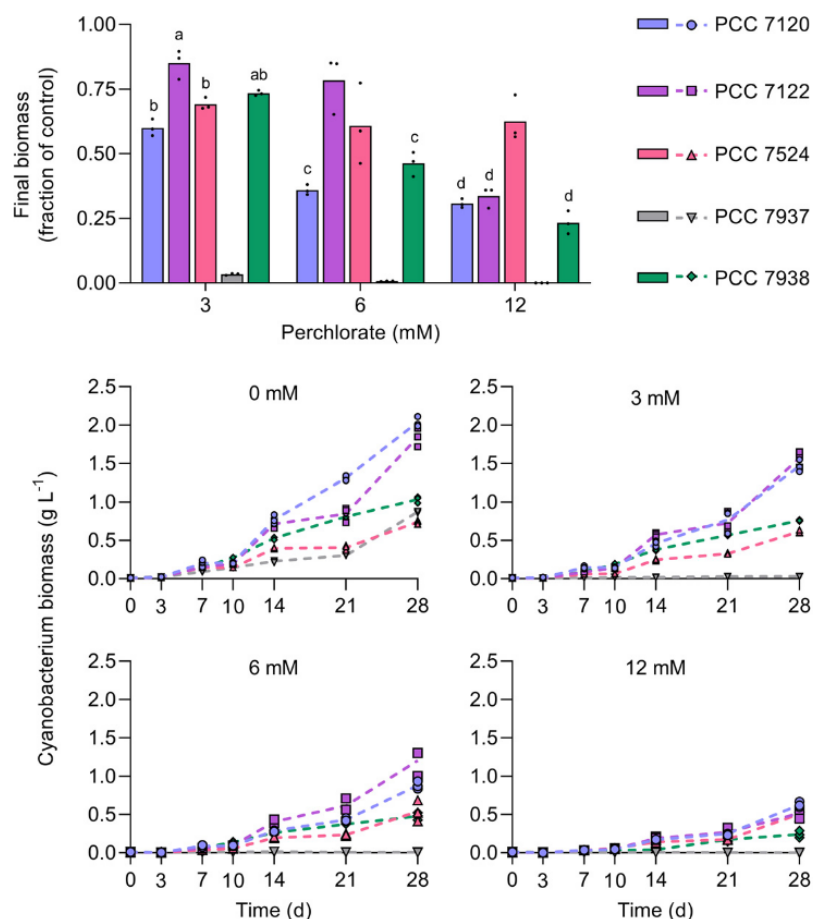


FIG 9 Crescita di PCC 7120, 7122, 7524, 7937 e 7938 a concentrazioni crescenti di perclorato di calcio [7].

Quattro dei cinque ceppi mostrano livelli di resistenza variabili, con nessuno di essi che supera in modo significativo gli altri e con il ceppo PCC 7937 inibito anche dalla concentrazione più bassa.

L'istogramma di Fig.9 suggerisce che in tutte e 3 le concentrazioni di perclorato, quattro dei cinque ceppi abbiano prodotto più del 20% della loro rispettiva biomassa di controllo, con l'unica eccezione del ceppo PCC 7937.

Alle concentrazioni di 3mM e di 6mM, PCC 7122 ha raggiunto valori più alti, producendo, rispettivamente, l'85% e il 78% della sua biomassa di controllo; anche se, a 3mM lo scarto con PCC 7938 non è così significativo.

Ad ogni modo, a mostrare la resistenza più alta alla massima concentrazione di perclorato testata è PCC 7524, con il 62% della biomassa di controllo. Per giunta, in tale ceppo si osserva una minore oscillazione della concentrazione di biomassa, al variare delle concentrazioni di perclorato.

PCC 7120 e PCC 7938 manifestano una tolleranza intermedia e simile; mentre, PCC 7937 esibisce la resistenza più bassa, con una crescita a malapena osservabile.

Tuttavia, urge sottolineare che, come riportato al paragrafo 3.4, la concentrazione della biomassa è stata inferita da quella della clorofilla *a*, applicando un fattore di conversione.

Tale metodo, però, presenta un grande limite di affidabilità che risiede nel fatto che agenti stressogeni (come i perclorati[9] o le radiazioni UV [5]) inducono i cianobatteri a ridurre drasticamente la produzione di clorofilla *a* e di carotenoidi. Ad esempio, stando a quanto riportato in Tab. 2 [9], in *Anabaena laxa* la concentrazione di clorofilla *a* passa da 4,3µg/mL a 1,3µg/mL.

Da ciò ne consegue che i risultati delle fasi di test eseguite con i simulanti della regolite e con il perclorato di calcio potrebbero essere affetti da bias, correggibili usando altri metodi per la stima della biomassa.

Tab. 2 Concentrazione di clorofilla *a* e di carotenoidi totali (esprese in µg/mL) e relativo rapporto, in cianobatteri esposti alle seguenti concentrazioni perclorato di magnesio: 0,25%=1,5mM 0,50%=3mM 1,0%=6mM [9].

<i>Species/strain</i>	<i>Sample</i>	<i>Chlorophyll a</i>	<i>Total carotenoids</i>	<i>Ratio chlorophyll a/carotenoids</i>
<i>Chalicogloea cavernicola</i>	Control	5.5 ± 0.1	1.2 ± 0.1	4.6
	0.25%	3.4 ± 0.1	1.1 ± 0.1	3.1*
<i>Chroococcidiopsis</i> sp.	Control	4.2 ± 0.1	1.8 ± 0.1	2.3 ^a
	0.25%	2.4 ± 0.5	1.2 ± 0.2	2.0 ^a
	0.5%	1.8 ± 0.1	0.5 ± 0.1	3.6 ^b
<i>Chroococcidiopsis cubana</i>	Control	4.5 ± 0.1	1.6 ± 0.1	2.8 ^a
	0.25%	3.8 ± 0.1	1.0 ± 0.1	3.8 ^b
	0.5%	1.3 ± 0.3	0.6 ± 0.1	2.2 ^a
<i>Chroococcidiopsis thermalis</i>	Control	4.8 ± 0.1	0.5 ± 0.1	9.6 ^a
	0.25%	3.8 ± 0.1	0.8 ± 0.1	4.7 ^b
	0.5%	2.5 ± 0.1	0.8 ± 0.1	3.1 ^b
	1.0%	1.4 ± 0.2	0.7 ± 0.2	2.0 ^c
<i>Anabaena laxa</i>	Control	4.3 ± 0.1	1.4 ± 0.1	3.1
	0.25%	3.1 ± 0.2	1.0 ± 0.1	3.1

Ad esempio, per risolvere questo problema, occorrerebbe misurare la densità ottica, a 750 nm, delle colture cellulari direttamente in piastra, tramite strumenti come il *Synergy HTX Multi-Mode Microplate Reader (BioTek)*, adottato in [9] che consentirebbe di realizzare delle curve di crescita affidabili, evitando di effettuare l'estrazione di pigmenti fotosintetici.

4.4 Tendenza a formare aggregati

Le camere di coltivazione a biofilms sono più efficienti, in termini di risorse, rispetto ai fotobioreattori planctonici. Per questo motivo, talvolta, la tendenza delle colture cellulari a formare biofilms risulta vantaggiosa e, quindi, desiderabile. Tuttavia, gli aggregati possono influenzare la fluidodinamica, portare a variazioni localizzate dei parametri di coltura, ostacolare i processi a valle e sporcare o danneggiare le apparecchiature. Inoltre, l'aggregazione può rendere estremamente difficoltosa la separazione della biomassa dalla regolite, operazione necessaria al fine di raccogliere l'una o rinnovare l'altra.

Dunque, sebbene la valutazione messa a punto dal presente studio sia solo qualitativa, riveste comunque un'importanza notevole.

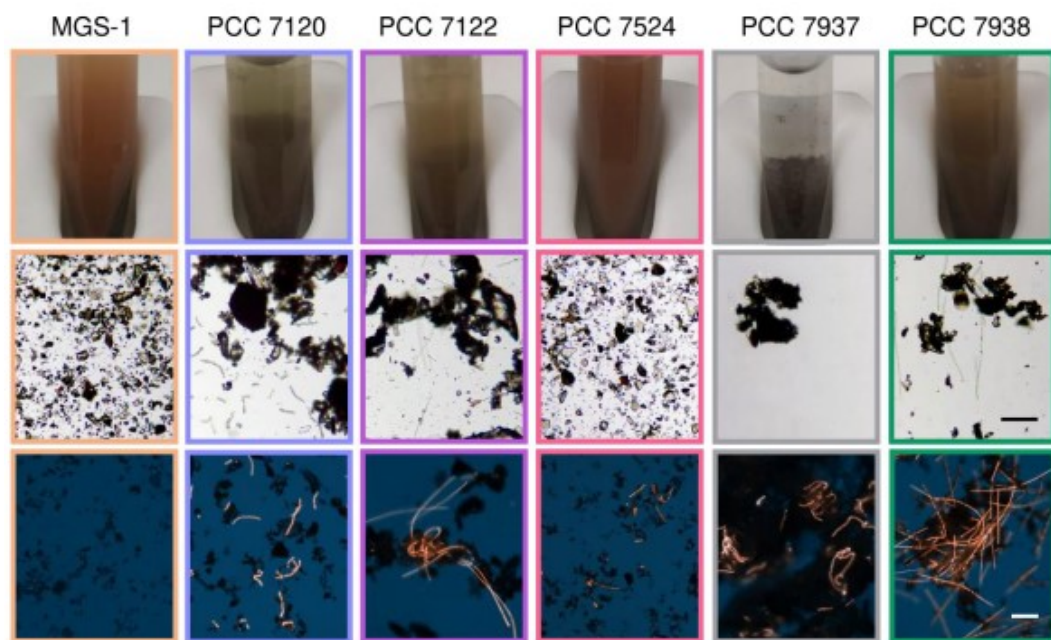


Fig. 10 Tendenze all'aggregazione di *Anabaena* sp. PCC 7120, 7122, 7524, 7937 e 7938, in acqua addizionata con MGS-1.

- **Fila superiore:** colture cianobatteriche di 28 giorni. Un controllo abiotico (a sinistra) è incluso per confronto.
- **Fila centrale:** foto, al microscopio ottico, delle colture mostrate nella fila superiore.
- **Fila inferiore:** immagini, al microscopio a fluorescenza, delle colture dopo 14 giorni.[7]

In condizioni standard (BG11₀), PCC 7122 tende a sviluppare aggregati cellulari fluttuanti o biofilm attaccati alle pareti del contenitore; al contrario, tutti gli altri ceppi formano culture omogenee o leggeri aggregati che possono facilmente essere disciolti, agitando delicatamente.

In presenza del simulante della regolite marziana (MGS-1), come si può vedere in Fig. 10, appaiono clusters di cellule in tutte le colture, tranne in quella di PCC 7524. In particolare, in PCC 7937 il grado di aggregazione è tale che, dopo l'inversione della provetta, non si è formata la sospensione torbida, come negli altri campioni; ma, le cellule e la regolite sono sedimentate immediatamente, lasciando un surnatante trasparente.

Pertanto, sulla base del criterio dell'omogeneità, in un fotobioreattore planctonico, come quello illustrato in Fig.1, PCC 7122 e PCC 7937 mostrano un'idoneità inferiore, rispetto agli altri ceppi.

Tuttavia, questa conclusione non tiene conto del fatto che i batteri che formano biofilms, in condizioni marziane simulate, hanno un tasso di sopravvivenza superiore, nel lungo termine, a quello delle cellule planctoniche.

Infatti, numerosi esperimenti condotti, a bordo dell'Expose-R2, hanno dimostrato che i biofilms di differenti microrganismi, tra i quali i cianobatteri dei generi *Chroococcidiopsis* e *Gloeocapsa*, manifestano un minor numero di danni al DNA rispetto alle forme libere [5]. Occorre, però, precisare che queste analisi sono state condotte su campioni cianobatterici che, prima di essere esposti al vuoto e alle radiazioni ultraviolette, erano stati essiccati.

Dunque, per validare l'ipotesi che il fotobioreattore planctonico proposto nel paper in esame rappresenti la soluzione ideale al trasporto di cianobatteri del genere *Anabaena*, dovrebbero essere condotti esperimenti simili a quelli sopracitati, ma, mantenendo *Anabaena* vitale, così da poter beneficiare della sua attività fotosintetica.

4.1 Sostenibilità come risorsa nutritiva per altri organismi

I batteri eterotrofi si nutrono di sostanze organiche, la cui disponibilità su Marte si prevede essere molto bassa.

Nonostante questo, però, svariati studi hanno comprovato l'utilizzo della biomassa cianobatterica di *Anabaena* come risorsa nutritiva per microrganismi, quali *E. coli* e *Bacillus subtilis* (vedi Fig. 12 [10]).

In particolare, in Fig.11 si può osservare come la crescita di *E. coli* W sia ben supportata dai lisati filtrati dei cinque i ceppi di *Anabaena*.

Infatti, in tutti i casi, *E. coli* ha raggiunto concentrazioni cellulari prossime o superiori a quella del controllo, coltivato in LB.

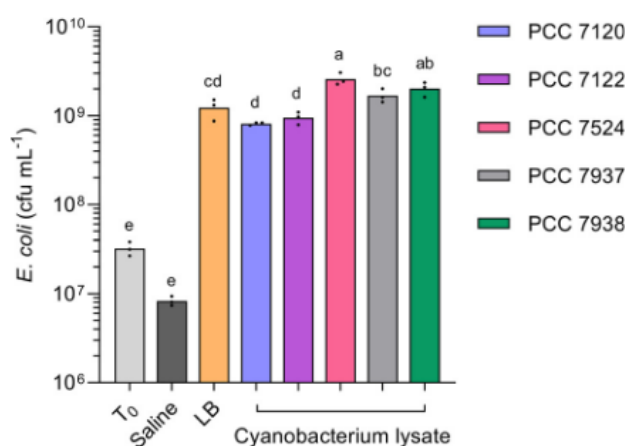


FIG 11 Concentrazioni cellulari di *E. coli* W all'inizio della coltura (T_0) e dopo l'incubazione notturna in soluzione salina (saline), terreno LB (LB), o in un lisato filtrato di PCC 7120, 7122, 7524, 7937 o 7938. Ad ogni colonna è attribuita una lettera alfabetica, in funzione della crescita del dato rappresentato (da "a" per il valore massimo ad "e" per il valore minimo). Il condividere la stessa lettera è indice della non significativa differenza statistica dei valori delle colonne [7].

La concentrazione più alta, pari a $2,6 \cdot 10^9 \pm 4,2 \cdot 10^8$ CFU/mL, è stata ottenuta in PCC 7524; mentre, la più bassa l'ha prodotta il lisato di PCC 7120 ed è risultata pari a $8,1 \cdot 10^8 \pm 2,9 \cdot 10^7$ CFU/mL.

Quest'ultimo valore, però, è in disaccordo con quanto riportato in "*Resistance of cyanobacteria to space and Mars environments, in the frame of the EXPOSE-R2 space mission and beyond*" [10].

Infatti, in esso si dimostra che 25g di biomassa secca di *Anabaena* PCC 7120 per litro di soluzione permettono ad *E. coli* W di raggiungere una concentrazione superiore a $3 \cdot 10^9$ CFU/ml [10].

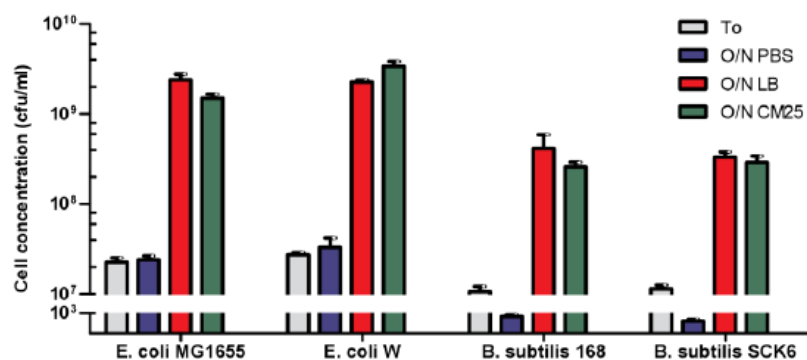


FIG 12 Concentrazioni cellulari di *E. coli* MG1655, *E. coli* W, *B. subtilis* 168 e *B. subtilis* SCK6 all'inizio della coltura (T_0) e dopo l'incubazione notturna in PBS, LB e listato cianobatterico di *Anabaena* sp. PCC 7120 (CM25) [10].

La mancata coincidenza dei risultati è probabilmente imputabile al fatto che nei due studi, per la fase di filtraggio dei lisati, si siano utilizzati filtri con pori di dimensioni notevolmente diverse.

Ciò ha fatto sì che, nonostante la concentrazione iniziale della biomassa fosse la stessa, le frazioni di biomassa trattenute dai filtri e, quindi, utilizzate come nutrimento, non fossero uguali.

Pertanto, per PCC 7120, come per gli altri ceppi, il valore riportato nell'articolo in oggetto non rappresenta una stima della produttività del ceppo in senso assoluto, ma, al contrario, va considerato contestualmente a quello degli altri ceppi, con il fine esclusivo del confronto.

Tale considerazione va applicata anche alla valutazione del potere nutritivo dei lisati nei confronti di *Lemna* sp.

Infatti, sebbene la maggior parte dei nutrienti necessari alla crescita delle piante siano presenti nella regolite, il suolo marziano è tossico a causa dei perclorati e, inoltre, non supporta lo sviluppo di apparati radicali. Dunque, anche per la coltivazione delle piante, si rivela necessario ricorrere alla biomassa cianobatterica.

Lemna sp., una piccola macrofita galleggiante comunemente nota come lenticchia d'acqua, è stata scelta come organismo modello delle piante superiori principalmente per la facilità di coltivazione in laboratorio; inoltre, le Lemnaceae sono considerate promettenti come fonte alimentare in sistemi spaziali per via della facilità di coltivazione, dell'elevata densità dei nutrienti, della mancanza di parti non commestibili e dell'elevata produttività.

La crescita di *Lemna* sp. è variata notevolmente a seconda del ceppo con cui è entrata in contatto (Fig.13).

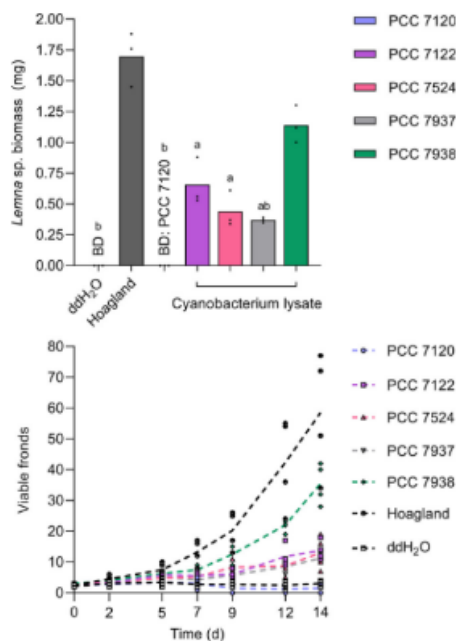


FIG 13 Crescita di *Lemna* sp. in lisati filtrati di PCC 7120, 7122, 7524, 7937 o 7938, in acqua distillata e deionizzata (ddH₂O), o in soluzione di Hoagland.

- **In alto:** biomassa di *Lemna* sp. dopo 14 giorni di coltivazione.
- **In basso:** numero di fronde vitali all'inizio della coltura e dopo 2, 5, 7, 9, 12 e 14 giorni di coltivazione. [7]

In ordine di biomassa decrescente, si trovano: PCC 7938 (1.14 ± 0.15 mg), PCC 7122 (0.66 ± 0.19 mg), PCC 7524 (0.44 ± 0.15 mg) e PCC 7937 (0.37 ± 0.02 mg). Le fronde poste nel lisato filtrato di PCC 7120 non si sono moltiplicate, ma sono diventate clorotiche. Le rese maggiori, però, si sono ottenute nella coltura di mantenimento (1.70 ± 0.22 mg), effettuata in terreno di Hoagland, che ha prodotto risultati considerevolmente migliori rispetto ai lisati cianobatterici.

5. Conclusioni

La valutazione dell'idoneità dei ceppi al Bio-ISRU su Marte, basatasi sui risultati riportati in Tab. 3, ha condotto alla selezione di PCC 7938 come cianobatterio modello.

Tab. 3 Panoramica dei risultati di test multipli che hanno portato alla selezione di *Anabaena* sp. PCC 7938 come organismo modello per Bio-ISRU [7].

Strain (PCC ID)	7120	7122	7524	7937	7938
Regolith-dependent growth	+	+	-	+/-	++
Perchlorate resistance	+/-	+	+	-	+/-
Suitability as a feedstock for heterotrophs	+	+	+	+	+
Suitability as feedstock for aquatic higher plants	-	+	+	+/-	++
Culture homogeneity (lack of biofilms/aggregates)	+/-	-	+	-	+

Questa scelta è stata dettata dal fatto che si tratta del ceppo con la più alta produttività in termini di biomassa, quando coltivato su simulanti di regolite marziana o lunare, ed ha una buona tolleranza ai perclorati. Per giunta, non mostra una forte tendenza all'aggregazione e sembra essere il più adatto come substrato per la crescita di altri organismi.

Tuttavia, è opportuno sottolineare che lo scopo di questo studio non era quello di valutare la produttività dei processi ISRU basati sui cianobatteri; pertanto, non sono stati simulati dei parametri, quali ad esempio la pressione parziale di N₂, di CO₂ e l'esposizione alle radiazioni cosmiche galattiche, che potrebbero avere un grosso impatto sulla crescita delle colture. Di conseguenza, PCC 7938 potrebbe non essere il candidato definitivo; ma, al momento, rappresenta il ceppo di *Anabaena* più adatto, costituendo, anche, una buona base per possibili future implementazioni.

A questo proposito, il team studentesco MUTANS, dell'Università di Padova, ha avviato un progetto di ricerca volto al miglioramento della resistenza di *Anabaena* PCC 7120 alle radiazioni e ai perclorati, in previsione di un suo utilizzo su Marte. Infatti, come precedentemente descritto, *Anabaena* è un cianobatterio capace di una naturale protezione nei confronti delle radiazioni UV e dello stress ossidativo, in quanto dotato di amminoacidi simili alle micosporine (MAA). Tuttavia, l'entità dei Raggi Cosmici Galattici (GCR) è tale da rendere necessaria l'implementazione di questi suoi meccanismi protettivi.

Per questo motivo, il primo obiettivo del progetto è indurre la sovraespressione di PprA, una proteina endogena, coinvolta nella riparazione del DNA.

Infine, essendo stata confermata sperimentalmente la buona tolleranza di PCC 7120 allo stress perclorico (risultati in Fig.14), si prevede l'ingegnerizzazione del batterio allo scopo di renderlo capace di convertire il perclorato disciolto nell'acqua in O₂ e Cl⁻, prodotti sfruttabili in molti processi biologici e chimici.

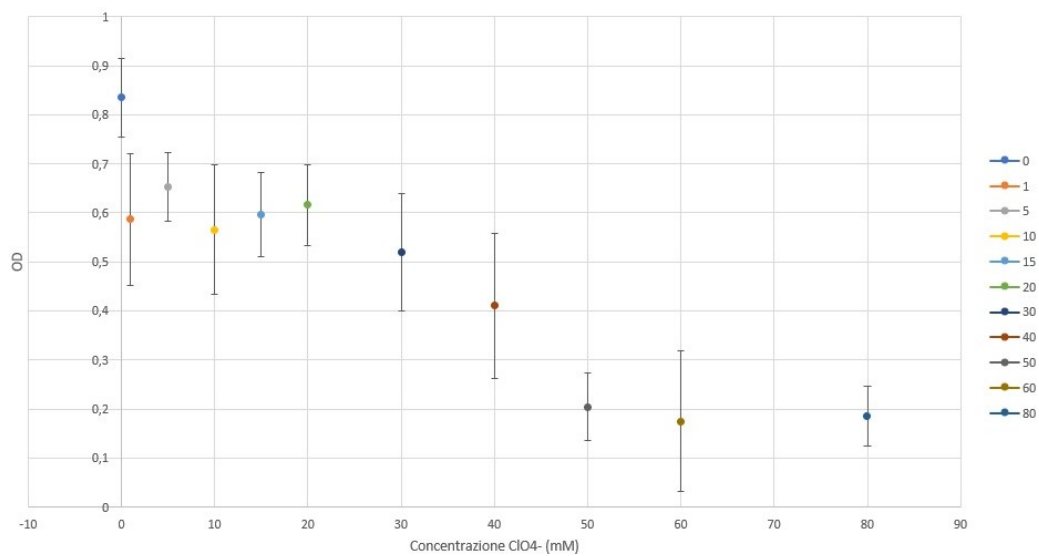


Fig. 14 Misurazione dell'OD allo spettrofotometro dopo una settimana di coltivazione a concentrazioni crescenti di perclorato di sodio

6. Bibliografia

- [1] C. Muddana, G. M. Desai, P. P. Wangikar, F. Zhang, H. B. Pakrasi, e Y. J. Tang, «Anabaena—a promising chassis for space exploration», *Npj Microgravity*, vol. 12, fasc. 1, p. 27, feb. 2026, doi: 10.1038/s41526-026-00568-2.
- [2] «Missions to Mars». [Online]. Disponibile su:
<https://exploration.esa.int/web/mars/-/56504-missions-to-mars>
- [3] T. P. Ramalho, G. Chopin, L. Salman, V. Baumgartner, C. Heinicke, e C. Verseux, «On the growth dynamics of the cyanobacterium Anabaena sp. PCC 7938 in Martian regolith», *Npj Microgravity*, vol. 8, fasc. 1, p. 43, ott. 2022, doi: 10.1038/s41526-022-00240-5.
- [4] C. Lasseur *et al.*, «MELISSA: THE EUROPEAN PROJECT OF CLOSED LIFE SUPPORT SYSTEM», *Gravitational Space Biol.*, vol. 23, fasc. 2, 2010.
- [5] Z. Mazur e I. Ślesak, «Cyanobacteria Under UV Radiation: General Insights into Stress Responses», *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 26, fasc. 22, p. 10926, gen. 2025, doi: 10.3390/ijms262210926.
- [6] C. Verseux, T. P. Ramalho, E. Bohuon, N. Kunst, V. Lang, e C. Heinicke, «Dependence of cyanobacterium growth and Mars-specific photobioreactor mass on total pressure, pN₂ and pCO₂», *Npj Microgravity*, vol. 10, fasc. 1, p. 101, nov. 2024, doi: 10.1038/s41526-024-00440-1.
- [7] T. P. Ramalho, G. Chopin, O. M. Pérez-Carrascal, N. Tromas, e C. Verseux, «Selection of Anabaena sp. PCC 7938 as a Cyanobacterium Model for Biological ISRU on Mars», *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 88, fasc. 15, pp. e00594-22, lug. 2022, doi: 10.1128/aem.00594-22.
- [8] M. Arai, K. Tomita-Yokotani, S. Sato, H. Hashimoto, M. Ohmori, e M. Yamashita, «Growth of terrestrial cyanobacterium, Nostoc sp., on Martian Regolith Simulant and its vacuum tolerance», *Biol. Sci. Space*, vol. 22, fasc. 1, pp. 8–17, 2008, doi: 10.2187/bss.22.8.
- [9] P. Rzymiski, B. Poniedziałek, N. Hippmann, e Ł. Kaczmarek, «Screening the Survival of Cyanobacteria Under Perchlorate Stress. Potential Implications for Mars *In Situ* Resource Utilization», *Astrobiology*, vol. 22, fasc. 6, pp. 672–684, giu. 2022, doi: 10.1089/ast.2021.0100.
- [10] C. Verseux, «Resistance of cyanobacteria to space and Mars environments, in the frame of the EXPOSE-R2 space mission and beyond». 27 aprile 2018. doi: 10.13140/RG.2.2.28437.88808.



Selection of *Anabaena* sp. PCC 7938 as a Cyanobacterium Model for Biological ISRU on Mars

Tiago P. Ramalho,^a Guillaume Chopin,^a  Olga M. Pérez-Carrascal,^b Nicolas Tromas,^{c,d}  Cyprien Verseux^a

^aCenter of Applied Space Technology and Microgravity (ZARM), University of Bremen, Bremen, Germany

^bDepartment of Integrative Biology, University of California, Berkeley, California, USA

^cDépartement des Sciences Biologiques, Université de Montréal, Montréal, Quebec, Canada

^dLS2N, Faculté des Sciences et Techniques (FST), Université de Nantes, Nantes, France

Tiago P. Ramalho and Guillaume Chopin contributed equally to this article. Author order was determined by tossing a coin.

ABSTRACT Crewed missions to Mars are expected to take place in the coming decades. After short-term stays, a permanent presence will be desirable to enable a wealth of scientific discoveries. This will require providing crews with life-support consumables in amounts that are too large to be imported from Earth. Part of these consumables could be produced on site with bioprocesses, but the feedstock should not have to be imported. A solution under consideration lies in using diazotrophic, rock-weathering cyanobacteria as primary producers: fed with materials naturally available on site, they would provide the nutrients required by other organisms. This concept has recently gained momentum but progress is slowed by a lack of consistency across contributing teams, and notably of a shared model organism. With the hope to address this issue, we present the work performed to select our current model. We started with preselected strains from the *Nostocaceae* family. After sequencing the genome of *Anabaena* sp. PCC 7938—the only one not yet available—we compared the strains' genomic data to determine their relatedness and provide insights into their physiology. We then assessed and compared relevant features: chiefly, their abilities to utilize nutrients from Martian regolith, their resistance to perchlorates (toxic compounds present in the regolith), and their suitability as feedstock for secondary producers (here a heterotrophic bacterium and a higher plant). This led to the selection of *Anabaena* sp. PCC 7938, which we propose as a model cyanobacterium for the development of bioprocesses based on Mars's natural resources.

IMPORTANCE The sustainability of crewed missions to Mars could be increased by biotechnologies which are connected to resources available on site via primary producers: diazotrophic, rock-leaching cyanobacteria. Indeed, this could greatly reduce the mass of payloads to be imported from Earth. The concept is gaining momentum but progress is hindered by a lack of consistency across research teams. We consequently describe the selection process that led to the choice of our model strain, demonstrate its relevance to the field, and propose it as a shared model organism. We expect this contribution to support the development of cyanobacterium-based biotechnologies on Mars.

KEYWORDS space exploration, biological life-support systems (BLSS), perchlorate resistance, geomicrobiology, *in situ* resource utilization (ISRU)

Crewed missions to Mars are foreseen within the coming decades (1). While astronauts of the first expeditions will likely spend less than 2 years at the surface (2), longer stays are expected to follow, up to permanently inhabited outposts—perhaps

Editor Jennifer B. Glass, Georgia Institute of Technology

Copyright © 2022 American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Address correspondence to Cyprien Verseux, cyprien.verseux@zarm.uni-bremen.de.

The authors declare no conflict of interest.

Received 6 April 2022

Accepted 6 June 2022

Published 12 July 2022

akin to current research stations in Antarctica. This will require the supply of large amounts of consumables, from oxygen to food to drugs, and the costs per mass of a payload sent to Mars will limit the feasibility of importing those consumables from Earth. An alternative would consist in producing them on site, and biological systems could there play a key role—especially after being engineered (3–6). However, biological systems must be fed and the feedstock, as other consumables, would best be sourced from Mars. In addition to decreasing the mass of imported payloads, this would provide the flexibility required to address changing mission demands and help reduce the dependence of outposts on costly and uncertain resupply missions (e.g., 5).

A solution has been proposed which lies in using diazotrophic, rock-weathering cyanobacteria (7–9). Their physiology is such that they could, it seems, be fed with materials available on site: water mined from the ground or atmosphere; carbon and nitrogen sourced from the atmosphere; and the local regolith (the Martian soil), from which it has been argued that they could extract the other necessary nutrients (7, 8, 10, 11). The cultured cyanobacteria could then produce various consumables directly, such as O₂ and dietary supplements (12, 13), but also support the growth of secondary producers (plants or microorganisms [9, 11]). The latter could, in turn, generate a wide range of critical consumables, ranging from food to structural materials to pharmaceuticals to fuels (e.g., 3, 14–16).

The number of research teams contributing to this concept, or closely related concepts, has increased significantly over the past 2 years (11, 16–21). Swift progress can consequently be expected in the near future. We argue, however, that this progress would benefit from a higher consistency across research groups. In particular, a shared model organism would help focus resources, compare results from separate projects, and ensure that studies from different teams can build upon one another. The work presented here is aimed at selecting such a model.

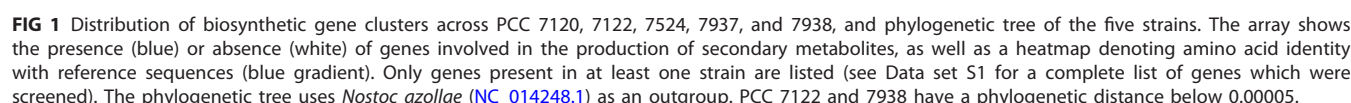
It has been suggested that desert cyanobacterium species were particularly suited to the utilization of local resources (*in situ* resource utilization, ISRU) on Mars (17, 19), as extremophilic properties may be an asset in case of exposure to harsh environmental conditions. While agreeing that such traits might provide an advantage, we put a stronger emphasis on other features, with the assumption that cultivation hardware would provide conditions mild enough for less resistant species. We do not anticipate, for instance, exposure to Mars-ambient UV flux, temperatures, or atmospheric pressure. Accordingly, we focused on the *Nostocaceae* family: some species within are (i) diazotrophic; (ii) able to use regolith as a source of mineral nutrients (8, 10, 11, 22); (iii) capable of fast growth; (iv) edible; and/or (v) amenable to genetic engineering.

Five strains from this family, preselected based on growth rates and robustness, were considered. After comparing their genomic data to determine their relatedness and provide insights into their physiology, we performed a series of assays to select among them a model organism. The main criteria we applied can be divided into two categories: (i) ISRU capabilities (efficiency of growth on regolith and perchlorate resistance); and (ii) suitability of the biomass as feedstock for other organisms, here assessed using models of heterotrophic bacteria (*Escherichia coli* W) and aquatic higher plants (*Lemna* sp.). Tendencies to aggregate were also taken into account because biofilms could interfere with photobioreactor operations.

This work led to the selection of *Anabaena* sp. PCC 7938, for which we provide a genome sequence that will help facilitate future investigations. We are relying on it for ongoing studies and suggest that other teams include it in their efforts, even if only to provide a point of comparison.

RESULTS

Genome-based comparison. When the present study was initiated, genome sequences were available for four of the five preselected strains. After sequencing the remaining genome, that of *Anabaena* sp. PCC 7938 (hereafter, PCC 7938), genome data from the five



strains (Table S1) were compared to determine their relatedness and provide insights into their physiology.

PCC 7938 and PCC 7122 appeared to have the same number of complete metabolic pathways and similar functional profiles (Fig. S2), although more pathways involved in nitrate reduction were found in the former (Fig. S3). Pathways related to galactose degradation, nucleotide sugar biosynthesis, and sulfate reduction were found to have a higher degree of completeness in PCC 7122 and PCC 7938 than in the other strains.

Fifty-two genes involved in biosynthetic gene clusters (BGCs) were identified, belonging to 23 BGCs (Fig. 1). Only the heterocystglycolipid gene cluster (present in all genomes) is complete. The BGC for nostocyclopeptide (a putative anti-toxin [23]) is nearly complete in PCC 7937, as well as GE2270 (an inhibitor of bacterial protein synthesis [24]) in PCC 7122 and PCC 7938. However, none of the cyanotoxin BGCs is complete and, for most (including microcystin and saxitoxin), essential core genes were found to be missing (25).

Biomass concentrations varied across both regolith types and strains (Fig. 2). For all strains, growth was highest in LMS-1 and lowest in LHS-1. Intermediate values were obtained with MGS-1 and its derivatives, and which among those regolith types most supported growth was strain-dependent. The most productive strain on regolith was

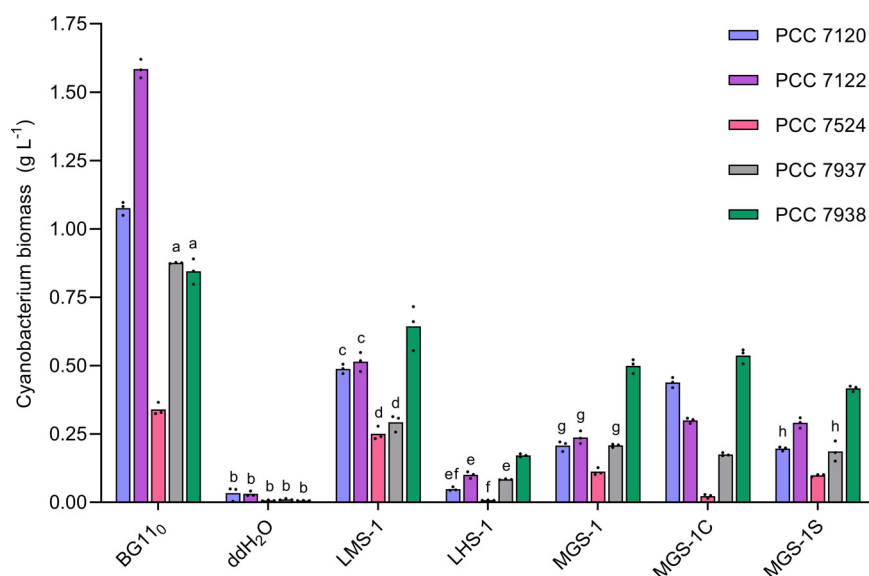


FIG 2 Biomass of PCC 7120, 7122, 7524, 7937, and 7938 after 28 days of cultivation in BG11₀, double-distilled and deionized water (ddH₂O), or ddH₂O supplemented with 200 kg m⁻³ of one among five regolith simulants: MGS-1 Mars Global Simulant (MGS-1); MGS-1C Clay ISRU (MGS-1C); MGS-1S Sulfate ISRU (MGS-1S); LHS-1 Lunar Highlands Simulant (LHS-1); or LMS-1 Lunar Mare Simulant (LMS-1). Columns represent mean values of three biological replicates (dots). Means obtained within a given medium and which do not share a letter are significantly different (Tukey test, adjusted $P < 0.05$).

PCC 7938: its final biomass was highest, regardless of the regolith type. In MGS-1, in particular, it yielded more than twice the biomass of any other strain (0.5 ± 0.02 g L⁻¹). Second overall came PCC 7120 and PCC 7122, which yielded the second- and third-highest biomass across all simulants (which among both came second was dependent on regolith type). Their biomass was either matched (LHS-1, MGS-1, and MGS-1S) or closely followed (LMS-1 and MGS-1C) by that of PCC 7937. PCC 7524 produced the least biomass under all conditions.

Perchlorate resistance. Perchlorate resistance was assessed by comparing biomass concentrations after 28 days of cultivation in the presence of perchlorate ions (3, 6, or 12 mM) with control values obtained without perchlorate (Fig. 3). The ranking of strains based on fitness varied with concentration. PCC 7122 reached the highest concentration in proportion to no-perchlorate controls in 3 and 6 mM perchlorate ions ($85\% \pm 6\%$ and $78\% \pm 11\%$, respectively), although the difference with PCC 7938 was not significant in 3 mM. However, PCC 7524 displayed a higher resistance in 12 mM, reaching $62\% \pm 9\%$ of the control's final biomass. This strain showed the lowest variation within the tested range of perchlorate concentrations. PCC 7120 and PCC 7938 had intermediate (and similar) resistance levels. Finally, PCC 7937 exhibited the lowest perchlorate resistance: growth was barely detectable at any of the tested concentrations.

Culture homogeneity. Culture homogeneity—a lack of a tendency to form surface biofilms or aggregates, which may interfere with the foreseen bioprocesses—was assessed qualitatively. Under standard conditions, cultures of PCC 7122 tended to develop free-floating cell aggregates or biofilms attached to the walls of culture vessels; all other strains led to nearly homogeneous cultures, or formed loose aggregates which could be dismantled with gentle shaking. In the presence of regolith simulant, clusters of cells and regolith appeared in all cultures but those of PCC 7924. With PCC 7937, in particular, the degree of aggregation was such that cells and regolith sedimented immediately after inverting tubes, leaving a clear supernatant (as opposed to the turbid suspension that persisted in other samples). The other strains adhered less strongly to the regolith (Fig. S5).

Suitability as a nutrient source for other organisms. The suitability of cyanobacterium strains as a nutrient source for other organisms was evaluated by cultivating a heterotrophic bacterium (*Escherichia coli* W) and an aquatic higher plant (*Lemna* sp.) in a filtered lysate of cyanobacterium biomass (25 g_{DW} L⁻¹ before filtration).

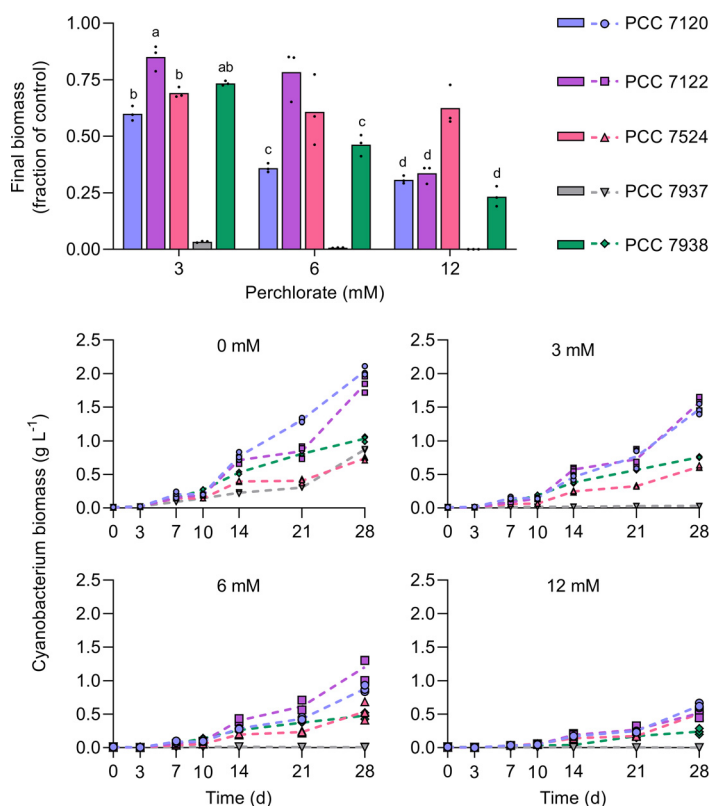


FIG 3 Growth of PCC 7120, 7122, 7524, 7937, and 7938 in the presence of perchlorates. Top: Biomass obtained after 28 days of cultivation in BG11₀ spiked with 3, 6, or 12 mM perchlorate ions (parent salt: calcium perchlorate), as a fraction of the biomass obtained in perchlorate-free BG11₀. Columns represent mean values of three biological replicates (dots). Means obtained within a given perchlorate concentration and which do not share a letter are significantly different (Tukey test, adjusted $P < 0.05$). Bottom: Biomass at culture onset and after 3, 7, 10, 14, 21, and 28 days of cultivation in BG11₀ spiked with 0, 3, 6, or 12 mM perchlorate ions. Symbols represent biological replicates.

Filtered lysates from all strains supported the growth of *E. coli* (Fig. 4). After overnight cultivation, *E. coli* cell concentrations reached levels equivalent to (PCC 7120, 7122, and 7937) or significantly higher than (PCC 7524 and 7938) those in LB medium, where they reached $9.2 \times 10^9 \pm 3.2 \times 10^8$ CFU mL⁻¹. Their range remained narrow across filtered lysates: from $8.1 \times 10^8 \pm 2.9 \times 10^7$ (PCC 7120) to $2.6 \times 10^9 \pm 4.2 \times 10^8$ (PCC 7524) CFU mL⁻¹.

The biomass produced by *Lemna* sp. within 2 weeks of cultivation varied significantly across filtered lysates (Fig. 5). The highest value (1.14 ± 0.15 mg) was obtained with PCC 7938, which was followed by PCC 7122 (0.66 ± 0.19 mg), PCC 7524 (0.44 ± 0.15 mg), and PCC 7937 (0.37 ± 0.02 mg). Fronds placed in the filtered lysate from PCC 7120 did not multiply but became chlorotic. In all cases, biomass yields were significantly lower than in Hoagland solution (1.70 ± 0.22 mg).

DISCUSSION

To be sustainable, settlements on Mars should rely on consumables produced on site rather than imported from Earth. It has been suggested that cyanobacteria could serve this purpose by feeding bioprocesses: after being cultivated using the planet's natural resources, they would produce nutrients for other organisms of biotechnological interest (9). Proofs-of-concept have been obtained and suggest that such a trophic chain could be implemented. However, systematic characterization and modeling are required to determine whether this solution would be cost-effective. Such efforts require a model organism which, ideally, would be used by a majority of the contributing

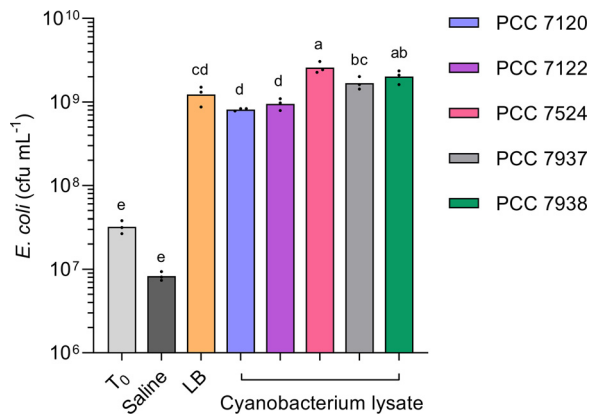


FIG 4 Cell concentrations of *E. coli* W at culture onset (T_0) and after overnight incubation in saline solution (saline), LB medium (LB), or a filtered lysate of PCC 7120, 7122, 7524, 7937, or 7938. Columns represent mean values of three biological replicates (dots). Means that do not share a letter are significantly different (Tukey test, adjusted $P < 0.05$).

research groups. After assessing candidate strains based on features relevant to the foreseen processes, we propose *Anabaena* sp. PCC 7938 as a model cyanobacterium for studies pertaining to the development of biological ISRU on Mars.

Our work started with five strains from the Pasteur Culture Collection of Cyanobacteria: *Anabaena* spp. PCC 7120, 7122, 7937, and 7938, and *Nostoc* sp. PCC 7524 (other designa-

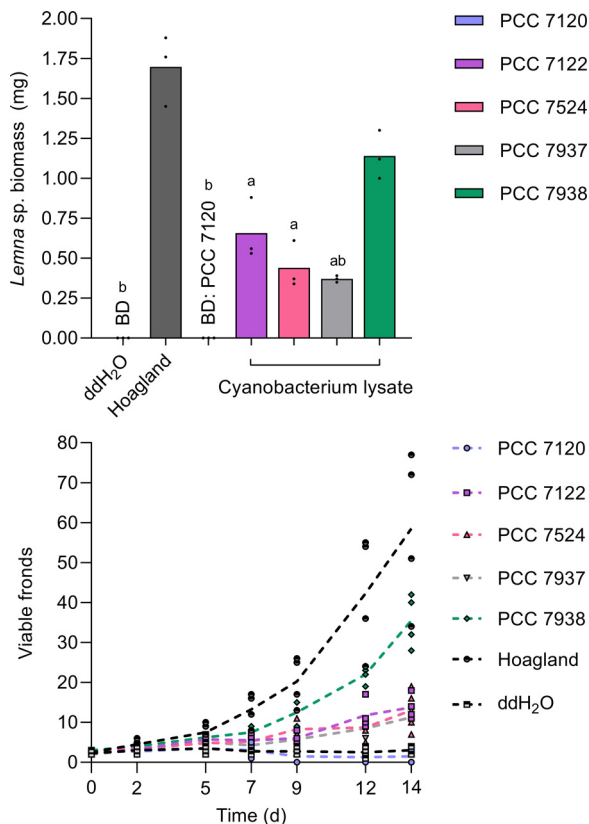


FIG 5 Growth of *Lemna* sp. in filtered lysates of PCC 7120, 7122, 7524, 7937, or 7938, in distilled and deionized water (ddH₂O), or in Hoagland solution (Hoagland). Top: Biomass of *Lemna* sp. after 14 days of cultivation. Columns represent mean values of three biological replicates (dots). Means that do not share a letter are significantly different (Tukey test, adjusted $P < 0.05$). BD, below detection. Bottom: Number of viable fronds at culture onset and after 2, 5, 7, 9, 12, and 14 days of cultivation. Symbols represent biological replicates.

tions can be found in literature: classification within *Nostocaceae* can be tentative and evolves rapidly). Prior to performing experiments, we sequenced the genome of PCC 7938—the others were already available at the time—and compared genomic data of the five strains. One motivation was to determine their relatedness; most striking was the genomic closeness of PCC 7122 and 7938, which is consistent with the overall similarity of the results obtained, for those strains, in the assays described below. Another motivation was a search for toxic secondary metabolites whose associated gene clusters are known. Indeed, toxins may affect the suitability of cyanobacteria as a nutrient source for secondary producers, let alone their edibility (if they are to be used as a dietary supplement). While genes belonging to toxin-associated clusters were identified, essential core genes were missing, and the production of no specific toxin was consequently predicted. This way of assessing toxicity, however, only gives limited insights: toxins may be produced that our approach failed to identify. Experimental validation would be required to conclude on a lack of toxicity.

Candidates were then compared with a series of experiments. The first pertained to the strains' abilities to feed on Martian regolith: these abilities will largely determine the efficiency of cyanobacterium growth on Mars, where the regolith would be the source of all nutrients not provided as atmospheric gases. A comparison was performed by growing each strain with three mineral mixtures analogous to Martian regolith, in high-purity water and under ambient air, with no other source of nutrients. Those mixtures were MGS-1—a simulant based on windblown soil at Rocknest (26)—and its sulfate-rich and smectite-rich derivatives. Simulants of regolith from lunar maria and highlands were included as well, for two main reasons. First, they provided additional points of comparison (helping assess capacities to grow on regolith of different compositions). Second, cyanobacteria are being considered for applications on the Moon: while our satellite lacks a substantial atmosphere, mineral nutrients (as well as water) could be sourced from the regolith and help reduce the dependency on Earth of bioprocesses. Regardless of the simulant, PCC 7938 was the most productive strain. In MGS-1, which is particularly relevant as it represents a type of regolith widespread on Mars, that strain reached biomass concentrations at least twice as high as any other strain.

The Martian regolith will not be a source of nutrients only: it contains toxic compounds, among which perchlorates are presumably the most critical. Those oxychlorine species have been detected and quantified at several locations on Mars (e.g., 27–29). They are likely ubiquitous at the surface, and how their concentration changes with depth is unknown (30). If no remediation is performed, using regolith as a source of nutrients means exposing cyanobacteria to perchlorates; resistance to those compounds is consequently expected to influence the efficiency of ISRU-based cyanobacterium cultivation. To compare the perchlorate resistance of the five preselected strains, the latter were grown in BG11_o spiked with concentrations of calcium perchlorate (a likely parent salt at Rocknest; [31]) leading to 3, 6, and 12 mM perchlorate ions. These concentrations correspond to those that would result from using 50, 100, and 200 kg m⁻³ of regolith containing 0.6 wt% of perchlorate ions (a seemingly typical concentration on Mars). We used the decrease in growth induced by perchlorates as the metric for comparison. Perchlorate resistance varied among strains, although none largely outperformed the others. Under all conditions, four of the five strains reached biomass concentrations above 20% of the no-perchlorate controls—the only exception being PCC 7937.

One major application suggested for cyanobacteria grown using materials available on Mars is their use as a nutrient source for other organisms. These secondary producers could then perform a wide range of functions, including the production of drugs, fuels, biomaterials, and various industrially useful chemicals; metal leaching; and food processing for taste improvement (4, 5). We thus compared the suitability of lysed and filtered biomass from the five preselected cyanobacterium strains as feedstock for two distant organisms: a heterotrophic bacterium and a higher plant.

Owing in large part to their dependence on organics, whose availability on Mars remains unknown but is expected to be very low, heterotrophic organisms most likely

could not be fed directly with Mars's natural resources. The biomass of some cyanobacteria, however, can be used as a nutrient source: heterotrophic bacteria (*E. coli* W, *E. coli* K-12, *Bacillus subtilis* 168, and *B. subtilis* SCK6) were previously grown in a filtrate of ground PCC 7120 (32), and *E. coli* W in a filtrate of ground PCC 7938 (11) or of ground *Chroococcidopsis* sp. CCME 029 (17). Here, we use *E. coli* W as a model, owing both to its being a widespread model organism and to its versatility in biotechnologies. After overnight cultivation, *E. coli* W reached concentrations in all cyanobacterium lysates comparable to those reached in LB medium, with little difference among strains.

While plants are autotrophs and could rely on atmospheric (rather than organic) carbon, they are generally expected not to be able to grow in unprocessed Martian regolith, among others because of a low bioavailability of mineral nutrients, low amounts of fixed nitrogen, poor water-holding potential, and excess salts and toxins (33–35). It has been suggested that cyanobacteria could be used as a nutrient source, whether as a supplement in processed regolith or in a solution for soilless cultivation (9), although, to our knowledge, that higher plants can be cultivated using cyanobacterium-extracted compounds as the only nutrient source beside water and atmospheric gases remained to be demonstrated. Here, we use duckweed (*Lemna* sp.), a small floating macrophyte, as a model higher plant. This was primarily motivated by its ease of cultivation in a microbiology laboratory. However, duckweeds are being considered as a food source in space due to their high nutrient density, lack of inedible parts, and high productivity (36–38). Growth of *Lemna* sp. in cyanobacterium lysates varied largely across cyanobacterium strains. PCC 7938 led to the highest biomass and frond numbers (ca. twice that of the second most productive strain); it was followed by PCC 7122, 7524, and 7937. PCC 7120 did not support the growth, or even survival, of *Lemna* sp.; what in that strain may be the cause currently cannot be ascertained.

It should be pointed out that the quantitative results obtained here were only meant for comparing strains: they should not be relied on to assess the productivity of cyanobacterium-based ISRU processes. Cultivation conditions in regolith, for instance, were not optimized; nor were steps taken to increase the resistance of cyanobacteria to perchlorates, or to remove the latter. As another example, the cyanobacterium biomass was simply ground and filtered before being fed to *E. coli* or *Lemna* sp., leaving out the large fraction of the biomass retained by the filters, and no attempt was made to convert nonmetabolizable compounds into useable forms.

The cyanobacterium strains' tendency to form aggregates and surface-bound biofilms was accounted for in the present selection, although it was assessed only qualitatively. Biofilms may be desired for some applications; examples may be the control of Martian dust over enclosed areas (39) or the use of biofilm cultivation chambers which, for some applications, may be more resource-efficient than planktonic photobioreactors. Here, however, we considered aggregation a drawback: in a bioprocess based on the production of planktonic biomass, biofilms can affect fluid dynamics, lead to localized changes in culture parameters, hinder downstream processes, and foul or damage equipment (40). In addition, it may make the separation of biomass and regolith (to collect the former or renew the latter) highly challenging. This criterion decreased the perceived suitability of PCC 7122—which even under routine conditions developed large, free-floating aggregates and formed biofilms on cultivation equipment—and of PCC 7937, which created large lumps of cells and grains when grown on regolith.

After considering the results as a whole (Table 1), we elected to use PCC 7938 as a cyanobacterium model for future studies pertaining to biological ISRU on Mars. First, because—in addition to features common to all preselected strains, such as diazotrophy—it led to the highest biomass productivity when grown on Martian or lunar regolith simulants, and appeared to be most suitable as a substrate for other organisms. Second, because it did not reveal any major flaw pertaining to other criteria, such as a high sensitivity to perchlorates or a strong tendency to aggregate.

PCC 7938 may not be the cyanobacterium which would eventually be used for practical applications: testing and comparing a large number of candidates from various

TABLE 1 Overview of the results from the comparative tests which led to the selection of *Anabaena* sp. PCC 7938 as a model strain

Strain (PCC ID)	7120	7122	7524	7937	7938
Regolith-dependent growth	+	+	–	+/-	++
Perchlorate resistance	+/-	+	+	–	+/-
Suitability as a feedstock for heterotrophs	+	+	+	+	+
Suitability as feedstock for aquatic higher plants	–	+	+	+/-	++
Culture homogeneity (lack of biofilms/aggregates)	+/-	–	+	–	+

genera may lead to the identification of more suitable isolates, and improvements may be brought using bio-engineering. It is, however, the most suitable strain identified so far, and it provides a good basis for assessing and increasing the resource-efficiency of cyanobacterium ISRU on Mars.

MATERIALS AND METHODS

Strains and growth conditions. *Anabaena* spp. PCC 7120, 7122, 7937, and 7938, and *Nostoc* sp. PCC 7524, were obtained from the Pasteur Culture Collection of Cyanobacteria (Paris, France). They were maintained inside a poly klima PK 520-LED photo-incubator at 25°C, in BG11₀ medium, with a light intensity of 5 to 10 $\mu\text{mol}_{\text{ph}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (16 h/8 h day/night cycle). Prior to experiments, cultures to be used for inoculation were cultivated on a rotary shaker at 100 rpm under a light intensity of 15 to 20 $\mu\text{mol}_{\text{ph}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Duckweed (*Lemna* sp.) was isolated from a stream in the Bürgerpark (Bremen, Germany). Axenic cultures were obtained by treatment with a sodium hypochlorite solution, as recommended by Sree and Appenroth (41). Routine cultivation was performed in Hoagland medium and otherwise under the same conditions as for the cyanobacteria.

Escherichia coli W (DSM 1116) was acquired from the German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (Braunschweig, Germany). Prior to experiments, samples from glycerol stocks were streaked on LB-agar plates and incubated overnight at 37°C.

Genome sequencing of *Anabaena* sp. PCC 7938. Genomic DNA of *Anabaena* sp. PCC 7938 was extracted using Macherey-Nagel's NucleoSpin Soil kit and sequenced using an Illumina NovaSeq 6000 S4, with 150-bp paired-end reads. A genomic library (with an average fragment size of 477 bp) was prepared using the NEB Ultra II kit (New England Biolabs). Low-quality reads and adapter sequences were trimmed using fastp (v0.20.1; [42]). Cleaned reads were then assembled with SPAdes (v3.11.1), using --careful parameter to reduce the potential number of mismatches and short indels (43). Reads were mapped back to SPAdes contigs using bowtie2 (v2.4.4; [44]) and contigs were filtered, clustered and binned using Anvi'o (v7.0; [45]). Each bin was taxonomically classified using Centrifuge (v1.04; [46]). Combining information such as coverage, tetranucleotide frequencies, GC content, and taxonomic affiliation, contaminants were screened for and the quality of the genome sequence was assessed. Completeness and contamination were estimated using Anvi'o (97.18% completeness, 8.45% redundancy) and checkM (v1.1.3; [47]; 99.4% completeness, 0% contamination).

Genome-based comparison of the cyanobacterium strains. Gene prediction in, and annotation of, the genomes of PCC 7120, 7122, 7524, 7937, and 7938 (Table S1) were done using Prokka (v1.14.6; [48]). A total of 298 core genes (shared by all strains, with blastp identity > 90%) were identified with Roary (v3.13.3; [49]) and aligned with --mafft Roary parameters. A phylogenetic tree was built in RAxML-NG (v. 1.1.0; 50) using the GTRGAMMA model, with 100 bootstraps. The average nucleotide-identity distances of the five genomes were estimated using FastANI (v1.32; [51]).

The five genomes were compared at the gene and functional levels using MicrobeAnnotator (v2.0.5; [52]; --full mode), which relies on the databases KOfam (53), UniProt's Swissprot and trEMBL (54), and NCBI's RefSeq (55). Genome-scale metabolic models were reconstructed using gapseq (v1.2; [56]), with --doall parameters and an autotrophic medium (gapseq media resources) for the gapfill step. gapseq relies on the databases MetaCyc (57), ModelSEED (58) and the Transporter Classification Database (59). The metabolic components were then compared using Metage2Metabo (v1.5.0; [60]), with --iscope parameters and a growth medium (seed) predicted from PCC 7938. A correspondence analysis was performed using the FactoMineR and factoextra R packages to compare models based on their metabolic potential.

In order to determine whether BGCs known to enable the production of toxins were found in any of the five genomes, a database of BGCs found in cyanobacteria and associated bacteria was generated. It gathered 94 BGCs and 460 genes (Data set S1). BGCs were predicted using ANTISMASH (v5.1.2; [61]), and the corresponding reference sequences (of nucleotides and amino acids) were retrieved from the NCBI or ANTISMASH databases. An all-against-all diamond BLASTP analysis (v2.0.8; [62]) was applied to find the best reciprocal hits between elements in the database and the cyanobacterium genome sequences (identity > 60%, and length of the sequences aligned > 30%). A presence-absence matrix of BGC in the five cyanobacterium strains was generated and combined with the phylogenetic tree using iTOL (v6; [63]).

Regolith-dependent growth. The five cyanobacterium strains were cultivated in 24-well plates containing 1.5 mL of double-distilled and deionized water (ddH₂O), BG11₀, or ddH₂O supplemented with 200 kg m⁻³ of one among the following regolith simulants: MGS-1 (26), MGS-1S, MGS-1C, LHS-1, and

LMS-1 (64). The simulants were purchased from the Center for Lunar and Asteroid Surface Science (Orlando, FL, USA); their bulk chemistry is given in Table S2. The inoculum, prepared by washing a pre-culture twice in ddH₂O, was delivered to an optical density at 750 nm of 0.02. All conditions were prepared in triplicate. The inoculated plates were sealed with parafilm to reduce evaporation and slits were cut to enhance gas exchange. Plates were incubated for 28 days at 25°C, with a light intensity of 15 to 20 $\mu\text{mol}_{\text{ph}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (16 h/8 h day/night cycle) and, to avoid shading from suspended regolith grains, without shaking. Chlorophyll a was extracted with ethanol from the whole of each sample and quantified based on optical density at 665 nm (65). The final biomass in each sample was inferred from chlorophyll a concentrations, using a conversion factor determined experimentally (Table S3). The significance of the differences in biomass concentration between cyanobacterium strains was assessed using a two-way ANOVA followed by Tukey's multiple-comparison test (adjusted *p*, 0.05).

Perchlorate resistance. Strains were grown in BG11₀ without perchlorates or spiked with calcium perchlorate (Sigma-Aldrich, Merck) at concentrations leading to 3, 6, and 12 mM perchlorate ions. The biomass obtained under each condition was determined after 0, 3, 7, 10, 14, 21, and 28 days. Cultivation was prepared and performed, and biomass quantified and compared, as described above (section "Regolith-dependent growth").

Culture homogeneity. Tendencies to form surface biofilms and aggregates were assessed qualitatively. Under routine conditions, this was performed by mere visual inspection. When regolith was used as a source of nutrients, this was performed as follows. Cells were grown for 28 days in ddH₂O supplemented with 200 kg m⁻³ of MGS-1. Samples were transferred to 1.5 mL Eppendorf tubes and left to sediment. Tubes were then inverted 5 times and left standing for 30 s, after which the abundance of sedimentary materials was assessed visually. Samples were further examined for the presence of cyanobacteria-regolith aggregates under an inverted microscope (Bresser Science IVM 401); images were then acquired using a mounted camera (Bresser MikroCam 5.0) and the associated software (MicroCamLabII). Additionally, fluorescence images were obtained from samples (fixed with 2% glutaraldehyde) of 14-day-old cultures grown under the same conditions. This was performed using a Zeiss Axioscope 5/7 microscope (Zeiss, Germany; equipped with a Solid-State Light source Colibri 3, type RGB-UV, an Axiocam 702 mono camera, and a 90 HE LED filter set) with the 470 and 625 nm light channels. Z-stacks were captured with a motorized stage, deconvoluted, and collapsed into a Z projection, using the manufacturer's Zen software (version 3.0).

Suitability as a nutrient source for other organisms. Filtered lysates of each strain were prepared from 25 g of dry biomass per L, as previously reported (11). An estimate of carbohydrate and protein concentrations in the lysates is given in Table S4.

E. coli W was cultivated overnight in the cyanobacterium filtered lysates, and final cell densities were assessed, as previously described (11). Differences in cell concentrations across filtered lysates and across controls were assessed with a one-way ANOVA followed by Tukey's multiple-comparison test (adjusted *p*, 0.05).

Assays with *Lemna* sp. were conducted as follows. Fronds from a culture in exponential phase were washed by dipping them successively in three vessels containing sterile ddH₂O. They were then transferred to 24-well plates (one colony of two to three fronds per well) containing 1.5 mL of distilled water, Hoagland medium, or one among the cyanobacterium filtered lysates. Each condition was prepared in triplicate. Plates were then incubated in conditions similar to the routine ones but with a light intensity of 15 to 20 $\mu\text{mol}_{\text{ph}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. The number of fronds was determined every 2 to 3 days (each new frond was counted from the moment when it was unambiguously visible with a 10x magnifying glass). After 14 days of cultivation, fronds were rinsed with ddH₂O, dried at 60°C, and weighed. The dry weight between conditions was compared with a one-way ANOVA followed by Tukey's multiple-comparison test (adjusted *p*, 0.05).

Statistical analysis. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism version 9.2.0 for Windows, by GraphPad Software (San Diego, California).

Data availability. PCC 7938 contigs are available in GenBank under Bioproject number [PRJNA812045](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJNA812045).

SUPPLEMENTAL MATERIAL

Supplemental material is available online only.

SUPPLEMENTAL FILE 1, PDF file, 2 MB.

SUPPLEMENTAL FILE 2, XLSX file, 0.01 MB.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Muriel Gugger (Pasteur Institute, Paris) for her insights when preselecting cyanobacterium strains; Klaus Juergen Appenroth (Jena University, Germany) for instructions on the obtention of axenic duckweed cultures; Clémence Frioux (INRIA Bordeaux) for her advice on GEM reconstruction; Sven Kerzenmacher (UFT, Bremen University) for access to fluorescence microscope facilities; and Guillaume Pillot (UFT, Bremen University) for support in operating these facilities.

This research work was supported by a Humboldt Research Fellowship for postdoctoral researchers to C.V. The project it belongs to is part of the "Humans on Mars Initiative" funded by the Federal State of Bremen and the University of Bremen.

REFERENCES

1. ISECG. 2018. The global exploration roadmap, 3rd edition. NP-2018–01-2502-HQ. NASA Headquarters, Washington, DC.
2. Drake BG. 2009. Human exploration of Mars: design reference architecture 5.0. NASA/SP-2009–566. NASA Headquarters, Washington, DC.
3. Berliner AJ, Hilzinger JM, Abel AJ, McNulty MJ, Makrygiorgos G, Aversesh NJHH, Sen Gupta S, Benvenuti A, Caddell DF, Cestellos-Blanco S, Doloman A, Friedline S, Ho D, Gu W, Hill A, Kusuma P, Lipsky I, Mirkovic M, Luis Meraz J, Pane V, Sander KB, Shi F, Skerker JM, Styer A, Valgardson K, Wetmore K, Woo S-GG, Xiong Y, Yates K, Zhang C, Zhen S, Bugbee B, Clark DS, Coleman-Derr D, Mesbah A, Nandi S, Waymouth RM, Yang P, Criddle CS, McDonald KA, Seefeldt LC, Menezes AA, Arkin AP. 2021. Towards a biomanufacturing on Mars. *Front Astron Sp Sci* 8.
4. Hendrickx L, Mergeay M. 2007. From the deep sea to the stars: human life support through minimal communities. *Curr Opin Microbiol* 10:231–237. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2007.05.007>.
5. Nangle SN, Wolfson MY, Hartsough L, Ma NJ, Mason CE, Merighi M, Nathan V, Silver PA, Simon M, Swett J, Thompson DB, Ziesack M. 2020. The case for biotech on Mars. *Nat Biotechnol* 38:401–407. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0485-4>.
6. Poulet L, Engeling K, Hatch T, Stahl-Rommel S, Velez-Justiniano Y-A, Castro-Wallace S, Buncheq J, Monje O, Hummerick M, Khodadad CLM. 2022. Large-scale crop production for the Moon and Mars: current gaps and future perspectives. *Front Astron Sp Sci* 8:733944. <https://doi.org/10.3389/fspas.2021.733944>.
7. Brown I, Sarkisova S, Garrison D, Thomas-Keprta K, Allen C, Jones J, Galindo C, McKay D. 2008. Bio-weathering of lunar and Martian rocks by cyanobacteria: a resource for Moon and Mars exploration. *Lunar and Planetary Sciences*.
8. Olsson-Francis K, Cockell CS. 2010. Use of cyanobacteria for in-situ resource use in space applications. *Planet Space Sci* 58:1279–1285. <https://doi.org/10.1016/j.pss.2010.05.005>.
9. Verseux C, Baqué M, Lehto K, De Vera JPP, Rothschild LJ, Billi D. 2016. Sustainable life support on Mars - the potential roles of cyanobacteria. *Int J Astrobiol* 15:65–92. <https://doi.org/10.1017/S147355041500021X>.
10. Arai M, Tomita-Yokotani K, Sato S, Hashimoto H, Ohmori M, Yamashita M. 2008. Growth of terrestrial cyanobacterium, *Nostoc sp.*, on Martian regolith simulant and its vacuum tolerance. *Biol Sci Space* 22:8–17. <https://doi.org/10.2187/bss.22.8>.
11. Verseux C, Heinicke C, Ramalho TP, Determann J, Duckhorn M, Smagin M, Avila M. 2021. A low-pressure, N₂/CO₂ atmosphere is suitable for cyanobacterium-based life-support systems on Mars. *Front Microbiol* 8:733944.
12. Gódia F, Albiol J, Montesinos JL, Pérez J, Creus N, Cabello F, Mengual X, Montras A, Lasseur C. 2002. MELISSA: a loop of interconnected bioreactors to develop life support in space. *J Biotechnol* 99:319–330. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(02\)00222-5](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(02)00222-5).
13. Poughon L, Laroche C, Creuly C, Dussap C-G, Paille C, Lasseur C, Monsieurs P, Heylen W, Coninx I, Mastroleo F, Leys N. 2020. *Limnospira indica* PCC8005 growth in photobioreactor: model and simulation of the ISS and ground experiments. *Life Sci Space Res (Amst)* 25:53–65. <https://doi.org/10.1016/j.lssr.2020.03.002>.
14. McNulty MJ, Xiong Y, Yates K, Karuppanan K, Hilzinger JM, Berliner AJ, Delzio J, Arkin AP, Lane NE, Nandi S, McDonald KA. 2021. Molecular pharming to support human life on the moon, Mars, and beyond. *Crit Rev Biotechnol* 41:849–864. <https://doi.org/10.1080/07388551.2021.1888070>.
15. Rothschild LJ. 2016. Synthetic biology meets bioprinting: enabling technologies for humans on Mars (and Earth). *Biochem Soc Trans* 44:1158–1164. <https://doi.org/10.1042/BST20160067>.
16. Krüyer NS, Realf MJ, Sun W, Genzale CL, Peralta-Yahya P. 2021. Designing the bioproduction of Martian rocket propellant via a biotechnology-enabled in situ resource utilization strategy. *Nat Commun* 12:6166. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-26393-7>.
17. Billi D, Fernandez BG, Fagliarone C, Chiavarini S, Rothschild LJ. 2021. Exploiting a perchlorate-tolerant desert cyanobacterium to support bacterial growth for in situ resource utilization on Mars. *Int J Astrobiol* 20:29–35. <https://doi.org/10.1017/S1473550420000300>.
18. Cyclic LM, Hausrath EM, Ming DW, Adcock CT, Raymond J, Remias D, Ruemmele WP. 2021. Investigating the growth of algae under low atmospheric pressures for potential food and oxygen production on Mars. *Front Microbiol* 12:733244. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.733244>.
19. Rzymiski P, Poniedzialek B, Hippmann N, Kaczmarek Ł. 2022. Screening the survival of cyanobacteria under perchlorate stress. Potential implications for Mars in situ resource utilization. *Astrobiology* 22:672–684. <https://doi.org/10.1089/ast.2021.0100>.
20. Tomita-Yokotani K, Kimura S, Ong M, Ajioka R, Igarashi Y, Fujishiro H, Katoh H, Hashimoto H, Mita H, Yokobori S. 2020. Tolerance of dried cells of a terrestrial cyanobacterium, *Nostoc sp.* HK-01 to temperature cycles, helium-ion beams, ultraviolet radiation (172 and 254 nm), and gamma rays: primitive analysis for space experiments. *Eco-Engineering* 32:47–53.
21. Mapstone LJ, Leite MN, Purton S, Crawford IA, Dartnell L. 2022. Cyanobacteria and microalgae in supporting human habitation on Mars. *Biotechnol Adv* 59:107946. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2022.107946>.
22. Olsson-Francis K, Simpson AE, Wolff-Boenisch D, Cockell CS. 2012. The effect of rock composition on cyanobacterial weathering of crystalline basalt and rhyolite. *Geobiology* 10:434–444. <https://doi.org/10.1111/j.1472-4669.2012.00333.x>.
23. Jokela J, Herfindal L, Wahlsten M, Permi P, Selheim F, Vasconcelos V, Døskeland SO, Sivonen K. 2010. A novel cyanobacterial nostocyclopeptide is a potent antitoxin against microcystins. *Chembiochem* 11:1594–1599. <https://doi.org/10.1002/cbic.201000179>.
24. Selva E, Beretta G, Montanini N, Saddler GS, Gastaldo L, Ferrari P, Lorenzetti R, Landini P, Ripamonti F, Goldstein BP, Berti M, Montanaro L, Denaro M, Montanaro L. 1991. Antibiotic GE2270 a: a novel inhibitor of bacterial protein synthesis. I. Isolation and characterization. *J Antibiot* 44:693–701. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.44.693>.
25. Dittmann E, Fewer DP, Neilan BA. 2013. Cyanobacterial toxins: biosynthetic routes and evolutionary roots. *FEMS Microbiol Rev* 37:23–43. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2012.12000.x>.
26. Cannon KM, Britt DT, Smith TM, Fritsche RF, Batchelder D. 2019. Mars global simulant MGS-1: a Rocknest-based open standard for basaltic Martian regolith simulants. *Icarus* 317:470–478. <https://doi.org/10.1016/j.icarus.2018.08.019>.
27. Hecht MH, Kounaves SP, Quinn RC, West SJ, Young SMM, Ming DW, Catling DC, Clark BC, Boynton WW, Hoffman J, DeFlores LP, Gospodinova K, Kapit J, Smith PH. 2009. Detection of perchlorate and the soluble chemistry of Martian soil at the Phoenix lander site. *Science* 325:64–67. <https://doi.org/10.1126/science.1172466>.
28. Kounaves SP, Chaniotakis NA, Chevrier VF, Carrier BL, Folds KE, Hansen VM, McElhoney KM, O'Neil GD, Weber AW. 2014. Identification of the perchlorate parent salts at the Phoenix Mars landing site and possible implications. *Icarus* 232:226–231. <https://doi.org/10.1016/j.icarus.2014.01.016>.
29. Sutter B, McAdam AC, Mahaffy PR, Ming DW, Edgett KS, Rampe EB, Eigenbrode JL, Franz HB, Freissinet C, Grotzinger JP, Steele A, House CH, Archer PD, Malespin CA, Navarro-González R, Stern JC, Bell JF, Calef FJ, Gellert R, Glavin DP, Thompson LM, Yen AS. 2017. Evolved gas analyses of sedimentary rocks and eolian sediment in Gale Crater, Mars: results of the Curiosity rover's sample analysis at Mars instrument from Yellowknife Bay to the Namib Dune. *J Geophys Res Planets* 122:2574–2609. <https://doi.org/10.1002/2016JE005225>.
30. Carrier BL. 2017. Next steps forward in understanding Martian surface and subsurface chemistry. *J Geophys Res Planets* 122:1951–1953. <https://doi.org/10.1002/2017JE005409>.
31. Millan M, Szopa C, Buch A, Summons R, Navarro-Gonzalez R, Mahaffy P, Johnson SS. 2020. Influence of calcium perchlorate on organics under SAM-like pyrolysis conditions: constraints on the nature of Martian organics. *J Geophys Res Planets* 125:e2019JE006359.
32. Verseux C. 2018. Resistance of cyanobacteria to space and Mars environments, in the frame of the EXPOSE-R2 space mission and beyond. PhD thesis, University of Rome "Tor Vergata".
33. Eichler A, Hadland N, Pickett D, Masaitis D, Handy D, Perez A, Batchelder D, Wheeler B, Palmer A. 2021. Challenging the agricultural viability of Martian regolith simulants. *Icarus* 354:114022. <https://doi.org/10.1016/j.icarus.2020.114022>.
34. Maggi F, Pallud C. 2010. Space agriculture in micro- and hypo-gravity: a comparative study of soil hydraulics and biogeochemistry in a cropping unit on Earth, Mars, the moon and the space station. *Planet Space Sci* 58:1996–2007. <https://doi.org/10.1016/j.pss.2010.09.025>.
35. Oze C, Beisel J, Dabsys E, Dall J, North G, Scott A, Lopez AM, Holmes R, Fendorf S. 2021. Perchlorate and agriculture on Mars. *Soil Syst* 5:37. <https://doi.org/10.3390/soilsystems503037>.
36. Escobar CM, Escobar AC, Power GJ, Nabity JA. 2020. μ G-LilyPondTM: preliminary design of a floating plant pond for microgravity. Proceedings of the 50th International Conference on Environmental Systems. ICES-2020-246. ICES, Emmaus, PA.

37. Gale J, Smernoff DT, MacIer BA, MacElroy RD. 1989. Carbon balance and productivity of *Lemna gibba*, a candidate plant for CELSS. *Adv Sp Res* 9: 43–52. [https://doi.org/10.1016/0273-1177\(89\)90027-6](https://doi.org/10.1016/0273-1177(89)90027-6).
38. Romano LE, Aronne G. 2021. The world smallest plants (*Wolffia* sp.) as potential species for bioregenerative life support systems in space. *Plants* 10:1896. <https://doi.org/10.3390/plants10091896>.
39. Liu Y, Cockell CS, Wang G, Hu C, Chen L, De Philippis R. 2008. Control of lunar and Martian dust — experimental insights from artificial and natural cyanobacterial and algal crusts in the desert of inner Mongolia, China. *Astrobiology* 8:75–86. <https://doi.org/10.1089/ast.2007.0122>.
40. Dzianach PA, Dykes GA, Strachan NJC, Forbes KJ, Pérez-Reche FJ. 2019. Challenges of biofilm control and utilization: lessons from mathematical modelling. *J R Soc Interface* 16. <https://doi.org/10.1098/rsif.2019.0042>.
41. Sree SK, Appenroth K-J. 2017. Cultivation, sterilization and stock cultivation of duckweeds; an update. In *International Steering Committee on Duckweed Research and Applications* (eds.), Duckweed Forum 5:32–54. http://www.ruduckweed.org/uploads/1/0/8/9/10896289/iscdra-duckweed_forum_issue17-2017-04.pdf.
42. Chen S, Zhou Y, Chen Y, Gu J. 2018. fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics* 34:i884–i890. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty560>.
43. Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, Lesin VM, Nikolenko SI, Pham S, Pribelski AD, Pyshkin AV, Sirotnik AV, Vyahhi N, Tesler G, Alekseyev MA, Pevzner PA. 2012. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J Comput Biol* 19:455–477. <https://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021>.
44. Langmead B, Salzberg SL. 2012. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods* 9:357–359. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1923>.
45. Eren AM, Esen OC, Quince C, Vineis JH, Morrison HG, Sogin ML, Delmont TO. 2015. Anvi'o: an advanced analysis and visualization platform for 'omics data. *PeerJ* 3:e1319. <https://doi.org/10.7717/peerj.1319>.
46. Kim D, Song L, Breitwieser FP, Salzberg SL. 2016. Centrifuge: rapid and sensitive classification of metagenomic sequences. *Genome Res* 26:1721–1729. <https://doi.org/10.1101/gr.210641.116>.
47. Parks DH, Imelfort M, Skennerton CT, Hugenholtz P, Tyson GW. 2015. CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. *Genome Res* 25:1043–1055. <https://doi.org/10.1101/gr.186072.114>.
48. Seemann T. 2014. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics* 30:2068–2069. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu153>.
49. Page AJ, Cummins CA, Hunt M, Wong VK, Reuter S, Holden MTG, Fookes M, Falush D, Keane JA, Parkhill J. 2015. Roary: rapid large-scale prokaryote pan genome analysis. *Bioinformatics* 31:3691–3693. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv421>.
50. Kozlov AM, Darriba D, Flouri T, Morel B, Stamatakis A. 2019. RAXML-NG: a fast, scalable and user-friendly tool for maximum likelihood phylogenetic inference. *Bioinformatics* 35:4453–4455. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz305>.
51. Jain C, Rodriguez-R LM, Phillippy AM, Konstantinidis KT, Aluru S. 2018. High throughput ANI analysis of 90K prokaryotic genomes reveals clear species boundaries. *Nat Commun* 9:1–8. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07641-9>.
52. Ruiz-Perez CA, Conrad RE, Konstantinidis KT. 2021. MicrobeAnnotator: a user-friendly, comprehensive functional annotation pipeline for microbial genomes. *BMC Bioinformatics* 22:11–16. <https://doi.org/10.1186/s12859-020-03940-5>.
53. Aramaki T, Blanc-Mathieu R, Endo H, Ohkubo K, Kanehisa M, Goto S, Ogata H. 2020. KofamKOALA: KEGG Ortholog assignment based on profile HMM and adaptive score threshold. *Bioinformatics* 36:2251–2252. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz859>.
54. Bateman A. 2019. UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. *Nucleic Acids Res* 47:D506–D515.
55. O'Leary NA, Wright MW, Brister JR, Ciuffo S, Haddad D, McVeigh R, Rajput B, Robbertse B, Smith-White B, Ako-Adjei D, Astashyn A, Badretdin A, Bao Y, Blinkova O, Brover V, Chetvernin V, Choi J, Cox E, Ermolaeva O, Farrell CM, Goldfarb T, Gupta T, Haft D, Hatcher E, Hlavina W, Joardar VS, Kodali VK, Li W, Maglott D, Masterson P, McGarvey KM, Murphy MR, O'Neill K, Pujar S, Rangwala SH, Rausch D, Riddick LD, Schoch C, Shkeda A, Storz SS, Sun H, Thibaud-Nissen F, Tolstoy I, Tully RE, Vatsan AR, Wallin C, Webb D, Wu W, Landrum MJ, Kimchi A, et al. 2016. Reference sequence (RefSeq) database at NCBI: current status, taxonomic expansion, and functional annotation. *Nucleic Acids Res* 44:D733–D745. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1189>.
56. Zimmermann J, Kaleta C, Waschina S. 2021. gapseq: informed prediction of bacterial metabolic pathways and reconstruction of accurate metabolic models. *Genome Biol* 22:1–35. <https://doi.org/10.1186/s13059-021-02295-1>.
57. Caspi R, Billington R, Fulcher CA, Keseler IM, Kothari A, Krummenacker M, Latendresse M, Midford PE, Ong Q, Ong WK, Paley S, Subhraveti P, Karp PD. 2018. The MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes. *Nucleic Acids Res* 46:D633–D639. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx935>.
58. Henry CS, DeJongh M, Best AA, Frybarger PM, Linsay B, Stevens RL. 2010. High-throughput generation, optimization and analysis of genome-scale metabolic models. *Nat Biotechnol* 28:977–982. <https://doi.org/10.1038/nbt.1672>.
59. Saier MH, Reddy VS, Tamang DG, Västermark Å. 2014. The transporter classification database. *Nucleic Acids Res* 42:D251–D258. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1097>.
60. Belcour A, Frioux C, Aite M, Bretaudeau A, Hildebrand F, Siegel A. 2020. Metage2metabo, microbiota-scale metabolic complementarity for the identification of key species. *eLife* 9:1–38. <https://doi.org/10.7554/eLife.61968>.
61. Blin K, Shaw S, Steinke K, Villebro R, Ziemert N, Lee SY, Medema MH, Weber T. 2019. antiSMASH 5.0: updates to the secondary metabolite genome mining pipeline. *Nucleic Acids Res* 47:W81–W87. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz310>.
62. Buchfink B, Xie C, Huson DH. 2015. Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND. *Nat Methods* 12:59–60. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3176>.
63. Letunic I, Bork P. 2021. Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Nucleic Acids Res* 49:W293–W296. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab301>.
64. Isachenkov M, Chugunov S, Landsman Z, Akhatov I, Metke A, Tikhonov A, Shishkovsky I. 2022. Characterization of novel lunar highland and mare simulants for ISRU research applications. *Icarus* 376:114873. <https://doi.org/10.1016/j.icarus.2021.114873>.
65. Ritchie RJ. 2008. Universal chlorophyll equations for estimating chlorophylls a, b, c, and d and total chlorophylls in natural assemblages of photosynthetic organisms using acetone, methanol, or ethanol solvents. *Photosynth* 46: 115–126. <https://doi.org/10.1007/s11099-008-0019-7>.