

Накопление мутаций в геномах микроорганизмов в процессе длительного хранения и культивирования

А.Е.Курилова, А.Ю.Лебедева, А.Г.Богун

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, Оболенск, Московская область, Российская Федерация

Важнейшая задача коллекционной деятельности заключается в сохранении исходных свойств депонированных микроорганизмов. Для этого в лабораторных условиях используются несколько методических приемов. Наиболее часто используемыми из них являются два метода длительного хранения – криоконсервация и лиофильное высушивание. Непосредственно процедурам, связанным с длительным хранением, предшествуют этапы культивирования внутри лаборатории. Обычно для оценки эффективности применяемого метода консервации используют выживаемость бактериальной культуры. Фенотипическая, а особенно генетическая стабильность культуры изучаются гораздо реже. В последние 10 лет в арсенале микробиологов появился новый мощный метод изучения изменений в геноме микроорганизмов – полногеномное секвенирование. Использование данного подхода позволяет обнаруживать мутации в любом участке генома микроорганизма, в том числе не влияющие на его фенотип. В работе проведен анализ литературы, посвященной исследованию мутаций в геномах бактерий, возникающих в процессах длительного хранения и культивирования, с использованием методов полногеномного секвенирования.

Ключевые слова: лиофилизация, криоконсервация, хранение микроорганизмов, повреждение ДНК, микробиологические коллекции, стресс замораживания–оттаивания

Для цитирования: Курилова А.Е., Лебедева А.Ю., Богун А.Г. Накопление мутаций в геномах микроорганизмов в процессе длительного хранения и культивирования. Бактериология. 2021; 6(4): 84–93. DOI: 10.20953/2500-1027-2021-4-84-93

Accumulation of mutations in the genomes of microorganisms during long-term storage and cultivation

A.E.Kurilova, A.Yu.Lebedeva, A.G.Bogun

State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Moscow Region, Russian Federation

Culture collections play a key role in underpinning microbiology, supplying and preserving different microorganisms with their original properties. But during the preservation of microorganisms researchers face the adaptation of microorganisms to preserving conditions, to prevent it long-term methods of preservation are used. The most popular methods are cryoconservation and freeze-drying, or lyophilization. The conditions of growing cultures before the conservation are also essential and they also can determine phenotypic and genetic properties after the preservation. The vital problem in preservation is to ensure genetic stability since the viability of cells after preservation may not necessarily correlate with the full maintenance of all properties. Usually in the experiments of long-term preservation the survival rate of the strains is estimated, but this is only a quantitative assessment, not qualitative one. Whole genome sequencing has largely been used to evaluate mutations. This method affords estimation of the mutations that even can not affect the phenotype. Our focus throughout this exercise has been on seeking to the estimation of genetic stability in microorganisms in long-term preservation and cultivation.

Key words: lyophilization, cryoconservation, cryopreservation, DNA damage, culture collections, freeze-drying, freeze-thaw stress

For citation: Kurilova A.E., Lebedeva A.Yu., Bogun A.G. Accumulation of mutations in the genomes of microorganisms during long-term storage and cultivation. Bacteriology. 2021; 6(4): 84–93. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2021-4-84-93

Для корреспонденции:

Курилова Александра Евгеньевна, аспирант, младший научный сотрудник отдела коллекционных культур ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Адрес: 142279, Московская обл., г.о. Серпухов, р.п. Оболенск, Территория «Квартал А», 24
Телефон: (4967) 31-1919

Статья поступила 07.12.2021 г., принята к печати 27.12.2021 г.

For correspondence:

Alexandra E. Kurilova, Post-Graduate Student, Junior Researcher of the Department of Collection Cultures, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rosпотребнадзор

Address: SRCAMB 24 "Quarter A" Territory, 142279, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow Region, Russian Federation
Phone: (4967) 31-1919

The article was received 07.12.2021, accepted for publication 27.12.2021

В современной микробиологии сбор и поддержание коллекций микроорганизмов являются одним из наиболее важных направлений практической деятельности. Коллекции культур микроорганизмов возникли благодаря Роберту Коху, который впервые ввел метод выделения чистых культур на искусственных средах [1]. Первая сервисная коллекция микроорганизмов была создана профессором Франтишек Кралом в 1890 г. в Праге. Благодаря своему опыту выделения, культивирования и хранения микроорганизмов он был назначен доцентом кафедры бактериологии и уже в 1900 г. опубликовал первый каталог коллекции микроорганизмов [2]. Коллекции микроорганизмов позволяют решать фундаментальные и прикладные задачи, в том числе депонирование, хранение и распространение большого количества разнообразных микроорганизмов и обеспечение связанной с ними информации для научных, промышленных, сельскохозяйственных и медицинских целей. Основной задачей коллекционной деятельности является сохранение штаммов в неизменном состоянии и предоставление их для сравнительных экспериментов. Благодаря коллекциям микроорганизмов становится возможным уточнение таксономического положения культур с атипичным фенотипом и генотипами, исследование возбудителей. От качества материала в коллекции зависит достоверность исследований, проводимых в разных лабораториях, поскольку без использования референтных культур невозможно сравнение результатов, полученных в разных лабораториях [3]. Микробиологические коллекции предназначены для формирования и поддержания микроорганизмов в условиях, исключающих утрату их свойств, изменения морфологических, биохимических, серологических и токсических свойств или чувствительности к антибиотикам [4]. Организации, занимающиеся коллекционной деятельностью, ответственны за хранение большого разнообразия штаммов и поддержание их в жизнеспособном неизменном состоянии, что является трудоемкой задачей. Небольшую коллекцию можно поддерживать, используя традиционный метод периодического пересева на свежие питательные среды. Тем не менее применение данного подхода может способствовать накоплению генетических мутаций и, как следствие, изменению биологических свойств бактериальной клетки [5].

Коллекционная деятельность имеет важное значение при изучении возбудителей особо опасных инфекций (ООИ). В Российской Федерации (РФ) коллекции возбудителей ООИ находятся в подведомственных учреждениях Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Российской академии наук, Российской академии медицинских наук, Министерства обороны РФ, Министерства сельского хозяйства РФ [6].

Для сохранения обширных коллекционных фондов в коллекциях используются методы долгосрочного хранения культур [7]. В большинстве случаев в качестве оценки эффективности того или иного метода хранения микроорганизмов используют выживаемость культуры [8], а фенотипическая и тем более генетическая стабильность культур изучаются намного реже. Однако при использовании различных методов хранения штаммов были зарегистрированы изменения их гено- и фенотипов [9, 10].

В последние годы для изучения изменений генотипа микроорганизмов в коллекциях исследователи получили возможность проводить количественную оценку геномных мутаций методом полногеномного секвенирования, в том числе для разных пассажей одной коллекционной культуры. Так, в исследовании Sakurai и Kawasaki [11] изучалось накопление полиморфизмов при хранении штаммов, депонированных в биоресурсном центре Национального института технологий и оценки Японии (NBRC). Авторами был проведен анализ полногеномных полиморфизмов различных партий микроорганизмов, которые были получены из одного источника и хранились в NBRC от 4 до 38 лет, в лиофильно-высушенном состоянии при +4°C. При сравнении последовательности геномов штаммов одного происхождения, а также штаммов, полученных из других публичных коллекций, геномные различия были обнаружены у всех 24 протестированных бактериальных культур, находящихся на хранении в данной организации. Однако авторы не проводили анализ причин возникновения мутаций. С одной стороны, мутации в партиях материала, заложенных в разное время, могут накопиться при пересевах культуры между этапами длительного хранения. С другой – процедуры, сопряженные с лиофилизацией, являются сильным стрессом, способным привести к повышенной частоте возникновения мутаций [11].

В 2016 г. было показано воздействие криоконсервации на бактериальные геномы [12]. Авторы подвергли три штамма *Escherichia coli* однократному замораживанию при различных концентрациях криопротектора глицерина и различных методах замораживания. Штаммы не только демонстрировали различия в жизнеспособности в зависимости от концентрации глицерина, но и этот единственный случай замораживания, очевидно, привел к потере редких аллелей в экспериментальных популяциях. Авторы пришли к выводу, что криоконсервация сама по себе может влиять на фенотипы и генотипы популяции, и связали данные изменения с естественным отбором, а не генетическим дрейфом.

Прогресс в области технологий секвенирования ДНК нового поколения (next-generation sequencing/NGS) привел к широкому внедрению данного метода в деятельность микробиологов. На сегодняшний день эти технологии доступны для широкого спектра исследований [13]. Существует несколько доступных платформ NGS: Illumina, Ion Torrent, Pacific Biosciences, мономолекулярное нанопоровое секвенирование компании Oxford Nanopore, MGI, с использованием которых можно проводить анализ геномов бактерий. Одним из наиболее распространенных способов использования NGS для определения аутентичных свойств бактериальных штаммов является их ресеквенирование и сравнение с наиболее близким эталонным геномом для выявления существенных генетических различий между ними [14]. Данная технология применяется для выявления мутаций при хранении и культивировании коллекционных культур, вызванных воздействием стрессовых физических факторов и применения искусственных питательных сред [15]. Поскольку метаболические особенности и транскрипционные регуляторные факторы микроорганизмов оптимизированы эволюцией в ответ на селективное давление, присутствующее в естественной экологической нише каждого вида, переход к лабораторным методам поддержания культур в жизнеспособном

состоянии способен привести к возникновению субпопуляций бактериальной культуры, приспособленных к изменившимся условиям. Находясь в лабораторных условиях, микроорганизмы могут адаптироваться путем возникновения мутаций, инактивирующих гены, излишние в данной среде [16]. Показательной является работа Liu et al. (2017), посвященная анализу мутаций в геномах пяти изолятов *E. coli*, четыре из которых (GE3, MEM, PAR и WAT) были выделены из окружающей среды, а один (MG1655) являлся культурой распространенного лабораторного штамма K-12 [17]. Особенность данной работы заключалась в реконструкции полных последовательностей бактериальных хромосом и плазмид для каждого из бактериальных штаммов, взятых в работы по алгоритму *de novo*. Авторами были изучены скорости накопления мутаций в условиях длительного культивирования в стационарной фазе и при ежедневных пересевах изучаемых бактериальных культур. После 10 дней культивирования до 25 мутаций присутствовало во всех культурах естественных изолятов (рис. 1). Среди всех мутаций два гена были подвержены параллельным изменениям при различающемся генетическом фоне изолятов, взятых в работу. Мутации в гене *rpoS* присутствовали в изолятах, полученных от всех четырех разных предков. Помимо этого, изоляты приобрели мутации в гене *mutL*, влияющем на репарацию ДНК. Повышенная частота мутаций в этих изолятах указывает на опасность генетической нестабильности, возникающей в лабораторных условиях. Ни мутации гена *rpoS*, ни мутации гена *mutL* не были обнаружены в лабораторном штамме MG1655, однако в нем при тех же условиях культивирования все же присутствовало несколько новых мутаций.

Особый интерес представляет тот факт, что повышенная частота мутационного процесса зарегистрирована в этом эксперименте для культур, длительное время находившихся в стационарной стадии роста (LE1). Эта работа подтверждает более ранние наблюдения, согласно которым длительная инкубация в стационарной фазе в течении нескольких дней на богатых средах (и даже пересылка культур между лабо-

раториями) способна приводить к возникновению гетерогенности бактериальных популяций [18, 19].

Эффекты, связанные с лабораторными пассажами, не ограничиваются штаммами *E. coli*, а наблюдаются для разных бактерий, включая патогены [20–25]. Однако в работе Liu впервые были показаны изменения генома изучаемого микроорганизма с использованием прямого метода – реконструкции полных последовательностей бактериальных хромосом и плазмид [17].

Проблемы при хранении микроорганизмов

Существуют краткосрочные и долгосрочные методы консервации бактериальных штаммов. К краткосрочным методам относятся периодические пересевы на свежие питательные среды (субкультивирование), хранение под минеральным маслом, хранение в воде и водно-солевых растворах, хранение высушиванием на твердых носителях, хранение замораживанием при температурах ниже точки кристаллизации воды. К долгосрочной консервации относят замораживание при низких температурах (криоконсервация), консервацию высушиванием из замороженного состояния (лиофилизация), консервацию высушиванием из жидкого состояния (L-высушивание) [5, 26–28].

Точные механизмы, приводящие к индукции генотипических и фенотипических изменений в микробных клетках во время хранения и субкультивирования, еще не ясны и требуют дополнительных исследований. Предполагается, что несколько факторов, включая температурный шок, окислительный стресс, токсичность криопротекторов, криоповреждения, образование внутриклеточного льда, влияние вакуума и испарения жидкости при сушке и замораживании, а также образование свободных радикалов, могут вызывать различные виды генотипических и фенотипических изменений в культурах [29]. Помимо методов хранения, колебания температуры во время замораживания и оттаивания и даже перенос культур из одного морозильника в другой могут рассматриваться как факторы, вызывающие стрессовые условия для микроорганизмов.

В настоящее время не все широко распространенные методы хранения могут быть применимы для выделенных изолятов бактерий. Для некоторых бактериальных культур характерно гипермутаторное состояние – процесс ускоренного накопления мутаций, как правило, связанный с ошибками в работе бактериальных полимераз либо систем репарации ДНК. Особую проблему для деятельности микробных коллекций представляет сохранение подобных клинических изолятов в том случае, если они актуальны для изучения возбудителей инфекционных заболеваний.

Для организаций, работающих над моделированием ООИ или разработкой вакцин, критически важным является сохранение вирулентности культуры. Была исследована стабильность двух плазмид вирулентности 142 изолятов *Bacillus anthracis* после хранения на протяжении нескольких десятков лет при температуре -20°C на бруцелла-бульоне с добавлением 20% глицерина. Плазмида pXO1 содержит гены, кодирующие сибиреязвенный токсин, а плазмида pXO2 несет кластер генов, отвечающий за экспрессию капсулы. Путем фенотипической оценки с использованием стандартных микробиологических критериев и ПЦР-анализа с ис-

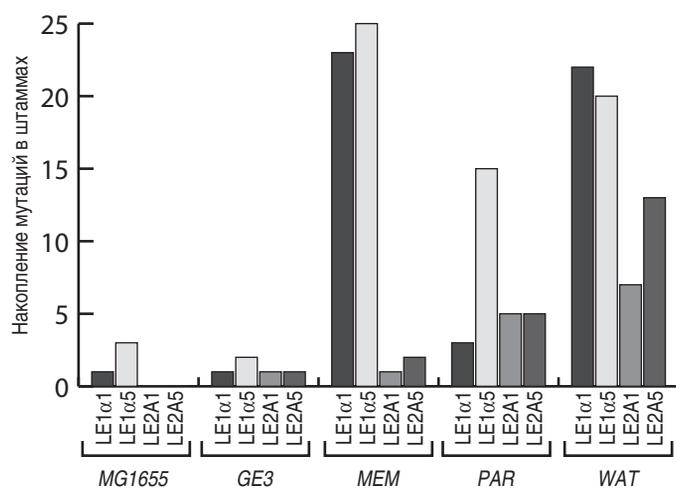


Рис. 1. Накопление мутаций в штаммах в процессе эксперимента (Liu, 2017) [17]. MG1655 – лабораторная культура штамма K-12, GE3, MEM, PAR и WAT – природные изоляты. LE1α1, LE1α5 – клоны, полученные при культивировании в стационарной фазе 10 дней без пересевов; LE2A1, LE2A5 – клоны, полученные при культивировании 10 дней при ежедневном пересеве.

пользованием праймеров, специфичных для этих плазмид, была выявлена утрата плазмиды pXO2 у 21 изолята *B. anthracis*. Изначально 35 изолятов *B. anthracis* продемонстрировали смешанный фенотип мукоидных/немучоидных колоний, 21 изолят не смог восстановить экспрессию капсулы после повторного культивирования на бикарбонатном агаре в анаэробном состоянии [30].

В некоторых случаях обнаружить изменения в геномах изучаемых микроорганизмов не удается, несмотря на существенную разницу их свойств. Так, в нашем центре были проведены тестикулярные пассажи микробной культуры через организм морской свинки, которые позволили значительно увеличить вирулентность *Yersinia pestis* B-6706. Показатель LD₅₀ культуры для морских свинок до анимализации превышал 10⁶ КОЕ, однако после данной процедуры составил всего 68 КОЕ [31]. Проведенное двукратное полногеномное секвенирование на платформах Illumina MiSeq и Ion Torrent PGM исходной и анимализованной культур не выявило различий в геноме. Увеличение вирулентности бактериальной культуры вследствие селекции в организме морской свинки оказалось не связано с появлением спонтанных «мутантов», а вызвано изменением экспрессии генов *psaA*, *pst*, *ansB*, *YPO3636* и *YPO0412* [32].

Микробиологические исследования часто включают обмен штаммами между лабораториями и коллекционными центрами. Сохранность фенотипических и генетических свойств передаваемых штаммов важна для обеспечения воспроизводимых экспериментальных результатов. Длительно время одним из наиболее распространенных способов транспортировки микроорганизмов была культура бактерий в агаровых столбиках. Однако такой способ транспортировки коллекционных культур может приводить к генетической нестабильности, в том числе проявляющейся в накоплении мутаций в гене *rpoS* штаммов *E. coli*. В 2011 г. обнаружена высокая экспрессия продукта гена *rpoS* у культуры *E. coli* MC4100TF, трижды транспортированной между лабораториями, что было связано с инсерцией IS1 в ген *rssB*. Сигма-фактор RpoS, накапливающийся в ответ на стрессовые факторы в стационарной фазе, вступает в конкуренцию с σ^{70} – сигма-фактором «домашнего хозяйства» – за связывания РНК-полимеразы с промоторами генов. Высокая экспрессия RpoS приводит к низкой активности биосинтеза щелочной фосфатазы и плохому росту на ацетате [18].

В 2004 г. Paul et al. показали, что длительное хранение токсигенных штаммов *Vibrio cholerae* на агаровых столбиках может приводить к отбору спонтанных нетоксигенных «мутантов» благодаря мутации в промоторе *toxR*. У *toxR*-«мутантов» отсутствует экспрессия генов *ToxR*-регулона, в том числе токсина холеры, вследствие чего они получают конкурентное преимущество роста перед токсигенными клетками *in vitro* [33].

Для долгосрочного хранения бактериальных культур часто используют лиофилизацию и криоконсервацию [27, 34, 35]. Выбор между методами зачастую зависит от устойчивости микроорганизма к конкретной процедуре, имеющегося оборудования, возможности соблюдения требований биологической безопасности, а также продолжительности, условий и сроков хранения.

При криоконсервации уровень метаболизма клеток снижается с понижением температуры. Так, чем ниже температура хранения и частота колебаний температуры, тем выше стабильность и шанс успешного сохранения жизнеспособной культуры. Сложности с использованием данного метода связаны с необходимостью наличия оборудования для замораживания. Температура, необходимая для сохранения культур, обычно составляет от -80 до -135°C. Для хранения культур дольше 5 лет рекомендуется хранение при сверхнизких температурах в жидком азоте (при -196°C) или его парах [36]. Системы хранения в парах жидкого азота используются для хранения в условиях, препятствующих кросс-контаминации. При использовании данных криогенных технологий необходимо специализированное оборудование, способное обеспечивать постоянство температуры хранения.

Sleight et al. провели эксперимент по изучению эволюционной адаптации микроорганизмов к режиму замораживания–оттаивания. Таким образом, оценивалось влияние стресса замораживания–оттаивания на культуры (*freeze-thaw stress*). В эксперименте рассматривались 15 популяций *E. coli* и их приспособление к 150 двухдневным циклам замораживания (без использования криопротекторов), оттаивания и роста. По результатам исследования отмечалось изменение фенотипических свойств культур, что проявлялось в изменении скорости их роста. Так, у экспериментальных групп наблюдалось сокращение лаг-фазы, то есть периода медленного роста, когда культура приспосабливается к среде. В результате дальнейших исследований авторы выяснили, что улучшение приспособляемости организмов к циклам замораживания–оттаивания было обусловлено мутациями в гене *cls* кардиолипин синтазы – фермента, отвечающего за энергетический обмен клетки, и вставкой IS150 в межгенной области *uspA-uspB*, кодирующей два универсальных стрессовых белка. Мутация гена *cls* помогает поддерживать текучесть мембран после замораживания и оттаивания, но физиологический механизм улучшения приспособленности вследствие вставки IS150 остается неизвестным [37, 38].

Для лучшей сохранности бактериальных культур при замораживании–оттаивании используют криопротекторы, например раствор глицерина [39]. В этих же целях часто используются сахара (лактоза, мальтоза и трегалоза). Они оказывают протективное воздействие на клеточные мембраны, так как связываются с мембранными белками и препятствуют их денатурации в процессе изменения температур [40–42].

Криопротекторы предупреждают действие таких повреждающих факторов, как формирование внутриклеточного льда и обезвоживание. При этом к криопротекторам предъявляются следующие требования: они должны быть хорошо растворимыми в воде и сохранять это свойство при низких температурах, а также иметь низкую токсичность, чтобы было возможно использовать их в больших концентрациях [43, 44]. Кроме того, существует практика включения в питательные среды, используемые в качестве среды для замораживания, компонентов-криопротекторов [45, 46].

Wing et al. (2020) в своем исследовании оценивали последствия замораживания и оттаивания как на фенотипиче-

ском, так и на геномном уровнях, используя популяции *Saccharomyces cerevisiae*. Анализ проводился на пяти различных популяциях дрожжей: одной рекомбинантной популяции SGRP-4X, используемой для картирования локусов количественных признаков, и четырех изогенных штаммов. Криоконсервацию проводили при -80°C в присутствии криопротектора глицерина. Проводили пять последовательных циклов замораживания и оттаивания, после чего анализировали данные полногеномного секвенирования на уровне популяции (Pool-SEQ) после однократного цикла и после пяти циклов. Рекомбинантные популяции продемонстрировали повышенную способность выживать в течение пяти циклов замораживания–оттаивания, тогда как изогенные линии не показали заметных различий в жизнеспособности в тех же условиях. Данные Pool-SEQ для исходно изогенных линий выявили некоторые потенциальные генетические последствия циклов замораживания–оттаивания в виде мутаций *de novo* в каждой из изогенных линий. Однако, учитывая, что жизнеспособность существенно не изменялась в течение повторяющихся циклов замораживания–оттаива-

ния, вероятно, эти предполагаемые мутации имеют незначительные фенотипические последствия, связанные с замораживанием и оттаиванием, или вообще не имеют их. При изучении данных по рекомбинантным популяциям было обнаружено пять примеров потенциальных полезных мутаций *de novo*, которые могут лежать в основе наблюдаемого увеличения жизнеспособности, в том числе ген *rca1*, кодирующий переносчик кадмия. Авторы отмечают, что влияние криоконсервации на эксперименты с участием популяций с небольшими или отсутствующими генетическими вариациями, вероятно, будет незначительным [47].

Сублимационная сушка, или лиофилизация, считается золотым стандартом в области хранения микроорганизмов [29]. Обычно этот процесс включает замораживание материала, а затем высушивание в условиях вакуума, при этом замороженная вода переходит в газообразное состояние и удаляется. Тем самым почти полностью устраняется активность воды, что способствует повышению стабильности и жизнеспособности живых клеток при длительном хранении и помогает продлить срок хранения образцов [27, 48]. Однако

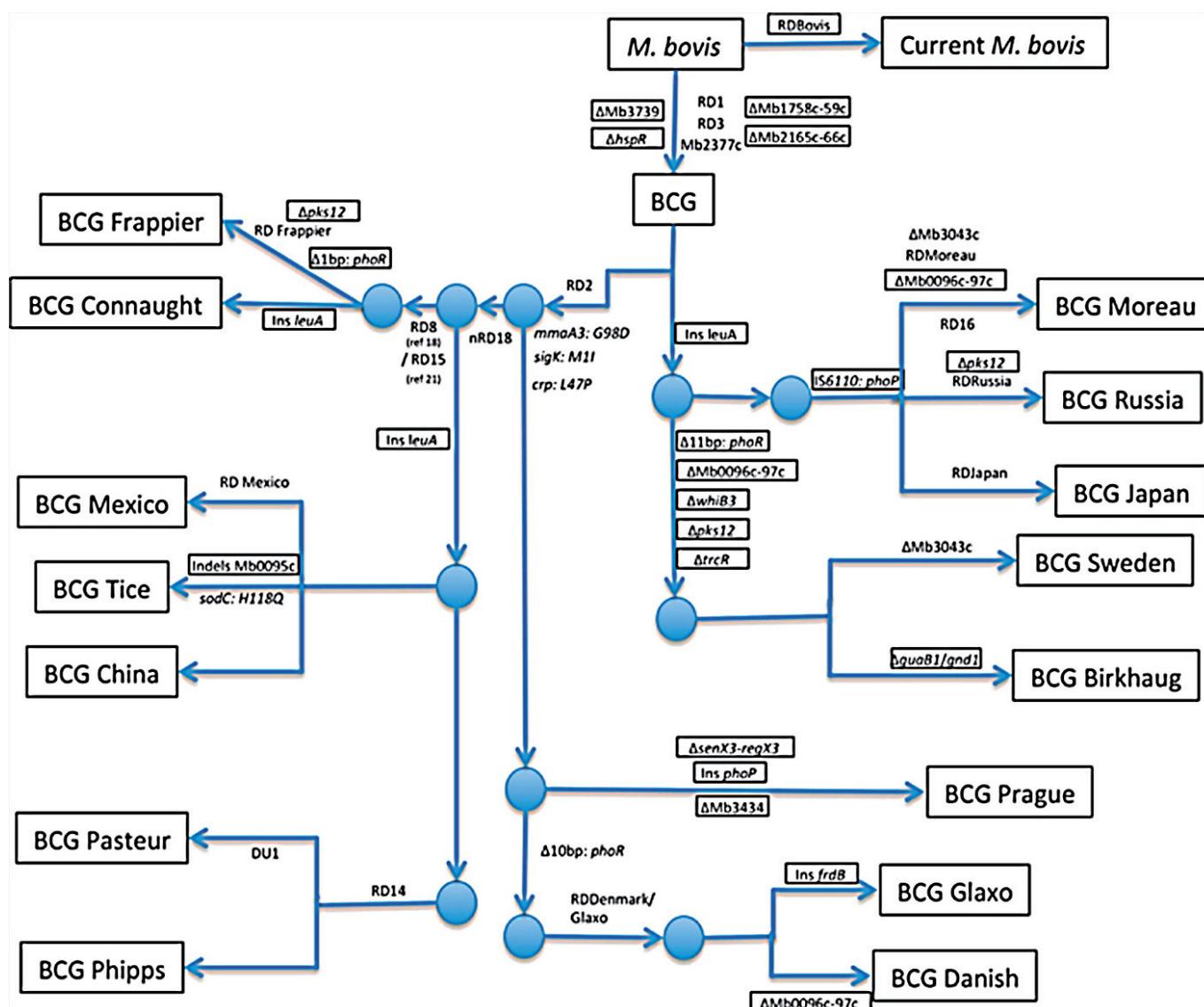


Рис. 2. Схема эволюции вакцинных штаммов БЦЖ, демонстрирующая исходный вирулентный штамм-предок *M. bovis* и последующую серию геномных изменений, включая делеции областей различия гена (regions of difference/RD), однонуклеотидные полиморфизмы (SNP) и некоторые штамм-специфические вставки ('Ins') и делеции ('Δ') [59].

было также показано, что процесс высушивания из замороженного состояния повреждает живые клетки, вызывая изменения свойств мембран, вторичные структурные изменения белков и разрывы цепей нуклеиновых кислот [49–52]. Повреждение, вызванное последовательными этапами замораживания, сушки и регидратации как эукариотических, так и прокариотических клеток, в основном объясняется повреждением ДНК и внутриклеточной потерей воды [53].

Dorman и Thomson секвенировали геном, изучили морфологию и фенотип лиофилизированного штамма *V. cholerae* NCTC 30, впервые выделенного в 1916 г. После 102 лет хранения была выявлена потеря подвижности у *V. cholerae* NCTC 30, а также идентифицирована мутация, из-за которой отсутствовала экспрессия генов биосинтеза жгутика [54]. Эта мутация возникла в результате сдвига рамки считывания гена *flrC*. Ген *flrC* кодирует регулятор ответа FlrC, контролирующей экспрессию генов биосинтеза жгутика класса III (жгутиковый колпачок, моторный компонент MotX и коровый флагеллин FlaA). При этом гены класса III оставались интактными у NCTC 30. Сдвиг рамки считывания препятствует синтезу последних 48 аминокислот С-конца FlrC. Поскольку эта область является ДНК-связывающим доменом регулятора ответа, то данная мутация предотвращает активацию *flrC*-генов биосинтеза жгутика класса III у *V. cholerae* NCTC 30, что вызвало отсутствие жгутика у бактерии [55].

Информация о том, как менялись фенотипы и накапливались мутации в ходе распространения исследуемого штамма при культивировании и хранении, необходима для обеспечения возможности сравнения результатов, получаемых разными научными группами в разные периоды времени. Известным примером изменения свойств бактериальных культур является ситуация с вакцинным штаммом *Mycobacterium bovis*. С момента изобретения вакцины БЦЖ (бациллы Кальметта–Герена) оригинальный штамм, хранящийся в институте Пастера, распространялся и использовался для производства субкультур и последующей вакцинации населения. Вакцина БЦЖ существует с 1921 г. и является одной из наиболее широко используемых из всех существующих в настоящее время вакцин. Вакцинация охватывает более 80% новорожденных и детей грудного возраста в странах, где она является компонентом национальной программы иммунизации детей. Ежегодно вводится более 120 млн доз БЦЖ [56]. Длительное поддержание культуры в разных коллекциях привело к накоплению генетических различий между субкультурами БЦЖ [57, 58]. За прошедшие годы выявлено более 14 субкультур БЦЖ, которые использовались в качестве штаммов вакцины БЦЖ в разных частях мира. На рис. 2 представлена генеалогия штаммов БЦЖ с обозначениями соответствующих мутаций.

В связи с этим в коллекционной деятельности необходимо выявлять генетические изменения депонированных штаммов и их влияние на свойства культуры во время долгосрочного хранения в коллекциях. Для уменьшения последствий повреждения ДНК вследствие стресса, вызванного замораживанием–оттаиванием, а также регидратацией, в клетках активируются механизмы репарации ДНК. Данный факт был установлен путем мониторинга индукции генов с использованием панели биолюминисцентных биорепортеров *E. coli*. Было показано, что гены репарации ДНК, принад-

лежащие оперону SOS, индуцировались при регидратации после лиофилизированного состояния. Это наблюдение было подтверждено УМУ-хроматом в *Salmonella typhimurium*, а также анализом ПЦР в реальном времени выбранных генов SOS *E. coli*. Результаты Rosen et al. также показывают, что весь процесс лиофилизации, а не замораживание или высушивание по отдельности, способствует индукции поврежденных ДНК [60].

Приведенные данные демонстрируют, что появление мутаций в бактериальных популяциях, культивируемых в лабораториях, являются широко распространенным явлением. Таким образом, для современной коллекционной деятельности важным условием поддержания аутентичных свойств штаммов является создание условий в лаборатории, которые будут способствовать устранению мутантных клонов, что позволит повысить стабильность сохранения исходных свойств бактериальных культур.

Заключение

В настоящее время убедительно показана возможность изменения фенотипических и генотипических свойств бактериальных культур в коллекционных фондах в результате длительного хранения и культивирования. За редким исключением исследования механизмов их возникновения проводятся на штаммах *E. coli*. При этом показано, что структура генома бактериальной культуры может оказывать значительное влияние на скорость накопления мутаций. Применяемые методы длительного хранения культур микроорганизмов сами по себе могут вызывать повреждения ДНК и приводить к накоплению мутаций в культурах, что может приводить к изменению фенотипических свойств микроорганизмов. Поскольку возникновение мутаций в геномах живых организмов представляет собой фундаментальный процесс, связанный с их эволюцией и способностью приспосабливаться к условиям окружающей среды, актуальная задача современной коллекционной деятельности фактически заключается в остановке эволюции бактериальных культур в лабораторных условиях.

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках государственного задания по НИОКР 1.1.18.

Financial support

The publication was carried out within the framework of the state assignment for R&D 1.1.18.

Конфликт интересов

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Conflict of interest

Authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

Литература

1. Blevins SM, Bronze MS. Robert Koch and the 'golden age' of bacteriology. Int J Infect Dis. 2010;14(9):e744–e751. DOI: 10.1016/j.ijid.2009.12.003
2. Kocur M. History of the Král Collection. Institute for Fermentation, Osaka. 1990;2:4–12.

3. Van Hop D. Establishment and management of culture collections of microorganisms (mBRC): an overview: Conventional to Modern Approaches. 2018.55-109. DOI: 10.1007/978-3-319-96971-8_3
4. Маркин ВА. Коллекции патогенных вирусов в решении общебиологических проблем. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2007;6:84-93.
5. Онищенко ГГ, Кутырев ВВ, Осин АВ. Коллекционная деятельность в области использования патогенных микроорганизмов в обеспечении биологической безопасности Российской Федерации. Инфекционные болезни: Новости. Мнения. Обучение. 2016;1:37-46.
6. Онищенко ГГ, Кутырев ВВ, Топорков АВ, Осин АВ. Современное состояние коллекционной деятельности, связанной с использованием возбудителей инфекционных болезней I-II групп патогенности. Проблемы особо опасных инфекций. 2010;1(103):5-10. DOI: 10.21055/0370-1069-2010-1(103)-5-10
7. Morgan CA, Herman N, White PA, Vesey G. Preservation of microorganisms by drying; a review. J Microbiol Methods. 2006 Aug;66(2):183-93. DOI: 10.1016/j.mimet.2006.02.017
8. Сидорчук АА, Краснова АА. Сохранность культур бактерий различных групп при длительном хранении в лиофилизированном состоянии. Российский ветеринарный журнал. 2016;3:22-25.
9. Bonetto MC, Sacco NJ, Hilding Ohlsson A, Cortón E. Metabolism of *Klebsiella pneumoniae* freeze-dried cultures for the design of BOD bioassays. Lett Appl Microbiol. 2012 Nov;55(5):370-5. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2012.03302.x
10. Lang E, Malik KA. Maintenance of biodegradation capacities of aerobic bacteria during long-term preservation. Biodegradation. 1996;7:65-71. DOI: 10.1007/BF00056559
11. Sakurai K, Kawasaki H. Genetic variation during long-term preservation of bacteria in public culture collections. Int J Syst Evol Microbiol. 2018;68(5):1815-21. DOI: 10.1099/ijsem.0.002717
12. Sprouffske K, Aguilar-Rodriguez J, Wagner A. How archiving by freezing affects the genome-scale diversity of *Escherichia coli* populations. Genome Biol Evol. 2016;8(5):1290-8. DOI: 10.1093/gbe/evw054
13. Mardis ER. Next-generation DNA sequencing methods. Annu Rev Genomics Hum Genet. 2008;9:387-402. DOI: 10.1146/annurev.genom.9.081307.164359
14. Deatherage DE, Barrick JE. Identification of mutations in laboratory-evolved microbes from next-generation sequencing data using breseq. Methods Mol Biol. 2014;1151:165-88. DOI: 10.1007/978-1-4939-0554-6_12
15. McDonald MJ. Microbial Experimental Evolution – a proving ground for evolutionary theory and a tool for discovery. EMBO Rep. 2019;20(8):e46992. DOI: 10.15252/embr.201846992
16. Hottes AK, Freddolino PL, Khare A, Donnell ZN, Liu JC, Tavazoie S. Bacterial adaptation through loss of function. PLoS Genet. 2013;9(7):e1003617. DOI: 10.1371/journal.pgen.1003617
17. Liu B, Eydallin G, Maharjan RP, Feng L, Wang L, Ferenci T. Natural *Escherichia coli* isolates rapidly acquire genetic changes upon laboratory domestication. Microbiology (Reading). 2017;163(1):22-30. DOI: 10.1099/mic.0.000405
18. Spira B, de Almeida Toledo R, Maharjan RP, Ferenci T. The uncertain consequences of transferring bacterial strains between laboratories – *rpoS* instability as an example. BMC Microbiol. 2011;8(11):248. DOI: 10.1186/1471-2180-11-248
19. Finkel SE, Kolter R. Evolution of microbial diversity during prolonged starvation. Proc Natl Acad Sci USA. 1999;96:4023-7. DOI: 10.1073/pnas.96.7.4023
20. Arvand M, Schubert H, Viezens J. Emergence of distinct genetic variants in the population of primary *Bartonella henselae* isolates. Microbes Infect. 2006;8:1315-20. DOI: 10.1016/j.micinf.2005.12.015
21. Davidson CJ, White AP, Surette MG. Evolutionary loss of the *rdar* morphotype in *Salmonella* as a result of high mutation rates during laboratory passage. The ISME Journal. 2008;2:293-307. DOI: 10.1038/ismej.2008.4
22. Douglas GL, Klaenhammer TR. Genomic evolution of domesticated microorganisms. Annu Rev Food Sci Technol. 2010;1:397-414. DOI: 10.1146/annurev.food.102308.124134
23. Hathaway LJ, Brugger SD, Morand B, Bangert M, Rotzetter JU, Hauser C, et al. Capsule type of *Streptococcus pneumoniae* determines growth phenotype. PLoS Pathog. 2012;8(3):e1002574. DOI: 10.1371/journal.ppat.1002574
24. Kearns DB, Losick R. Swarming motility in undomesticated *Bacillus subtilis*. Mol Microbiol. 2003;49(3):581-90. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2003.03584.x
25. Somerville GA, Beres SB, Fitzgerald JR, Deleo FR, Cole RL, et al. *In vitro* serial passage of *Staphylococcus aureus*: changes in physiology, virulence factor production, and *agr* nucleotide sequence. J Bacteriol. 2002;184(5):1430-7. DOI: 10.1128/JB.184.5.1430-1437.2002
26. Smith D, Ryan MJ, Day JG. The UKNCC Biological Resource: Properties, Maintenance and Management, Egham, UK, UKNCC Secretariat, 2001.
27. Heylen K, Hoefman S, Vekeman B, Peiren J, De Vos P. Safeguarding bacterial resources promotes biotechnological innovation. Appl Microbiol Biotechnol. 2012 May;94(3):565-74. DOI: 10.1007/s00253-011-3797-y
28. Overmann J, Abt B, Sikorski J. Present and Future of Culturing Bacteria. Annu Rev Microbiol. 2017 Sep 8;71:711-730. DOI: 10.1146/annurev-micro-090816-093449
29. Prakash O, Nimonkar Y, Shouche YS. Practice and prospects of microbial preservation. FEMS Microbiol Lett. 2013 Feb;339(1):1-9. DOI: 10.1111/1574-6968.12034
30. Buyuk F, Sahin M, Cooper C, Celebi O, Saglam AG, Baillie L, et al. The effect of prolonged storage on the virulence of isolates of *Bacillus anthracis* obtained from environmental and animal sources in the Kars Region of Turkey. FEMS Microbiol Lett. 2015;362(13):1-6. DOI: 10.1093/femsle/fnv102
31. Анисимов НВ, Комбарова ТИ, Платонов МЕ, Иванов СА, Сухова МА, Дентовская СВ, Анисимов АП. Способ отбора филогенетически близких штаммов *Yersinia pestis*, отличающихся по вирулентности для морских свинок. Инфекция и иммунитет. 2015;5(4):373-376. DOI: 10.15789/2220-7619-2015-4-373-376
32. Соломенцев ВИ, Кадникова ЛА, Кисличкина АА, Майская НВ, Комбарова ТИ, Платонов МЕ, и др. Сравнительное секвенирование транскриптомов культур *Yersinia pestis* subsp. *microti* bv. *ulegeica*, отличающихся по вирулентности для морских свинок. Бактериология. 2017;2(2):30-35. DOI: 10.20953/2500-1027-2017-2-30-35
33. Paul K, Ghosh A, Sengupta N, Chowdhury R. Competitive growth advantage of nontoxigenic mutants in the stationary phase in archival cultures of pathogenic *Vibrio cholerae* strains. Infect Immun. 2004 Sep;72(9):5478-82. DOI: 10.1128/IAI.72.9.5478-5482.2004
34. Siberry G, Brahmadathan KN, Pandian R, Lalitha MK, Steinhoff MC, John TJ. Comparison of different culture media and storage temperatures for the long-term preservation of *Streptococcus pneumoniae* in the tropics. Bull World Health Organ. 2001;79(1):43-7.
35. Smith D, Ryan M. Implementing best practices and validation of cryopreservation techniques for microorganisms. ScientificWorldJournal. 2012;2012:805659. DOI: 10.1100/2012/805659
36. Stacey GN, Day JG. Long-term ex situ conservation of biological resources and the role of biological resource centers. Methods Mol Biol. 2007;368:1-14. DOI: 10.1007/978-1-59745-362-2_1
37. Sleight SC, Lenski RE. Evolutionary adaptation to freeze-thaw-growth cycles in *Escherichia coli*. Physiol Biochem Zool. 2007 Jul-Aug;80(4):370-85. DOI: 10.1086/518013
38. Sleight SC, Orlic C, Schneider D, Lenski RE. Genetic basis of evolutionary adaptation by *Escherichia coli* to stressful cycles of freezing, thawing and growth. Genetics. 2008 Sep;180(1):431-43. DOI: 10.1534/genetics.108.091330
39. Cabrera E, Welch LC, Robinson MR, Sturgeon CM, Crow MM, Segarra VA. Cryopreservation and the Freeze-Thaw Stress Response in Yeast. Genes (Basel). 2020 Jul 22;11(8):835. DOI: 10.3390/genes11080835
40. Chin YW, Lee S, Yu HH, Yang SJ, Kim TW. Combinatorial Effects of Protective Agents on Survival Rate of the Yeast Starter, *Saccharomyces cerevisiae* 88-4, after Freeze-Drying. Microorganisms. 2021 Mar 16;9(3):613. DOI: 10.3390/microorganisms9030613

41. Romano N, Schebor C, Mobili P, Gómez-Zavaglia A. Role of mono- and oligosaccharides from FOS as stabilizing agents during freeze-drying and storage of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *Food Res Int*. 2016 Dec;90:251-258. DOI: 10.1016/j.foodres.2016.11.003
42. Martos GI, Minahk CJ, de Valdez GF, Morero R. Effects of protective agents on membrane fluidity of freeze-dried *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. *Lett Appl Microbiol*. 2007 Sep;45(3):282-8. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2007.02188.x
43. Pegg DE. Principles of cryopreservation. In: Day JG, Stacey GN (eds.). *Cryopreservation and freeze-drying protocols*. Humana Press, Totowa, NJ. 2007, pp. 39-58.
44. Elliott GD, Wang S, Fuller BJ. Cryoprotectants: A review of the actions and applications of cryoprotective solutes that modulate cell recovery from ultra-low temperatures. *Cryobiology*. 2017 Jun;76:74-91. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2017.04.004
45. Bellali S, Bou Khalil J, Fontanini A, Raoult D, Lagier JC. A new protectant medium preserving bacterial viability after freeze drying. *Microbiol Res*. 2020 Jun;236:126454. DOI: 10.1016/j.micres.2020.126454
46. Kurtmann L, Skibsted LH, Carlsen CU. Browning of freeze-dried probiotic bacteria cultures in relation to loss of viability during storage. *J Agric Food Chem*. 2009 Aug 12;57(15):6736-41. DOI: 10.1021/jf901044u
47. Wing KM, Phillips MA, Baker AR, Burke MK. Consequences of Cryopreservation in Diverse Natural Isolates of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genome Biol Evol*. 2020 Aug 1;12(8):1302-1312. DOI: 10.1093/gbe/evaa121
48. Fonseca F, Cenard S, Passot S. Freeze-drying of lactic acid bacteria. *Methods Mol Biol*. 2015;1257:477-88. DOI: 10.1007/978-1-4939-2193-5_24
49. Castro H, Teixeira P, Kirby R. Evidence of membrane damage in *Lactobacillus bulgaricus* following freeze drying. *Journal of Applied Microbiology*. 1997;82:87-94. DOI: 10.1111/j.1365-2672.1997.tb03301.x
50. Tymczyszyn EE, del Rosario Díaz M, Gómez-Zavaglia A, Disalvo EA. Volume recovery, surface properties and membrane integrity of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* dehydrated in the presence of trehalose or sucrose. *Journal Appl Microbiol*. 2007;103(6):2410-9. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2007.03482.x
51. Tymczyszyn EE, Díaz R, Pataro A, Sandonato N, Gómez-Zavaglia A, Disalvo EA. Critical water activity for the preservation of *Lactobacillus bulgaricus* by vacuum drying. *Int J Food Microbiol*. 2008;128(2):342-7. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2008.09.009
52. Haindl R, Neumayr A, Frey A, Kulozik U. Impact of cultivation strategy, freeze-drying process, and storage conditions on survival, membrane integrity, and inactivation kinetics of *Bifidobacterium longum*. *Folia Microbiol (Praha)*. 2020 Dec;65(6):1039-1050. DOI: 10.1007/s12223-020-00815-3
53. Sharma VK, Klihanov AM. Moisture-induced aggregation of lyophilized DNA and its prevention. *Pharm Res*. 2007 Jan;24(1):168-75. DOI: 10.1007/s11095-006-9138-7
54. Dorman MJ, Thomson NR. 'Community evolution' – laboratory strains and pedigrees in the age of genomics. *Microbiology (Reading)*. 2020 Mar;166(3):233-238. DOI: 10.1099/mic.0.000869
55. Dorman MJ, Kane L, Domman D, Turnbull JD, Cormie C, Fazal MA, et al. The history, genome and biology of NCTC 30: a non-pandemic *Vibrio cholerae* isolate from World War One. *Proc Biol Sci*. 2019 Apr 10;286(1900):20182025. DOI: 10.1098/rspb.2018.2025
56. Abdallah AM, Behr MA. Evolution and Strain Variation in BCG. *Adv Exp Med Biol*. 2017;1019:155-169. DOI: 10.1007/978-3-319-64371-7_8
57. Wada T, Maruyama F, Iwamoto T, Maeda S, Yamamoto T, Nakagawa I, Yamamoto S, Ohara N. Deep sequencing analysis of the heterogeneity of seed and commercial lots of the bacillus Calmette–Guérin (BCG) tuberculosis vaccine substrain Tokyo-172. *Sci Rep*. 2015 Dec 4;5:17827. DOI: 10.1038/srep17827
58. Shibayama K, Mochida K, Yagi T, Mori S, Arakawa Y, Yamamoto S. Quantification of two variant strains contained in freeze-dried Japanese BCG vaccine preparation by real-time PCR. *Biologicals*. 2007 Apr;35(2):139-43. DOI: 10.1016/j.biologicals.2006.07.005
59. Abdallah AM, Hill-Cawthorne GA, Otto TD, Coll F, Guerra-Assunção JA, Gao G, et al. Genomic expression catalogue of a global collection of BCG vaccine strains show evidence for highly diverged metabolic and cell-wall adaptations. *Sci Rep*. 2015 Oct 21;5:15443. DOI: 10.1038/srep15443
60. Rosen R, Buchinger S, Pfänder R, Pedhazur R, Reifferscheid G, Belkin S. SOS gene induction and possible mutagenic effects of freeze-drying in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2016 Nov;100(21):9255-9264. DOI: 10.1007/s00253-016-7751-x

References

- Blevins SM, Bronze MS. Robert Koch and the 'golden age' of bacteriology. *Int J Infect Dis*. 2010;14(9):e744-e751. DOI: 10.1016/j.ijid.2009.12.003
- Kocur M. History of the Král Collection. *Institute for Fermentation, Osaka*. 1990;2:4-12.
- Van Hop D. Establishment and management of culture collections of microorganisms (mBRC): an overview: Conventional to Modern Approaches. 2018.55-109. DOI: 10.1007/978-3-319-96971-8_3
- Markin VA. Collections of pathogenic viruses for addressing general biologic problems. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2007;6:84-93. (In Russian).
- Onishchenko GG, Kutyrev VV, Osin AV. Collection activities in the sphere of pathogenic microorganisms usage for the provision of biological safety in the Russian Federation. *Infectious Diseases. News, Opinions, Training*. 2016;1:37-46. (In Russian).
- Onishenko GG, Kutyrev VV, Toporkov AV, Ossin AV. Current state of collection activity relative to the use of infectious agents of I–II pathogenicity groups. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii (Problems of Particularly Dangerous Infections)*. 2010;1(103):5-10. DOI: 10.21055/0370-1069-2010-1(103)-5-10 (In Russian).
- Morgan CA, Herman N, White PA, Vesey G. Preservation of microorganisms by drying; a review. *J Microbiol Methods*. 2006 Aug;66(2):183-93. DOI: 10.1016/j.mimet.2006.02.017
- Sidorchuk AA, Krasnova AA. Preservation of bacterial cultures different groups after prolonged storage in a lyophilized condition. *Rossiiskii veterinarnyi zhurnal*. 2016;3:22-25. (In Russian).
- Bonetto MC, Sacco NJ, Hilding Ohlsson A, Cortón E. Metabolism of *Klebsiella pneumoniae* freeze-dried cultures for the design of BOD bioassays. *Lett Appl Microbiol*. 2012 Nov;55(5):370-5. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2012.03302.x
- Lang E, Malik KA. Maintenance of biodegradation capacities of aerobic bacteria during long-term preservation. *Biodegradation*. 1996;7:65-71. DOI: 10.1007/BF00056559
- Sakurai K, Kawasaki H. Genetic variation during long-term preservation of bacteria in public culture collections. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2018;68(5):1815-21. DOI: 10.1099/ijsem.0.002717
- Sprouffske K, Aguilar-Rodríguez J, Wagner A. How archiving by freezing affects the genome-scale diversity of *Escherichia coli* populations. *Genome Biol Evol*. 2016;8(5):1290-8. DOI: 10.1093/gbe/evw054
- Mardis ER. Next-generation DNA sequencing methods. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2008;9:387-402. DOI: 10.1146/annurev.genom.9.081307.164359
- Deatherage DE, Barrick JE. Identification of mutations in laboratory-evolved microbes from next-generation sequencing data using breseq. *Methods Mol Biol*. 2014;1151:165-88. DOI: 10.1007/978-1-4939-0554-6_12
- McDonald MJ. Microbial Experimental Evolution – a proving ground for evolutionary theory and a tool for discovery. *EMBO Rep*. 2019;20(8):e46992. DOI: 10.15252/embr.201846992
- Hottes AK, Freddolino PL, Khare A, Donnell ZN, Liu JC, Tavazoie S. Bacterial adaptation through loss of function. *PLoS Genet*. 2013;9(7):e1003617. DOI: 10.1371/journal.pgen.1003617

17. Liu B, Eydallin G, Maharjan RP, Feng L, Wang L, Ferenci T. Natural *Escherichia coli* isolates rapidly acquire genetic changes upon laboratory domestication. *Microbiology (Reading)*. 2017;163(1):22-30. DOI: 10.1099/mic.0.000405
18. Spira B, de Almeida Toledo R, Maharjan RP, Ferenci T. The uncertain consequences of transferring bacterial strains between laboratories – *rpoS* instability as an example. *BMC Microbiol*. 2011;8(11):248. DOI: 10.1186/1471-2180-11-248
19. Finkel SE, Kolter R. Evolution of microbial diversity during prolonged starvation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999;96:4023-7. DOI: 10.1073/pnas.96.7.4023
20. Arvand M, Schubert H, Viezens J. Emergence of distinct genetic variants in the population of primary *Bartonella henselae* isolates. *Microbes Infect*. 2006;8:1315-20. DOI: 10.1016/j.micinf.2005.12.015
21. Davidson CJ, White AP, Surette MG. Evolutionary loss of the *rdar* morphotype in *Salmonella* as a result of high mutation rates during laboratory passage. *The ISME Journal*. 2008;2:293-307. DOI: 10.1038/ismej.2008.4
22. Douglas GL, Klaenhammer TR. Genomic evolution of domesticated microorganisms. *Annu Rev Food Sci Technol*. 2010;1:397-414. DOI: 10.1146/annurev.food.102308.124134
23. Hathaway LJ, Brugger SD, Morand B, Bangert M, Rotzetter JU, Hauser C, et al. Capsule type of *Streptococcus pneumoniae* determines growth phenotype. *PLoS Pathog*. 2012;8(3):e1002574. DOI: 10.1371/journal.ppat.1002574
24. Kearns DB, Losick R. Swarming motility in undomesticated *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol*. 2003;49(3):581-90. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2003.03584.x
25. Somerville GA, Beres SB, Fitzgerald JR, Deleo FR, Cole RL, et al. *In vitro* serial passage of *Staphylococcus aureus*: changes in physiology, virulence factor production, and *agr* nucleotide sequence. *J Bacteriol*. 2002;184(5):1430-7. DOI: 10.1128/JB.184.5.1430-1437.2002
26. Smith D, Ryan MJ, Day JG. The UKNCC Biological Resource: Properties, Maintenance and Management, Egham, UK, UKNCC Secretariat, 2001.
27. Heylen K, Hoefman S, Vekeman B, Peiren J, De Vos P. Safeguarding bacterial resources promotes biotechnological innovation. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2012 May;94(3):565-74. DOI: 10.1007/s00253-011-3797-y
28. Overmann J, Abt B, Sikorski J. Present and Future of Culturing Bacteria. *Annu Rev Microbiol*. 2017 Sep 8;71:711-730. DOI: 10.1146/annurev-micro-090816-093449
29. Prakash O, Nimonkar Y, Shouche YS. Practice and prospects of microbial preservation. *FEMS Microbiol Lett*. 2013 Feb;339(1):1-9. DOI: 10.1111/1574-6968.12034
30. Buyuk F, Sahin M, Cooper C, Celebi O, Saglam AG, Baillie L, et al. The effect of prolonged storage on the virulence of isolates of *Bacillus anthracis* obtained from environmental and animal sources in the Kars Region of Turkey. *FEMS Microbiol Lett*. 2015;362(13):1-6. DOI: 10.1093/femsle/fnv102
31. Anisimov AP, Kombarova TI, Platonov ME, Ivanov SA, Sukhova MA, Dentovskaya SV, Anisimov AP. Selection of phylogenetically closely-related *Yersinia pestis* strains differing in their virulence for guinea pigs. *Russian Journal of Infection and Immunity*. 2015;5(4):373-376. DOI: 10.15789/2220-7619-2015-4-373-376 (In Russian).
32. Solomentsev VI, Kadnikova LA, Kislichkina AA, Mayskaya NV, Kombarova TI, Platonov ME, et al. Comparative sequencing of transcriptomes of *Yersinia pestis* subsp. *microti* bv. *ulegeica*, different by virulence for guinea pigs. *Bacteriology*. 2017;2(2):30-35. DOI: 10.20953/2500-1027-2017-2-30-35 (In Russian).
33. Paul K, Ghosh A, Sengupta N, Chowdhury R. Competitive growth advantage of nontoxicogenic mutants in the stationary phase in archival cultures of pathogenic *Vibrio cholerae* strains. *Infect Immun*. 2004 Sep;72(9):5478-82. DOI: 10.1128/IAI.72.9.5478-5482.2004
34. Siberry G, Brahmadathan KN, Pandian R, Lalitha MK, Steinhoff MC, John TJ. Comparison of different culture media and storage temperatures for the long-term preservation of *Streptococcus pneumoniae* in the tropics. *Bull World Health Organ*. 2001;79(1):43-7.
35. Smith D, Ryan M. Implementing best practices and validation of cryopreservation techniques for microorganisms. *ScientificWorldJournal*. 2012;2012:805659. DOI: 10.1100/2012/805659
36. Stacey GN, Day JG. Long-term ex situ conservation of biological resources and the role of biological resource centers. *Methods Mol Biol*. 2007;368:1-14. DOI: 10.1007/978-1-59745-362-2_1
37. Sleight SC, Lenski RE. Evolutionary adaptation to freeze-thaw-growth cycles in *Escherichia coli*. *Physiol Biochem Zool*. 2007 Jul-Aug;80(4):370-85. DOI: 10.1086/518013
38. Sleight SC, Orlic C, Schneider D, Lenski RE. Genetic basis of evolutionary adaptation by *Escherichia coli* to stressful cycles of freezing, thawing and growth. *Genetics*. 2008 Sep;180(1):431-43. DOI: 10.1534/genetics.108.091330
39. Cabrera E, Welch LC, Robinson MR, Sturgeon CM, Crow MM, Segarra VA. Cryopreservation and the Freeze-Thaw Stress Response in Yeast. *Genes (Basel)*. 2020 Jul 22;11(8):835. DOI: 10.3390/genes11080835
40. Chin YW, Lee S, Yu HH, Yang SJ, Kim TW. Combinatorial Effects of Protective Agents on Survival Rate of the Yeast Starter, *Saccharomyces cerevisiae* 88-4, after Freeze-Drying. *Microorganisms*. 2021 Mar 16;9(3):613. DOI: 10.3390/microorganisms9030613
41. Romano N, Schebor C, Mobili P, Gómez-Zavaglia A. Role of mono- and oligosaccharides from FOS as stabilizing agents during freeze-drying and storage of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *Food Res Int*. 2016 Dec;90:251-258. DOI: 10.1016/j.foodres.2016.11.003
42. Martos GI, Minahk CJ, de Valdez GF, Morero R. Effects of protective agents on membrane fluidity of freeze-dried *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. *Lett Appl Microbiol*. 2007 Sep;45(3):282-8. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2007.02188.x
43. Pegg DE. Principles of cryopreservation. In: Day JG, Stacey GN (eds.). *Cryopreservation and freeze-drying protocols*. Humana Press, Totowa, NJ. 2007, pp. 39-58.
44. Elliott GD, Wang S, Fuller BJ. Cryoprotectants: A review of the actions and applications of cryoprotective solutes that modulate cell recovery from ultra-low temperatures. *Cryobiology*. 2017 Jun;76:74-91. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2017.04.004
45. Bellali S, Bou Khalil J, Fontanini A, Raoult D, Lagier JC. A new protectant medium preserving bacterial viability after freeze drying. *Microbiol Res*. 2020 Jun;236:126454. DOI: 10.1016/j.micres.2020.126454
46. Kurtmann L, Skibsted LH, Carlsen CU. Browning of freeze-dried probiotic bacteria cultures in relation to loss of viability during storage. *J Agric Food Chem*. 2009 Aug 12;57(15):6736-41. DOI: 10.1021/jf901044u
47. Wing KM, Phillips MA, Baker AR, Burke MK. Consequences of Cryopreservation in Diverse Natural Isolates of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genome Biol Evol*. 2020 Aug 1;12(8):1302-1312. DOI: 10.1093/gbe/evaa121
48. Fonseca F, Cenard S, Passot S. Freeze-drying of lactic acid bacteria. *Methods Mol Biol*. 2015;1257:477-88. DOI: 10.1007/978-1-4939-2193-5_24
49. Castro H, Teixeira P, Kirby R. Evidence of membrane damage in *Lactobacillus bulgaricus* following freeze drying. *Journal of Applied Microbiology*. 1997;82:87-94. DOI: 10.1111/j.1365-2672.1997.tb03301.x
50. Tymczyszyn EE, del Rosario Díaz M, Gómez-Zavaglia A, Disalvo EA. Volume recovery, surface properties and membrane integrity of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* dehydrated in the presence of trehalose or sucrose. *Journal Appl Microbiol*. 2007;103(6):2410-9. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2007.03482.x
51. Tymczyszyn EE, Díaz R, Pataro A, Sandonato N, Gómez-Zavaglia A, Disalvo EA. Critical water activity for the preservation of *Lactobacillus bulgaricus* by vacuum drying. *Int J Food Microbiol*. 2008;128(2):342-7. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2008.09.009
52. Haindl R, Neumayr A, Frey A, Kulozik U. Impact of cultivation strategy, freeze-drying process, and storage conditions on survival, membrane integrity, and inactivation kinetics of *Bifidobacterium longum*. *Folia Microbiol (Praha)*. 2020 Dec;65(6):1039-1050. DOI: 10.1007/s12223-020-00815-3
53. Sharma VK, Klibanov AM. Moisture-induced aggregation of lyophilized DNA and its prevention. *Pharm Res*. 2007 Jan;24(1):168-75. DOI: 10.1007/s11095-006-9138-7

54. Dorman MJ, Thomson NR. 'Community evolution' – laboratory strains and pedigrees in the age of genomics. *Microbiology (Reading)*. 2020 Mar;166(3):233-238. DOI: 10.1099/mic.0.000869
55. Dorman MJ, Kane L, Domman D, Turnbull JD, Cormie C, Fazal MA, et al. The history, genome and biology of NCTC 30: a non-pandemic *Vibrio cholerae* isolate from World War One. *Proc Biol Sci*. 2019 Apr 10;286(1900):20182025. DOI: 10.1098/rspb.2018.2025
56. Abdallah AM, Behr MA. Evolution and Strain Variation in BCG. *Adv Exp Med Biol*. 2017;1019:155-169. DOI: 10.1007/978-3-319-64371-7_8
57. Wada T, Maruyama F, Iwamoto T, Maeda S, Yamamoto T, Nakagawa I, Yamamoto S, Ohara N. Deep sequencing analysis of the heterogeneity of seed and commercial lots of the bacillus Calmette–Guérin (BCG) tuberculosis vaccine substrain Tokyo-172. *Sci Rep*. 2015 Dec 4;5:17827. DOI: 10.1038/srep17827
58. Shibayama K, Mochida K, Yagi T, Mori S, Arakawa Y, Yamamoto S. Quantification of two variant strains contained in freeze-dried Japanese BCG vaccine preparation by real-time PCR. *Biologicals*. 2007 Apr;35(2):139-43. DOI: 10.1016/j.biologicals.2006.07.005
59. Abdallah AM, Hill-Cawthorne GA, Otto TD, Coll F, Guerra-Assunção JA, Gao G, et al. Genomic expression catalogue of a global collection of BCG vaccine strains show evidence for highly diverged metabolic and cell-wall adaptations. *Sci Rep*. 2015 Oct 21;5:15443. DOI: 10.1038/srep15443
60. Rosen R, Buchinger S, Pfänder R, Pedhazur R, Reifferscheid G, Belkin S. SOS gene induction and possible mutagenic effects of freeze-drying in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2016 Nov;100(21):9255-9264. DOI: 10.1007/s00253-016-7751-x

Информация об авторах:

Лебедева Анастасия Юрьевна, младший научный сотрудник отдела коллекционных культур ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
Адрес: 142279, Московская обл., г.о. Серпухов, р.п. Оболенск, Территория «Квартал А», 24
Телефон: (4967) 31-1919

Богун Александр Геннадьевич, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник отдела коллекционных культур ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
Адрес: 142279, Московская обл., г.о. Серпухов, р.п. Оболенск, Территория «Квартал А», 24
Телефон: (4967) 36-0000
E-mail: bogun@obolensk.org

Information about authors:

Anastasia Y. Lebedeva, Junior Researcher of the Department of Collection Cultures, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rospotrebnadzor
Address: SRCAMB 24 "Quarter A" Territory, 142279, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow Region, Russian Federation
Phone: (4967) 31-1919

Aleksandr G. Bogun PhD (Biological Sciences), Leading Researcher of the Department of Collection Cultures, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rospotrebnadzor
Address: SRCAMB 24 "Quarter A" Territory, 142279, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow Region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0000
E-mail: bogun@obolensk.org

НОВОСТИ НАУКИ

Новое исследование обнаружило прямую и специфичную для пола связь между составом микробиома младенца и поведенческим здоровьем в раннем детстве

Предыдущие исследования установили связь между микробиомом кишечника и поведением, таким как депрессия, тревожность и синдром дефицита внимания с гиперактивностью. Но до сих пор практически не было данных о людях, на основе которых можно было бы охарактеризовать роль микробиома в младенчестве в отношении этих результатов у детей и того, как они могут различаться у мальчиков и девочек. Чтобы определить, связаны ли различия в микробиоме младенца с нейроповедением и различается ли это поведение у мальчиков и девочек, исследовательская группа использовала когортное исследование новорожденных. Исследователи проанализировали образцы стула у 260 младенцев в разные моменты времени – шесть недель, один год и два года. Это позволило им охарактеризовать виды микробов, присутствующих в кишечнике каждого участника, и их функции. Затем они использовали систему оценки поведения для детей. Установлено, что изменения микробиома происходят раньше, чем изменения в поведении. Обнаружено, что микробиомы младенцев и детей раннего возраста были связаны с нейроповеденческими структурами, такими как тревога, депрессия, гиперактивность и социальное поведение, в зависимости от времени и пола. Например, обнаружили, что увеличение разнообразия кишечника было лучше для мальчиков, а это означает, что оно было связано с меньшим количеством форм поведения, таких как тревога и депрессия, но не среди девочек. Установлены различия в социальном поведении с микробиомами, измеренными на более поздних стадиях, где были доказательства того, что разнообразие, опять же, может быть полезным для мальчиков, но не для девочек.

Хотя результаты не позволяют идентифицировать виды микробов, которые можно использовать для предотвращения развития у детей нейроповедения, такого как тревога или депрессия, полагают, что они послужат информацией для будущих исследований, которые помогут более глубоко изучить некоторые из полученных результатов.

Laue HE, Karagas MR, Coker MO, Bellinger DC, Baker ER, Korrick SA, Madan JC. Sex-specific relationships of the infant microbiome and early-childhood behavioral outcomes. *Pediatr Res*. 2021 Nov 4. DOI: 10.1038/s41390-021-01785-z.

