

УДК 579.65

ОСОБЕННОСТИ ОБРАЗОВАНИЯ МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВ ПРОБИОТИЧЕСКИМИ БАКТЕРИЯМИ *LACTOBACILLUS PLANTARUM* 8PA-3 НА РАЗЛИЧНЫХ НОСИТЕЛЯХ В УСЛОВИЯХ КОСМИЧЕСКОГО ПОЛЕТА

Рыбальченко О.В.¹, Орлова О.Г.¹, Капустина В.В.¹, Попова Е.В.², Кутник И.В.²

¹Санкт-Петербургский государственный университет

²Научно-исследовательский испытательный центр подготовки космонавтов им. Ю.А. Гагарина, Звёздный городок, Московская обл.

E-mail: OVR@inbox.ru

*В работе представлен сравнительный анализ микробных сообществ, образованных пробиотическими лактобактериями *Lactobacillus plantarum* 8PA-3 на различных носителях в космических экспериментах «Биопленка» в экспедициях МКС-53, МКС-54 и МКС-56.*

*Объектом исследования в период этих экспедиций служили клетки *L. plantarum* 8PA-3, развивающиеся на микроцеллюлозных сорбентах, полистироле и различных порошковых и пластинчатых полимерных подложках. Одновременно с исследованиями в условиях микрогравитации аналогичные эксперименты проводили в наземных условиях. Формирование микробных сообществ на поверхности различных подложек исследовали методами трансмиссионной (ТЭМ) и сканирующей (СЭМ) электронной микроскопии.*

*Сравнительный анализ микробных сообществ, развивающихся на различных носителях в космических и наземных условиях, позволил оценить в динамике особенности их развития. Полученные данные об ультратонком строении биопленочных и планктонных форм клеток *L. plantarum* 8PA-3, участвующих в развитии микробных сообществ в условиях микрогравитации, свидетельствуют об особых морфофизиологических свойствах клеток, а также о структурных особенностях самих биопленок.*

*Ключевые слова: космический эксперимент, микрогравитация, биопленки, пробиотические бактерии, полимерные носители, электронная микроскопия, *Lactobacillus plantarum* 8PA-3.*

Авиакосмическая и экологическая медицина. 2022. Т. 56. № 5. С. 85–95.

DOI: 10.21687/0233-528X-2022-56-5-85-95

Вопросы выживания бактерий и других микроорганизмов в условиях микрогравитации в настоящее время вызывают значительный научный интерес у широкого круга исследователей космического пространства. Усиленное внимание к этой проблеме обусловлено повышенной устойчивостью покоящихся форм различных видов микроорганизмов.

Стратегия выживания микроорганизмов в неблагоприятных условиях связана с рядом высокоэффективных механизмов (спорообразование,

формирование микробных сообществ, образование покоящихся форм, конъюгация и др.), применяемых бактериальными сообществами в зависимости от своих физиологических особенностей и характера внешнего воздействия. Самым известным и эффективным механизмом считают спорообразование. Устойчивость микробных спор в экстремальных условиях при воздействии высоких и низких температур, повышенной радиации и глубоком вакууме является одной из важнейших тем, привлекающих исследователей в различных областях космической биотехнологии.

Данные, полученные в рамках программы ГНЦ РФ – ИМБП РАН «Биориск», свидетельствуют о возможности бактерий некоторых видов сохранять жизнеспособность после длительного 31-месячного пребывания в открытом космическом пространстве [1]. В результате длительного исследования повреждающего воздействия неблагоприятных факторов космической среды у выживших бактерий выявлена повышенная нуклеазная активность и увеличение устойчивости к ряду антимикробных препаратов.

Вопросы множественной устойчивости бактерий к антимикробным препаратам при воздействии факторов космического полета обсуждаются в статье Ю.А. Морозовой и В.К. Ильина в эксперименте «Плаزمид» [2]. Авторы предложили использовать анализ частоты передачи плазмид в качестве биоиндикатора, отражающего состояние микробных сообществ при воздействии экстремальных факторов в космических условиях.

В процессе проведения космической программы «Электронный нос» получены результаты, свидетельствующие об успешном использовании нового метода исследования контаминации поверхностей на Международной космической станции (МКС) [3]. Метод позволил проводить анализ состава микробных метаболитов, специфических для каждой таксономической группы МО, развивающихся на поверхностях различных материалах в условиях космического полета.

В настоящее время известно, что подавляющее большинство бактерий, обитающих на различных поверхностях в самых разнообразных природных экосистемах планеты Земля, находятся в иммобилизованном состоянии и образуют биопленки. Однако данные о возможности образования микробных сообществ в условиях космического полета оставались неполными, поскольку эти исследования проводили в специальных симуляционных аппаратах в наземных условиях [4]. До последнего времени полностью отсутствовали сведения о выявлении закономерностей при формировании биопленок пробиотическими бактериями – представителями нормальной микробиоты организма человека.

Первые публикации о пробиотических свойствах лактобактерий *Lactobacillus acidophilus* – обитателей нормобиоты желудочно-кишечного и урогенитального трактов человека, выращенных в условиях космического полета, представлены коллективом авторов ГосНИИ особо чистых биопрепаратов [5].

Исследователи из ГосНИИ особо чистых биопрепаратов и СПбГУ в рамках деятельности биотехнологической подсекции КНТС в 2016 г. опубликовали данные об особенностях формирования бактериальных биопленок в условиях космического полета [6].

В данных экспериментах нами выявлены ускоренный рост и динамика формирования биопленок в условиях невесомости другого вида пробиотических лактобактерий *L. plantarum* 8RA-3, при этом установлено, что в космическом эксперименте (КЭ) пробиотические лактобактерии эффективнее, чем в наземных условиях, формировали микробные сообщества в виде биопленок.

Обсуждение проблемы образования биопленок пробиотическими бактериями продолжалось в рамках конференций «Пилотируемые полеты в космос» в 2019, 2021 гг., однако многие вопросы, в частности связанные с особенностями развития бактериальных биопленок на разных поверхностях, до сих пор остаются нерешенными [7, 8].

В настоящее время известно, что бактериальные биопленки состоят из сообщества прикрепленных к носителю микроорганизмов, погруженных в полисахаридный матрикс. Межклеточный матрикс выполняет защитную функцию, предохраняя клетки от высыхания и действия противомикробных препаратов [9].

Молекулярные механизмы, участвующие в инициации и ингибировании образования биопленок, в настоящее время активно исследуют.

Достоверно известно, что определенные стадии формирования биопленок в основном регулируются адаптивными реакциями, а не конкретными генетическими программами. По-видимому, образование биопленок может происходить несколькими путями, а пространственная структура биопленок зависит от вида бактерий и условий окружающей среды.

Важно отметить, что формирование биопленки невозможно без наличия подходящей для колонизации микроорганизмами поверхности носителя. Твердый носитель при погружении в жидкую среду, в частности воду, адсорбирует на свою поверхность так называемый молекулярный слой, состоящий из незаряженных молекул органических веществ. Этот тончайший молекулярный слой включает от 20 до 100 рядов молекул толщиной 0,002–0,008 мкм. В результате физические свойства поверхности носителя, такие, как заряд, гидрофобность и др., подвергаются значительным изменениям. Модификация поверхности носителя, в свою очередь, влияет на прикрепление к ней бактерий, т.е. на адсорбцию.

Формирование биопленки происходит в несколько стадий [10]. Вначале адсорбция бактерий носит обратимый характер, что обусловлено слабыми и в основном дисперсионными силами, которые основаны на взаимном периодическом возмущении электронов в сближающихся молекулах, приводящими к временному возникновению диполей. Непрерывное возникновение таких диполей влечет за собой постоянно возобновляющиеся силы притяжения. На следующей стадии происходит уже необратимая адгезия между бактериями и поверхностью носителя, которая опосредуется адгезинами – молекулами, входящими в состав клеточной стенки и/или других поверхностных структур бактерий [11]. В III и IV фазах формирования биопленка созревает в результате химических перекрестных реакций, синтеза внеклеточных полисахаридов (ВПС), формирования матрикса и образования микроколоний. На завершающей стадии формирования биопленки в фазе V происходит вытеснение бактерий из зрелой биопленки в окружающую среду в виде планктонных форм клеток [12].

Адгезию бактериальных клеток к субстрату можно контролировать либо путем изменения химического состава поверхности носителя, либо самой бактериальной клеточной стенки [13–15]. Поверхностная адсорбция носителя, его химические и физические свойства являются основным условием и ключом к росту и стабильности биопленки. В связи с этим пристальное внимание уделяют изучению влияния химического состава поверхности носителя на адгезию бактерий и дальнейшее формирование биопленки [16, 17].

Различные методы поверхностной модуляции носителя включают ковалентную и нековалентную модификации, контролируемое высвобождение малых молекул и разрушение полимерных поверхностей. Обнаружено, что изменение химического состава поверхности влияет на первоначальное прикрепление бактерии к носителю, тем самым снижая поверхностную адсорбцию [18–20]. Тем не менее химическая модуляция поверхностей не может полностью препятствовать адсорбции клеток и

образованию биопленки [21]. Химическая обработка может включать образование побочных продуктов, которые приводят к нежелательным реакциям, особенно в условиях живого организма. Следует отметить, что бактериальные клетки в составе биопленки способны самостоятельно изменять поверхностные свойства носителя, способствуя выживанию в различных стрессовых условиях.

В работе представлен анализ результатов экспериментов, проведенных на борту российского сегмента МКС-53, МКС-54, МКС-56 в рамках космической программы «Биопленка», в ходе которой получены данные об особенностях формирования бактериальных биопленок пробиотических бактерий *L. plantarum* 8PA-3 на носителях различной химической природы.

Методика

Микробиологическим объектом исследования являлся производственный пробиотический штамм лактобактерий *Lactobacillus plantarum* 8PA-3, используемый для получения препаратов с целью нормализации микробиоты желудочно-кишечного тракта человека. Данный штамм лактобактерий выделен из препарата флорин® форте (Florin forte) (ЗАО «Партнер», Россия).

Эксперименты по изучению влияния микрогравитации на морфофизиологические и сорбционные свойства микроорганизмов проводили в кассетах научной аппаратуры (НА) «Константа». Каждая кассета состояла из корпуса, в верхней части которого располагался инъекционно-поршневый механизм. Поршни приводили в движение путем надавливания на верхнюю планку, при этом содержащийся в емкостях биофиксатор проникал в ячейки с различными носителями и лактобактериями, выращенными до определенной стадии развития.

Предварительно перед проведением КЭ и наземного эксперимента (НЭ) «Биопленка» кассеты «Константа» в наземных условиях заправляли следующими рабочими растворами:

1. Суспензионная культура лактобактерий *L. plantarum* 8PA-3 (титр $3,6 \times 10^4$ КОЕ/мл) в жидкой питательной среде МРС-бульон (HiMedia Laboratories, Индия).

2. Микроцеллюлозный носитель – диэтиламиноэтилцеллюлоза (DEAE-целлюлоза). Фракционный состав частиц 200–800 мкм, ПОЕ (полная обменная емкость) = 0,12 мг-экв/мл (КЭ на МКС-53).

3. Полимерный полистироловый носитель (КЭ на МКС-53). Средняя молекулярная масса (ММ) полистирола составляет 80–100 тысяч, в зависимости от способа его получения. Формула полистирола: $C_6H_5CH = CH_2$. В эксперименте использовали полистирол в виде квадратных пластинок размером 5 x 5 мм, толщиной 2 мм.

4. Полимерная подложка – сложная смесь полисахаридов из 2 основных фракций: 1 – нейтральный полимер (гелеобразующая фракция из D-галактозы и L-глюкозы) и 2 – заряженный сульфатированный полимер (агароза, сложный эфир D-глюкуроновой кислоты и пировиноградной кислоты (в виде порошка 0,2 г/л) (КЭ на МКС-54).

5. Полимерная подложка – сложная смесь полисахаридов из 2 основных фракций: 1 – нейтральный полимер (гелеобразующая фракция из D-галактозы и L-глюкозы) и 2 – заряженный сульфатированный полимер (агароза, сложный эфир D-глюкуроновой кислоты и пировиноградной кислоты (в виде пластинок) (КЭ на МКС-56).

6. Биофиксатор 5%-ный глутаральдегид.

Заправленные бактериальной культурой, биофиксатором и полимерными носителями кассеты НА «Константа» доставляли на МКС и хранили до начала эксперимента при температуре $+4 \pm 2$ °С. В назначенное в соответствии с циклограммой время кассеты помещали в термостат при температуре $+37$ °С для выращивания бактерий на носителях в виде биопленок. Через определенные промежутки времени из термостата извлекали по одной кассете и проводили фиксацию материала, вводя биофиксатор – 5%-ный глутаральдегид в емкость с бактериальной суспензией, после чего кассеты размещали на хранение при температуре $+4 \pm 2$ °С до отправки на Землю. Фиксацию материала проводили в соответствии со следующей циклограммой: 0, 10, 18, 24, 48, 72 ч. Далее аппаратуру с материалами КЭ доставляли в наземную лабораторию. Для сравнения в качестве контроля параллельно с КЭ проводили наземные исследования в аналогичной аппаратуре в соответствии с циклограммой КЭ «Биопленка». После возвращения НА на Землю пробы готовили для электронно-микроскопического исследования ультраструктуры биопленок, а также формирующих их планктонных форм клеток в Ресурсном центре «Развитие молекулярных и клеточных технологий» СПбГУ.

Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ)

При получении препаратов материал фиксировали в парах 2,5%-ного раствора глутаральдегида на буфере Хенкса в течение 12 ч при температуре $+4$ °С. Затем пробы высушивали и помещали на подложку, приклеенную электропроводным клеем к специальным держателям, после чего на поверхность материала напыляли тонкий слой золота в вакуумной установке JFC-1100 (JEOL, Япония). Готовые препараты просматривали в сканирующем электронном микроскопе JSM-35C (JEOL, Япония) при ускоряющем напряжении 15 кВ.

Трансмиссионная электронная микроскопия (ТЭМ)

Исследование ультраструктуры биопленок *L. plantarum* 8PA-3, сформированных на поверхности

полимерных подложек, проводили методом ультратонких срезов (ТЭМ).

Ультратонкие срезы получали из проб, фиксированных 2,5%-ном водным раствором глутаральдегида при температуре +4 °С в НА «Константа». После изъятия фиксированного материала из ячеек отмытые раствором Хенкса клетки подвергали вторичной фиксации 1%-ным раствором четырехокси осмия (OsO_4) на основе того же раствора Хенкса в течение 2 ч при температуре +4 °С. Фиксированные раствором OsO_4 клетки после отмытки раствором Хенкса помещали в 2%-ный раствор уранилацетата (УА) на ацетатном буфере pH = 5,2 при температуре +40 °С на 1 ч. Отмытые ацетатным буфером клетки обезвоживали в серии этиловых спиртов возрастающей концентрации, в смеси спирта и ацетона и в чистом ацетоне. Затем клетки заливали в смолу Spurr. Срезы готовили на ультратоме LKB-8800 (LKB, Швеция). Проводили окраску срезов УА и цитратом свинца. Препараты просматривали в трансмиссионном электронном микроскопе JEM-100С (JEOL, Япония) при ускоряющем напряжении 80 кВ.

Результаты и обсуждение

*Характер роста клеток *L. plantarum* 8РА-3 на поверхности микроцеллюлозных носителей в период экспедиции МКС-53*

При исследовании характера роста пробиотических лактобактерий на микроцеллюлозных сорбентах в ходе космического и наземного экспериментов на МКС-53 методом СЭМ показана активная адгезия клеток *L. plantarum* 8РА-3 на поверхности глобул носителей. Во всех препаратах через 10 ч с начала выращивания лактобактерий на сорбентах обнаружены единичные и парами адгезированные к поверхности носителя клетки лактобактерий, распределенные по поверхности глобул с различной частотой (рис. 1, А, В).

Начиная с 48-го часа выращивания в КЭ и НЭ на поверхности частиц сорбента формировались многослойные сообщества бактерий, образующие сплошной слой клеток в виде биопленок (см. рис. 1, Б, Г). Микроцеллюлозный сорбент продемонстрировал хорошие адгезивные свойства для клеток бактерий на начальных этапах развития культуры. Развитие бактериальных культур и формирование биопленок на поверхности данного сорбента происходило с высокой скоростью и достигало значительной плотности сформированных микробных сообществ.

Трансмиссионная электронная микроскопия лактобактерий *L. plantarum* 8РА-3, растущих на микроцеллюлозных носителях, показала, что в КЭ и НЭ на начальных этапах выращивания (10 ч) клетки располагались по поверхности сорбента поодиночке или в виде небольших скоплений. Морфофизиологические свойства клеток

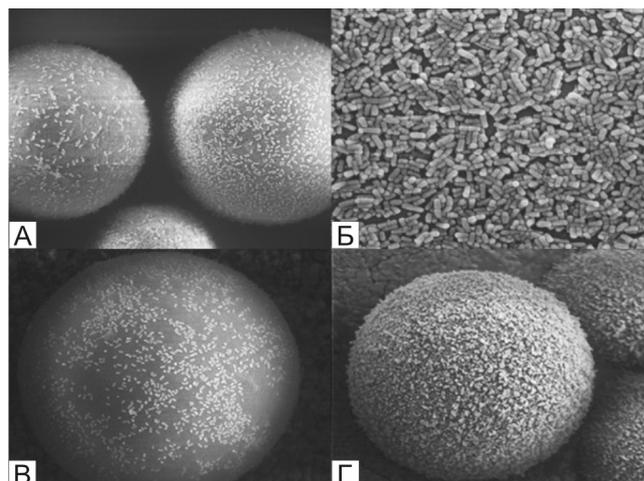


Рис. 1. Сканирующая электронная микроскопия. А, Б – космический эксперимент (КЭ). А – время культивирования 10 ч. Единичные и парами клетки лактобактерий на поверхности глобул микроцеллюлозного сорбента. Б – время культивирования 48 ч. Поверхность глобулы микроцеллюлозного носителя, сферические включения пептидогликана. Многослойная биопленка. В, Г – наземный эксперимент (НЭ). В – время культивирования 10 ч. Единичные и парами клетки лактобактерий на поверхности глобул микроцеллюлозного сорбента. Г – время культивирования 48 ч. Поверхность глобулы микроцеллюлозного носителя. Многослойные скопления клеток лактобактерий, вторичный рост клеток в виде микроколоний. Длина маркера 10 мкм

свидетельствовали об их физиологической активности, выявлены делящиеся клетки с хорошо просматриваемой зоной нуклеоида, большинство клеток с увеличенной толщиной пептидогликанового слоя клеточных стенок (рис. 2, А, В).

На завершающем этапе КЭ (48 ч выращивания) у части клеток лактобактерий в условиях микрогравитации отмечены деструктивные изменения с фокальным (точечным) повреждением клеточной стенки и развитой системой внутрицитоплазматических мембран (см. рис. 2, Б). По мере роста лактобактерий на микроцеллюлозном сорбенте в НЭ (48 ч) также отмечено усиленное развитие внутрицитоплазматических мембранных структур и постепенное разрушение клеточных стенок с последующим лизисом клеток (см. рис. 2, Г).

Следует отметить, что в процессе развития пробиотической культуры на поверхности микроцеллюлозного носителя в КЭ выявлено увеличение скоплений внеклеточного пептидогликана (рис. 3, А, Б). Скопление пептидогликана значительно превышало таковое при выращивании культуры в НЭ, что может свидетельствовать о воздействии неблагоприятных условий (в том числе микрогравитации) на культуру лактобактерий.

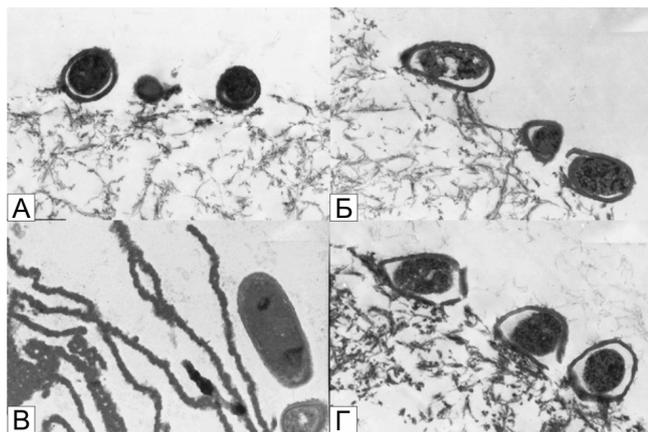


Рис. 2. Трансмиссионная электронная микроскопия. Ультратонкий срез интактных клеток *Lactobacillus plantarum* 8PA-3. А, Б – КЭ. А – время культивирования 10 ч. Физиологически активные и частично деструктурированные клетки, прикрепленные к нитям микроцеллюлозного сорбента. Б – время культивирования 48 ч. Клетки на поверхности микроцеллюлозного носителя с развитой системой внутрицитоплазматических мембран. Деструктурированные клетки с фокальным повреждением клеточной стенки. В, Г – НЭ. В – Время культивирования 10 ч. Клетки в физиологически активном состоянии, встречаются утолщения и слущивание пептидогликанового слоя клеточной стенки. Г – время культивирования 48 ч. Клетки *L. plantarum* 8PA-3 с фокальными повреждениями клеточной стенки. Длина маркера 1 мкм

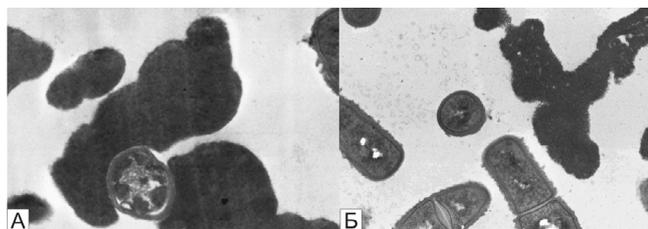


Рис. 3. Трансмиссионная электронная микроскопия. А, Б – КЭ. Ультратонкий срез интактных клеток *L. plantarum* 8PA-3. Время культивирования 48 ч. Физиологически активные и частично деструктурированные клетки с развитой системой внутрицитоплазматических мембран. Утолщение пептидогликанового слоя клеточной стенки. Внеклеточные скопления пептидогликана. Длина маркера 1 мкм

В результате анализа характера роста *L. plantarum* 8PA-3 на микроцеллюлозных носителях в условиях КЭ и НЭ на отдельных участках ультратонких срезов обнаружены прикрепленные к поверхности сорбента единичные и многослойные группы клеток, возникшие в результате вторичного роста лактобактерий. Обращает на себя внимание

увеличение скоплений пептидогликана в виде сферических включений в условиях КЭ через 48 ч с начала эксперимента, при этом в НЭ подобного эффекта не наблюдалось.

Характер роста клеток L. plantarum 8PA-3 на поверхности полистироловых носителей в условиях микрогравитации в период экспедиции на МКС-53

Анализ характера роста *L. plantarum* 8PA-3 на полистироловых носителях в КЭ на начальных этапах выращивания (10 ч) с использованием СЭМ выявил единичные лактобактерии и скопления клеток, адгезированных к поверхности носителя (рис. 4, А). Микроколонии на отдельных участках носителя, сливаясь, образовывали тонкую, однослойную биопленку. На начальных этапах роста в НЭ на полистироловых подложках также выявлен активный рост клеток. На поверхности носителя единичные клетки формировали группы клеток, которые давали начало новым микроколониам (см. рис. 4, В).

На завершающих этапах выращивания (48 ч) лактобактерий в КЭ на полистироле обнаружены плотно прилегающие друг к другу группы клеток, состоящие из коротких цепочек и единичных клеток (см. рис. 4, Б). Обнаружены однослойные и многослойные группы клеток рядом с крупными внеклеточными скоплениями пептидогликана. В НЭ (48 ч) на большей части поверхности полистироловых подложек микробные сообщества лактобактерий представляли собой фрагментарно расположенную смесь сливающихся мелких микроколоний, единичных клеток и коротких цепочек (см. рис. 4, Г).

Анализ обрастания полистироловых носителей в условиях КЭ и НЭ (подсчет клеток на сканограммах, метод СЭМ) в период экспедиции на МКС-53 свидетельствует о некоторых различиях в динамике формирования биопленок клетками *L. plantarum* 8PA-3. В условиях микрогравитации обрастание полистироловых подложек происходило более равномерно (см. рис. 4, А, Б), а в наземных условиях рост многослойных биопленок на отдельных участках носителя можно признать более интенсивным, тогда как на других участках выявлялись лишь единичные клетки (см. рис. 4, В, Г). Рост биопленок в условиях микрогравитации сопровождался более активным образованием отделяющихся с поверхности клеточных стенок лактобактерий внеклеточных глобул пептидогликана, в наземных условиях скопления пептидогликана выявлялись значительно реже.

В ходе КЭ и НЭ методом СЭМ удалось выявить динамику образования микробных сообществ на поверхности полистирола (рис. 4, 5). На завершающих этапах выращивания лактобактерий (48 ч) в НЭ наблюдали единичные клетки, короткие цепочки и

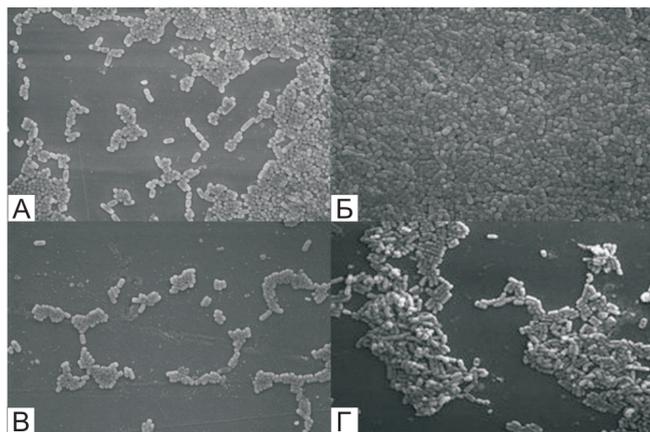


Рис. 4. Сканирующая электронная микроскопия. Клетки *L. plantarum* 8PA-3 на полистироле. А, Б – КЭ. А – время культивирования 10 ч. Клетки единичные и парами на начальных этапах выращивания. Б – время культивирования 48 ч. На отдельных участках сорбента сформирована многослойная биопленка и крупные скопления пептидогликана. В, Г – НЭ. В – время культивирования 10 ч. Группы клеток и микроколонию наряду с единичными клетками лактобактерий. Г – время культивирования 48 ч. На отдельных участках многослойные микроколонию соединены в единую структуру; единичные группы клеток и немногочисленные сферические образования пептидогликана. Длина маркера 10 мкм

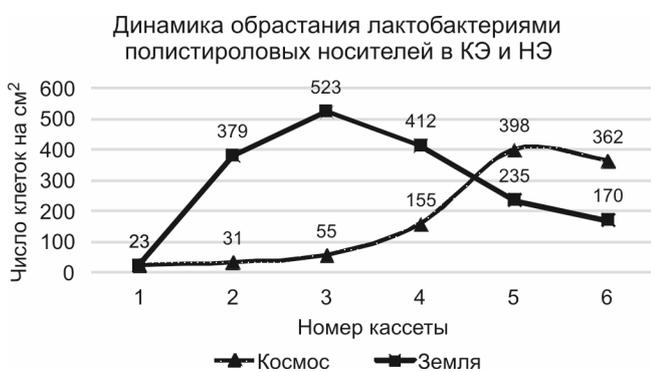


Рис. 5. Число клеток *L. plantarum* 8PA-3 на полистироловых носителях в НЭ и КЭ

мелкие микроколонию, в то время как в КЭ выявляли сформированные биопленки в окружении сферических внеклеточных скоплений пептидогликана. Отмечено более интенсивное и равномерное обрастание полистироловых носителей в условиях микрогравитации (см. рис. 4, А, Б), по сравнению с НЭ, в котором рост лактобактерий осуществлялся только в виде микроколонию на протяжении всего цикла развития микробных сообществ (см. рис. 4, В, Г).

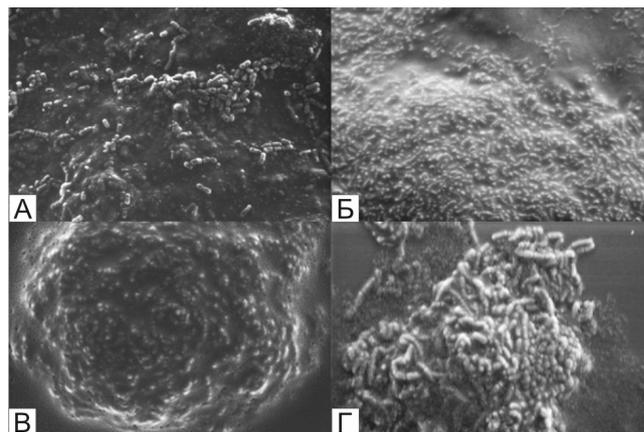


Рис. 6. Сканирующая электронная микроскопия. Поверхность полимерной подложки. А, Б – КЭ. А – время культивирования 10 ч. Единичные и парами клетки, микроколонию лактобактерий, углубленные в полимерную подложку, сверху покрыты мелкодисперсными наслоениями из компонентов подложки. Б – время культивирования 60 ч. Многослойная биопленка включает скопления клеток *L. plantarum* 8PA-3 в окружении мелкодисперсных компонентов полимерной подложки. В, Г – НЭ. В – время культивирования 10 ч. Микроколонию *L. plantarum* 8PA-3 покрыта наслоениями из мелкодисперсной субстанции полимерной подложки. Г – время культивирования 60 ч. Крупные многослойные микроколонию, сливающиеся в биопленки. Клетки *L. plantarum* 8PA-3 с наслоениями мелкодисперсного порошка полимерной подложки. Длина маркера 10 мкм

*Характер роста клеток *L. plantarum* 8PA-3 на полимерных носителях с фибриллярной структурой в виде порошка на МКС-54*

На следующем этапе проведения экспериментов в экспедиции МКС-54 с целью исследования образования биопленок пробиотическими лактобактериями на плотных поверхностях использовали полимерную подложку с фибриллярной структурой, включающую мелкодисперсные компоненты в виде порошка.

Препараты для сравнительного электронно-микроскопического анализа биопленок лактобактерий готовили через 10, 20, 30, 48 и 60 ч с начала выращивания культуры. В КЭ через 10 ч обнаружены единичные, парные клетки и мелкие микроколонию, углубленные в полимерную подложку с мелкодисперсными наслоениями компонентов носителя (рис. 6, А). При проведении НЭ через 10 ч выращивания наряду с единичными и парными клетками, также выявляли микроколонию, поверхность которых покрыта мелкодисперсными наслоениями из компонентов полимерной подложки (см. рис. 6, В).

На завершающем этапе выращивания (60 ч) в КЭ и НЭ на поверхности данного типа носителей обнаружены многослойные биопленки, включающие

скопления клеток *L. plantarum* 8PA-3 в окружении мелкодисперсных компонентов полимерной подложки (см. рис. 6, Б, Г).

В результате выращивания пробиотических лактобактерий *L. plantarum* 8PA-3 в ячейках с жидкой питательной средой МРС на поверхности полимерных подложек в виде порошка выявлен активный рост бактериальных клеток. При этом на начальных этапах выращивания лактобактерий как в КЭ, так и в НЭ удалось обнаружить образование микроколоний (см. рис. 6, А, В). На завершающем этапе выращивания микроколонии сливались и образовывали на поверхностях полимерных подложек многослойные микробные сообщества (см. рис. 6, Б, Г). Однако отмечено более интенсивное и равномерное обрастание полимерных подложек данного типа в условиях микрогравитации (см. рис. 6, А, Б) по сравнению с НЭ (см. рис. 6, В, Г). В связи с образованием на поверхности микроколоний пленки из мелкодисперсного компонента полимерного порошкового носителя в толще микробных сообществ не представлялось возможным выявить глобулы пептидогликана.

Характер роста клеток L. plantarum 8PA-3 на полимерных носителях с фибриллярной структурой (в виде пластин) на МКС-56

В период экспедиции МКС-56 проводили сравнительный электронно-микроскопический анализ развития биопленок лактобактерий, сформированных на пластинчатых полимерных подложках.

На начальном этапе выращивания в КЭ (10 ч) пластинчатые полимерные подложки обрастали единичными клетками и группами клеток, адгезированными к поверхности носителя. На начальных стадиях формирования микроколоний в КЭ (10 ч) выявлены многочисленные скопления пептидогликана в виде мелкодисперсных образований. В НЭ на начальных этапах роста (10 ч) отмечены единичные и парами адгезированные к поверхности носителя клетки лактобактерий, окруженные внеклеточными агрегатами пептидогликана.

К 48-му часу выращивания в КЭ на поверхности пластинчатого полимерного носителя на отдельных участках носителя, особенно в углублениях пластинок, выявлены скопления клеток лактобактерий в виде многослойных биопленок, при этом отмечено значительное увеличение агрегатов внеклеточного пептидогликана. В НЭ на завершающем этапе выращивания лактобактерии неравномерно распределялись по поверхности подложки, образуя множество микроколоний, крупных скоплений лактобактерий в виде биопленок. Внеклеточные агрегаты пептидогликана располагались на различных участках носителя.

Сравнительный анализ ультраструктуры планктонных форм клеток *L. plantarum* 8PA-3 в КЭ и НЭ с использованием ТЭМ позволил оценить их

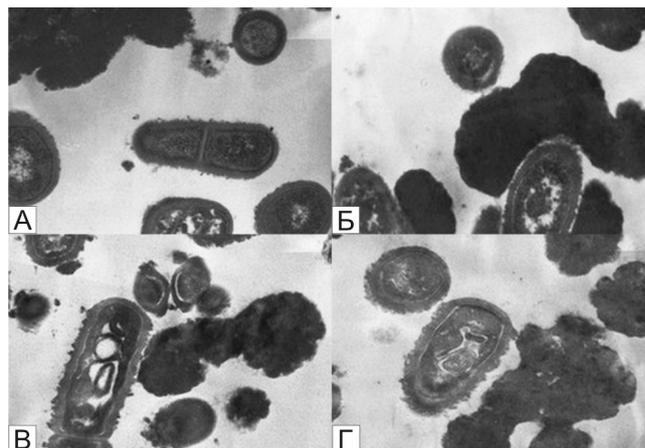


Рис. 7. Трансмиссионная электронная микроскопия. Ультратонкие срезы планктонных форм клеток *L. plantarum* 8PA. А, Б – КЭ. А – время культивирования 10 ч. Физиологически активные и делящиеся клетки, клеточная стенка состоит из толстого слоя пептидогликана. Крупные внеклеточные скопления пептидогликана. Б – время культивирования 48 ч. Физиологически активные и деструктурированные клетки в окружении крупных агрегатов внеклеточного пептидогликана. В, Г – НЭ. В – время культивирования 10 ч. Физиологически активные и частично деструктурированные клетки с утолщенной клеточной стенкой и развитой системой внутрицитоплазматических мембран. Внеклеточные скопления пептидогликана округлой формы. Г – время культивирования 48 ч. Физиологически активные клетки с утолщенной клеточной стенкой и развитой системой внутрицитоплазматических мембран частично деструктурированы. Внеклеточные скопления пептидогликана сформировали крупные агрегаты. Длина маркера 1 мкм

участие в формировании биопленок в условиях микрогравитации.

Для анализа ультратонких срезов планктонных форм клеток *L. plantarum* 8PA-3 на начальном этапе формирования микробных сообществ на пластинчатых полимерных носителях готовили суспензионный материал через 10 ч с начала выращивания культуры. На начальном этапе выращивания в КЭ большая часть популяции была представлена физиологически активными и делящимися клетками, клеточная стенка которых включала мощный слой пептидогликана. При отторжении фрагментов клеточной стенки возникали крупные внеклеточные скопления пептидогликана (рис. 7, А). Начальный этап развития культуры (10 ч) в НЭ характеризовался наличием физиологически активных, а также частично деструктурированных клеток с утолщенной клеточной стенкой и развитой системой внутрицитоплазматических мембран. Между клетками отмечено скопление внеклеточных образований из пептидогликана (см. рис. 7, В).

Завершающий этап выращивания лактобактерий (48 ч) в КЭ на пластинчатых полимерных носителях характеризовался усилением гетерогенности популяции, в которой наряду с физиологически активными и делящимися клетками появлялись деструктурированные клетки в окружении крупных агрегатов внеклеточного пептидогликана (см. рис. 7, Б). На завершающем этапе развития культуры лактобактерий (48 ч) в НЭ практически все физиологически активные клетки с утолщенной клеточной стенкой и развитой системой внутрицитоплазматических мембран частично деструктурированы. Между клетками отмечено скопление внеклеточных образований пептидогликана (см. рис. 7, Г).

С самого начала процесса развития микробных сообществ на пластинчатых полимерных подложках практически все клетки лактобактерий характеризовались значительным утолщением клеточной стенки за счет увеличения пептидогликана. Наряду с лактобактериями на всех ультратонких срезах выявлены внеклеточные скопления пептидогликана, причем на более поздних этапах развития микробных сообществ его масса значительно увеличивалась. В некоторых случаях внеклеточные скопления пептидогликана достигали размеров, значительно превышающих величину самих клеток, при этом прослеживался контакт лактобактерий с внеклеточным пептидогликаном. Усиленное образование внеклеточных скоплений пептидогликана происходило в результате отслоения утолщенной клеточной стенки, что, вероятно, являлось проявлением защитной реакции лактобактерий в особых условиях культивирования в небольшом объеме питательной среды в ограниченном пространстве ячеек кассет НА «Константа».

В ходе проведенных исследований впервые осуществлено выращивание микробных сообществ в виде биопленок пробиотических бактерий *L. plantarum* 8PA-3 в условиях микрогравитации на носителях различной химической природы. Получены электронно-микроскопические данные о характере роста, развитии и закономерностях формирования бактериальных сообществ лактобактерий на различных носителях.

В ходе осуществления проекта «Биопленка» в период экспедиции МКС-53 проведен сравнительный анализ микробных сообществ пробиотических лактобактерий *L. plantarum* 8PA-3, развивающихся в НА «Константа» на полимерных подложках 2 типов: микроцеллюлозных сорбентах и полистироловых носителях. В результате получена информация о последовательном развитии лактобактерий, начиная с момента адгезии единичных клеток и заканчивая формированием полноценных микробных сообществ в виде биопленок.

Анализ роста *L. plantarum* 8PA-3 на поверхности микроцеллюлозных сорбентов выявил высокую

адгезионную способность клеток бактерий к носителям. По данным СЭМ с самого начала КЭ отмечено образование микроколоний с дальнейшим их развитием в многослойные биопленки, содержащие многочисленные внеклеточные агрегаты пептидогликана. Выявлено значительное разнообразие морфологических форм клеток *L. plantarum* 8PA-3, прикрепленных как к друг к другу, так и к нитям микроцеллюлозного сорбента: от физиологически активных и делящихся до деструктурированных. На всех этапах развития микробных сообществ у большей части клеток лактобактерий наблюдали утолщение клеточной стенки за счет увеличения пептидогликанового слоя.

В НЭ СЭМ показала развитие биопленок на поверхности микроцеллюлозных сорбентов с меньшей интенсивностью и на более поздних этапах роста культуры, при этом на фоне сформированных многослойных скоплений лактобактерий в виде мелких микроколоний просматривалась фибриллярная структура микроцеллюлозного сорбента. Как и в КЭ, клетки лактобактерий находились рядом с внеклеточными глобулами пептидогликана, однако их было значительно меньше, чем в условиях КЭ. Вероятно, скопление пептидогликана в виде межклеточного матрикса является следствием несбалансированного роста клеточной стенки лактобактерий в особых условиях эксперимента в НА «Константа». Также возможно, что выявленное утолщение клеточной стенки, ее отслоение и накопление в виде межклеточного матрикса свидетельствуют об усилении метаболической активности лактобактерий, что представляет собой защитную реакцию клеток при развитии в экстремальных условиях эксперимента.

Следует также отметить интенсивное образование внутрицитоплазматических мембран в клетках лактобактерий при выращивании на поверхности микроцеллюлозного сорбента, свидетельствующее об интенсификации ферментативной активности бактерий. Увеличение мембран коррелировало с повышением доли клеток с фокальной деструкцией и полностью деструктурированных клеток. Возможно, указанные морфологические изменения связаны с синтезом и повышением активности бактериоцинов, разрушающих клеточные стенки лактобактерий, однако данное предположение требует дальнейшего анализа материала.

Фокальный характер разрушения клеток, проявляющийся в виде лизиса клеточных стенок на завершающих этапах выращивания лактобактерий на микроцеллюлозных сорбентах, сходен с разрушением бактерий бактериоцинами, которые могут вырабатываться отдельными представителями собственной популяции лактобактерий при проявлении внутривидового антагонизма. Точечное разрушение клеточной стенки может приводить к слущиванию

фрагментов клеточной стенки, в том числе пептидогликана, и последующему разрушению клеток. Антагонистический характер взаимоотношений в микробных популяциях описан у широкого круга микроорганизмов и может быть вызван воздействием самых различных факторов внешней среды.

Иную картину наблюдали при исследовании пробиотических лактобактерий *L. plantarum* 8PA-3, растущих на полистироловых носителях в НА «Константа» в КЭ. Анализ методом СЭМ полимерных подложек из полистирола выявил постепенное обрастание клетками лактобактерий поверхности данного полимера. Анализ культуры в НЭ на завершающих этапах выращивания лактобактерий позволил выявить наряду с единичными клетками и короткими цепочками лактобактерий лишь мелкие сливающиеся микроколони, свидетельствующие о менее активном процессе формирования биопленок, чем в условиях воздействия микрогравитации. Образование крупных внеклеточных глобул пептидогликана сопутствовало всем указанным этапам развития культуры *L. plantarum* 8PA-3 как в космических, так и в наземных условиях. Однако, как и в случае с микроцеллюлозным сорбентом, в условиях микрогравитации образование внеклеточного пептидогликана происходило более интенсивно. При этом образования микробных сообществ в виде полноценных биопленок на протяжении всего цикла развития лактобактерий как в наземных условиях, так и при микрогравитации не отмечали.

Электронно-микроскопическое исследование микробных сообществ лактобактерий на порошковых полимерных подложках в период экспедиции МКС-54 свидетельствует о различиях в динамике формирования биопленок. Отмечено более интенсивное и равномерное обрастание порошковых полимерных подложек в условиях микрогравитации по сравнению с НЭ. Многослойные скопления плотно прилегающих друг к другу клеток, углубленные в толщу полимерного носителя, оказались в толще мелкодисперсных наслоений порошковой полимерной подложки, что затрудняло проведение исследований ультратонкого строения клеток.

По данным СЭМ на пластинчатых полимерных подложках в КЭ и НЭ завершающий этап выращивания лактобактерий характеризовался неравномерным распределением клеток на различных участках носителя. В этих случаях формирование бактериальных сообществ в виде микроколоний и крупных наслоений в виде фрагментов биопленок, а также распределение внеклеточных агрегатов из пептидогликана значительно отличалось и зависело от специфических особенностей места их расположения на пластинах (впадины, трещины, углубления поверхности).

Исследование характера роста клеток *L. plantarum* 8PA-3 на полимерных носителях с

фибрилярной структурой (в виде пластин) проводили в ходе экспедиции МКС-56. Анализ ультратонкой структуры планктонных форм клеток *L. plantarum* 8PA-3 в КЭ и НЭ с использованием ТЭМ позволяет оценить их участие в развитии биопленок в условиях микрогравитации.

На всех этапах развития микробных сообществ лактобактерий на пластинчатых полимерных подложках в КЭ и НЭ отмечено наличие вегетативных форм клеток с интактной структурой в физиологически активном состоянии. Большинство клеток с самого начала процесса развития микробных сообществ характеризовались значительным утолщением клеточной стенки за счет увеличения слоя пептидогликана. На всех ультратонких срезах наряду с лактобактериями выявлены внеклеточные скопления пептидогликана. При этом отмечено более активное формирование внеклеточного пептидогликана в условиях микрогравитации. В НЭ образование пептидогликана происходило менее интенсивно.

Проведенный различными электронно-микроскопическими методами анализ позволил считать микроцеллюлозный сорбент наиболее оптимальным субстратом для формирования полноценных многослойных бактериальных биопленок лактобактерий *L. plantarum* 8PA-3 в КЭ. Однако на завершающих этапах выращивания лактобактерий в КЭ и НЭ отмечено появление крупных многослойных скоплений клеток в виде микроколоний не только на микроцеллюлозном сорбенте, но и в углублениях и неровностях поверхностей пластинчатых полимерных подложек. Следует подчеркнуть, что полистироловая подложка способствовала формированию многослойных биопленок в гораздо меньшей степени. На завершающем этапе выращивания на всех исследованных носителях биопленка лактобактерий представляла собой классический вариант микробного сообщества, состоящего из клеток, погруженных в межклеточный матрикс, основными компонентами которого являлись пептидогликановые агрегаты, сформированные из отслоившихся фрагментов клеточных стенок лактобактерий.

Установлено, что рост культуры лактобактерий в КЭ и НЭ в значительной степени зависел от природы полимерного материала, на котором происходило развитие биопленок пробиотических бактерий. Полученные данные позволили предположить, что в условиях микрогравитации возможен комплексный эффект воздействия глобальных космических факторов, таких, как слабая сила тяжести, электромагнитные поля различной природы и повышенная солнечная активность. Все перечисленные факторы могут оказывать значительное влияние на пробиотические бактерии *L. plantarum* 8PA-3, ускоряя ее рост и развитие в виде биопленок.

Исследование динамики роста клеток *L. plantarum* 8PA-3 в условиях микрогравитации

позволило установить, что морфофизиологические свойства *L. plantarum* 8PA-3 (утолщение клеточной стенки, инвагинация внутрицитоплазматических мембранных структур мезосомального типа, образование пептидогликановых сферических структур и межклеточного матрикса, а также фокальная деструкция клеток) свидетельствуют о различной степени интенсивности проявления метаболических реакций при развитии лактобактерий на различных носителях в условиях микрогравитации.

Проведенные в космических условиях исследования пробиотических бактерий представляют значительный интерес прежде всего в связи с тем, что лактобактерии разных видов входят в состав микробиоты желудочно-кишечного и урогенитального трактов человека. Исследуемые штаммы лактобактерий широко используют в качестве пробиотиков для регулирования состава нормобиоты, в связи с чем знание об изменяющихся свойствах этих бактерий в условиях микрогравитации позволит сохранить здоровье космонавтов при длительных полетах в космосе.

В настоящее время в литературе отсутствуют сведения о характере роста микроорганизмов при формировании биопленок на поверхностях полимерных подложек в условиях микрогравитации. Не существует достоверно установленной корреляции между шероховатыми свойствами носителей, скоростью образования биопленок и ее стабильностью, что, по всей вероятности, связано с типом носителя и особенностями его структуры, а также видом бактерий.

В проведенном исследовании проанализирована связь между характером шероховатости носителя и степенью обрастания этого носителя бактериальными биопленками. Установлено, что рост лактобактерий в КЭ и НЭ в значительной степени зависел от природы полимерного материала, на котором происходило формирование биопленок. Предварительные данные позволяют получить информацию о свойствах различных носителей и их взаимодействии с бактериальными клетками, а также ставят целый ряд последующих вопросов о влиянии характера взаимоотношений самих бактерий при развитии в виде биопленок на различных поверхностях.

Выводы

Все полимерные подложки, прошедшие проверку в КЭ (кроме полистирола), обладают пребиотическими свойствами, что придает им способность положительно воздействовать на микробиоту организма. Попадая в кишечник, полимерные подложки могут стимулировать рост представителей нормальной микробиоты и, как следствие, подавлять развитие в организме условно патогенных и патогенных бактерий.

Список литературы

1. Поликарпов Н.А., Новикова Н.Д., Сычев В.Н. и др. Исследование выживания различных биологических объектов в открытом космосе (космический эксперимент «Биориск») // Медико-биологические эксперименты на борту российского сегмента Международной космической станции / О.И. Орлов, ред. М., 2021. С. 121–125.

Polikarpov N.A., Novikova N.D., Sychev V.N. et al. Investigation of the survival of various biological objects in outer space (space experiment «Biorisk») // Biomedical experiments on board the Russian segment of the International Space Station / O.I. Orlov, ed. Moscow, 2021. P. 121–125.

2. Морозова Ю.А., Ильин В.К. Влияние факторов космического полета на распространение генов антибиотикоустойчивости у бактерий (космический эксперимент «Плаزمид») // Медико-биологические эксперименты на борту российского сегмента Международной космической станции / О.И. Орлов, ред. М., 2021. С. 152–153.

Morozova Yu.A., Ilyin V.K. The influence of space flight factors on the spread of antibiotic resistance genes in bacteria (space experiment «Plasmid») // Biomedical experiments on board the Russian segment of the International Space Station / O.I. Orlov, ed. Moscow, 2021. P. 152–153.

3. Харин С.А., Новикова Н.Д., Поддубко С.В., Дешевая Е.А. Исследование микробной загрязненности внутренних поверхностей международной космической станции (космический эксперимент «Электронный нос») // Медико-биологические эксперименты на борту российского сегмента Международной космической станции / О.И. Орлов, ред. М., 2021. С. 157–160.

Kharin S.A., Novikova N.D., Poddubko S.V., Deshevaya E.A. Investigation of microbial contamination of the internal surfaces of the International Space Station (space experiment «Electronic nose») // Biomedical experiments on board the Russian segment of the International Space Station / O.I. Orlov, ed. Moscow, 2021. P. 157–160.

4. Orsini S.S., Lewis A.M., Rice K.C. Investigation of simulated microgravity effects on *Streptococcus mutans* physiology and global gene expression // *Nature Partner J. (NPJ) Microgravity*. 2017. V. 3. № 4. URL: www.nature.com/npjmgrav doi:10.1038/s41526-016-0006-4.

5. Кобатов А.И., Вербицкая Н.Б., Добролеж О.В. и др. Изучение пробиотических характеристик бактерий *Lactobacillus acidophilus*, выращенных в условиях космического полета // Медицина экстремальных ситуаций. 2008. № 4 (26). С. 66–77.

KobatoV A.I., Verbitskaya N.B., Dobrolezh O.V. et al. Study of probiotic characteristics of *Lactobacillus acidophilus* bacteria grown in space flight // *Meditsina ekstremal'nykh situatsiy*. 2008. № 4 (26). P. 66–77.

6. Рыбальченко О.В., Орлова О.Г., Вишневская О.Н. и др. Особенности формирования бактериальных биопленок в условиях космического полета // Микробиология. 2016. № 6. С. 3–10.

Rybalchenko O.V., Orlova O.G., Vishnevskaya O.N. et al. Features of bacterial biofilms formation in space flight conditions // *Mikrobiologiya*. 2016. № 6. P. 3–10.

7. Рыбальченко О.В., Орлова О.Г., Потокин И.Л., Черкасова Г.В. Образование биопленок пробиотических бактерий на различных носителях в условиях космического полета // Пилотируемые полеты в космос: Матер. XIII Междунар. науч.-практ. конф. Звездный городок, 2019. С. 123–124.

Rybalchenko O.V., Orlova O.G., Potokin I.L., Cherkasova G.V. Formation of biofilms of probiotic bacteria on various carriers in space flight conditions // *Manned space flights: Materials of the XIII International Scientific and Practical Conference*. Star City, 2019. P. 123–124.

8. Рыбальченко О.В., Орлова О.Г., Капустина В.В. и др. Динамика образования смешанных микробных сообществ при совместном инкубировании лактобактерий и микрококков в космических условиях // Пилотируемые полеты в космос: Матер. XIV Междунар. науч.-практ. конф. Звездный городок, 2021. С. 110–112.

Rybalchenko O.V., Orlova O.G., Kapustina V.V. et al. Dynamics of formation of mixed microbial communities during joint incubation of lactobacilli and micrococci in space conditions // *Manned space flights: Materials of the XIV International Scientific and Practical Conference*. Star City, 2021. P. 110–112.

9. Burmole M., Webb J.S., Rao D. et al. Enhanced biofilm formation and increased resistance to antimicrobial agents and bacterial invasion are caused by synergistic interactions in multispecies biofilms // *Appl. Environ. Microbiol.* 2006. V. 72. № 6. P. 3916–3923.

10. Perozo E., Kloda A., Cortes M., Martinac B. Physical principles underlying the transduction of bilayer deformation forces during mechanosensitive channel gating // *Nat. Struct. Biol.* 2002. V. 9. P. 696–703.

11. Phillips R., Ursel T., Wiggins P., Sens P. Emerging roles for lipids in shaping membrane-protein function // *Nature*. 2009. V. 459. P. 379–385.

12. Malanovic N., Lohner K. Gram-positive bacterial cell envelopes: The impact on the activity of antimicrobial peptides // *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* 2016. V. 1858. Is. 5. P. 936–946.

13. Busscher H.J., Weerkamp A.H. Specific and non-specific interactions in bacterial adhesion to solid substrata // *FEMS Microbiology Letters*. 1987. V. 46. № 2. P. 165–173.

14. Dutta Sinha S., Chatterjee S., Maiti P.K. et al. Evaluation of the role of substrate and albumin on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm morphology through FESEM and FTIR studies on polymeric biomaterials // *Prog. Biomater.* 2017. V. 6. №1–2. P. 27–38.

15. Garrett T.R., Bhakoo M., Zhang Z. Bacterial adhesion and biofilms on surfaces // *Progress in Natural Science*. 2008. V. 18. P.1049–1056.

16. Navarre W.W., Schneewind O. Surface proteins of gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 1999. V. 63. P. 174–229.

17. Silhavy T.J., Kahne D., Walker S. The bacterial cell envelope // *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2010. V. 2. № 5. a000414.

18. Lorenzetti M., Dogsa I., Stosicki T. et al. The influence of surface modification on bacterial adhesion to Titanium-based substrates // *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 2015. V. 7. № 3. P. 1644–1651.

19. Kolewe K.W., Zhu J., Mako N.R. et al. Bacterial adhesion is affected by the thickness and stiffness of Poly(ethylene glycol) hydrogels // *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 2018. V. 10. № 3. P. 2275–2281.

20. Diraz C., Cortizo M.C., Schilardi P.L. et al. Influence of the nanomicrostructure of the surface on bacterial adhesion // *Mat. Res.* 2007. V. 10. № 1. P. 11–14.

21. Qiu Y., Zhang N., An Y.H., Wen X. Biomaterial strategies to reduce implant-associated infections // *Int. J. Artif. Organs*. 2007. V. 30. № 9. P. 828–841.

Поступила 28.02.2022

TRENDS IN FORMATION OF MICROBIAL COMMUNITIES BY PROBIOTIC BACTERIA *LACTOBACILLUS PLANTARUM* 8PA-3 ON VARIOUS CARRIERS IN THE SPACE FLIGHT ENVIRONMENT

Rybalchenko O.V.¹, Orlova O.G.¹, Kapustina V.V.¹, Popova E.V.², Kutnik I.V.²

¹Saint-Petersburg State University

²Gagarin Research and Test Cosmonaut Training Center, Star City, Moscow region

The paper contains comparative analysis of microbial communities formed by probiotic lactobacteria *L. plantarum* 8PA-3 on various carriers (space experiment Biofilm) during ISS missions 53, 54 and 56.

Object of the investigations was *L. plantarum* 8PA-3 cells inoculated on microcellulose sorbates, polystyrene and a variety of powder and laminar-type polymer substrates. Simultaneously, same culture and substrates were used in the laboratory experiment. Resulted biofilms were investigated using transmission (TEM) and scanning (SEM) electron microscopy.

Comparative analysis was aimed to detect difference in the development of microbial communities resided on various carriers in space and ground-based laboratories. The obtained data about the ultrathin structure of biofilm and plankton-like *L. plantarum* 8PA-3 cells involved in formation of microbial communities in microgravity make us think of distinctive morphophysiological properties of these cells, as well as the biofilm structure.

Key words: space experiment, microgravity, biofilms, probiotic bacteria, polymer carriers, electron microscopy, *Lactobacillus plantarum* 8PA-3.

Aviakosmicheskaya i Ekologicheskaya Meditsina (Russia). 2022. V. 56. № 5. P. 85–95.