

УДК 579.62

<https://doi.org/10.32634/0869-8155-2021-350-6-6-11>

Тип статьи: Краткий обзор

Type of article: Brief review

**Малик Н.И.<sup>1</sup>,  
Гулейчик И.А.<sup>1</sup>,  
Малик Е.В.<sup>1</sup>,  
Чупахина Н.А.<sup>1</sup>,  
Русанов И.А.<sup>1</sup>,  
Самохвалова Н.С.<sup>1</sup>,  
Сафронова В.И.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> *Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов ФГБУ «ВГНКИ», 123022, Москва, Звенигородское шоссе, д. 5, nimalik@vgnki.ru*

<sup>2</sup> *Всероссийский НИИ сельскохозяйственной микробиологии, 196608, Санкт-Петербург, Пушкин-8, ш. Подбельского, 3 v.savronova@rambler.ru*

**Ключевые слова:** криоконсервация, молочнокислые бактерии, криопротекторы, микробиота.

**Для цитирования:** Малик Н.И., Гулейчик И.А., Малик Е.В., Чупахина Н.А., Русанов И.А., Самохвалова Н.С., Сафронова В.И. Оценка жизнеспособности культур молочнокислых микроорганизмов при их замораживании и низкотемпературном хранении. *Аграрная наука.* 2021; 350 (6): 6–11.

<https://doi.org/10.32634/0869-8155-2021-350-6-6-11>

**Конфликт интересов отсутствует**

**Nina I. Malik<sup>1</sup>,  
Irina A. Guleychik<sup>1</sup>,  
Evgeny V. Malik<sup>1</sup>,  
Nataliya A. Chupahina<sup>1</sup>,  
Ivan A. Rusanov<sup>1</sup>,  
Nadezhda S. Samohvalova<sup>1</sup>,  
Vera I. Safronova<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> *Federal State Budgetary Institution «The Russian State Center for Animal Feed and Drug Standardization and Quality», Zvenigorodskoye shosse 5, 123022, Moscow, Russia*

<sup>2</sup> *Federal State Budgetary Scientific Institution «All-Russia Institute for Agricultural Microbiology», Podbelsky chausse 3, Saint-Petersburg, Pushkin 8, 196608, Russia*

**Key words:** cryopreservation, lactic acid bacteria, cryoprotectors, microbiota.

**For citation:** Malik N.I., Guleychik I.A., Malik E.V., Chupahina N.A., Rusanov I.A., Samohvalova N.S., Safronova V.I. Assessment of the viability of cultures of lactic acid microorganisms during their freezing and low-temperature storage. *Agrarian Science.* 2021; 350 (6): 6–11. (In Russ.)

<https://doi.org/10.32634/0869-8155-2021-350-6-6-11>

**There is no conflict of interests**

# Оценка жизнеспособности культур молочнокислых микроорганизмов при их замораживании и низкотемпературном хранении

## РЕЗЮМЕ

**Актуальность.** Значительный рост микробиом-ассоциированных болезней, тесно связанных с нарушениями бактериального разнообразия и функций нормальной кишечной микробиоты, диктует необходимость разработки и осуществления мер по длительному сохранению отдельных представителей нормальной микробиоты с целью создания новых стратегий для модуляции состава микробиомов.

**Методы.** Изучено влияние технологии глубокого замораживания и хранения кишечных изолятов молочнокислых бактерий 2 таксономических групп, выделенных от птицы, в условиях Станции низкотемпературного автоматизированного хранения биологических образцов Ведомственной коллекции полезных микроорганизмов сельскохозяйственного назначения Россельхозакадемии (ВКСМ) на среде культивирования MRS с использованием в качестве криоконсервантов 10 и 20% глицерина или 10 и 20% сахарозы. Взвеси изолятов замораживали при -150 °С в течение 18 час и затем размещали в автоматизированное криохранилище при -80 °С. Контроль образцов на сохранность живых клеток и функциональную активность культур молочнокислых бактерий проводили после замораживания при -150 °С перед помещением в криохранилище и далее в динамике хранения при температуре -80 °С через 4, 9 и 18 мес хранения.

**Результаты.** Технология криозамораживания молочнокислых бактерий на MRS-бульоне с использованием в качестве криоконсервантов 10 и 20% глицерина или 10 и 20% сахарозы, позволяет сохранять жизнеспособность, физиологические и биохимические свойства кишечных изолятов молочнокислых бактерий при хранении в течение 18 мес. Все использованные защитные среды (MRS –бульон с глицерином 10 и 20%, MRS-бульон с сахарозой 10 и 20%) показали сравнимые результаты по сохранности жизнеспособности и кислотообразующей активности изолятов *Lactobacillus fermentum*-2, *Pediococcus pentosaceus* 6п-3, *Pediococcus pentosaceus* 28п-1. тогда хранение изолята *Pediococcus pentosaceus* (28п-1) в заданном параметре на защитной среде с 10 и 20% сахарозы привело к снижению активности кислотообразования.

## Assessment of the viability of cultures of lactic acid microorganisms during their freezing and low-temperature storage

### ABSTRACT

**Relevance.** A significant increase in microbiome-associated diseases, closely related to violations of the bacterial diversity and functions of the normal intestinal microbiota, dictates the need to develop and implement measures for the long-term preservation of individual representatives of the normal microbiota in order to create new strategies for modifying the composition of microbiomes.

**Methods.** The influence of the technology of deep freezing and storage of intestinal isolates of lactic acid bacteria of 2 taxonomic groups isolated from poultry in the conditions of the Low-temperature automated storage of biological samples of the Departmental Collection of useful microorganisms for Agricultural purposes of the Russian Agricultural Academy (VKSM) on the MRS culture medium using 10 and 20% glycerin or 10 and 20% sucrose as cryopreservants was studied. The suspensions of the isolates were frozen at -150 °C for 18 hours and then placed in an automated cryopreservation at -80 °C. Control of samples for safety

**Results.** The technology of cryofreezing of lactic acid bacteria on MRS-broth using 10 and 20% glycerin or 10 and 20% sucrose as cryopreservants allows preserving the viability, physiological and biochemical properties of intestinal isolates of lactic acid bacteria when stored for 18 months. All the protective media used (MRS-broth with glycerin 10 and 20%, MRS –broth with sucrose 10 and 20%) showed comparable results in the preservation of viability and acid-forming activity of *Lactobacillus fermentum*-2, *Pediococcus pentosaceus* 6p-3, *Pediococcus pentosaceus* 28p-1 isolates. Then the storage of *Pediococcus pentosaceus* isolate (28p-1) in a given parameter on a protective medium with 10 and 20% sucrose led to a decrease in the activity of acid formation.

Поступила: 10 июля  
После доработки: 11 июля  
Принята к публикации: 11 июля

Received: 10 July  
Revised: 11 July  
Accepted: 11 July

## Введение

Одной из задач, обозначенных в ФЗ № 492-ФЗ «О биологической безопасности в Российской Федерации» является формирование, сохранение и развитие государственной коллекции представителей нормальной микрофлоры человека, сельскохозяйственных животных и растений, а также криогенных банков образцов природных нормальных микробиоценозов (биоматериалов).

Способность живых организмов, к выживанию при замораживании и оттаивании впервые установил Генри Пауэр, когда успешно провёл эксперимент по замораживанию и восстановлению жизнеспособности нематод [1]. Polge et al (1949) стали первыми учеными, сообщившими об успешном замораживании и сохранении жизнеспособности птичьих сперматозоидов. [2]. Первые попытки использования криоконсервации для бактерий были предприняты А. Macfadyen et al в начале 1900-х годов с использованием жидкого воздуха [3].

В основе всех методов консервации, предлагаемых для длительного хранения микроорганизмов, лежит перевод клеток в состояние анабиоза, что ведет к снижению или прекращению всех метаболических процессов. Распространенными и основополагающими методами длительного хранения микроорганизмов являются лиофильное высушивание и криоконсервация [4].

Криоконсервация (криоанабиоз) является наиболее перспективным методом долгосрочного хранения микроорганизмов. Использование азота в качестве криоконсерванта было впервые предложено Jahnelm F. et al в 1930 году [5]. При криоконсервации в парах жидкого азота удается получить высокий уровень жизнеспособных клеток, титр которых при длительном хранении при температуре от минус 70 °С до минус 196 °С сохраняется на исходном уровне, что делает практически неограниченным возможное время хранения. Добавление защитного вещества к культуре перед замораживанием в жидком азоте не требуется [6, 7] и этот метод используется почти во всех коллекциях микробных культур в развитых странах мира [1, 8, 9].

Однако, как было установлено, в процессе подготовки к консервации при замораживании-оттаивании клетки подвергаются воздействию большого числа неблагоприятных факторов, таких как температура, скорость замораживания, которые могут вызвать необратимые повреждения клеточных структур и функций (криоповреждений), снизить выживаемость, привести к изменению экспрессии генов и морфологии клеток, потере клеточной функции, вплоть до гибели клеток [10, 11, 12].

Чтобы уменьшить риск криоповреждений, традиционные подходы к криоконсервации связаны как правило с присутствием защитных веществ или криопротекторов [13, 14, 15], в качестве которых в микробиологии обычно используют растворы глицерина; диметилсульфоксида (ДМСО); в сочетании с глюкозой или сахарозой [6, 16]. Первые успешные результаты замораживания спермы петуха с использованием криопротектора — глицерина получили Polge C., A. Smith, L. Parkes в 1949 г. [2].

При отработке технологии криоконсервирования микроорганизмов Leila B. и др. (2000) установили, что жесткое снижение температуры (от 37 °С до минус 80 °С) приводит к значительной потере жизнеспособности клеток, зависящей от рН среды и выбора криопротектора [17].

Известны работы по изучению влияния криоконсервации в диапазоне от минус 10 до минус 45 °С и условиях

замораживания (в воздушной среде при естественной конвекции и в жидком хладоносителе) на сохранность бактериальных заквасок из культур термофильных молочнокислых бактерий *L. acidophilus* и *L. bulgaricus* в процессе хранения в течение 270 суток. На протяжении всего периода хранения наилучшая выживаемость микроорганизмов отмечена в заквасках, замороженных в хладоносителе при минус 45 °С [18].

Baumann D.P., Reinbold G.W. (1996) при исследовании условий, влияющих на выживание замороженных при — 196 °С чистых культур штаммов молочнокислых бактерий и бактериальных ассоциаций установили, что быстрое замораживание с последующим быстрым оттаиванием приводило к большему выживанию хранившихся при температуре минус 196 °С культур. Однако время хранения биоматериала при этих температурах было ограничено. По их же данным время хранения разных видов бактерий при минус 70 °С колебалось в пределах 12–40 месяцев [19].

Baati L. et al (2000) считают, что медленная скорость охлаждения и предзаморозный стресс приводят к повышению резистентности клеток молочнокислых бактерий и сохранению их физиологических характеристик, тогда как резкое понижение температуры (с 37 °С до минус 80 °С) приводит к значительной потере жизнеспособности клеток. Предварительная инкубация клеток при низкой температуре (22 °С) в течение 6 ч привела к развитию криотолерантности, о чем свидетельствовала повышенная способность выживать после замораживающей обработки в течение 24 ч при температуре минус 80 °С [20].

Fonseca F. et al (2001) установили, что термофильные молочнокислые бактерии проявляют различную выживаемость при замораживании и хранении в замороженном состоянии в зависимости от условий обработки. Устойчивость оценивали количественно по снижению кислотообразующей активности при замораживании и в течение 8 недель хранения. Устойчивость к замораживанию и замороженному хранению была улучшена за счет использования высокой скорости замораживания и низкой температуры хранения [21].

Савкина О.А. и др. (2014) использовали технику криоконсервирования для изучения сохранности культур молочнокислых бактерий рода *Lactobacillus*, замороженных на водном растворе, содержащем 30% глицерина и 17% сахарозы при -20 °С и хранившихся в течение 24 мес. при минус 80 °С [22].

По данным Сидякиной Т.М. (1991), криоконсервация фекалий в жидком азоте с криопротекторами белковополисахаридной природы позволяет сохранять жизнеспособность микроорганизмов, а тот факт, что соотношение индикаторных бактерий в этих условиях было близким таковому в нативном материале, говорит о сохранении естественных ассоциаций практически в неизменном состоянии [23].

Несмотря на то, что в настоящее время накоплен некоторый опыт по криоконсервации молочнокислых микроорганизмов, на практике используют эмпирические подходы для подбора режимов замораживания конкретных объектов, чаще исходя из технических возможностей используемого криогенного оборудования, физиологических свойств биологического объекта.

Молочнокислые микроорганизмы являются доминирующими представителями нормальной микробиоты кишечника птицы играющие, как известно, решающую роль в эволюции функций кишечника и в общем здоровье хозяина и в этой связи широко используются для

производства пробиотических кормовых добавок и иммунобиологических лекарственных средств для профилактики дисбактериозов, повышения естественной резистентности организма и увеличения продуктивности животных [24, 25].

Новик Г.И. (1998) при изучении жизнеспособности бифидобактерий после криоконсервации выявила хорошее протекторное действие среды МРС-Б, обеспечивающей сохранность исходной жизнеспособности и физиологической активности культур независимо от скорости охлаждения. Криозащитный эффект среды МРС-Б, вероятно, обусловлен протекторными свойствами отдельных компонентов (пептон, глюкоза, агар-агар, твин-80), входящих в ее состав, однако в полной мере объяснить механизм наблюдаемого защитного действия сложно [25].

Значительный рост инфекционных и неинфекционных болезней животных и птицы, тесно связанных с нарушениями бактериального разнообразия и функций нормальной кишечной микробиоты, диктует необходимость разработки и осуществления мер по сохранению отдельных представителей нормальной кишечной микробиоты с целью разработки новых стратегий для модуляции состава микробиомов.

В связи с указанной работой по выяснению более четких представлений по управлению процессами консервации и восстановления жизнеспособности конкретных микроорганизмов сохраняют актуальность, внося существенный теоретический и практический вклад во все увеличивающуюся проблему сохранения биологического разнообразия.

Цель нашей работы заключалась в изучении влияния замораживания и низкотемпературного хранения при минус 80 °С на кишечные изоляты молочнокислых бактерий, выделенные от птицы.

Исследования выполнены в условиях Станции низкотемпературного автоматизированного хранения биологических образцов Ведомственной коллекции полезных микроорганизмов сельскохозяйственного назначения Россельхозакадемии.

#### Методика

Материалы Лиофилизированные культуры изолятов молочнокислых бактерий *Lactobacillus fermentum*-2, *Lactobacillus fermentum*-17, *Pediococcus pentosaceus* (6п-3), *Pediococcus pentosaceus* (28п-1), *Lactobacillus brevis* (33с-1), выделенные из кишечника птицы.

#### Методы

Этап 1. Лиофилизированные культуры изолятов реактивировали на МРС-бульоне и пересевали на агар МРС стандартными методами при 37+1 °С на 48 час для отбора изолированных колоний, которые переносили в пробирки с 5 см<sup>3</sup> бульона МРС и культивировали 72 час при 37+1 °С.

Этап 2. Бульонные культуры пересевали сплошным газом на косяки с агаризованной средой МРС, культивировали при 37+1 °С в течение 48 час, после чего делали смывы, используя 4 варианта защитных сред — МРС -бульон с глицерином (10 и 20%) или сахарозой (10 и 20%) и определяли исходную концентрацию клеток (КОЕ/мл), функциональную активность и фенотипические свойства каждого изолята перед замораживанием и закладкой на хранение.

Этап 3. Полученные взвеси каждого изолята расфасовывали по 0,2 мл в криопробирки и замораживали при минус 150 °С в течение 18 час и затем плашки с криопробирками размещали в автоматизированное крио-

охранилище при минус 80 °С, присваивая код доступа в компьютерную базу данных Станции низкотемпературного автоматизированного хранения биологических образцов.

Контроль образцов на сохранность живых клеток и функциональную активность культур молочнокислых бактерий проводили после замораживания при минус 150 °С перед помещением в криохранилище и далее в динамике хранения при температуре минус 80 °С через 4, 9 и 18 мес хранения.

Оценку жизнеспособности испытуемых изолятов проводили по ГОСТ 10444.11-89 [26] методом последовательных десятикратных разведений аликвот с высевом на плотные питательные среды (MRS-агар с мелом или без мела HiMedia) и подсчетом выросших колоний. Стабильность фенотипических свойств проверяли методом пассирования изолятов на жидких и плотных питательных средах и дальнейшим через 3–5 пассажей тестированием биохимических свойств с использованием панелей API-50 CHL. Функциональную активность культур молочнокислых бактерий оценивали по росту на средах с различным значением pH, отношением к желчи и кислотообразующей активности. Кислотообразующую активность изолятов определяли методом Тернера по ГОСТ 3624-92 [27].

#### Результаты

Наши исследования показали, что сверхбыстрое замораживание при минус 150 0 С в течение 18 час не привело к гибели клеток исследованных изолятов молочнокислых бактерий. Незначительное снижение количества живых клеток на этапе сверхбыстрого замораживания отмечено у изолята *Lactobacillus fermentum* -17 на защитной среде с 10 и 20% глицерина и *Lactobacillus brevis* 33с-1 на защитной среде с 10 и 20% сахарозы.

Исследование жизнеспособности изолятов молочнокислых бактерий в криоконсервированном состоянии в динамике показало, что хранение в течение 4 и 9 мес. сопровождалось незначительным повышением титра жизнеспособных клеток изолятов *Lactobacillus fermentum* -2, *Pediococcus pentosaceus* 6п-3, *Lactobacillus brevis* 33с-1 по сравнению со значениями lg КОЕ/мл, установленными перед закладкой в криоконсерватор (табл. 1).

При обсуждении этого феномена можно исходить только из того предположения, что в процессе криоконсервации происходит разделение агглютированных клеток которое в частности, наблюдается у клубеньковых бактерий, хотя этот вопрос требует отдельного обсуждения [28].

Особенно выраженным явление агглютинации по наблюдениям Сафроновой В.И. и Оследкина Ю.С. и др. (2007) может быть в случае приготовления исходной суспензии высокого титра (порядка 10<sup>8</sup>–10<sup>9</sup> кл/мл), что необходимо для повышения криоустойчивости культур микроорганизмов [23, 29].

В нашем эксперименте установлено, что хранение при минус 80 °С в течение 18 мес привело к снижению жизнеспособности изолята *Lactobacillus fermentum* 17 и *Lactobacillus brevis* 33с-1 (см. табл. 1) по сравнению со значениями lg КОЕ/мл, установленными перед закладкой в криоконсерватор.

Так, количество живых клеток изолята *Lactobacillus fermentum* 17 на МРС-бульоне с 10% сахарозы снизилось с 8,20+0,89 до 6,04+0,69 lg КОЕ/мл, а на МРС-бульоне с 20% сахарозы с 8,14+0,72 до 6,08+0,64 lg КОЕ/мл.

Таблица 1. Жизнеспособность изолятов молочнокислых бактерий в динамике низкотемпературного хранения (lg КОЕ/мл)

Table 1. Viability of lactic acid bacteria isolates in the dynamics of low-temperature storage (lg CFU/ml)

Защитная среда	Lactobacillus fermentum (2)				Lactobacillus fermentum (17)				Pediococcus			
	Количество живых клеток молочнокислых бактерий в аликвоте культур по срокам исследований											
	0*	1	2	3	4	0*	1	2	3	4	0*	1
MRS-бульон с 10% глицерина	7,60±0,76	7,63±0,72	8,41±0,82	7,11±0,76	7,54±0,70	8,60±0,86	7,23±0,72	8,50±0,81	8,14±0,88	7,86±0,74	8,68±0,86	8,83±0,80
MRS-бульон с 20% глицерина	7,75±0,71	7,88±0,89	8,32±0,84	8,39±0,86	8,25±0,82	8,55±0,83	7,28±0,71	8,50±0,88	7,67±0,72	7,54±0,79	8,49±0,80	8,68±0,83
MRS-бульон с 10% сахарозы	7,82±0,77	7,79±0,71	7,34±0,74	7,54±0,71	6,04±0,62	8,63±0,81	8,20±0,89	7,23±0,72	7,08±0,73	6,04±0,69	8,51±0,81	8,61±0,89
MRS-бульон с 20% сахарозы	7,18±0,69	7,31±0,70	7,80±0,70	7,62±0,74	5,98±0,54	8,25±0,81	8,14±0,72	7,28±0,70	5,90±0,51	6,08±0,64	8,18±0,80	8,28±0,81

Примечание: 0\* — значение нативной культуры изолята перед замораживанием; 1 — после кратковременного замораживания при -150 °С;

Продолжение табл. 1

Исследуемый изолят												
pentosaceus (6п-3)			Pediococcus pentosaceus (28п-1)				Lactobacillus brevis (33с-1)					
Количество живых клеток молочнокислых бактерий в аликвоте культур по срокам исследований												
2	3	4	0*	1	2	3	4	0*	1	2	3	4
9,08±0,82	8,18±0,08	8,15±0,88	8,97±0,82	8,98±0,84	8,08±0,80	8,18±0,82	7,11±0,71	8,78±0,87	8,86±0,86	8,69±0,84	7,11±0,76	5,64±0,50
9,23±0,98	9,18±0,91	9,11±0,99	8,66±0,81	8,76±0,89	8,08±0,81	7,38±0,70	6,08±0,64	8,64±0,81	7,66±0,71	7,41±0,69	6,62±0,64	4,52±0,42
9,04±0,92	9,18±0,91	9,15±0,91	8,95±0,68	7,00±0,71	8,99±0,81	8,25±0,83	7,04±0,71	8,25±0,80	7,07±0,71	7,1±0,79	7,57±0,69	5,25±0,53
8,76±0,81	8,9±0,83	8,08±0,81	8,95±0,83	9,08±0,92	9,15±0,91	9,54±0,91	8,72±0,81	8,41±0,80	7,94±0,74	7,78±0,71	5,15±0,51	5,54±0,54

Таблица 2. Оценка физиологических свойств изолятов молочнокислых бактерий в динамике низкотемпературного хранения

Table 2. Evaluation of physiological properties of lactic acid bacteria isolates in the dynamics of low-temperature storage

Среды роста	Защитная среда																
	MRS-бульон с 10% глицерина				MRS-бульон с 20% глицерина				MRS-бульон с 10% сахарозы				MRS-бульон с 20% сахарозы				
	0*	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
<b>Lactobacillus fermentum (2)</b>																	
MRS 20% желчи	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MRS 40% желчи	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
МПБ pH 4,2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
МПБ pH 8,3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Lactobacillus fermentum (17)</b>																	
MRS 20% желчи	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MRS 40% желчи	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
МПБ pH 4,2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
МПБ pH 8,3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Pediococcus pentosaceus 6п-3</b>																	
MRS 20% желчи	±	±	±	-	-	+	+	-	-	±	+	-	±	+	+	±	±
MRS 40% желчи	±	±	±	-	-	+	+	-	-	±	+	-	±	+	+	±	±
МПБ pH 4,2	±	+	+	±	±	+	+	±	+	+	±	-	±	+	+	-	-
МПБ pH 8,3	±	+	+	±	+	+	+	±	+	+	±	-	±	+	+	-	-
<b>Pediococcus pentosaceus 28п-1</b>																	
MRS 20% желчи	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MRS 40% желчи	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
МПБ pH 4,2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
МПБ pH 8,3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Lactobacillus brevis 33с-1</b>																	
MRS 20% желчи	±	+	+	±	±	+	+	±	+	+	+	+	+	±	±	±	±
MRS 40% желчи	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
МПБ pH 4,2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
МПБ pH 8,3	+	+	+	+	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Примечание: 0\* — значение нативной культуры изолята перед замораживанием; 1 — после кратковременного замораживания при -150 °С; 2 — через 4 мес хранения при -80 °С; 3 — через 9 мес хранения при -80 °С; 4 — через 18 мес хранения при -80 °С.

Таблица 3. Активность кислотообразования ( $^{\circ}\text{T}$ ) изолятов молочнокислых бактерий в динамике низкотемпературного хранения

Table 3. The activity of acid formation ( $^{\circ}\text{T}$ ) of lactic acid bacteria isolates in the dynamics of low-temperature storage

Исследуемый изолят	Защитная среда				
	MRS-бульон	MRS-бульон с 10% глицерина			
	Кислотность в $^{\circ}\text{T}$ по срокам исследований				
	0	1	2	3	4
<i>Lactobacillus fermentum</i> (2)	79,7±1,1	76,3±1,5	78,0±0,6	79,0±0,07	79,3±0,64
<i>Lactobacillus fermentum</i> (17)	84,0±1,3	79,3±0,8	80,0±0,7	75,8±1,3	78,6±0,21
<i>Pediococcus pentosaceus</i> (6п-3)	45,0±0,7	43,3±1,5	44,5±0,5	42,4±0,9	44,2±0,35
<i>Pediococcus pentosaceus</i> (28п-1)	46,0±1,3	43,7±0,4	46,0±0,0	41,8±0,6	41,2±0,41
<i>Lactobacillus brevis</i> (33с-1)	66,3±1,1	64,7±1,1	65,0±1,3	64,8±1,0	64,9±0,11

Продолжение табл. 3

Защитная среда											
MRS-бульон с 20% глицерина				MRS-бульон с 10% сахарозы				MRS-бульон с 20% сахарозы			
Кислотность в $^{\circ}\text{T}$ по срокам исследований											
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
80,7±0,4	79,3±0,4	80,7±0,4	80,9±0,23	80,0±0,6	78,7±1,1	80,0±0,7	79,7±0,35	79,6±0,8	77,7±0,9	79,3±0,4	79,0±0,66
81,0±0,7	80,3±0,7	79,2±1,1	78,8±0,15	83,7±1,1	84,3±0,9	80,2±1,4	79,5±0,35	83,3±0,8	83,7±0,9	79,2±1,4	80,1±0,26
44,5±0,5	42,0±0,7	41,8±0,9	42,9±0,15	46,0±0,0	45,7±0,4	43,6±0,7	44,4±0,21	43,7±0,8	44,7±1,1	42,2±0,64	42,5±0,66
44,3±0,4	46,0±0,7	43,0±0,8	41,1±0,10	43,3±1,1	44,3±0,2	41,4±0,9	36,8±0,15	45,3±0,4	44,0±0,7	43,6±0,72	38,80±0,2
63,3±0,4	66,0±0,7	62,6±1,5	60,6±0,21	65,0±0,0	67,7±0,9	66,0±0,4	64,7±0,15	65,3±0,4	66,3±0,9	65,2±1,0	65,0±0,1

Примечание: 0\* — значение нативной культуры изолята перед замораживанием; 1 — после кратковременного замораживания при -150 °C; 2 — через 4 мес хранения при -80 °C; 3 — через 9 мес хранения при -80 °C; 4 — через 18 мес хранения при -80 °C.

Количество живых клеток изолята *Lactobacillus brevis* 33с-1 через 18 мес хранения в условиях минус 80 °C на MRS-бульоне с 10% глицерина снизилось с  $8,86 \pm 0,86$  lg КОЕ/мл до  $5,64 \pm 0,50$  lg КОЕ/мл, на MRS-бульоне с 20% глицерина — с  $7,66 \pm 0,71$  lg КОЕ/мл до  $4,52 \pm 0,42$  lg КОЕ/мл соответственно, на MRS-бульоне с 10% сахарозы снизилось с  $7,07 \pm 0,71$  lg КОЕ/мл до  $5,25 \pm 0,53$  lg КОЕ/мл и на MRS-бульоне с 20% сахарозы — с  $7,94 \pm 0,74$  lg КОЕ/мл до  $5,54 \pm 0,54$  lg КОЕ/мл.

Как уже было отмечено (Сафронова В.И. и Оследкин Ю.С. и др. (2007), жизнеспособность микроорганизмов значительно повышается, если исходная концентрация клеток в суспензии была высокой, порядка  $10^9$ – $10^{11}$  кл/мл [29]. Уплотненные суспензии клеток имеют более высокий титр выживания, чем разбавленные, так как лизированные клетки и клеточные вещества могут выполнять криозащитную роль.

Однако по нашему мнению, при заданном условии нашего эксперимента параметре (предварительное замораживание образцов при -150 °C в течение 18 час) кристаллизация влаги в защитной среде и в самой клетке сопровождается образованием мелких кристаллических структур, более равномерно распределённых по всей толще замораживаемого объекта, чем при температурах от -25 °C до -45 °C), в результате чего, по мнению Farrant J. (1980), не происходит разрывов клеток или сжатия их протоплазмы [11].

Проведенное исследование физиологических свойств изолятов молочнокислых бактерий, испытывавших шоковое воздействие сверхнизкой температуры (-150 °C) и далее хранившихся при минус 80 °C в течение 18 мес, показало, что, способность к росту на

средах с желчью и разным значением pH у изолятов *Lactobacillus fermentum* 17, *Lactobacillus fermentum*-2, *Pediococcus pentosaceus* 28п-1, *Lactobacillus brevis* 33с-1 в динамике не отличались от показателей, установленных у нативных культур перед заморозкой и закладкой на хранение, тогда как данные табл. 2, свидетельствуют, что изолят *Pediococcus pentosaceus* 6п-3 хранившийся на MRS-бульоне с 10% и 20% глицерина через 9 и 18 мес хранения утратил резистентность к 20 и 40% желчи, сохранив устойчивость к росту на МПБ с pH 4,2 и 8,3 (см. табл. 2).

Результаты определения активности кислотообразования у кишечных изолятов молочнокислых бактерий в динамике процесса, представленные в табл. 3 показывают, что хранение изолятов *Lactobacillus fermentum*-2, *Lactobacillus fermentum*-17, *Pediococcus pentosaceus* 6п-3 и *Lactobacillus brevis* 33с-1 при -80 °C в течение 18 мес с использованием в качестве криопротектора MRS-бульона с 10 и 20% глицерина или 10 и 20% сахарозы не оказало негативного влияния на активность кислотообразования в 0T, тогда как хранение изолята *Pediococcus pentosaceus* (28п-1) в заданном параметре на защитной среде с 10 и 20% сахарозы привело к снижению активности кислотообразования с  $43,3 \pm 1,1$  до  $36,8 \pm 0,15$  0T и с  $45,3 \pm 0,4$  до  $38,80 \pm 0,2$  0T соответственно.

Исследование биохимических характеристик штаммов по 49 тестам API-50 CHL показало полную идентичность биохимических свойств у культур перед закладкой на криоконсервацию и после 9 мес их хранения, и таким образом, процесс криоконсервации не влияет на генетическую стабильность штаммов молочнокислых микроорганизмов.

**Выводы**

В целом наши данные не расходятся с результатами исследований Короткая Е.В. (2011), Г.И. Новик (1998), Astrid B Andersen, и др. (1999), Passot S., и др. (2011) Gibson, C. A. и др. (2014) и других авторов [18, 25, 30, 31, 32], изучавших влияние различных режимов и способов криоконсервации на жизнеспособность и стабильность морфологических, культуральных и биохимических свойств изолятов молочнокислых бактерий, молочнокислых кокков и стартовых заквасок для молочной и хлебопечерной промышленности.

**ЛИТЕРАТУРА**

- Morris GJ. Cryopreservation: An Introduction to Cryopreservation in Culture Collections., Culture Centre of Algae and Protozoa, Cambridge, UK, 1981, 27p.
- Polge C., Smith AU. and Parkes AS. Revival of Spermatozoa after Vitrification and Dehydration at Low Temperatures. Nature, 1949; vol. 164, (4172): p. 666.
- Macfadyen A., Rowland S. Note on the influence of the temperature of liquid air on bacteria. The Lancet, 1900, vol. 155, (3999): p. 1130.
- Похиленко ВД., Баранов АМ., Детушев КВ. Методы длительного хранения коллекционных культур микроорганизмов и тенденции развития. Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Медицинские науки. 2009; 4 (12): с. 99-121.
- [Pohilenko VD, Baranov AM, Detushev KV. Methods of long-term storage of collection cultures of microorganisms and development trends. Izvestiya visshih uchebnykh zavedenii. Povoljskii region. Meditsinskie nauki. 2009; 4 (12): p. 99-121 (In Russ.)]
- Jahnelm F. Uber das Ueberleben von Syphilis und Recurrensspirochäten sowie Sodukspirillen in flüssigem Stickstoff (temperature -196o) und die Winwirkung anderer Kaltegrade auf diese. Mikroorganismen Klin. Wschr. 1937; vol. 16: p.1304-1305
- [Jahnelm F. About the survival of syphilis and recurring spirils as well as soda spirils in liquid nitrogen (temperature -196o) and the effect of other degrees of cold on them. Mikroorganismen Klin. Wschr. 1937; vol. 16: p.1304-1305 (In Germ)]
- Morgan CA., Herman N., White PA., Vesey G. Preservation of micro-organisms by drying: A review. Journal of Microbiological Methods. 2006; vol. 66 (2): p. 183-193
- Смит О. Биологическое действие замораживания и переохлаждения. Пер. с англ. О. Смит. М., 1963. 430 с.
- The WFCC Guidelines for the Establishment and Operation of Culture Collections (Online). 2010.
- Uzunova-Donova T., Donev T. Anabiosis and conservation of microorganisms. J. of Culture Collections. 2005; (4): p.17-28
- NNI Cryopreservation manual. Nalge Nunc International Corp., Penfield, New York, USA. 1998.
- Farrant J. General observations on cell preservation. Low Temperature Preservation in Medicine and Biology, Pitman Medical Limited, Kent, England.1980; (1-18).
- Бронштейн ВЛ. К механизму взаимодействия растущих кристаллов льда с биологическими структурами при замораживании Докл. АН СССР. 1978; (3): p.722-725
- [Bronstein VL. To the mechanism of the interaction of growing ice crystals with biological structures during freezing, Dokl. AN SSSR, 1978; (3): p.722-725, (In Russ.)]
- Safronova V., Tikhonovich I. Automated cryobank of microorganisms: Unique possibilities for long-term authorized depositing of commercial microbial strains. In: Microbes in applied research: current advances and challenges, 2012. Singapore, p.331-334
- Mazur P. Cryobiology: the freezing of biological systems. Science. 1970; (168): p.939-949.
- Mazur, P. Freezing of live cells: mechanisms and implications. Am J Physiol. 1984; (247): p.125-142.
- Elliott GD., Wang S., Fuller BJ. Cryoprotectants: A review of the actions and applications of cryoprotective solutes that modulate cell recovery from ultra-low temperatures. Cryobiology. 2017; (76): p.74-91
- Leila B., Fabre-Gea C., Auriol D., J Blanc P. Study of the cryotolerance of Lactobacillus acidophilus: effect of culture and freezing conditions on the viability and cellular protein levels. J. of Food Microbiology. 2000; Vol. 59, (3): p.241-247
- Короткая ЕВ. Исследование свойств криоконсервированных заквасок. Техника и технология пищевых производств. 2011; (1(20)): p.31-36.
- [Korotkaya EV. Investigation of the properties of cryopreserved starter cultures. Tehnika i tehnologiya pischevix proizvodstv, 2011; (1(20)): p.31-36 In Russ.]
- Baumann DP., Reinbold GW. Freezing of Lactic Cultures. J.

Полученные результаты свидетельствуют, что метод криозамораживания молочнокислых бактерий на MRS-бульоне с использованием в качестве криоконсервантов 10 и 20% глицерина или 10 и 20% сахарозы, позволяет сохранять жизнеспособность изолятов молочнокислых бактерий, и обеспечивает сохранность физиологических и биохимических свойств при хранении в течение 18 мес.

Представленная информация может иметь практическое значение для подготовки чистых культур микроорганизмов, выделенных из микробиомов птицы к низкотемпературному хранению.

of Dairy Sci. 1966; Vol. 49 (3): p.259-264

20. Baati L., Fabre-Gea C., Auriol D., Blanc P. J. Study of the cryotolerance of Lactobacillus acidophilus: effect of culture and freezing conditions on the viability and cellular protein levels. J. Food Microbiol. 2000; 59(3):p.241-7

21. Fonseca F, Beal C., Corrieu G. Operating conditions that affect the resistance of lactic acid bacteria to freezing and frozen storage. Cryobiology. 2001; 43(3):189-198.

22. Савкина ОА., Терновской ГВ., Локачук МН., Павловская ЕН., Сафронова ВИ. Криоконсервация перспективный метод хранения промышленно ценных штаммов молочнокислых бактерий и дрожжей. Сельскохозяйственная биология, 2014; (4): с.112-119

[Savkina OA, Ternovskii GV, Lokachuk MN, Pavlovskaya EN, Safronova VI. Cryopreservation is a promising method for storing industrially valuable strains of lactic acid bacteria and yeast. Sel'skhozaystvennaya mikrobiologiya 2014; (4): p.112-119, (In Russ.)]

23. Сидякина ТМ. Консервация микроорганизмов в коллекциях культур. Сб. научн. трудов «Консервация генетических ресурсов. Методы. Проблемы. Перспективы». АН СССР, Пушкинский научн. центр. Институт биологической физики. Пушкино.1991; с.81-159.

[Sidiakina TM. Conservation of Microorganisms in Culture Collections. Sbornik nauchnykh trudov "Konservatsiya geneticheskikh resursov. Metodi. Problemi. Perspektivi. AN SSSR, Puschinskii nauchnyi centr. Institut biologicheskoi fiziki. Puschino 1991; p.81-159 (In Russ.)]

24. Ouwehend A. C., Salminen S., Isolauri E. Probiotics: an overview of beneficial effects. J. Microbiol. 2003; Vol. 41 (2): с. 63-72.

25. Новик ГИ. Сохранение жизнеспособности и физиологических свойств бифидобактерий при криоконсервации и лиофилизации. Микробиология. – 1998. – Т. 67, № 5. – с. 637-642

[Novik GI. Preservation of the viability and physiological properties of bifidobacteria during cryopreservation and lyophilization. Mikrobiologiya, 1998. – Т. 67, № 5. – p. 637-642 (In Russ.)]

26. ГОСТ 10444.11-89 Продукты пищевые. Методы определения молочнокислых микроорганизмов.

[GOST 10444.11-89 Food products. Methods for the determination of lactic acid microorganisms.]

27. ГОСТ 3624-92 Молоко и молочные продукты. Титриметрические методы определения кислотности.

[GOST 3624-92 Milk and dairy products. Titrimetric methods for determining acidity]

28. Сафронова ВИ. Комплексная характеристика и селекция клубеньковых бактерий козлятника Rhizobium galegae: Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук, Санкт-Петербург, 1994. 14 с.

[Safronova VI, Complex characterization and selection of nodule bacteria of the goat's rue Rhizobium galegae. Dissertatsiya na soiskanie uchenoi stepeni kandidata biologicheskikh nauk, Sankt-Peterburg, 1994. 14 p. (In Russ.)]

29. Сафронова В.И., Оследкин Ю.С., Свиридова О.В., Воробьев Н.И. Методы консервации коллекционных культур микроорганизмов. СПб, 2007.

[Safronova VI, Osledkin US, Sviridova OV, Vorob'yov NI. Methods for the conservation of collection cultures of microorganisms, SPb, 2007 (In Russ.)]

30. Andersen Astrid B, Mette S Fog-Petersen, Larsen H., Skibsted L. H. Storage Stability of Freeze-dried Starter Cultures (Streptococcus thermophilus) as Related to Physical State of Freezing Matri. Food Science and Technology. 1999;. Vol. 32 (8): p.540-547.

31. Passot S., Rault A., Cenard S., Fonseca F Cryopreservation of Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus: Towards a quantitative understanding of the cell biophysical response during freezing. Cryobiology. 2010; Vol. 61 (3): 372.

32. Gibson C. A., Landerki G. B., Morse P. M. Effects of additives on the survival of lactic streptococci in frozen storage. Appl. Microbiol. 1966; (14): p.665-669.