

## Оптимизация условий сохранения труднокультивируемых экстремально чувствительных к кислороду облигатно-анаэробных бактерий кишечной микробиоты как кандидатов в пробиотические штаммы

Б. О. Бембеева\*<sup>1,2</sup>, Е. Л. Исаева<sup>1,3</sup>, В. В. Муравьева<sup>1</sup>, К. Н. Жигалова<sup>1</sup>,  
О. В. Нечаева<sup>1</sup>, Д. Х. Базухейр<sup>1</sup>, Т. В. Припутневич<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Минздрава России, Москва

<sup>2</sup> ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Минздрава России, Москва

<sup>3</sup> ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России, Москва

### Резюме

**Актуальность.** Облигатно-анаэробные труднокультивируемые бактерии, составляющие основную часть микробиоты толстого кишечника, являются потенциальными кандидатами в высокоэффективные пробиотики нового поколения, поскольку способны синтезировать разнообразные метаболиты, в том числе короткоцепочечные жирные кислоты, оказывающие стимулирующее действие как на комменсальные бактерии, так и на клетки макроорганизма. Однако для их длительного сохранения необходимо тщательно подбирать способ консервации и защитные компоненты. **Цель.** Оценить эффективность использования различных криопротекторов для повышения жизнеспособности труднокультивируемых облигатно-анаэробных бактерий при сохранении методами лиофилизации и криоконсервации. **Заключение.** Проведенные исследования показали, что лиофильное высушивание в наибольшей степени способствовало сохранению жизнеспособности *Faecalibacterium prausnitzii*, *Anaerostipes hadrus*, *Eubacterium hallii* при условии использования в качестве стабилизирующей среды, в состав которой входили инулин, цистеин и рибофлавин, обеспечивая сохранение исходного титра бактерий в течение 30 суток. Среди исследуемых бактерий эффективность криоконсервации была показана для *A. hadrus*, поскольку обеспечивала выживаемость бактерий на исходном уровне в течение 14 суток хранения вне зависимости от используемого криоконсерванта, однако к 30-м суткам их жизнеспособность значительно снижалась (в 100 раз при использовании в качестве криоконсерванта жидкой питательной среды, в 110 – с рубленным мясом и углеводами с добавлением глицерина, в 10 000 – с коммерческим криоконсервантом CRYOINSTANT). Полученные результаты позволяют рекомендовать лиофилизацию в качестве наиболее оптимального метода длительного хранения пробиотических штаммов бактерий при использовании высокоэффективных стабилизаторов.

**Ключевые слова:** труднокультивируемые бактерии, облигатные анаэробы, лиофилизация, криоконсервация, пробиотики  
Конфликт интересов не заявлен.

**Для цитирования:** Бембеева Б. О., Исаева Е. Л., Муравьева В. В. и др. Оптимизация условий сохранения труднокультивируемых экстремально чувствительных к кислороду облигатно-анаэробных бактерий кишечной микробиоты как кандидатов в пробиотические штаммы. *Эпидемиология и Вакцинопрофилактика*. 2024;23(6):54-60. <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2024-23-6-54-60>

### Optimising Conditions for the Preservation of Extremely Oxygen Sensitive Obligate Anaerobes of the Gut Microbiota as Candidates for Probiotic Strains

BO Bembeeva\*\*<sup>1,2</sup>, EL Isaeva<sup>1,3</sup>, VV Muravieva<sup>1</sup>, KN Zhigalova<sup>1</sup>, OV Nechaeva<sup>1</sup>, DKh Bazukheyir<sup>1</sup>, TV Priputnevich<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after Academician V.I. Kulakov of Ministry of Health of Russian Federation, Moscow, Russia

\* Для переписки: Бембеева Байр Очировна, научный сотрудник института микробиологии, антимикробной терапии и эпидемиологии, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Минздрава России, 117997, Москва, ул. Академика Опарина, д. 4. +7 (962) 728-21-35, b\_bembeeva@oparina4.ru. ©Бембеева Б. О. и др.

\*\* For correspondence: Bembeeva Bayr O., researcher at the Institute of Microbiology, Antimicrobial Therapy and Epidemiology National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after Academician V.I. Kulakov of Ministry of Healthcare of Russian Federation, 4, Oparin st., Moscow, 117997, Russia. +7 (962) 728-21-35, b\_bembeeva@oparina4.ru. ©Bembeeva BO, et al.

<sup>2</sup>Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education «N.I. Pirogov Russian National Research Medical University» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

<sup>3</sup>Federal State Budgetary Educational Institution of Further Professional Education "Russian Medical Academy of Continuous Professional Education" of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow, Russia

#### Abstract

Obligate anaerobic difficult culture bacteria, which make up the bulk of the microbiota of the large intestine, are potential candidates for the development of highly effective new generation probiotics, since they are capable of synthesizing a variety of metabolites, including short-chain fatty acids, which have a stimulating effect on both commensal bacteria and host cells. However, for their long-term preservation, it is necessary to carefully select the preservation method and protective components. To evaluate the efficacy of using different cryoprotectants to increase the viability of obligate anaerobic difficult culture bacteria when preserved by lyophilisation and cryopreservation methods. The studies showed that freeze-drying contributed most to the preservation of the viability of *Faecalibacterium prausnitzii*, *Anaerostipes hadrus*, *Eubacterium hallii*, provided that they were used as a stabilizing medium, which included inulin, cysteine and riboflavin, ensuring the preservation of the initial bacterial titer for 30 days. Among the studied bacteria, the effectiveness of cryopreservation was shown for *A. hadrus*, since it ensured the survival of bacteria at the initial level for 14 days of storage, regardless of the cryopreservative used, but by the 30th day their viability decreased significantly (by 100 times when using liquid as a cryopreservative). nutrient medium 110 with minced meat and carbohydrates with the addition of glycerin, 10 000 with the commercial cryopreservative CRYOINSTANT). The results obtained allow us to recommend lyophilization as the most optimal method for long-term storage of probiotic strains of bacteria using highly effective stabilizers.

**Keywords:** difficult culture bacteria, obligate anaerobes, lyophilisation, cryopreservation, probiotics  
No conflict of interest to declare.

For citation: Bembееva BO, Isaeva EL, Muravieva VV, et al. Optimising conditions for the preservation of extremely oxygen sensitive obligate anaerobes of the gut microbiota as candidates for probiotic strains. *Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2024;23(6):54-60 (In Russ.). <https://doi:10.31631/2073-3046-2024-23-6-54-60>

#### Введение

Кишечный микробиом играет важную роль в обеспечении здоровья организма и в норме устойчив к внешним или внутренним воздействиям. Однако инфекционные и неинфекционные заболевания, применение антибиотиков, химиотерапевтических препаратов, гормонотерапия и ряд других факторов приводят к развитию дисбиоза. В тех случаях, когда самостоятельное восстановление функций нормальной микрофлоры невозможно, проводят коррекцию дисбиоза. В зависимости от тяжести состояния могут применяться различные группы препаратов. Чаще всего используют пробиотики, в состав которых входят представители кишечной микрофлоры, подавляющие рост и размножение патогенных бактерий в кишечнике и модулирующие кишечно-микробные пути ферментации [1,2]. Пробиотики дают достаточно быстрый эффект, однако после прекращения их приема симптомы дисбиоза могут вернуться. Стимуляцию роста и метаболизма резидентной микрофлоры проводят с помощью пребиотиков, включающих субстраты, которые не расщепляются пищеварительными ферментами организма человека, однако ферментируются кишечными бактериями [1–5]. К ним относятся олигосахариды, фруктаны (инулин и фруктоолигосахариды) и галактаны (галактоолигосахариды). Кроме того, имеются комбинации вышеуказанных препаратов, получившие название синбиотики [1,3,6]

В настоящее время особая роль отводится облигатно-анаэробным бактериям, доля которых в кишечной микробиоте достигает 90%. Большинство из них продуцируют широкий спектр метаболитов,

в том числе короткоцепочечные жирные кислоты (КЦЖК), которые регулируют работу дистальных участков слизистой оболочки кишечника, иммунной, дыхательной и других систем органов, а также стимулируют метаболизм кишечной микрофлоры [1,3]. Основная из них – масляная кислота (бутират), которая является предпочтительным источником энергии для колоноцитов [1,7,8], она стимулирует их пролиферацию [1,9] и усиливает секрецию слизи [1,10]. Преимущественным продуцентом бутирата является *Faecalibacterium prausnitzii* (*F. prausnitzii*).

*F. prausnitzii* и другие продуценты бутирата рассматривают в качестве перспективных кандидатов при разработке пробиотиков нового поколения, которые позволят с большей эффективностью проводить восстановление микрофлоры кишечника после перенесенных инфекций, в том числе и после COVID-19. Как и другие пробиотические штаммы бактерий, они должны соответствовать ряду критериев, рекомендованных ВОЗ:

- выделены из природных субстратов;
- определена их видовая принадлежность по фено- и генотипическим признакам;
- имеют генетический паспорт;
- обладают широким спектром антагонистической активности в отношении патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, не обладая при этом ингибирующим действием на резидентную микрофлору;
- оказывают положительный эффект на организм человека, например, повышают колонизационную резистентность;
- сохраняют жизнеспособность и способны синтезировать продукты метаболизма в условиях

## Original Articles

кишечного микроокружения, являясь устойчивыми к низким значениям pH, органическим кислотам, к повышенному содержанию желчи, солей натрия и др.;

- способны к адгезии на эпителиальных клетках кишечника с последующей колонизацией;
- являются биологически безопасными (отсутствие секреции факторов вирулентности);
- характеризуются стабильностью по биологической активности, сохраняют жизнеспособность в течение длительного срока хранения [11,12].

Однако соответствие всем критериям при работе с труднокультивируемыми облигатно-анаэробными микроорганизмами требует особых условий, включая создание строгого анаэробнозона и селективных питательных сред, а также выполнения всех манипуляций и процедур по культивированию и сохранению этой группы микроорганизмов в условиях анаэробной станции.

Важной проблемой является необходимость длительного хранения этой категории микроорганизмов, которое требует оптимизации процесса подготовки культур, подбора стабилизирующих питательных субстратов и условий сохранения. Это необходимо для обеспечения их жизнеспособности и сохранности исходных биологических свойств. Для этих целей успешно применяются низкотемпературная консервация и лиофилизация, в результате чего снижается метаболическая активность микроорганизмов, и они переходят в состояние анабиоза. Для сохранения труднокультивируемых экстремально чувствительных к кислороду облигатно-анаэробных бактерий кишечной микробиоты необходимо подобрать оптимальные условия для проведения лиофилизации или криоконсервации, что прежде всего связано с выбором криопротектора, который препятствует внутри- и внеклеточному образованию льда [18,24–26] и образует стеклообразный матрикс [18,27].

**Цель исследования** – оценка эффективности использования различных стабилизирующих сред (криопротекторов) для повышения жизнеспособности труднокультивируемых облигатно-анаэробных бактерий при сохранении методами лиофилизации и криоконсервации.

### Материалы и методы

В качестве объектов исследования использовали культуры облигатных анаэробов – представителей кишечной микробиоты – *Faecalibacterium prausnitzii* (*F. prausnitzii*), *Anaerostipes hadrus* (*A. hadrus*), *Eubacterium hallii* (*E. hallii*), выделенные у взрослых здоровых добровольцев. Выбор данных микроорганизмов был связан с тем, что они являются труднокультивируемыми, крайне чувствительными к кислороду, и это усложняет возможность их выделения. Поскольку проведенные ранее исследования с применением метода культуромикрии позволили подобрать оптимальные параметры для их культивирования [28], было необходимо оптими-

зировать условия для их длительного сохранения, так как, являясь высокоэффективными продуцентами КЦЖК, данные виды комменсальных бактерий после более детального изучения их биологических свойств могут рассматриваться в качестве кандидатных штаммов пробиотических препаратов нового поколения. Кроме того, из всех выделенных труднокультивируемых облигатных анаэробов эти виды обладали высокой жизнеспособностью, по сравнению с большинством выделенных культур представителей микробиоты кишечника.

Анализ эффективности стабилизации исследуемых культур в процессе лиофилизации проводили для следующих вариантов криопротекторов:

№ 1 – криопротектор, состоящий из раствора фосфатно-солевого буфера, инулина, цистеина и рибофлавина [1].

№ 2 – криопротектор, включающий раствор фосфатно-солевого буфера, инулин, цистеин, рибофлавин, крахмал и пшеничные отруби [1].

Для оценки влияния процесса криоконсервации на выживаемость исследуемых бактерий применяли два варианта криоконсервантов:

№ 3 – коммерческий криоконсервант CRYOINSTANT (Deltalab S.L., Испания).

№ 4 – жидкая питательная среда 110 с рубленным мясом и углеводами с добавлением глицерина [29].

Подготовку культур исследуемых бактерий для лиофилизации проводили в условиях анаэробной станции (BACTRON, SHEL LAB, USA) в атмосфере трехкомпонентной газовой смеси ( $H_2$  – 10%,  $N_2$  – 80%,  $CO_2$  – 10%). Из чистых культур микроорганизмов с помощью денситометра готовили инокулюм в растворе фосфатно-солевого буфера с концентрацией не менее  $10^9$  КОЕ/мл (4 единицы по МакФарланд, что соответствует  $1,2 \times 10^9$  КОЕ/мл). Затем полученную суспензию центрифугировали при 6000 об./мин., супернатант удаляли и осадок ресуспендировали в среде для лиофилизации (№ 1 и № 2). Полученную субстанцию гомогенизировали стерильной лопаткой и по 1 мл разливали в стеклянные флаконы для лиофилизации объемом 2 мл. Флаконы с подготовленными образцами микроорганизмов закрывали пробкой в анаэробных условиях и помещали в низкотемпературный холодильник (-80 °C) на 6 часов, а затем быстро загружали на полку лиофильной сушилки. Лيوфилизацию проводили в лиофильной сушильной машине (Martin Christ Alpha 1-4 LSC Plus, Германия).

Процесс лиофилизации включал два этапа: I (основная сушка) – 5 часов при давлении 0,1 мбар, что соответствовало температуре – 42 °C; II (конечная сушка) – 2 часа при давлении 0,001 мбар, что соответствовало температуре – 76 °C. По окончании лиофилизации пробки флаконов плотно закрывали с помощью автоматического пресса и завальцовывали металлическими крышками. Лيوфилизат хранили при  $t = + 4$  °C.

Для криоконсервации бактериальный инокулюм в растворе фосфатно-солевого буфера с кон-

центрацией не менее  $10^9$  КОЕ/мл (4 единицы по МакФарланд) центрифугировали (ELMI CM-50, Россия) при 6000 g. Полученный осадок с помощью стерильной лопатки ресуспендировали в условиях анаэробной станции в среде для криоконсервации того же объема (№ 3 и № 4), переносили в криопробирку объемом 2 мл, гомогенизировали и замораживали в условиях низкотемпературного холодильника ( $-80$  °C).

Для оценки жизнеспособности (выживаемости) культур, подвергнутых лиофилизации и криоконсервации, культуры предварительно восстанавливали.

Лиофилизированные образцы восстанавливали следующим образом: флаконы извлекали из холодильника и выдерживали при комнатной температуре в течение 10 минут, затем в условиях анаэробной станции лиофилизат восстанавливали с помощью раствора фосфатно-солевого буфера в объеме 1 мл. Полученный инокулюм высевали на плотную питательную среду, селективную для этих микроорганизмов.

Криоконсервированные микроорганизмы извлекали из низкотемпературной камеры и восстанавливали посредством быстрого размораживания в течение 2–3 минут на водяной бане при 37 °C. Размороженные культуры высевали на плотную питательную среду, селективную для этих микроорганизмов.

Для определения количества жизнеспособных микроорганизмов из восстановленной бактериальной суспензии готовили десятикратные серийные разведения в условиях анаэробного бокса. В стерильные пробирки разливали по 4,5 мл раствора фосфатно-солевого буфера. В первую пробирку добавляли 0,5 мл исходной бактериальной суспензии, далее в соответствии с правилом смены пипеток переносили 0,5 мл из меньшего разведения в большее. Всего готовили 6 десятикратных разведений. Производили посев 0,1 мл инокулюма каждого разведения в чашки Петри с питательной средой и растирали стерильным шпателем от большего разведения к меньшему. Чашки с посевами инкубировали при температуре  $37 \pm 1$  °C в течение 48 ч, после чего проводили подсчет выросших колоний. Определение количества жизнеспособных клеток в образцах проводили в десятикратном повторе. Общее число жизнеспособных клеток считывали по формуле:

$$X = a \times 10^{n+1}, \text{ где}$$

X – число колониеобразующих единиц бактерий в 1 мл пробы;

a – число колоний в учитываемом разведении;

n – учитываемое разведение.

Оценку выживаемости исследуемых бактерий проводили в динамике на 1-е, 14-е и 30-е сутки хранения. Статистическую обработку полученных результатов проводили методом определения медианы и интерквартильного расстояния в программе Статистика 12.

### Результаты

Установлено, что использование криопротектора № 1 способствовало повышению выживаемости всех исследуемых культур облигатных анаэробов в процессе хранения (табл. 1). Его наибольшая эффективность показана для видов *E. hallii* и *A. hadrus*, количественные показатели выживаемости которых сохранялись на исходном уровне в течение 14 и 30 суток хранения. В присутствии криопротектора № 1 выживаемость *F. prausnitzii* на 14-е сутки хранения также была на исходном уровне, а на 30-е сутки количество жизнеспособных бактерий снижалось в 10 раз по сравнению с 1 и 14 сутками.

Криопротектор № 2 характеризовался меньшей стабилизирующей способностью, поскольку наблюдалось снижение жизнеспособности всех исследуемых бактерий в 10 раз на 14-е сутки хранения. Еще большее снижение выживаемости труднокультивируемых облигатно-анаэробных бактерий происходило на 30-е сутки хранения, при этом наиболее чувствительным оказался штамм *E. hallii*, показатели выживаемости которого были в пределах  $10^3$  КОЕ/мл.

При хранении исследуемых культур после их криоконсервации коммерческий криоконсервант № 3 проявил низкий защитный эффект (табл. 2). Так, уже через сутки хранения наблюдалось снижение численности жизнеспособных клеток *F. prausnitzii* в 10 раз, а на 14-е и 30-е сутки хранения рост бактерий отсутствовал. Хотя количество жизнеспособных клеток *E. hallii* через сутки после проведения криоконсервации оставалось на исходном уровне, на 14-е и 30-е сутки хранения жизнеспособных клеток обнаружено не было. Более эффективным криоконсервант № 3 был по отношению к *A. hadrus*: через 14 суток хранения количественные показатели не отличались от исходных, однако через 30 суток количество жизнеспособных клеток снизилось до  $10^4$  КОЕ/мл.

Используемая в качестве криоконсерванта жидкая питательная среда с рубленным мясом и углеводами с добавлением глицерина оказывала выраженное защитное действие в отношении *A. hadrus*, способствуя сохранению жизнеспособности бактерий на исходном уровне через 14 суток хранения, однако через 30 суток количество жизнеспособных клеток снижалось в 1000 раз ( $10^6$  КОЕ/мл). На 14-е сутки хранения количественные показатели *F. prausnitzii* соответствовали исходным значениям, однако на 30-е сутки жизнеспособные микроорганизмы не обнаруживались. Количество *E. hallii* снижалось в динамике и к 30-м суткам хранения составляло  $10^3$  КОЕ/мл.

### Обсуждение

Полученные результаты показали, что для сохранения труднокультивируемых крайне чувствительных к кислороду бактерий оптимальным является лиофильное высушивание. В качестве стабилизи-

**Таблица 1. Динамика выживаемости труднокультивируемых облигатно-анаэробных, крайне чувствительных к кислороду бактерий-продуцентов КЦЖК в процессе хранения лиофилизированных культур в течение одного месяца (КОЕ/мл) со средним отклонением**

**Table 1. Survival dynamics of difficult culture obligate-anaerobic, highly oxygen-sensitive, bacteria producing SCFA during storage of lyophilized cultures for one month (CFU/ml) with mean deviation**

Исследуемые культуры Cultures	1-е сутки 1st day		14-е сутки 14th day		30-е сутки 30th day	
	№ 1	№ 2	№ 1	№ 2	№ 1	№ 2
<i>F. prausnitzii</i>	4,35 [2,3;5,6] *10 <sup>8</sup>	2,25 [1,2;3,4] *10 <sup>8</sup>	2,55 [1,7;3,5] *10 <sup>8</sup>	2,6 [2,1;3,6] *10 <sup>7</sup>	3,9 [2,8;5,6] *10 <sup>7</sup>	3,1 [1,8;5,2] *10 <sup>4</sup>
<i>A. hadrus</i>	7,55 [6,2;8,3] *10 <sup>8</sup>	5,15 [4,5;6,5] *10 <sup>8</sup>	5,8 [5,1;7,4] *10 <sup>8</sup>	4,9 [1,3;5,8] *10 <sup>7</sup>	2,45 [1,8;3,1] *10 <sup>8</sup>	5,8 [4,8;7,1] *10 <sup>5</sup>
<i>E. hallii</i>	6,5 [5,6;7,7] *10 <sup>8</sup>	5,6 [3,8;6,5] *10 <sup>8</sup>	2,5 [1,6;3,4] *10 <sup>8</sup>	4,7 [3,4;6,3] *10 <sup>7</sup>	2,1 [1,2;2,3] *10 <sup>8</sup>	4,65 [2,5;5,7] *10 <sup>3</sup>

Примечание: «-» – отсутствие роста  
Note: «-» -- no growth

**Таблица 2. Динамика выживаемости труднокультивируемых облигатно-анаэробных, крайне чувствительных к кислороду бактерий-продуцентов КЦЖК в процессе криохранения в течение одного месяца (КОЕ/мл) со средним отклонением**

**Table 2. Survival dynamics of difficult culture obligate-anaerobic, highly oxygen-sensitive, bacteria producing SCFA during cryopreservation for one month (CFU/ml) with mean deviation**

	Исследуемые культуры Cultures	1-е сутки 1st day		14-е сутки 14th day		30-е сутки 30th day	
		№ 3	№ 4	№ 3	№ 4	№ 3	№ 4
1.	<i>F. prausnitzii</i>	1,8 [1,3;2,5] *10 <sup>7</sup>	3,2 [2,5;4,2] *10 <sup>8</sup>	-	1,25 [1,2;1,7] *10 <sup>8</sup>	-	-
2.	<i>A. hadrus</i>	5,1 [3,5;7,5] *10 <sup>8</sup>	5,65 [4,2;7,3] *10 <sup>8</sup>	2,05 [1,2;3,5] *10 <sup>8</sup>	3,6 [2,5;4,9] *10 <sup>8</sup>	4,35 [2,4;5,8] *10 <sup>4</sup>	4,9 [3,5;6,1] *10 <sup>6</sup>
3.	<i>E. hallii</i>	3,3 [2,5;4,2] *10 <sup>8</sup>	3,6 [2,5;4,3] *10 <sup>8</sup>	-	4,1 [3,6;4,9] *10 <sup>5</sup>	-	3,15 [2,4;8] *10 <sup>3</sup>

Примечание: «-» – отсутствие роста.  
Note: «-» – no growth.

рующей среды предпочтительнее использовать состав с инулином, цистеином и рибофлавином, поскольку такое сочетание компонентов обеспечивает бактериям максимальный защитный эффект при повреждающем воздействии низких температур и вакуума. Метод криоконсервации оказался наиболее пригоден для сохранения бактерий *A. hadrus*, при этом использование обоих вариантов исследуемых криоконсервантов позволяло сохранять жизнеспособность бактерий в течение 14 суток на исходном уровне, однако к 30-м суткам количественные показатели (КОЕ) резко снижались. Преимуществом использования лиофилизации для хранения культур микроорганизмов является доступность этого метода в условиях лаборатории и незначительные экономические расходы.

Известно, что во время криоконсервации микроорганизмы подвергаются низкотемпературным воздействиям, что приводит к разрушению клеточных мембран из-за повышенного осмотического давления, вызванного растворителями в остав-

шейся незамороженной фракции, и образованию внутри- и внеклеточных кристаллов льда [13–15]. Во время лиофилизации, помимо замораживания, микробные клетки подвержены воздействию вакуума, обеспечивающего процесс дегидратации клетки методом сублимации, что приводит к увеличению осмотического давления и еще большему повреждению мембран и поверхностных белков [13,16]. Следовательно, лиофильное высушивание оказывает большее стрессовое воздействие на чувствительные бактерии, чем процесс криоконсервации [17,18]. В процессе уменьшения количества воды в клетках возрастает концентрация ионов металлов, что увеличивает скорость протекания реакций свободнорадикального окисления и приводит к повышению концентрации активных форм кислорода, вызывая окислительный стресс.

Поэтому для уменьшения побочных действий вышеуказанных процессов необходимо применение криопротекторов, выбор которых зависит от метода сохранения и особенностей микрооргани-

ма. Достаточно часто для криоконсервации используют глицерин, который представляет собой низкомолекулярное соединение, легко проникающее внутрь клетки, защищая ее компоненты. Однако его не применяют для лиофилизации из-за вязкости, способствующей образованию липкого и недостаточно высушенного конечного продукта [18,19]. В качестве защитного средства при лиофилизации часто используется фруктан инулин. Он формирует внешние комплексы с антиоксидантами цистеином и рибофлавином, которые защищают микробные клетки от окислительного повреждения, а также усиливает связь между микробными клетками и субстратом для их прикрепления (кукурузный крахмал и пшеничные отруби) [1,20].

Помимо благоприятного воздействия на жизнеспособность микроорганизмов, важно, чтобы компоненты лиофилизированного продукта, составляющего часть пробиотического препарата, благотворно влияли на организм человека. Растительные ингредиенты, входящие в состав пробиотических препаратов, способны оказывать положительное влияние на макроорганизм. Так, например, пшеничные отруби содержат арабиноксилан, который уменьшает воспаление в кишечнике, а кукурузный крахмал увеличивает синтез КЦЖК [1,21]. Все вышеперечисленные компоненты способствуют увеличению количества бифидобактерий, снижающих

воспалительные реакции в кишечнике, и, соответственно, могут рассматриваться в качестве пребиотиков компонентов синбиотических препаратов нового поколения [1,22,23]. Для сохранения труднокультивируемых экстремально чувствительных к кислороду облигатно-анаэробных бактерий кишечной микробиоты необходимо подобрать оптимальные условия для проведения лиофилизации или криоконсервации, что прежде всего связано с выбором криопротектора, который препятствует внутри- и внеклеточному образованию льда [18,24–26] и образует стеклообразный матрикс [18,27].

### Заключение

Подбор оптимального способа консервации и защитных компонентов для длительного сохранения бактерий открывает перспективы разработки высокоэффективных пробиотиков нового поколения на основе труднокультивируемых облигатно-анаэробных бактерий кишечной микробиоты, продуцирующих разнообразные биологически активные вещества, в том числе и КЦЖК.

Работа выполнена в рамках государственного задания Минздрава России «Разработка комплексного подхода к диагностике и коррекции дисбиотических нарушений микробиоты кишечника, спровоцированных антибактериальной терапией, у новорожденных детей» (124020600025-2).

### Литература/References

- Khan M. T., Van Dijk J. M., Harmsen H. J. M. Antioxidants keep the potentially probiotic but highly oxygen-sensitive human gut bacterium *Faecalibacterium prausnitzii* alive at ambient air. *PLoS One*, vol. 9, no. 5, 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0096097.
- Goldin B. R. Health benefits of probiotics. *Nutr.* 1998 Oct;80(4):S203-7. PMID: 9924285.
- Vyas U. and Ranganathan N. Probiotics, prebiotics, and synbiotics: Gut and beyond. *Gastroenterology Research and Practice*. 2012. doi: 10.1155/2012/872716.
- Gibson G. R. and Roberfroid M. B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. *Journal of Nutrition*, vol. 125, no. 6, 1995. doi: 10.1093/jn/125.6.1401.
- Gibson G. R., Beatty E. R., Wang X., et al. Selective stimulation of bifidobacteria in the human colon by oligofructose and inulin. *Gastroenterology*, vol. 108, no. 4, 1995. doi: 10.1016/0016-5085(95)90192-2.
- Kolida S. and Gibson G. R. Synbiotics in health and disease. *Annu Rev Food Sci Technol*, vol. 2, 2011. doi: 10.1146/annurev-food-022510-133739.
- Mortensen P. B., Clausen M. R. Short-chain fatty acids in the human colon: Relation to gastrointestinal health and disease. *Scandinavian Journal of Gastroenterology, Supplement*, vol. 31, no. 216, 1996. doi: 10.3109/00365529609094568.
- Hague A., Singh B., Paraskeva C. Butyrate acts as a survival factor for colonic epithelial cells: Further fuel for the in vivo versus in vitro debate. *Gastroenterology*, vol. 112, no. 3, 1997, doi: 10.1053/gast.1997.v112.agast971036.
- Sakata T. Stimulatory effect of short-chain fatty acids on epithelial cell proliferation in the rat intestine: a possible explanation for trophic effects of fermentable fibre, gut microbes and luminal trophic factors. *British Journal of Nutrition*, vol. 58, no. 1, 1987, doi: 10.1079/bjn19870073.
- Shimotoyodome A., Meguro S., Hase T., et al. Decreased colonic mucus in rats with loperamide-induced constipation. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*, vol. 126, no. 2, 2000, doi: 10.1016/S1096-4933(00)00194-X.
- Martín R., Miquel S., Benevides L., et al., Functional characterization of novel *Faecalibacterium prausnitzii* strains isolated from healthy volunteers: A step forward in the use of *F. prausnitzii* as a next-generation probiotic. *Front Microbiol*, vol. 8, no. JUN, 2017, doi: 10.3389/fmicb.2017.01226.
- World Gastroenterology Organisation Global Guidelines Probiotics and prebiotics, 2017.
- Bircher L., Geirnaert A., Hammes F., et al. Effect of cryopreservation and lyophilization on viability and growth of strict anaerobic human gut microbes. *Microb Biotechnol*, vol. 11, no. 4, 2018, doi: 10.1111/1751-7915.13265.
- Malik K. A. Cryopreservation of bacteria with special reference to anaerobes. *World J Microbiol Biotechnol*, vol. 7, no. 6, 1991, doi: 10.1007/BF00452850.
- Meryman H. T. Cryopreservation of living cells: Principles and practice. *Transfusion*, vol. 47, no. 5, 2007. doi: 10.1111/j.1537-2995.2007.01212.x.
- Broeckx G., Vandenheuvel D., Claes I. J. J., et al. Drying techniques of probiotic bacteria as an important step towards the development of novel pharmabiotics. *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 505, no. 1–2, 2016. doi: 10.1016/j.ijpharm.2016.04.002.
- Heylen K., Hoefman S., Vekeman B., et al. Safeguarding bacterial resources promotes biotechnological innovation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 94, no. 3, 2012. doi: 10.1007/s00253-011-3797-y.
- Bellali S., Bou Khalil J., Fontanini A., et al. A new protectant medium preserving bacterial viability after freeze drying. *Microbiol Res*, vol. 236, 2020, doi: 10.1016/j.micres.2020.126454.
- de Valdez G. F., de Giori G. S., de Ruiz Holgado A. P., et al. Comparative study of the efficiency of some additives in protecting lactic acid bacteria against freeze-drying. *Cryobiology*, vol. 20, no. 5, 1983, doi: 10.1016/0011-2240(83)90044-5.
- Khan M. T., Duncan S. H., Stams A. J. M., et al. The gut anaerobe *Faecalibacterium prausnitzii* uses an extracellular electron shuttle to grow at oxic-anoxic interphases. *ISME Journal*, vol. 6, no. 8, 2012, doi: 10.1038/ismej.2012.5.
- Neyrinck A.M., Van Hée V.F., Piron N. et al. Wheat-derived arabinoxylan oligosaccharides with prebiotic effect increase satietogenic gut peptides and reduce metabolic endotoxemia in diet-induced obese mice. *Nutr Diabetes*, vol. 2, no. JANUARY, 2012, doi: 10.1038/nutd.2011.24.
- Neyrinck A.M., Possemiers S., Druart C., et al. Prebiotic effects of wheat Arabinoxylan related to the increase in bifidobacteria, roseburia and bacteroides/prevotella in diet-induced obese mice. *PLoS One*, vol. 6, no. 6, 2011, doi: 10.1371/journal.pone.0020944.
- Gänzle M. G. and Follador R. Metabolism of oligosaccharides and starch in lactobacilli: A review. *Frontiers in Microbiology*, vol. 3, no. SEP. 2012. doi: 10.3389/fmicb.2012.00340.
- Baumann D. Preservation of lactic cultures. 1964.
- Fowler A. and Toner M. Cryo-injury and biopreservation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 1066, 2006. doi: 10.1196/annals.1363.010.
- Leslie S. B., Israeli E., Lighthart B., et al. Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during. *Appl Environ Microbiol*, vol. 61, no. 10, 1995, doi: 10.1128/aem.61.10.3592-3597.1995.
- Crowe J. H., Carpenter J. F., Crowe L. M. The role of vitrification in anhydrobiosis. *Annual Review of Physiology*, vol. 60, 1998. doi: 10.1146/annurev.physiol.60.1.73.

28. Бембеева Б.О., Исаева Е.Л., Муравьева В.В. и др. Изучение кишечной микробиоты методом культуромики. *Бактериология*. 2024; 9(1): 58–62. DOI: 10.20953/2500-1027-2024-1-58-62/Bembeeva B.O., Isaeva E.L., Muravieva V.V., et al. Study of intestinal microbiota by culturomics. *Bacteriology*. 2024; 9(1): 58–62. (In Russ.). DOI: 10.20953/2500-1027-2024-1-58-62 29. [https://www.dsmz.de/microorganisms/medium/pdf/DSMZ\\_Medium110.pdf](https://www.dsmz.de/microorganisms/medium/pdf/DSMZ_Medium110.pdf)

### Об авторах

- **Байр Очировна Бембеева** – научный сотрудник института микробиологии, антимикробной терапии и эпидемиологии ФГБУ НМИЦ АГП им. В. И. Кулакова. Минздрава России, Москва, Россия. +7 (962) 728-21-35, b\_bembeeva@oparina4.ru. <https://orcid.org/0000-0002-8820-9903>.
- **Елена Леонидовна Исаева** – к. м. н., старший научный сотрудник института микробиологии, антимикробной терапии и эпидемиологии ФГБУ НМИЦ АГП им. В. И. Кулакова. Минздрава России, Москва, Россия. +7 (906) 152-82-79, isaeva73@bk.ru. <https://orcid.org/0000-0001-6224-8202>.
- **Вера Васильевна Муравьева** – к. б. н., старший научный сотрудник института микробиологии, антимикробной терапии и эпидемиологии ФГБУ НМИЦ АГП им. В. И. Кулакова. Минздрава России, Москва, Россия. +7 (906) 723-72-35, ammur14@mail.ru. <https://orcid.org/0000-0003-0383-0731>.
- **Ксения Николаевна Жигалова** – младший научный сотрудник института микробиологии, антимикробной терапии и эпидемиологии ФГБУ НМИЦ АГП им. В. И. Кулакова. Минздрава России, Москва, Россия. +7 (926) 059-21-19, ksenya.zhigalova.95@gmail.com. <https://orcid.org/0000-0001-6949-5759>.
- **Ольга Викторовна Нечаева** – д. б. н., старший научный сотрудник института микробиологии, антимикробной терапии и эпидемиологии ФГБУ НМИЦ АГП им. В. И. Кулакова. Минздрава России, Москва, Россия. +7 (927) 108-11-08, o\_nechaeva@oparina4.ru. <https://orcid.org/0000-0003-3331-1051>.
- **Даляль Халед Базухейр** – младший научный сотрудник института микробиологии, антимикробной терапии и эпидемиологии ФГБУ НМИЦ АГП им. В. И. Кулакова. Минздрава России, Москва, Россия. +7 (906) 265-25-51, d\_bazukheyr@oparina4.ru. <https://orcid.org/0009-0006-6059-6258>.
- **Татьяна Валерьевна Припутневич** – чл.-корр. РАН, д. м. н., директор института микробиологии, антимикробной терапии и эпидемиологии ФГБУ НМИЦ АГП им. В. И. Кулакова. Минздрава России, Москва, Россия. +7 (910) 414-56-16, priput1@gmail.com. <http://orcid.org/0000-0002-4126-9730>.

Поступила: 24.05.2024. Принята к печати: 11.09.2024.

Контент доступен под лицензией CC BY 4.0.

### About the Authors

- **Bayr O. Bembeeva** – researcher at the Institute of Microbiology, Antimicrobial Therapy and Epidemiology National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after Academician V.I. Kulakov of Ministry of Health of Russian Federation, Moscow, Russia. +7 (962) 728-21-35, b\_bembeeva@oparina4.ru. <https://orcid.org/0000-0002-8820-9903>.
- **Elena L. Isaeva** – Cand. Sci. (Med.), Senior researcher at the Institute of Microbiology, Antimicrobial Therapy and Epidemiology National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after Academician V.I. Kulakov of Ministry of Health of Russian Federation, Moscow, Russia. +7 (903) 152-82-79, isaeva73@bk.ru. <https://orcid.org/0000-0001-6224-8202>.
- **Vera V. Muravieva** – Cand. Sci. (Biol.), Senior researcher at the Institute of Microbiology, Antimicrobial Therapy and Epidemiology National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after Academician V.I. Kulakov of Ministry of Health of Russian Federation, Moscow, Russia. +7 (906) 723-72-35, ammur14@mail.ru. <https://orcid.org/0000-0003-0383-0731>.
- **Kseniya N. Zhigalova** – Researcher at the Institute of Microbiology, Antimicrobial Therapy and Epidemiology National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after Academician V.I. Kulakov of Ministry of Health of Russian Federation, Moscow, Russia. +7 (926) 059-21-19, ksenya.zhigalova.95@gmail.com. <https://orcid.org/0000-0001-6949-5759>.
- **Olga V. Nechaeva** – Dr. Sci. (Biol.), Senior researcher at the Institute of Microbiology, Antimicrobial Therapy and Epidemiology National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after Academician V.I. Kulakov of Ministry of Healthcare of Russian Federation, Moscow, Russia. +7 (927) 108-11-08, o\_nechaeva@oparina4.ru. <https://orcid.org/0000-0003-3331-1051>.
- **Dalyal Kh. Bazukheyr** – junior researcher at the Institute of Microbiology, Antimicrobial Therapy and Epidemiology National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after Academician V.I. Kulakov of Ministry of Health of Russian Federation, Moscow, Russia. +7 (906) 265-25-51, d\_bazukheyr@oparina4.ru. <https://orcid.org/0009-0006-6059-6258>.
- **Tatiana V. Priputnevich** – Corresponding Member of Russian Academy of Sciences, Dr. Sci. (Med.), Director of Microbiology, Antimicrobial therapy and Epidemiology Institute, National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after Academician V.I. Kulakov of Ministry of Health of Russian Federation, Moscow, Russia. +7 (910) 414-56-16, priput1@gmail.com. <http://orcid.org/0000-0002-4126-9730>.

Received: 24.05.2024. Accepted: 11.09.2024.

Creative Commons Attribution CC BY 4.0.