

## СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ВЫЖИВАЕМОСТИ КИШЕЧНЫХ БАКТЕРИЙ ЧЕЛОВЕКА ПОСЛЕ КРИОКОНСЕРВАЦИИ В ЖИДКОМ АЗОТЕ

**Л.В. Заломова, Е.Е. Фесенко**

ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пущино, Россия

Проблема длительной высокоэффективной криоконсервации сложных микробных сообществ, населяющих желудочно-кишечный тракт человека, на сегодняшний день в мире не решена. Методы криоконсервации микроорганизмов в основном разработаны для сохранения индивидуальных бактериальных культур. Проведены исследования по оценке выживаемости целевых видов бактерий микробиоты кишечника человека в процессе криоконсервации в жидком азоте с использованием перспективной криозащитной комбинации – ФСК (фетальная сыворотка коров) +5 % ДМСО (Табл. 1). ФСК, используемая только для сохранения эукариотических клеток, была впервые применена к бактериальным ассоциациям с высокой (>80 %) выживаемостью всей донорской микробиоты при криоконсервации. Показана высокая эффективность применения данной двухкомпонентной криозащитной композиции при криоконсервации панели культур аэробных (*Acinetobacter johnsoni*), факультативно-анаэробных (*Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*), микроаэрофильных (*Lactobacillus plantarum*) и облигатно-анаэробных бактериальных культур (*Bifidobacterium breve*), различающихся по составу клеточной стенки (грамтрицательные, грамположительные). Исследование сохранности кишечной микробиоты оценивали 3 методами: флуоресцентный анализ LIVE/DEAD, культивирование на микропланшете с фотометрическим измерением роста культуры и традиционное микробиологическое культивирование, которые продемонстрировали выживаемость от 72 до 98 % исходного количества клеток. Все три метода показали высокую корреляцию между собой. Подход с использованием комбинации двух равноэффективных криопротекторов увеличивает шансы на успешную криоконсервацию микробного сообщества в целом.

Таблица 1. Жизнеспособность 5 видов бактериальных культур после криоконсервации, культивирование на планшете (n=3). \* – отличия достоверны при сравнении с 5 % ДМСО, согласно критерию Манна–Уитни

| Название вида       | NaCl          | 5 % ДМСО      |            | 10 % ФСК      | 25 % ФСК      | 50 % ФСК      | 75 % ФСК      | ФСК            |
|---------------------|---------------|---------------|------------|---------------|---------------|---------------|---------------|----------------|
| <b>E.coli</b>       | <b>90±1,2</b> | <b>94±2,0</b> | Без ДМСО   | <b>92±0,5</b> | <b>93±1,0</b> | <b>92±3,0</b> | <b>93±2,3</b> | <b>96±1,7</b>  |
|                     |               |               | + 5 % ДМСО | <b>90±1,0</b> | <b>90±1,7</b> | <b>93±2,0</b> | <b>96±1,5</b> | <b>98±1,0</b>  |
| <b>E. faecalis</b>  | <b>88±2,0</b> | <b>95±1,4</b> | Без ДМСО   | <b>90±3,0</b> | <b>92±1,5</b> | <b>93±2,0</b> | <b>98±1,0</b> | <b>99±1,0</b>  |
|                     |               |               | + 5 % ДМСО | <b>95±2,0</b> | <b>97±3,5</b> | <b>96±2,0</b> | <b>96±2,0</b> | <b>99±0,5</b>  |
| <b>L. plantarum</b> | <b>81±1,3</b> | <b>87±1,5</b> | Без ДМСО   | <b>86±3,2</b> | <b>86±3,0</b> | <b>87±1,5</b> | <b>88±1,6</b> | <b>90±3,5</b>  |
|                     |               |               | + 5 % ДМСО | <b>91±2,0</b> | <b>90±1,5</b> | <b>90±1,8</b> | <b>92±3,0</b> | <b>93±2,0</b>  |
| <b>A. johnsoni</b>  | <b>83±1,2</b> | <b>95±2,0</b> | Без ДМСО   | <b>90±3,0</b> | <b>92±4,0</b> | <b>95±1,5</b> | <b>98±1,3</b> | <b>98±0,5</b>  |
|                     |               |               | + 5 % ДМСО | <b>92±2,3</b> | <b>92±1,0</b> | <b>93±1,3</b> | <b>97±1,0</b> | <b>96±1,2</b>  |
| <b>B. breve</b>     | <b>47±1,5</b> | <b>69±4,0</b> | Без ДМСО   | <b>65±1,6</b> | <b>67±2,0</b> | <b>88±4,8</b> | <b>87±3,5</b> | <b>88±1,3*</b> |
|                     |               |               | + 5 % ДМСО | <b>63±2,5</b> | <b>65±3,0</b> | <b>78±6,0</b> | <b>78±5,5</b> | <b>82±4,8*</b> |