

Генетическая стабильность бактериальных культур в процессе хранения

А.Ю.Лебедева, А.Е.Соломенцева, М.Р.Барькова, Н.А.Сухаричева

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии»,
Оболensk, Российская Федерация

Бактериальные культуры нашли широкое применение в медицинской, пищевой и биотехнологической отраслях. Хранение штаммов и изучение их свойств является одной из важнейших задач коллекций культур. Для поддержания культур в жизнеспособном состоянии могут использоваться различные методические приемы – пересевы на плотные и жидкие питательные среды, лиофильное высушивание, криоконсервация. Однако переход к условиям длительного хранения является сильным стрессовым фактором для большинства микроорганизмов. Это способствует повышению частоты мутационного процесса и приводит к изменению их генотипических и фенотипических свойств. В настоящем обзоре рассматриваются основные методы хранения и стрессовые факторы, влияющие на возникновение мутаций.
Ключевые слова: лиофилизация, криоконсервация, хранение микроорганизмов, мутационный процесс, фенотип, генотип

Для цитирования: Лебедева А.Ю., Соломенцева А.Е., Барькова М.Р., Сухаричева Н.А. Генетическая стабильность бактериальных культур в процессе хранения. Бактериология. 2024; 9(1): 95–104. DOI: 10.20953/2500-1027-2024-1-95-104

Genetic stability of microbial cultures in preservation

A.Yu.Lebedeva, A.E.Solomentseva, M.R.Barkova, N.A.Sukharicheva

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

The activity of microbial collections is related to the study and maintenance of bacterial cultures used in the medical, food and biotechnology industries. To maintain cultures in a viable state, various methodological techniques can be used – transfers on solid and liquid nutrient media, freeze-drying, cryopreservation. However, the transition to long-term storage conditions is a strong stress factor for most microorganisms, and, as a result, it contributes to an increase in the frequency of mutations. There are a number of problems of long-term preservation of microorganisms, including loss of viability of strains, as well as changes in their phenotype and genotype. In this review we are mostly focused on the main stress factors that affect the occurrence of mutations during long-term preservation of microorganism strains using various storage methods.
Key words: preservation of microorganisms, lyophilization, cryoconservation, genotype, phenotype.

For citation: Lebedeva A.Yu., Solomentseva A.E., Barkova M.R., Sukharicheva N.A. Genetic stability of microbial cultures in preservation. Bacteriology. 2024; 9(1): 95–104. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2024-1-95-104

К настоящему времени бактериальные культуры нашли широкое применение в различных отраслях человеческой деятельности [1]. Использование микроорганизмов в качестве референтных в научных, промышленных, сельскохозяйственных, экологических и медицинских исследованиях предполагает хранение штаммов в лабораториях и коллекциях культур. На сегодняшний день существует множество методов хранения, однако нет универсального способа, который бы подходил для всех видов микроорганизмов.

Раньше основным критерием качества метода хранения считалась выживаемость микроорганизмов на этапе восстановления культуры, а также сохранение их фенотипических

свойств. В настоящее время повышенное внимание уделяется поддержанию генетической стабильности исходных штаммов, так как на формирование фенотипа микроорганизма ключевое влияние оказывает его генотип. В литературе отмечаются мутационные изменения коллекционных штаммов, что приводит к развитию нескольких лабораторных линий одного штамма с различными фенотипическими свойствами [2]. Это, в свою очередь, может повлиять на релевантность результатов исследований, проводимых с использованием этих штаммов в разных лабораториях.

Мутации микробных культур могут быть вызваны различными причинами, в т.ч. спонтанным мутагенезом, условиями

Для корреспонденции:

Лебедева Анастасия Юрьевна, младший научный сотрудник отдела коллекционных культур ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Адрес: 142279, Московская область, г.о. Серпухов, р.п. Оболensk, территория «Квартал А», 24
Телефон: (4967) 31-19-19
E-mail: lebedeva@obolensk.org

Статья поступила 28.08.2023, принята к печати 29.03.2024

For correspondence:

Anastasia Yu. Lebedeva, Junior Researcher of Culture Collection Dep., State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Address: 24 "Quarter A" Territory, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow Region, 142279, Russian Federation
Phone: (4967) 31-19-19
E-mail: lebedeva@obolensk.org

The article was received 28.08.2023, accepted for publication 29.03.2024

культивирования и качеством сред, а также способом хранения. В зависимости от метода хранения микробные культуры подвергаются действию многих стрессовых факторов, таких как вакуум, низкие температуры, изменение осмотического давления.

В настоящем обзоре представлены преимущества и недостатки краткосрочных и долгосрочных методов хранения культур. Рассмотрен вопрос генетической стабильности и описаны основные причины возникновения мутаций в результате хранения микроорганизмов.

Основные способы хранения микроорганизмов

Существуют методы непродолжительного и долгосрочного хранения микроорганизмов. Выбор способа хранения обычно определяется особенностями микроорганизма, целями и задачами исследования, наличием специального оборудования.

Методы непродолжительного хранения относительно просты, не требуют дорогостоящего оборудования и незаменимы в повседневной работе с микроорганизмами. К ним относятся: субкультивирование [3–5], хранение под минеральным маслом [6–8], в воде и водно-солевых растворах [9, 10], замораживание и хранение при температуре ниже точки кристаллизации воды [11] и на сорбентах влаги [12].

Для долгосрочного хранения микроорганизмов используются следующие методы: консервация замораживанием при низких температурах [13–15], сублимационное высушивание [16, 17], консервация высушиванием из жидкого состояния [18]. Эффект консервации методами сублимационной сушки и замораживанием достигается тем, что клетки, лишаясь свободной воды в условиях криогенных температур, переходят в состояние анабиоза. Изменение скорости реакций в микробной клетке достигается путем понижения температуры и удалением воды, что ведет к снижению скорости всех химических реакций или их полному прекращению. Известно, что основным фактором, обеспечивающим протекание биохимических процессов в клетке, является вода. Она составляет от 75 до 85% от массы микробной клетки, служит дисперсионной средой для коллоидов, растворителем для кристаллоидов и сама является компонентом многообразных реакций. Потеря влаги ведет к замедлению жизнедеятельности микробной клетки [19].

Метод субкультивирования позволяет поддерживать микробные штаммы благодаря периодическим пересевам культур на свежие питательные среды [3]. Среда для культивирования, температура хранения и временной интервал, через который осуществляются пересевы, различаются в зависимости от вида перевиваемых культур и должны быть установлены заранее.

Высушивание биоматериалов из замороженного состояния (лиофилизация, сублимационное высушивание, замораживание-высушивание) – широко распространенный способ, при котором вода испаряется в условиях вакуума без оттаивания льда. При использовании данного способа многие физиологически разнородные виды бактерий и бактериофаги удается сохранять в жизнеспособном состоянии в течение длительного времени, если высушенные клетки защищены от воздействия кислорода, влаги и света [20]. Данный метод позволяет защитить культуры от загрязнения

во время хранения [21]. Однако во время сублимационной сушки клетки находятся в неблагоприятных условиях, таких как низкая температура и низкая активность воды, что снижает их жизнеспособность [22].

Консервация замораживанием при низких температурах, или криоконсервация, сегодня широко используется для длительного сохранения биологических функций самых разных клеток. Консервирование путем замораживания (например, до температуры жидкого азота) является одним из эффективных методов хранения микроорганизмов, поскольку обладает большой универсальностью, сокращает процедуру пробоподготовки, а также снижает рабочую нагрузку на персонал и риск заражения по сравнению с рутинным субкультивированием. Успех криоконсервации зависит от нескольких факторов: стадии роста и концентрации микроорганизмов, скорости замораживания и оттаивания, а также использования криопротекторов [16].

В литературе известно мнение, что стандартные протоколы консервации не подходит для определенных групп микроорганизмов [16, 23, 24]. Для бактерий, которые подвержены криоповреждению или гибнут после консервации, должны быть разработаны специальные протоколы хранения, чтобы обеспечивать оптимальные условия хранения.

В отношении долгосрочного хранения культур в коллекциях Всемирная федерация коллекций культур (The World Federation for Culture Collections/WFCC) разработала и опубликовала рекомендации по поддержанию культур [25]. Данная организация признает, что различные микроорганизмы часто требуют специальных методов консервации для обеспечения сохранения жизнеспособности культуры и ее чистоты. Согласно рекомендациям, чтобы свести к минимуму вероятность потери штаммов, каждый штамм следует сохранять, когда это практически возможно, с помощью хотя бы двух разных методов. По крайней мере один из них должен осуществляться путем сублимационной сушки (лиофилизации) или криоконсервации.

Накопление мутаций в результате хранения микроорганизмов

Благодаря использованию методов полногеномного секвенирования удалось обнаружить различия в геномах одних и тех же штаммов в различных коллекциях, что показано в работах ряда авторов. Так, в работе 2018 г. Y.W.Kwon et al. сравнили полный геном коллекционного штамма *Lactobacillus rhamnosus* GG KCTC 5033 из Корейской коллекции типовых культур (Korean Collection for Type Cultures/KCTC), полученного из Американской коллекции типовых культур (American Type Culture Collection/ATCC), с полным геномом исходного штамма *L. rhamnosus* GG ATCC 53103. При сравнении был выявлен 41 однонуклеотидный полиморфизм (single nucleotide polymorphism/SNP). Предполагается, что одиночные мутации произошли случайным образом в течение периода хранения в KCTC после субдепонирования из ATCC (таблица).

Полученные данные показывают, что большинство геномов бактериальных культур, хранящихся в биоресурсных центрах, коллекциях культур или лабораториях, могут быть изменены в результате случайного мутагенеза [26].

M.Desroches et al. сравнили геномы изолятов *Escherichia coli* из английской (NCTC86), французской (CIP61.11), аме-

Таблица. Преимущества и недостатки различных методов хранения микроорганизмов
 Table. *Advantages & disadvantages of different methods of microbial preservation*

Вид хранения микроорганизмов / <i>Methods of microbial preservation</i>	Преимущества метода / <i>Advantages of the method</i>	Недостатки метода / <i>Disadvantages of the method</i>	Ссылки <i>Ref.</i>
На сорбентах влаги (почва, уголь, бумага, песок, смолы и др.) / <i>Using moisture sorbents (soil, coal, paper, sand, resins, etc.)</i>	Простота исполнения, отсутствие необходимости в дополнительном оборудовании, экономическая эффективность и надежность с точки зрения жизнеспособности бактериальных культур, подходит для длительного хранения спорообразующих культур / <i>Simple to use, no need for extra equipment, economic efficiency and reliability in terms of viability of bacterial cultures, suitable for long-term storage of spore-forming cultures</i>	Длительная стерилизация некоторых твердых носителей, риск потери штаммов / <i>Prolonged sterilization of some solid carriers, risk of strain loss</i>	12
Под минеральным маслом / <i>Under mineral oil</i>	Простота исполнения, отсутствие необходимости в дополнительном оборудовании / <i>Simple to use, no need for extra equipment</i>	Возможность заражения переносимыми по воздуху спорами, замедленный рост при восстановлении, рост в неблагоприятных условиях, что может привести к селекции определенных клонов / <i>Risk of infection with airborne spores, delayed growth during recovery, possibility of clone selection</i>	6, 7, 8
В воде и водно-солевых растворах / <i>In water and salt aqueous solutions</i>	Простота исполнения, отсутствие необходимости в дополнительном оборудовании / <i>Simple to use, no need for extra equipment</i>	Ограниченное время хранения / <i>Limited time of preservation</i>	9, 10
Замораживание при температурах ниже точки кристаллизации воды / <i>Freezing at temperatures below the water crystallization point</i>	Простота исполнения, отсутствие необходимости в дополнительном оборудовании / <i>Simple to use, no need for extra equipment</i>	Не подходит для криочувствительных бактерий / <i>Not for cryo-susceptible bacteria</i>	11
Субкультивирование / <i>Subculturing</i>	Простота исполнения, отсутствие необходимости в дополнительном оборудовании / <i>Simple to use, no need for extra equipment</i>	Метод непродолжительного хранения, риск контаминации бактериальных культур, риск возникновения мутаций / <i>Short-term preservation method, risk of bacterial culture contamination, risk of mutagenesis</i>	3, 4, 5
Сублимационное высушивание / <i>Freeze-drying</i>	Защита культуры от загрязнения во время хранения, обеспечение простого способа транспортировки культур, подходит для многих видов культур / <i>Protecting cultures from contamination during storage, providing an easy way to transport cultures, suitable for many types of cultures</i>	Трудоемкость в исполнении, не подходит для чувствительных к высушиванию бактерий / <i>Laborious procedure, not suitable for dry-sensitive bacteria</i>	16, 17
Консервация замораживанием при низких температурах / <i>Low-temperature freezing preservation</i>	Большая универсальность, сокращение процедуры пробоподготовки, эффективное подавление активности микроорганизмов, снижение рабочей нагрузки на персонал и риска заражения, подходит для многих видов культур / <i>Great versatility, shortened sample preparation procedure, effective inhibition of microbial activity, reduced workload and risk of infection, suitable for many types of cultures</i>	Риск криоповреждения клеток, не подходит для криочувствительных бактерий / <i>Risk of cells cryodamage, not suitable for cryo-sensitive bacteria</i>	13, 14, 15
Консервация высушиванием из жидкого состояния / <i>Liquid drying</i>	Подходит для культур, чувствительных к замораживанию / <i>Suitable for freeze-susceptible cultures</i>	Требует специализированного оборудования / <i>Specialized equipment is needed</i>	18

риканской (ATCC 4157) и немецкой (DSM301) коллекций, а также сравнили полученные данные с геномами штаммов в базе данных NCBI *E. coli* MG1655 [27] и *E. coli* CIP2.83 [28]. В исследуемых геномах было обнаружено случайное распределение мутаций по всей хромосоме. Во всех четырех изолятах авторы выделяют ряд мутаций в генах системы репарации *E. coli*, такие как: делеции в гене *mutL*, трансверсии и сдвиг рамки считывания гена *mutT*. Также исследуемые штаммы демонстрировали высокую частоту мутаций в гене домашнего хозяйства *rpoB*, кодирующем β-субъединицу РНК-полимеразы [29]. Ряд мутаций был обнаружен в генах белков поринов (*ompF* и *acrB*, *acrE*, *acrS*), участвующих в

диффузии питательных веществ. Появление мутаций в этих генах во время консервации может играть важную роль при обмене общей устойчивости штамма к стрессу на улучшенный метаболизм, чтобы обеспечить выживание в условиях голода, вызванных хранением. Основными причинами накопления мутаций в коллекционных штаммах можно считать стрессовые условия при подготовке к длительному хранению и непрерывное лабораторное субкультивирование [30].

J.Klockgether et al. заметили некоторые генетические несоответствия у штаммов *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, хранящихся в разных лабораториях. Авторы взяли за основу существующую последовательность генома PAO1-UW и

сравнили с последовательностями геномов эталонных штаммов MPAO1 и PAO1-DSM, хранящихся в Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур, с помощью физического картирования и секвенирования на платформе Illumina. Штамм MPAO1 был источником мутантов с транспозонными вставками, а PAO1-DSM идентичен по своей рестрикционной карте SpeI-DpnI исходному изоляту. По сравнению со штаммом PAO1-UW у штаммов MPAO1 и PAO1-DSM были обнаружены следующие отличия в геноме: отсутствие большой инверсии, дупликация мобильной области профага размером 12 т.п.н., несущей отдельную интегразу и протеинфосфатазы или киназы, делеции от 3 до 1006 п.н. и не менее 39 SNP, затрагивающих последовательности белков. Сублинии PAO1 различались по своей способности справляться с ограничением питательных веществ и разной вирулентностью в модели острой инфекции дыхательных путей у мышей. Таким образом, лабораторные процедуры привели к появлению широкого спектра генотипов PAO1 за последние 50 лет. В настоящее время высокопроизводительное ресеквенирование становится надлежащим контролем качества геномов штаммов микроорганизмов [31].

Работы Y.W.Kwon et al., M.Desroches et al., J.Klockgether et al. наглядно показывают, что в коллекциях микроорганизмов может происходить изменение эталонных штаммов как вследствие хранения микроорганизмов, так и в результате субкультивирования.

Как известно, метод субкультивирования не используется для длительного хранения коллекций культур различных штаммов, поскольку не может предотвратить изменения их генотипа и фенотипа. Так, например, N.R.Ratib et al. изучили влияние периодического культивирования *E. coli* K-12 в течение 1200 дней на процесс накопления мутаций. В ходе эксперимента было выделено 1117 клонов из 24 временных точек и отсекуено с использованием технологий Illumina NextSeq и HiSeq. В 5 мл бульона LB вносили приблизительно 10^6 КОЕ *E. coli* K-12 и отбирали по 10 мкл пробы на 10, 20 и 30-й дни и каждые последующие 30 дней. Плотность популяции увеличилась более чем в 1000 раз – до $5 \cdot 10^9$ КОЕ/мл – после экспоненциального роста в 1-й день. После стационарной фазы и фазы гибели размер популяции оставался примерно $5 \cdot 10^7$ КОЕ/мл между 10-м и 60-м днями (рисунок, А). Количество мутаций на клон увеличивалось с течением времени, при этом клоны с 1200-го дня приобретали в среднем 18 мутаций (рисунок, В). Было идентифицировано 679 уникальных мутаций во всех клонах, в т.ч. 147 несинонимичных SNP, 376 новых вставок элементов инсерционной последовательности (Insertion sequence/IS), 14 больших делеций (от 100 п.н. до 64 т.п.н.) и 14 дупликаций (от 50 до 500 т.п.н.) (рисунок, С). Из 376 идентифицированных новых вставок IS-элементов 331 являются исключительно IS2-элементами, и большинство из них произошло между 270-м и 600-м днями (рисунок, С) [32]. Большинство мутировавших генов кодируют белки, участвующие в метаболизме, транспорте или регуляции транскрипции, позволяющие *E. coli* адаптироваться в условиях недостатка питания.

Известно, что при субкультивировании штаммы *Borrelia* могут сохраняться в течение недель, месяцев и даже лет, но это может привести к потере некоторых линейных, а также кольцевых плазмид [33]. Утрата некоторых плазмид может

изменить экспрессию ряда генов и способность бактерий заражать лабораторных животных [33]. Urška Glinšek Biškup et al. оценили корреляцию между продолжительностью культивирования и потерей плазмид в 34 штаммах *Borrelia* трех разных видов – *B. afzelii*, *B. garinii* и *B. burgdorferi sensu stricto*. В процессе длительного культивирования *in vitro*, состоящего из 50 пассажей, потеря плазмид была установлена у 46% штаммов *B. afzelii*, 40% штаммов *B. garinii* и 36% штаммов *B. burgdorferi* s.s. Потеря плазмид происходила между 5-м и 10-м пассажами, затрагивала только плазмиды в диапазоне 9-41 т.п.н., но не плазмиды в диапазоне 50–68 т.п.н. В результате штамм терял от одной до трех плазмид. Потенциальные выгоды и недостатки потери плазмид *Borrelia*, кроме утраты вирулентности, продолжают изучаться [34].

Генетическая стабильность музейных штаммов играет важную роль для использования их в изучении патогенеза, средств профилактики и лечения на биомоделях. Несмотря на введение международных стандартов, правил ведения коллекционных культур, например The Microbial Resource Research Infrastructure/MIRRI, Organization for Standardization/ISO [35], и периодический мониторинг геномов микроорганизмов, наблюдается накопление мутаций в коллекционных штаммах. Изучение причин возникновения мутаций и разработка новых стандартов и методов для хранения штаммов в коллекционных фондах остаются актуальными и на сегодняшний день.

Причины возникновения мутаций при хранении микроорганизмов

Разные методы хранения микроорганизмов предполагают различные стрессовые факторы, ведущие к появлению мутаций и увеличению их частоты. К одной из основных причин появления мутаций относятся ошибки во время репликации и рекомбинации. Эти процессы, как правило, приводят к неоднородности частоты мутаций на интервалах <1 kb [36]. S.Avrani et al. провели ряд эволюционных экспериментов, направленных на выяснение адаптации *E. coli* в условиях длительной стационарной фазы. Авторы наблюдали, что во всех независимо развивающихся популяциях *E. coli* более чем в 90% клеток происходят мутации в одном из трех участков основного фермента РНК-полимеразы. Мутации в генах РНК-полимеразы участвуют в адаптации к различным стрессам, включая высокие температуры, низкое содержание питательных веществ, воздействие ионизирующего излучения и истощение ресурсов [37].

Причинами появления мутаций могут быть различные стрессовые условия, приводящие к нарушению устойчивого метаболизма микроорганизмов. Например, клетки, растущие на бедной среде в присутствии источника углерода, который они не могут использовать, производят наиболее конкурентоспособных мутантов, способных его утилизировать [38]. У *Pseudomonas putida* появлялись единичные мутации, за счет которых происходит расширение диапазона ферментов для деградации органических соединений, таких как ксилон-моноксигеназа [38, 39] и катехол-диоксигеназа [38, 40].

Помимо влияния обедненных питательных сред на появление мутаций в геноме бактерий прямое воздействие также могут оказывать супероксидный, осмотический стресс

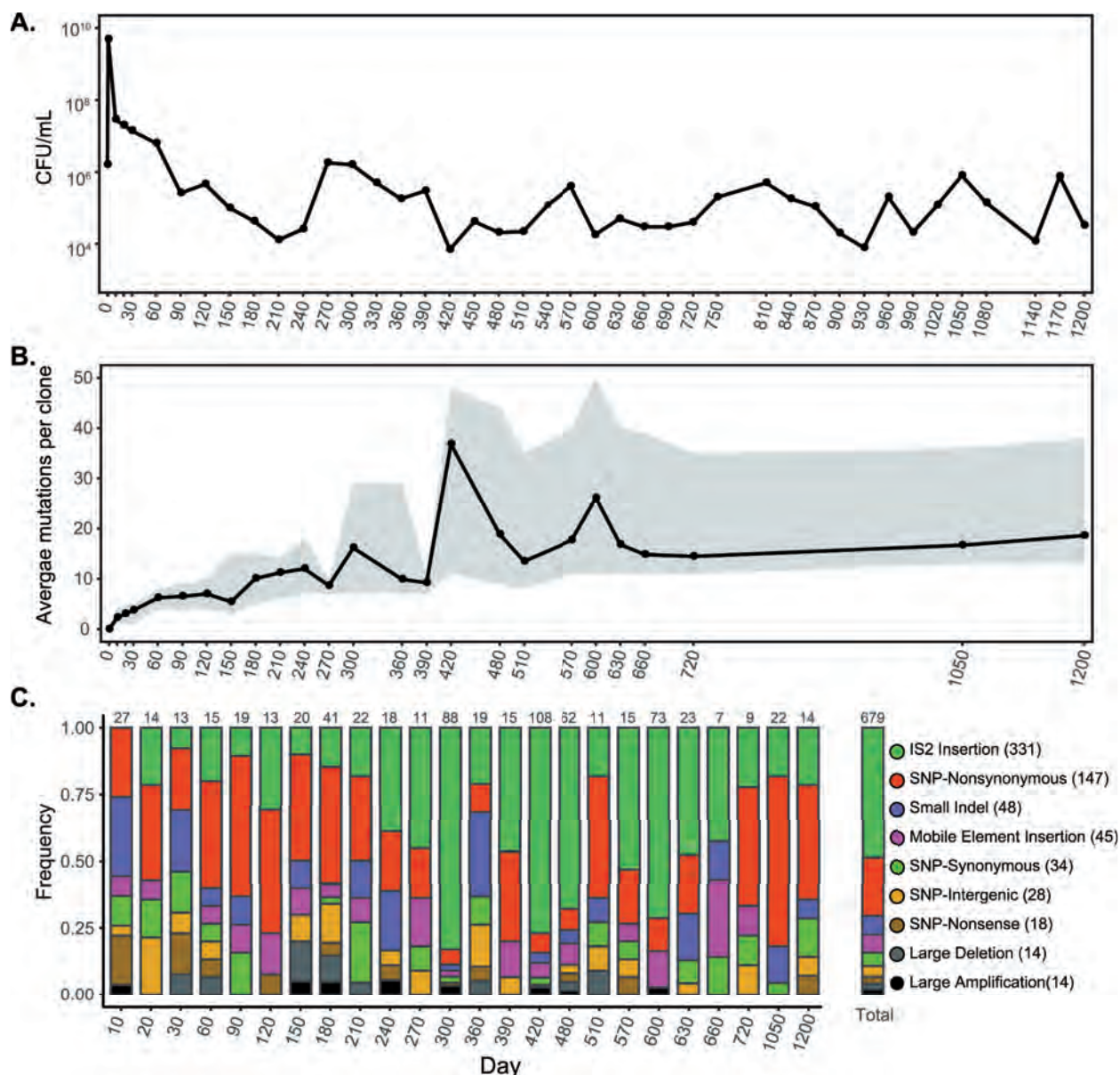


Рисунок. Плотность популяции, количество и частота мутаций, обнаруженных в *E. coli* в течение 1200 дней инкубации в периодической культуре. (А) Плотность популяции показана в виде КОЕ/мл на полулогарифмическом графике. (В) Среднее количество мутаций на клон для каждого момента времени, когда клоны были секвенированы, нанесено на график с диапазоном, показанным серым цветом. (С) Показаны частоты идентифицированных вставок IS2, несинонимичных мутаций, небольших вставок в диапазоне от 1 до 16 п.н., вставок мобильных элементов, синонимичных мутаций, межгенных SNP, нонсенс-мутаций, больших делеций в диапазоне от 100 п.н. до 64 т.п.н. и больших амплификации для 1117 клонов, секвенированных в 24 временных точках. Частота каждого типа мутации также показана для всех временных точек. Количество идентифицированных мутаций показано над каждой полосой.

Fig. Population density, number, and frequency of mutations detected in *E. coli* during 1,200 days of incubation in a long-term batch-culture evolution experiment. (A) The population density is shown as CFU/ml on a semi-log plot. (B) The average number of mutations per clone for each time point where clones were sequenced is graphed with the range shown in gray. (C) The frequencies of identified IS2 insertions, nonsynonymous mutations, small indels ranging from 1 to 16 bp, mobile element insertions, synonymous mutations, intergenic SNPs, nonsense mutations, large deletions ranging from 100 bp to 64 kbp, and large amplifications are shown for the 1,117 clones that were sequenced across 24 time points. The frequency of each mutation type is also shown for all time points. The number of mutations identified is shown above each bar [32].

и изменение температуры. Massey et al. отметили появление делеций в геномах и суперскрученности ДНК бактерий *Salmonella Typhimurium*, выращенных при концентрациях NaCl в промежутке от 0,17 до 0,67 М [41]. Активация суперспирализации ДНК в ответ на стресс сопровождается увеличением мутаций в несколько раз за счет образования вторичной структуры, содержащей неспаренные основания, уязвимые для мутаций. Селекция клонов, содержащих по-

лезные мутации, способствует их выживанию в условиях стресса.

Изменение внешних условий среды оказывает влияние не только на накопление мутаций, но в первую очередь на экспрессию ряда генов. Так, в *E. coli* в ответ на глюкозное голодание гены *relA* и *spotT* регулируют накопление гуанозинпентафосфата и гуанозинтетрафосфата, которые инициируют каскад генов чувствительных к изменению окружаю-

щей среды. Инициация генов в ответ на глюкозное голодание, в свою очередь, влияет на улучшение проницаемости внешней мембраны и транспорт глюкозы, а также генов, кодирующих ферменты с использованием альтернативных источников углерода, таких как лактоза, мальтоза, галактоза и рибоза [38].

Вероятно, наиболее эффективным процессом преодоления стресса и ускорения эволюции является иницирование специфических механизмов обратной связи. Таким образом, стрессовые условия вызывают мутации в определенных генах, позволяющих выживать бактериальным популяциям в неблагоприятных условиях [38].

В отношении методов криоконсервации и лиофилизации в качестве стресс-факторов стоит отметить такие условия, как жесткое воздействие замораживания и сушки, которые могут привести к необратимой денатурации мембранных белков и других клеточных компонентов микроорганизма [42, 43]. Таким образом, к основным факторам стресса и изменения генетических свойств микроорганизмов в процессе лиофилизации и криоконсервации относятся окислительный стресс, стресс замораживания-оттаивания, иссушающее действие вакуума и изменение pH среды.

Окислительный стресс

Активные формы кислорода (АФК) приводят к повреждению ДНК, мембраны, белков и считаются очень важным стрессовым фактором для бактерий [44]. В лабораторных условиях штаммы микроорганизмов подвержены окислительному стрессу при культивировании на питательных средах в результате активного аэробного роста. Применение ультрафиолетового облучения в качестве стерилизации питательных сред приводит также к образованию пероксида водорода [45–47]. Нарушения работы систем окислительной репарации ДНК (oxidative repair GO) или восстановления несоответствия ДНК (DNA mismatch repair/MMR) у бактерий делает их клетки более чувствительными к окислительному стрессу, ультрафиолетовому излучению и температуре [48].

E. coli адаптируется к действию пероксида водорода путем индукции ферментов каталазы, пероксидазы, глутаредоксина 1 и тиоредоксина, поглощающих радикалы и находящиеся под контролем фактора транскрипции OxyR [49]. Клетки *E. coli* с делецией гена *oxyR* были гиперчувствительны к добавлению в среду пероксида водорода и прекращали рост. У клеток *E. coli* без делеции гена *oxyR* добавление пероксида водорода вызывало всплеск мутаций, но не приводило к прекращению роста. V.Lagage et al. обнаружили, что в клетках *E. coli* дикого типа происходит некоторая задержка работы системы MMR, вследствие чего клетки становятся уязвимыми к мутагенным и токсическим эффектам гидроксильных радикалов, образующихся в результате реакции Фентона. Система MMR активно удаляет окислительные повреждения ДНК, но часть этих повреждений не поддается репарации и фиксируется в виде мутаций. Повторное добавление пероксида водорода приводит к отбору мутантов с конститутивно активным ответом OxyR [50], не приводя к появлению дополнительных мутаций, вызванных задержкой MMR [51]. Быстрое появление мутаций под действием АФК может способствовать приобретению лекарственной устойчивости и ускорять адаптацию микроорганизмов в организме хозяина [52].

C.Torres-Barcelo et al. индуцировали окислительный стресс действием пероксида водорода у штаммов дикого типа *P. aeruginosa* и штаммов, несущих делеции в системе репарации ДНК (*mutS*, *mutY*, *mutM*). Было выявлено, что штаммы с делециями более устойчивы к действию пероксида водорода, чем штамм дикого типа. Это объясняется секрецией внеклеточного фермента каталазы, разлагающей перекись водорода. У штамма с делецией в гене *mutS* секреция каталазы выше на 60% по сравнению со штаммом дикого типа [53]. Однако частота возникновения мутаций при окислительном стрессе выше у дикого типа *P. aeruginosa*, чем у штаммов с делециями [48].

Стресс замораживания-оттаивания

Замораживание и оттаивание вызывают несколько взаимосвязанных неблагоприятных факторов, влияющих на бактериальные клетки, включая обезвоживание, гиперосмотический стресс, образование кристаллов льда, окислительный стресс и холодовой шок.

Образование кристаллов льда сначала происходит во внеклеточном пространстве. По мере уменьшения температуры кристаллы льда растут, клетки сжимаются, мембраны и клеточные компоненты повреждаются. При дальнейшем охлаждении кристаллы льда могут образовываться внутри клетки, что ведет к разрушению клеточных мембран и гибели клеток [54, 55].

Образование кристаллов льда зависит от скорости охлаждения. Для уменьшения негативных эффектов заморозки используют защитные растворы, например, раствор глицерина, диметилсульфоксид, сахарозу, лактозу и другие [56].

Изменение осмотического давления. Осмотический шок возникает при внезапном изменении концентрации растворенных веществ вокруг клетки. Так как цитоплазматическая мембрана бактериальной клетки является проницаемой для воды, удаление воды за счет образования кристаллов льда создает гиперосмотическую внеклеточную среду, которая, в свою очередь, вытягивает воду из клеток преимущественно в диапазоне температур примерно до -20°C. Изменение осмотической концентрации окружающей среды может быстро привести к нарушению основных функций клетки, уменьшению ее объема, сморщиванию плазматической мембраны и увеличению ее проницаемости [57–59].

В результате оттока воды объем клетки уменьшается в течение нескольких секунд. Этот пассивный осмотический ответ клеток включает дегидратацию клеточных компонентов и сморщивание плазматической мембраны. Повышенная проницаемость плазматической мембраны во время обезвоживания или регидратации является основной причины гибели клеток. Фактически изменение осмотического давления вызывает утечку растворимых компонентов клетки в окружающую среду [60].

Для предотвращения действия осмотического стресса на клетки используют осмопротекторы – низкомолекулярные, гидрофильные, нетоксичные молекулы. Эти вещества аналогичны соединениям, используемым в качестве криопротекторов для сохранения прокариотических клеток при замораживании [61, 62].

В исследовании Y.W.Kwon et al. было проанализировано влияние стресса замораживания-оттаивания на выживаемость штамма *L. rhamnosus* GG и на сохранение его генома. В результате 150 циклов замораживания-оттаивания были обнаружены мутации в шести генах и в межгенном пространстве. Обнаруженные мутации присутствовали в генах, кодирующих D-аланил-D-аланилкарбоксипептидазу (*dacA*) и N-ацетилмураминовую кислоту-6-фосфатэстеразу (*murQ*), которые участвуют в синтезе пептидогликана – основного компонента клеточной стенки грамположительных бактерий. Авторы отмечают, что мутации в генах *dacA* и *murQ* могут вызывать изменения ферментативной активности и влиять на сшивку между пептидными цепями и изменение синтеза пептидогликана, что приводит к снижению жесткости клеточной стенки. Также мутации были обнаружены в гене *cls*, кодирующем кардиолипин-синтазу, участвующую в синтезе билипидного слоя, и генах, кодирующих белки Wze или CpsD, которые участвуют в биосинтезе экзополисахарида или капсульных полисахаридов у бактерий. В совокупности мутации у штаммов после обработки 150 циклов замораживания-оттаивания в основном происходили в генах, связанных с биосинтезом клеточной мембраны, клеточной стенки и полисахаридов капсулы. Жесткая и высокоструктурированная клеточная оболочка необходима для поддержания клеточных структур и защиты клеток от стресса окружающей среды. Однако мутации могут привести к образованию более гибкой клеточной стенки, которая может быть полезной для переживания стресса замораживания-оттаивания [26].

Холодовой шок. На выживаемость клеток к холодовому шоку влияет состав среды, в которой находятся клетки, концентрация клеток, температура, скорость охлаждения. Холодовой стресс приводит к индукции набора белков, называемых белками холодового шока (cold shock proteins/CSP) [63]. Все CSP принадлежат к одному семейству близкородственных низкомолекулярных белков. Они могут связываться с одноцепочечными нуклеиновыми кислотами и расщеплять вторичные структуры, образующиеся при низких температурах. Таким образом, считается, что CSP помогают осуществлению правильного процесса транскрипции и трансляции при холодовом стрессе [64].

Воздействие вакуума

Широко используемым из существующих методов сушки микроорганизмов для хранения является лиофилизация. При этом сушка происходит путем удаления влаги из замороженного раствора или суспензии в вакуумных условиях [65].

Обезвоживание вызывает серьезные повреждения клеточных компонентов: липидные мембраны могут изменяться с плоских бислоев на цилиндрические бислои, а углеводы, белки и нуклеиновые кислоты – подвергаться аминокарбонильным реакциям, которые приводят к поперечным сшивкам и к полимеризации биомолекул. Структурные преобразования вызывают функциональные изменения, которые могут включать ингибирование или изменение активности ферментов, изменение проницаемости мембран и изменение структуры ДНК. Это, в свою очередь, приводит к гибели клеток. Известно, что увеличение потери воды из-за воздействия вакуума приводит к частичной денатурации ДНК [66, 67].

Оценить воздействие вакуума на генетический материал микроорганизмов при лиофилизации в отдельности от других стрессовых факторов достаточно сложно. R.Moeller et al. исследовали природу повреждения ДНК в бактериальных спорах, вызванного иссушающим действием вакуума, а также специфическую систему репарации ДНК для устранения этих повреждений. Авторы предполагают, что наиболее критические повреждения в результате действия вакуума – это двухцепочечные разрывы ДНК (double-strand breaks/DSB) как у вегетативных, так и у споровых клеток. В качестве пути репарации этих повреждений рассматривается негомологичное соединение концов (non-homologous end joining/NHEJ). Чтобы исследовать способность к репарации ДНК по пути NHEJ во время прорастания спор, использовали споры *Bacillus subtilis* 168 дикого типа и мутантов с дефицитом системы репарации с мутациями в гене рекомбинации *recA*, гене SP-лиазы *spIB*, лигазоподобном гене NHEJ *ykoU* и NHEJ Ku-подобном гене *ykoV* и двойной мутант *ykoU/ykoV*. Для изучения эффекта экстремального высушивания, вызванного вакуумом, образцы подвергались воздействию сверхвысокого вакуума (10^{-7} Па) в течение 30 дней, по итогу этого воздействия авторы анализировали выживаемость образцов. После 30 дней экстремального высушивания, вызванного вакуумом, споры дикого типа и споры с мутацией в гене SP-лиазы *spIB* показали высокие уровни выживаемости (33,4 и 19,8% соответственно). В отличие от них споры, несущие мутации *recA*, *ykoU* или *ykoV*, были в 77 раз более чувствительны к действию высокого вакуума, а *ykoU/ykoV* – в 16 000 раз. Чрезвычайная чувствительность спор с дефицитом *ykoU/ykoV* к высушиванию полностью согласуется с наблюдением, что воздействие высокого вакуума индуцирует образование одноцепочечных и двухцепочечных разрывов в ДНК [68].

Изменение pH

Для каждой культуры клеток есть свой оптимальный диапазон pH, в котором они растут. Например, *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* E-012010 хорошо переносят сильно кислую среду (pH 3,0) [69]. Ряд молочнокислых бактерий лучше растут при слабокислых значениях pH: *Streptococcus thermophilus* (pH 6,5), *Lactobacillus bulgaricus* (pH от 5,8 до 6) или *Lactococcus lactis* subsp. (pH от 6,3 до 6,9) [70].

Изменение pH среды оказывает влияние как на энергетические процессы [68], так и на регуляцию генов, участвующих в катаболизме и транспорт метаболитов [71]. Так, например, S.Even et al. показали, что изменение pH *L. lactis* приводит к ингибированию транспорта питательных веществ и ферментативных реакций, а также к снижению транскрипции [72].

В процессе замораживания буферных растворов на основе фосфата натрия могут происходить сдвиги pH на 3 единицы из-за кристаллизации динатриевой соли этилендиаминтетрауксусной кислоты [73]. Низкие значения pH приводят к повреждению клеточной стенки, клеточной мембраны, тем самым влияя на Δ pH и мембранный потенциал. Изменение pH в кислую сторону цитозоля бактериальной клетки вызывает генетические повреждения и приводит к денатурации белков. Нарушается общий обмен веществ, приводящий к истощению энергии и гибели клеток [74].

Микроорганизмы могут адаптироваться к изменению pH среды. Например, у кислотоустойчивого штамма *E. coli* O157:H7 ATCC 43889 при выращивании в кислых условиях может происходить изменение экспрессии генов, связанных с регуляцией стресса. Происходит активация экспрессии генов *kdpA*, который кодирует калий-связывающую субъединицу калий-транспортирующей АТФазы, *bhsA*, который индуцирует образование биопленки у *E. coli*, и уменьшение экспрессии генов мальтозы *lamB*, *malK* и *malE* [75]. В исследовании V.Zorraquino также оценивалось образование мутаций при адаптации культур к низким значениям pH. У *E. coli*, выращенных при pH 5,5, были обнаружены мутации в следующих генах – *evgS* (сенсорная киназа), *rpoD* (σ 70 фактор РНК-полимеразы), *lon* (ДНК-связывающая протеаза) [76]. Wemekamp-Kamphuis et al. отметили, что замораживание *Listeria monocytogenes* в среде с низким pH вызвало экспрессию σ В-зависимых генов, обеспечивающих неспецифическую устойчивость к влиянию множественных стрессовых факторов. При этом выживаемость мутантных клеток *L. monocytogenes* с хромосомной делецией σ В в экспоненциальной фазе при pH 2,5 была в 10 000 раз ниже, чем выживаемость клеток дикого типа [77].

C.Strauss et al. провели эксперименты по накоплению мутаций у *Vibrio shilonii* AK1 при культивировании при различных значениях pH (7,76; 7,29 и 6,67). В исследовании была показана сильная положительная корреляция между значением pH и частотой мутаций, при этом скорость мутаций при pH 7,76 повышалась в 3 раза по сравнению с наблюдаемой при pH 6,67. Таким образом, более низкий pH изменял спектр мутаций *V. shilonii* в сторону образования большего количества нуклеотидов G/C [78]. Это также хорошо согласуется с результатами других исследований [79].

Заключение

Сохранение фенотипических характеристик и поддержание генетической стабильности бактериальных штаммов является одной из ключевых задач коллекционных фондов. Для этого используются различные способы хранения микроорганизмов, как непродолжительные, так и долгосрочные. При этом процесс хранения нередко связан с действием на клетку комплекса повреждающих физико-химических факторов, таких как низкие температуры, осмотический стресс, обезвоживание, изменение pH растворов. Это становится причиной повреждения клеточных компонентов: мембран, белков и нуклеиновых кислот. При длительном хранении микроорганизмов происходит накопление мутаций в их геномах, что, в свою очередь, оказывает влияние на фенотипические характеристики штаммов. Полностью избежать воздействия стресс-факторов невозможно, однако мониторинг генетической стабильности позволяет минимизировать эти изменения и подобрать эффективные условия хранения культуры.

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

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

Литература / References

1. Sharma A, Shouche Y. Microbial Culture Collection (MCC) and International Depository Authority (IDA) at National Centre for Cell Science, Pune. Indian J Microbiol. 2014 Jun;54(2):129-33. DOI: 10.1007/s12088-014-0447-y
2. Pascoe B, Williams LK, Calland JK, Meric G, Hitchings MD, Dyer M, et al. Domestication of *Campylobacter jejuni* NCTC 11168. Microb Genom. 2019 Jul;5(7):e000279. DOI: 10.1099/mgen.0.000279
3. Kumar S, Kashyap PL, Singh R, Srivastava AK. Preservation and maintenance of microbial cultures. Analyzing Microbes. Springer Protocols Handbooks. 2013. DOI: 10.1007/978-3-642-34410-7_11
4. Winters RD, Winn WC Jr. A simple effective method for bacterial culture storage: a brief technical report. J Bacteriol Virol. 40. 2010;99-101.
5. Samir A, Wasfy MO. A simple technique for long-term preservation of leptospires. J Basic Microbiol. 2013 Mar;53(3):299-301. DOI: 10.1002/jobm.201100551
6. Утепешева АА. Подбор методов длительного хранения коллекционных штаммов микромицетов и дрожжей. Экобиотех. 2019;2(4):494-498. / Utepesheva AA. Selection of methods for long storage of collection strains of micromycetes and yeast. Ecobiotech. 2019;2(4):494-498. DOI: 10.31163/2618-964X-2019-2-4-494-498
7. Nakasone KK, Peterson SW, Jong SC. Preservation and distribution of fungal cultures. Biodiversity of Fungi: Inventory and Monitoring Methods (Bills G, Muller GM, Foster MS, eds). Elsevier, Amsterdam. 37-47.
8. Smith D, Ryan MJ, Day JG. The UKNCC Biological Resource: Properties, Maintenance and Management. UKNCC Secretariat: Egham, UK, 2001.
9. Liao CH, Shollenberger LM. Survivability and long-term preservation of bacteria in water and in phosphate-buffered saline. Lett Appl Microbiol. 2003;37(1):45-50. DOI: 10.1046/j.1472-765x.2003.01345.x
10. Hutchison JR, Brooks SM, Kennedy ZC, Pope TR, Deatherage Kaiser BL, et al. Polysaccharide-based liquid storage and transport media for non-refrigerated preservation of bacterial pathogens. PLoS One. 2019 Sep 6;14(9):e0221831. DOI: 10.1371/journal.pone.0221831
11. Kuzemenská P, Burian V, Nováková E. Preservation of a *N. meningitidis* strain by freezing. A model experiment. Zentralbl Bakteriol Orig A. 1976 Oct; 236(1):16-21.
12. Kulkarni GA, Chitte RR. Preservation of thermophilic bacterial spores using filter paper disc techniques. J Bioprocess Biotechniques. 2015;5:1-3. DOI: 10.4172/2155-9821.1000223
13. Smith D, Ryan J, Stackebrandt E. The ex-situ conservation of microorganisms: aiming at a certified quality management. Biotechnology (Doelle HW, DaSilva EJ, eds). Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS), Developed under the Auspices of UNESCO, EOLSS Publisher, Oxford, UK, 2008.
14. Smith D, Ryan M. Implementing best practices and validation of cryopreservation techniques for microorganisms. ScientificWorldJournal. 2012;2012:805659. DOI: 10.1100/2012/805659
15. Guo N, Wei Q, Xu Y. Optimization of cryopreservation of pathogenic microbial strains. Journal of Biosafety and Biosecurity. 2020;2:66-70. DOI: 10.1016/j.jobb.2020.11.003.
16. Morgan CA, Herman N, White PA, Vesey G. Preservation of microorganisms by drying; a review. J Microbiol Methods. 2006;66:183-193.
17. Rockinger U, Funk M, Winter G. Current approaches of preservation of cells during (freeze) drying. J Pharm Sci. 2021;110(8):2873-93. DOI:10.1016/j.xphs.2021.04.018

18. Malik KA. Liquid-drying of microorganisms using a simple apparatus. *World J Microbiol Biotechnol.* 1992; Jan;8(1):80-2. DOI: 10.1007/BF01200693
19. Охупкина ВЮ. Методы поддержания микробных культур. Часть 2. Лиофилизация. Теоретическая и прикладная экология. 2009;4:21-32. / Okhapkina VYu. Methods of microbe cultures maintenance. Part 2. Liophilisation. Theoretical and Applied Ecology. 2009;4:21-32. (In Russian).
20. 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(14):37-46. / Onishchenko GG, Kutyrav 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(14):37-46. (In Russian).
21. Bond, C. Freeze-drying of yeast cultures. *Methods Mol Biol.* 2007;368:99-107. DOI:10.1007/978-1-59745-362-2_6
22. Bolla PA, de Serradell ML, de Urraza PJ, de Antoni GL. Effect of freeze-drying on viability and *in vitro* probiotic properties of a mixture of lactic acid bacteria and yeasts isolated from kefir. *J Dairy Res.* 2011;78(1):15-22. DOI: 10.1017/S0022029910000610
23. Philip N, Garba B, Neela VK. Long-term preservation of *Leptospira* spp.: challenges and prospects. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2018 Jul;102(13):5427-5435. DOI: 10.1007/s00253-018-9047-9
24. Hoefman S, Van Hoorde K, Boon N, Vandamme P, De Vos P, Heylen K. Survival or revival: long-term preservation induces a reversible viable but non-culturable state in methane-oxidizing bacteria. *PLoS One.* 2012;7(4):e34196. DOI: 10.1371/journal.pone.0034196
25. The WFCC Guidelines for the Establishment and Operation of Culture Collections (Online), 2010. Available at: <http://www.wfcc.info/guidelines/>
26. Kwon YW, Bae JH, Kim SA, Han NS. Development of Freeze-Thaw Tolerant *Lactobacillus rhamnosus* GG by Adaptive Laboratory Evolution. *Front Microbiol.* 2018 Nov 20;9:2781. DOI: 10.3389/fmicb.2018.02781
27. Blattner FR, Plunkett G 3rd, Bloch CA, Perna NT, Burland V, Riley M, et al. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science.* 1997 Sep 5;277(5331):1453-62. DOI: 10.1126/science.277.5331.1453
28. Archer CT, Kim JF, Jeong H, Park JH, Vickers CE, Lee SY, et al. The genome sequence of *E. coli* W (ATCC 9637): comparative genome analysis and an improved genome-scale reconstruction of *E. coli*. *BMC Genomics.* 2011 Jan 6;12:9. DOI: 10.1186/1471-2164-12-9
29. Jin DJ, Gross CA. Mapping and sequencing of mutations in the *Escherichia coli rpoB* gene that lead to rifampicin resistance. *J Mol Biol.* 1988;202:45-58. DOI: 10.1016/0022-2836(88)90517-7
30. Desroches M, Royer G, Roche D, Mercier-Darty M, Vallenet D, Médigue C, et al. The Odyssey of the Ancestral *Escherichia coli* Strain through Culture Collections: an Example of Allopatric Diversification. *mSphere.* 2018 Jan 31;3(1):e00553-17. DOI: 10.1128/mSphere.00553-17
31. Klockgether J, Munder A, Neugebauer J, Davenport CF, Stanke F, Larbig KD, et al. Genome diversity of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 laboratory strains. *J Bacteriol.* 2010 Feb;192(4):1113-21. DOI: 10.1128/JB.01515-09
32. Ratib NR, Seidl F, Ehrenreich IM, Finkel SE. Evolution in Long-Term Stationary-Phase Batch Culture: Emergence of Divergent *Escherichia coli* Lineages over 1,200 Days. *mBio.* 2021 Jan 26;12(1):e03337-20. DOI: 10.1128/mBio.03337-20
33. Labandeira-Rey M, Skare JT. Decreased infectivity in *Borrelia burgdorferi* strain B31 is associated with loss of linear plasmid 25 or 28-1. *Infect Immun.* 2001 Jan;69(1):446-55. DOI: 10.1128/IAI.69.1.446-455.2001
34. Biškup UG, Strle F, Ružić-Sabljic E. Loss of plasmids of *Borrelia burgdorferi sensu lato* during prolonged *in vitro* cultivation. *Plasmid.* 2011 Oct;66(1):1-6. DOI: 10.1016/j.plasmid.2011.02.006
35. Boundy-Mills K, Hess M, Bennett AR, Ryan M, Kang S, Nobles D, et al. The United States Culture Collection Network (USCCN): Enhancing Microbial Genomics Research through Living Microbe Culture Collections. *Appl Environ Microbiol.* 2015 Sep 1;81(17):5671-4. DOI: 10.1128/AEM.01176-15
36. Dillon MM, Sung W, Lynch M, Cooper VS. Periodic Variation of Mutation Rates in Bacterial Genomes Associated with Replication Timing. *mBio.* 2018 Aug 21;9(4):e01371-18. DOI: 10.1128/mBio.01371-18
37. Avrani S, Katz S, Hershberg R. Adaptations Accumulated under Prolonged Resource Exhaustion Are Highly Transient. *mSphere.* 2020 Aug 12;5(4):e00388-20. DOI: 10.1128/mSphere.00388-20
38. Wright BE. Stress-directed adaptive mutations and evolution. *Mol Microbiol.* 2004;52(3):643-650. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2004.04012.x
39. Abril MA, Michan C, Timmis KN, Ramos JL. Regulator and enzyme specificities of the TOL plasmid-encoded upper pathway for degradation of aromatic hydrocarbons and expansion of the substrate range of the pathway. *J Bacteriol.* 1989 Dec;171(12):6782-90. DOI: 10.1128/jb.171.12.6782-6790.1989
40. Ramos JL, Wasserfallen A, Rose K, Timmis KN. Redesigning metabolic routes: manipulation of TOL plasmid pathway for catabolism of alkylbenzoates. *Science.* 1987 Jan 30;235(4788):593-6. DOI: 10.1126/science.3468623
41. Massey RC, Rainey PB, Sheehan BJ, Keane OM, Dorman CJ. Environmentally constrained mutation and adaptive evolution in *Salmonella*. *Curr Biol.* 1999 Dec 16-30;9(24):1477-80. DOI: 10.1016/s0960-9822(00)80117-7
42. Cao-Hoang L, Dumont F, Marechal PA, Le-Thanh M, Gervais P. Rates of chilling to 0 degrees C: implications for the survival of microorganisms and relationship with membrane fluidity modifications. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2008 Jan;77(6):1379-87. DOI: 10.1007/s00253-007-1279-z
43. Cao-Hoang L, Dumont F, Marechal PA, Gervais P. Inactivation of *Escherichia coli* and *Lactobacillus plantarum* in relation to membrane permeabilization due to rapid chilling followed by cold storage. *Arch Microbiol.* 2010 Apr;192(4):299-305. DOI: 10.1007/s00203-010-0555-y
44. Kohanski MA, Dwyer DJ, Collins DJ. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nat Rev Microbiol.* 2010;8(6):423-435. DOI: 10.1038/nrmicro2333
45. Meunier SM, Sasges MR, Aucoin MG. Evaluating ultraviolet sensitivity of adventitious agents in biopharmaceutical manufacturing. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2017 Jun;44(6):893-909. DOI: 10.1007/s10295-017-1917-0
46. Rhee SG, Woo HA, Kil IS, Bae SH. Peroxiredoxin functions as a peroxidase and a regulator and sensor of local peroxides. *J Biol Chem.* 2012 Feb 10;287(7):4403-10. DOI: 10.1074/jbc.R111.283432
47. Dare EV, Gabriel M, Begum A, Sasges M, Aucoin MG. The effect of hydrogen peroxide produced during ultraviolet disinfection of CHO cell culture media. *Process Biochemistry.* 2017;61:147-155. DOI: 10.1016/j.procbio.2017.06.025
48. Torres-Barceló C, Cabot G, Oliver A, Buckling A, Maclean RC. A trade-off between oxidative stress resistance and DNA repair plays a role in the evolution of elevated mutation rates in bacteria. *Proc Biol Sci.* 2013 Feb 27;280(1757):20130007. DOI: 10.1098/rspb.2013.0007
49. Storz G, Tartaglia LA, Ames BN. Transcriptional regulator of oxidative stress-inducible genes: direct activation by oxidation. *Science.* 1990 Apr 13;248(4952):189-94. DOI: 10.1126/science.2183352
50. Anand A, Chen K, Catoiu E, Sastry AV, Olson CA, Sandberg TE, et al. OxyR Is a Convergent Target for Mutations Acquired during Adaptation to Oxidative Stress-Prone Metabolic States. *Mol Biol Evol.* 2020 Mar 1;37(3):660-667. DOI: 10.1093/molbev/msz251
51. Lagage V, Chen V, Uphoff S. Adaptation delay causes a burst of mutations in bacteria responding to oxidative stress. *EMBO Rep.* 2023 Jan 9;24(1):e55640. DOI: 10.15252/embr.202255640
52. Bell G. Evolutionary rescue. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics.* 2017;48:605-627. DOI: 10.1146/annurev-ecolsys-110316-023011
53. Shin DH, Choi YS, Cho YH. Unusual properties of catalase A (KatA) of *Pseudomonas aeruginosa* PA14 are associated with its biofilm peroxide resistance. *J Bacteriol.* 2008 Apr;190(8):2663-70. DOI: 10.1128/JB.01580-07

54. Inoue M, Nakatsuka S, Jinzaki M. Cryoablation of early-stage primary lung cancer. *Biomed Res Int.* 2014;2014:521691. DOI: 10.1155/2014/521691
55. Beal C, Fonseca F. Freezing of probiotic bacteria. *Advances in Probiotic Technology.* 2015;179-212.
56. Darwin M, Aschwin de Wolf Cde W, Gregory B, Fahy M, Michael Perry R. How cryoprotectants work. *Cryonics.* 2007;3:28.
57. Pátek M, Grulich M, Nešvera J. Stress response in *Rhodococcus* strains. *Biotechnol Adv.* 2021 Dec;53:107698. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2021.107698
58. Brauer AM, Shi H, Levin PA, Huang KC. Physiological and regulatory convergence between osmotic and nutrient stress responses in microbes. *Curr Opin Cell Biol.* 2023 Apr;81:102170. DOI: 10.1016/j.ceb.2023.102170
59. Wang M, Tian Y, Xu L, Zhang F, Lu H, Li M, et al. High osmotic stress increases ompK36 expression through the regulation of kbvR to decrease the antimicrobial resistance of *Klebsiella pneumoniae*. *Microbiol Spectr.* 2022 Jun 29;10(3):e0050722. DOI: 10.1128/spectrum.00507-22
60. Simonin H, Beney L, Gervais P. Sequence of occurring damages in yeast plasma membrane during dehydration and rehydration: mechanisms of cell death. *Biochim Biophys Acta.* 2007;1768(6):1600-1610. DOI: 10.1016/j.bbame.2007.03.017
61. Cleland D, Krader P, McCree C, Tang J, Emerson D. Glycine betaine as a cryoprotectant for prokaryotes. *J Microbiol Methods.* 2004. Jul;58(1):31-8. DOI: 10.1016/j.mimet.2004.02.015
62. Gaucher F, Rabah H, Kponouglo K, Bonnassie S, Pottier S, Dolivet A, et al. Intracellular osmoprotectant concentrations determine *Propionibacterium freudenreichii* survival during drying. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2020 Apr;104(7):3145-3156. DOI: 10.1007/s00253-020-10425-1
63. Wouters JA, Rombouts FM, Kuipers OP, de Vos WM, Abee T. The role of cold-shock proteins in low-temperature adaptation of food-related bacteria. *Syst Appl Microbiol.* 2000 Jun;23(2):165-73. DOI: 10.1016/S0723-2020(00)80001-6
64. Budkina KS, Zlobin NE, Kononova SV, Ovchinnikov LP, Babakov AV. Cold Shock Domain Proteins: Structure and Interaction with Nucleic Acids. *Biochemistry (Mosc).* 2020 Jan;85(Suppl 1):S1-S19. DOI: 10.1134/S0006297920140011
65. Wagman J, Weneck EJ. Preservation of bacteria by circulating-gas freeze drying. *Appl Microbiol.* 1963 May;11(3):244-8. DOI: 10.1128/am.11.3.244-248.1963
66. Tang M, Zhang P, Zxu D, Wang L, Wu L. SOS induction by vacuum, desiccation and low-energy ion beam mock-irradiation in bacteria. *Annals of Microbiology.* 2009;59(4):815-821. DOI: 10.1007/bf03179228
67. Horneck G, Klaus DM, Mancinelli RL. Space microbiology. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2010 Mar;74(1):121-56. DOI: 10.1128/MMBR.00016-09
68. Moeller R, Stackebrandt E, Reitz G, Berger T, Rettberg P, Doherty AJ, et al. Role of DNA repair by nonhomologous-end joining in *Bacillus subtilis* spore resistance to extreme dryness, mono- and polychromatic UV, and ionizing radiation. *J Bacteriol.* 2007 Apr;189(8):3306-11. DOI: 10.1128/JB.00018-07
69. Saarela M, Virkajärvi I, Alakomi HL, Mattila-Sandholm T, Vaari A, Suomalainen T, et al. Influence of fermentation time, cryoprotectant and neutralization of cell concentrate on freeze-drying survival, storage stability, and acid and bile exposure of *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* cells produced without milk-based ingredients. *J Appl Microbiol.* 2005;99(6):1330-9. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2005.02742.x
70. Rault A, Bouix M, Béal C. Fermentation pH influences the physiological-state dynamics of *Lactobacillus bulgaricus* CFL1 during pH-controlled culture. *Appl Environ Microbiol.* 2009 Jul;75(13):4374-81. DOI: 10.1128/AEM.02725-08
71. Sánchez-Clemente R, Guijo MI, Nogales J, Blasco R. Carbon Source Influence on Extracellular pH Changes along Bacterial Cell-Growth. *Genes (Basel).* 2020 Oct 30;11(11):1292. DOI: 10.3390/genes11111292
72. Even S, Lindley ND, Loubière P, Coccain-Bousquet M. Dynamic response of catabolic pathways to autoacidification in *Lactococcus lactis*: transcript profiling and stability in relation to metabolic and energetic constraints. *Mol Microbiol.* 2002 Aug;45(4):1143-52. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2002.03086.x
73. Pikal-Cleland KA, Cleland JL, Anchordoquy TJ, Carpenter JF. Effect of glycine on pH changes and protein stability during freeze-thawing in phosphate buffer systems. *J Pharm Sci.* 2002 Sep;91(9):1969-79. DOI: 10.1002/jps.10184
74. Papadimitriou K, Alegria Á, Bron PA, de Angelis M, Gobetti M, Kleerebezem M, et al. Stress Physiology of Lactic Acid Bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2016 Jul 27;80(3):837-90. DOI: 10.1128/MMBR.00076-15
75. Hwang D, Kim SM, Kim HJ. Transcriptome changes and polymyxin resistance of acid-adapted *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 43889. *Gut Pathog.* 2020 Dec 1;12(1):52. DOI: 10.1186/s13099-020-00390-5
76. Zorraquino V, Kim M, Rai N, Tagkopoulos I. The Genetic and Transcriptional Basis of Short and Long Term Adaptation across Multiple Stresses in *Escherichia coli*. *Mol Biol Evol.* 2017 Mar 1;34(3):707-717. DOI: 10.1093/molbev/msw269
77. Wemekamp-Kamphuis HH, Wouters JA, de Leeuw PP, Hain T, Chakraborty T, Abee T. Identification of sigma factor sigma B-controlled genes and their impact on acid stress, high hydrostatic pressure, and freeze survival in *Listeria monocytogenes* EGD-e. *Appl Environ Microbiol.* 2004 Jun;70(6):3457-66. DOI: 10.1128/AEM.70.6.3457-3466.2004
78. Strauss C, Long H, Patterson CE, Te R, Lynch M. Genome-Wide Mutation Rate Response to pH Change in the Coral Reef Pathogen *Vibrio shilonii* AK1. *mBio.* 2017 Aug 22;8(4):e01021-17. DOI: 10.1128/mBio.01021-17
79. Wang RY, Kuo KC, Gehrke CW, Huang LH, Ehrlich M. Heat- and alkali-induced deamination of 5-methylcytosine and cytosine residues in DNA. *Biochim Biophys Acta.* 1982 Jun 30;697(3):371-7. DOI: 10.1016/0167-4781(82)90101-4

Информация о соавторах:

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

Барькова Мария Рудольфовна, младший научный сотрудник отдела коллекционных культур ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Сухаричева Наталия Алексеевна, кандидат биологических наук, младший научный сотрудник отдела коллекционных культур ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Information about co-authors:

Aleksandra E. Solomentseva, Junior Researcher of Culture Collection Dep., State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Maria R. Barkova, Junior Researcher of Culture Collection Dep., State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Natalia A. Sukharicheva, PhD, Junior Researcher of Culture Collection Dep., State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор