УДК 57.043:579:615.014.41 *UDC 57.043:579:615.014.41*

Сохранность жизнеспособности и биологических свойств бактерий *S. aureus* и *P. aeruginosa* после хранения при температуре –196°С в течение 3-х лет

И.П.Высеканцев[1], С.В.Коший[1], Е.В.Кудокоцева[1], О.В.Шаповалова[2], О.Н.Белоконь[2]
[1]*Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков*
[2]*Институт дерматологии и венерологии АМН Украины, г.Харьков*

Preservation of Viability and Biological Properties of *S. aureus* and *P. aeruginosa* after 3 Years' Storage under –196°C

Vysekantsev I.P.[1], Koschij S.V.[1], Kudokotseva E.V.[1], Shapovalova O.V.[2], Belokon O.N.[2]
[1]*Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of the Ukraine, Kharkov*
[2]*Institute of Dermatology and Venerology of the Academy of Medical Sciences of the Ukraine, Kharkov*

Хранение при температуре жидкого азота бактерий *S. aureus* и *P. aeruginosa* в течение 3-х лет обеспечивало сохранность жизнеспособных клеток и биологических свойств, используемых для таксономии и идентификации указанных бактерий. Гибель части бактериальных клеток возможна на этапе охлаждения. В качестве среды криоконсервирования использовали мясо-пептонный бульон (МПБ) с добавлением сахарозы или ДМСО.

Ключевые слова: бактерии, криоконсервирование, биологические свойства.

Зберігання при температурі рідкого азоту бактерій *S. aureus* і *P. aeruginosa* на протязі 3-х років забезпечувало цілість життєздатних клітин і біологічних властивостей, які використовуються для таксономії і ідентифікації вказаних бактерій. Загибель частини бактеріальних клітин може відбуватись на етапі охолодження. Середовищем для консервування використовували м'ясо-пептонний бульйон з добавкою цукрози або ДМСО.

Ключові слова: бактерії, кріоконсервування, біологічні властивості.

The storage of *S. aureus* and *P. aeruginosa* bacteria under liquid nitrogen temperature during 3 years provided the preservation for viable cells and biological properties, used for taxonomy and identification of mentioned bacteria. The death of a part of cells is possible at the stage of cooling. Meat-peptone broth (MPB) with sucrose and DMSO additives was used as the preservation medium.

Key words: bacteria, cryopreservation, biological properties.

Разработка эффективных методов длительного хранения микроорганизмов имеет большое значение для обеспечения работы коллекций и банков микроорганизмов различного назначения [1,11]. Значимость создания таких методов еще более возросла после усовершенствования законодательной базы Украины, охраняющей авторские права разработчиков и предусматривающей обязательное депонирование микроорганизмов [6].

Разработка технологий криоконсервирования микроорганизмов определенного вида или рода включает несколько этапов: исследование влияния на криочувствительность микроорганизма исходных морфофункциональных свойств, зависящих от ряда факторов, подбор среды консервирования и режимов замораживания-отогрева, изучение сохранности жизнеспособности в процессе криоконсервирования, исходных генетически детерминированных биологических свойств и

Development of efficient methods for microorganisms' long-term storage is of great importance for providing the work of microorganisms' collections and banks of different designations [1, 11]. The significance of elaboration for such methods has much more increased after improving the legislative base of Ukraine, protecting the author's rights of inventors and foreseeing the obligatory deposition of microorganisms [6].

The development of technologies for microorganism cryopreservation of certain species or lines comprises several stages: study of the effect on microorganisms' cryosensitivity of initial morphofunctional properties, depending on some factors; selection of preservation medium and freeze-thawing regimens; study of viability preservation during cryopreservation, initial genetically determined biological properties and cell functional activity [1, 9, 10].

Bacteria of *S. aureus* and *P. Aeruginosa* species play a considerable role in etiology of pyo-inflammatory

Адрес для корреспонденции: Высеканцев И.П. Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины,ул. Переяславская,23, г. Харьков, Украина 61015; тел.:+38 (057) 7720126, факс: +38 (057) 7720084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

Address for correspondence: Vysekantsev I.P. Institute for Problems of Cryobiology&Cryomedicine of the Natl. Acad. Sci. of Ukraine, 23, Pereyaslavskaya str.,Kharkov, Ukraine 61015; tel.:+38 (057) 7720126, fax: +38 (057) 7720084, e-mail:cryo@online.kharkov.ua

функциональной активности клеток [1,9,10].

Бактерии видов *S.aureus* и *P.aeruginosa* играют существенную роль в этиологии гнойно-воспалительных и других заболеваний человека и в связи с этим эталонные штаммы и клинические изоляты этих бактерий хранятся в коллекциях медицинских учреждений с целью разработки рациональных схем лечения,средств и методов диагностики, препаратов для специфической профилактики [7]. Данные о сохранности в процессе криоконсервирования биологических свойств бактерий S.aureus и P.aeruginosa, используемых для таксономии и идентификации, отсутствуют.

Цель данной работы - изучение сохранности жизнеспособности и биологических свойств бактерий *S.aureus* и *P.aeruginosa* в процессе низкотемпературного хранения в течение 3-х лет (срок наблюдения).

Материалы и методы

Исследования проводили с бактериями *Staphylococcus aureus* АТСС 25923 и *Pseudomonas aeruginosa* АТСС 27853 (штаммы получены из Института дерматологии и венерологии АМН Украины). Бактерии выращивали на мясопептонном агаре (МПА) [2] в течение 18 ч при температуре 37°С. Смывали бактерии с МПА средами консервирования. В качестве защитных сред использовали МПБ [2] с добавлением 5% сахарозы (хч) или 5% ДМСО (ДиаЭМ, Москва). Для предотвращения возможного инфицирования окружающей среды в случае разгерметизации криопробирок бактерии замораживали по разработанному нами способу [5]. Криопробирки "Nunc" с бактериальными суспензиями в объеме 1 мл помещали в пластиковые контейнеры (ТУ 64-1-1178-85), затем контейнеры заполняли 96%-м этиловым спиртом и герметизировали. Программное замораживание образцов производили в программном замораживателе биообъектов "Cryoson BV-6". Поскольку представленные результаты являются частью программы исследования сохранности в процессе криоконсервирования биологических объектов, бактерии замораживали по режимам, используемым нами и для замораживания других объектов.

Бактерии *S. aureus* замораживали по 2 программам:

1 – погружение контейнеров в жидкий азот; 2 – охлаждение от 18 до 0°С со скоростью 1°С/мин, выдерживание при 0°С в течение 5 мин, охлаждение от 0 до –40°С со скоростью 70°С/мин, погружение в жидкий азот.

Бактерии *P.aeruginosa* замораживали по программам 2 и 3 – охлаждение от 18 до 0°С со скоростью 1°С/мин, выдерживание при 0°С в

and other human diseases, and in this connection the reference strains and clinical isolates of these bacteria are stored in the collections of medical establishments with the aim to develop the proper treatment protocols, means and methods of diagnosis, preparations for specific preventive measures [7]. There are no data on the preservation of biological properties during cryopreservation of *S. aureus* and *P. aeruginosa* bacteria, used for taxonomy and identification.

The aim of this work was to study the preservation of the viability and biological properties of *S. aureus* and *P. aeruginosa* bacteria during low temperature preservation for 3 years (observation term).

Materials and Methods

Investigations were carried-out with *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 bacteria (strains were obtained from the Institute of Dermatology and Venerology of the Academy of Medical Sciences of the Ukraine). Bacteria were cultured in meat-peptone agar (MPA) [2] during 18 hours at 37°C. Bacteria were washed-out from MPA using the preservation media. As protective media we used meat-peptone broth (MPB) [2] with adding 5% sucrose (chemically pure) or 5% DMSO (DiaEM Moscow). For preventing a possible environment contamination in case of the cryovials' seal failure the bacteria were frozen according to the way, elaborated by us [5]. The "Nunc" cryovials with bacterial suspensions in 1ml volume were placed into plastic containers (TU 64-1-1178-85), then containers were filled with 96% ethyl alcohol and sealed. The samples' freezing was accomplished in a programmable freezer for bioobjects "Cryoson BV-6". Since the presented data are a part of the program for studying the integrity during biological objects' cryopreservation, bacteria were frozen by the regimens, used for freezing of other objects. *S aureus* bacteria were frozen by 2 programs: 1 – container immersion into liquid nitrogen; 2 – cooling from 18 down to 0°C with the rate of 1°C/min, exposure at 0°C during 5 min, cooling from 0 down to -40°C with the rate of 70°C/min, immersion into liquid nitrogen.

P. aeruginosa bacteria were frozen by programs 2 and 3: cooling from 18 down to 0°C with 1°C/min rate, exposure at 0°C during 5 min, cooling from 0 down to -40°C with 2°C/min rate, immersion into liquid nitrogen. The samples were thawed on water bath at 37°C.

Bacteria viability was determined according to the Koch's dish method [3] by the amount of formed on MPA macrocolonies. Biological properties of bacteria were investigated by the methods, described in the paper [4, 7]. In bacteria *S. aureus* there were studied the resistance to novobiocin, the presence of hemolysins enzymes, lecithinase, plasmocoagulase,

течение 5 мин, охлаждение от 0 до –40°С со скоростью 2°С/мин, погружение в жидкий азот. Отогревали образцы на водяной бане при 37°С.

Жизнеспособность бактерий определяли чашечным методом Коха [3] по количеству макроколоний, сформировавшихся на МПА. Биологические свойства бактерий исследовали по методам, описанным в [4,7]. У бактерий *S.aureus* изучали резистентность к новобиоцину, наличие ферментов гемолизинов, лецитиназы, плазмокоагулазы, ДНКазы, фосфатазы, каталазы, сахаролитических ферментов и способность к продукции ацетоина.Сахаролитические свойства *S.aureus* определяли с использованием микро-тест-системы МТС-5 (НПО "Питательные среды", Махачкала, Россия).

У *P.aeruginosa* исследовали наличие сахаролитических ферментов, ферментов цитохромоксидазы, аргинингидролазы, желатиназы, нитратредуктазы, чувствительность к хлориду бария, способность к окислению маннита, мочевины и синтезу пигментов пиоцианина и пиовердина, подвижность. Статистическую обработку полученных результатов проводили по общепринятым в медико-биологических исследованиях методам [8]. Достоверность расчетов 95%.

Результаты и обсуждение

Исходная концентрация бактерий, суспендированных в МПБ с сахарозой, составила для *S. aureus* $(1,9\pm0,3)\times10^7$, для *P. aeruginosa* – $(3,52\pm0,5)\times10^8$ клеток/мл. Исходная концентрация бактерий, суспендированных в МПБ с ДМСО, составляла для *S.aureus* $(1,5\pm0,6)\times10^7$, для *P.aeruginosa* – $(4,1\pm0,4)\times10^8$ клеток/мл. Замораживание по программам 1 и 2 приводило к достоверному снижению количества жизнеспособных клеток *S.aureus* при использовании в качестве среды консервирования МПБ с добавлением сахарозы. Во всех остальных вариантах

DNAase, phosphatase, catalase, saccharolytic enzymes and the capability to produce acetoin. Saccharolytic properties of *S. aureus* were determined using MTC-5 microtest systems (Scientific& Production Unit "Pitatelnye sredy", Makhachkala, Russia).

In *P. aeruginosa* we studied the presence of saccharolytic enzymes, those of cytochrome oxidase, arginine hydrolase, gelatinase, nitrate reductase, barium chloride sensitivity, capability to oxidation of mannitol, urea and synthesis of pigments of pyocianine and pyoverdine, motility. Statistical processing of the results obtained was performed by the common methods in medical and biological investigations [8]. Statistical significance of calculations was 95%.

Results and discussion

Initial concentration of bacteria, suspended in MPB with sucrose made for *S. aureus* $(1.9\pm0.3)\times10^7$, for *P. aeruginosa* $(3.52\pm0.5)\times10^8$ of cells/ml. That for bacteria, suspended in MPB with DMSO made for *S. aureus* $(1.5\pm0.6)\times10^7$, for *P. aeruginosa* $(4.1\pm0.4)\times10^8$ of cells/ml. Freezing by the programs 1 and 2 resulted in a considerable and true decrease in the number of *S. aureus* viable cells when using MPB with sucrose adding as a medium of preservation. In all the rest experimental variants the freezing did not cause a considerable and true decrease in the number of viable cells in *S. aureus* and *P. aeruginosa* (Table 1).

Таблица 1. Жизнеспособность бактерий *S.aureus* ATCC 25923 и *P.aeruginosa* ATCC 27853 после хранения образцов в жидком азоте в течение 3-х лет

Table 1. Viability of *S. aureus* ATCC 25923 and *P. aeruginosa* ATCC 27853 bacteria after the 3 years' sample storage in liquid nitrogen

Бактерии Bacteria	Среда консервирования Preservation medium	Режим охлаждения Cooling regimen	Количество жизнеспособных бактерий в 1 мл после хранения Amount of viable bacteria in 1 ml after storage			
			Контроль Control	1 год 1 year	2 года 2 years	3 года 3 years
			$\bar{X}\pm S\bar{x}$	$\bar{X}\pm S\bar{x}$	$\bar{X}\pm S\bar{x}$	$\bar{X}\pm S\bar{x}$
S. aureus	МПБ + 5% сахарозы MPB + 5% of sucrose	1	$(9,3\pm0,4)\times10^6$	$(8,5\pm0,5)\times10^6$	$(9,6\pm0,4)\times10^6$	$(8,9\pm0,4)\times10^6$
		2	$(7,7\pm0,4)\times10^6$	$(7,3\pm0,5)\times10^6$	$(7,6\pm0,4)\times10^6$	$(7,3\pm0,5)\times10^6$
	МПБ + 5% ДМСО MPB + 5% of DMSO	1	$(1,0\pm0,4)\times10^7$	$(1,0\pm0,4)\times10^7$	$(1,0\pm0,5)\times10^7$	$(9,9\pm0,4)\times10^7$
		2	$(9,1\pm0,3)\times10^6$	$(9,1\pm0,4)\times10^6$	$(9,2\pm0,5)\times10^6$	$(9,0\pm0,4)\times10^6$
P. aeruginosa	МПБ + 5% сахарозы MPB + 5% of sucrose	2	$(3,4\pm0,3)\times10^8$	$(3,3\pm0,5)\times10^8$	$(3,3\pm0,4)\times10^8$	$(3,1\pm0,5)\times10^8$
		3	$(2,1\pm0,4)\times10^8$	$(2,1\pm0,4)\times10^8$	$(2,1\pm0,4)\times10^8$	$(2,3\pm0,5)\times10^8$
	МПБ + 5% ДМСО MPB + 5% of DMSO	2	$(4,2\pm0,5)\times10^8$	$(4,1\pm0,4)\times10^8$	$(4,2\pm0,5)\times10^8$	$(4,1\pm0,3)\times10^8$
		3	$(3,8\pm0,4)\times10^8$	$(3,7\pm0,5)\times10^8$	$(3,7\pm0,4)\times10^8$	$(3,6\pm0,5)\times10^8$

Примечание: P – уровень доверительной вероятности между средними значениями после кратковременного замораживания и хранения в течение 3-х лет. P>0,05.

Notes: P is the level of confidence probability between average values after short-term freezing and storage during 3 years; P>0.05.

Таблица 2. Сохранность биологических свойств бактерий *S.aureus* АТСС 25923 после хранения при температуре жидкого азота в течение 3-х лет

Table 2. Integrity of biological properties of *S. aureus* ATCC 25923 after the 3 years' storage under liquid nitrogen temperature

Биологические свойства Biological properties		До криоконсерирования Before cryopreservation	Наличие признака впроцессе хранения,год Sign presence during storage,year					
			МПБ + 5% сахарозы MPB + 5% of sucrose			МПБ + 5% ДМСО MPB + 5% of DMSO		
			1	2	3	1	2	3
Гемолиз эритроцитов Erythrocyte hemolysis		+	+	+	+	+	+	+
Лецитовителазная реакция Lecithin – vitelline reaction		+	+	+	+	+	+	+
Каталаза Catalase		+	+	+	+	+	+	+
Плазмокоагулаза Plasmocoagulase		+	+	+	+	+	+	+
Чувствительность к новобиоцину (МИК 1,6 мкг/мл) Sensitivity to novobiocin (MIC 1.6 mkg/ml)		+	+	+	+	+	+	+
ДНК аза DNAase		+	+	+	+	+	+	+
Фосфатаза Phosphatase		+	+	+	+	+	+	+
Продукция ацетоина Acetoin production		+	+	+	+	+	+	+
Ферментация углеводов: Carbohydrate fermentation:	маннита mannitol	+	+	+	+	+	+	+
	мальтозы maltose	+	+	+	+	+	+	+
	сахарозы sucrose	+	+	+	+	+	+	+
	маннозы mannose	+	+	+	+	+	+	+

Примечание : + – наличие признака.

Notes: + is the sign presence.

эксперимента замораживание не вызывало достоверного снижения количества жизнеспособных клеток у *S.aureus* и *P.aeruginosa* (табл.1). В процессе хранения в течение 3-х лет (срок наблюдения) при стабильной температуре жидкого азота количество жизнеспособных бактерий во всех образцах не изменялось.

Изучение биологических свойств бактерий в процессе криоконсервирования показало, что охлаждение по разным программам в разных средах консервирования и последующее хранение в течение 3-х лет при стабильной температуре жидкого азота не вызывали изменения исследовавшихся биологических свойств бактерий (табл.2,3).

During the 3-years' storage (observation term) under the stable temperature of liquid nitrogen there was no change in a number of viable bacteria for all the samples.

The study of biological properties of bacteria during cryopreservation demonstrated, that the cooling with different programs in various preservation media and the following storage during 3 years did not cause the change in studied biological properties of bacteria (Table 2, 3).

Conclusions

The obtained results testify to a high efficiency of cryopreservation as the method of long-term storage of *S. aureus* and *P. aeruginosa* bacteria, providing the integrity of viable cells and their biological properties, being the tests for taxonomy and identification. At the

Таблица 3. Сохранность биологических свойств бактерий *P.aeruginosa* ATCC 27853 после хранения при температуре жидкого азота в течение 3-х лет

Table 3. Integrity of biological properties of *P. aeruginosa* ATCC 27853 after the 3 years' storage under liquid nitrogen temperature

Биологические свойства Biological properties		До криоконсервирования Before cryopreservation	Наличие или отсутствие признака в процессе хранения, год Sign presence or absence during storage, year					
			МПБ + 5% сахарозы MPB + 5% of sucrose			МПБ + 5% ДМСО MPB + 5% of DMSO		
			1	2	3	1	2	3
Синтез пиоцианина Pyocianine synthesis		+	+	+	+	+	+	+
Синтез пиовердина Pyoverdine synthesis		+	+	+	+	+	+	+
Рост бактерий при 42 °С на селективной среде "Псевдомонас АПС" Bacteria growth at 42°C on selective medium "Pseudomonas APS"		+	+	+	+	+	+	+
Цитохромоксидаза Cytochrome oxidase		+	+	+	+	+	+	+
Нитратредуктаза Nitrate reductase		+	+	+	+	+	+	+
Аргинингидролаза Arginine hydrolase		+	+	+	+	+	+	+
Желатиназа Gelatinase		+	+	+	+	+	+	+
Чувствительность к хлориду бария Barium chloride sensitivity		+	+	+	+	+	+	+
Окисление мочевины на среде Хью – Лейфсона Urea oxidation on Hugh – Leifson's medium		+	+	+	+	+	+	+
Окисление маннита на среде Хью – Лейфсона Mannitol oxidation on Heugh – Leifson's medium		+	+	+	+	+	+	+
Подвижность на среде Олькеницкого Motility on Olkenitsky's medium		+	+	+	+	+	+	+
Рост на среде Симмонса Growth on Simmons' medium		+	+	+	+	+	+	+
Ферментация углеводов: Carbohydrate fermentation:	сорбита sorbitol	–	–	–	–	–	–	–
	мальтозы maltose	–	–	–	–	–	–	–
	лактозы lactose	–	–	–	–	–	–	–
	глюкозы glucose	+	+	+	+	+	+	+
	сахарозы sucrose	+	+	+	+	+	+	+
	иннозита inositol	+	+	+	+	+	+	+
	рамнозы rhamnose	–	–	–	–	–	–	–

Примечание : + – наличие признака; – отсутствие признака.

Notes: + is the sign presence; – is the sign absence.

Выводы

Полученные результаты свидетельствуют о высокой эффективности криоконсервирования как метода долгосрочного хранения бактерий *S.aureus* и *P.aeruginosa*, обеспечивающего сохранность жизнеспособных клеток и их биологических свойств, являющихся тестами для таксономии и идентификации. На этапе охлаждения возможна гибель части бактерий, избежать которую удается подбором режима охлаждения. Показана возможность использования МПБ с добавлением сахарозы или ДМСО в качестве среды консервирования при криоконсервировании бактерий.

Литература

1. Криобиология и биотехнология/ Под общ. ред. А.А. Цуцаевой.– Киев: Наук. думка, 1987.– 216 с.
2. *Лабинская А.С.* Микробиология с техникой микробиологических исследований.– М.: Медицина, 1978.– 394 с.
3. *Луста К.А.,Фихте Б.А.* Методы определения жизнеспособности микроорганизмов.– Пущино, 1990.–186 с.
4. Медицинская микробиология. Часть первая / Под ред. А.М.Королюка, В.Б. Сбойчакова.– СПб, 1999.– 272 с.
5. Пат. 37995 А Україна, МПК[7] С12 N1/04, А 61L2 / 18. Спосіб зберігання і транспортування біоматеріалу/ І.П. Висеканцев, Т.М. Гуріна.– Заявлено 15.05.2000. Опубл. 15.05.2001. Бюл.№4. ІІ.– С. 1.133.
6. *Підгорський В.С., Головач Т.М., Суденко В.І.* Депонування мікроорганізмів при патентуванні винаходів та його наслідки для винахідника // Мікробіол. журн.– 2001.– Т.63, №1.– С. 56-61.
7. *Поздеев О.К.* Медицинская микробиология / Под ред. В.И.Покровского.– М.: ГЭОТАР-МЕД, 2001.– 768 с.
8. *Приседський Ю.Г.* Статична обробка результатів біологічних експериментів: Навч. посіб.– Донецьк: Донец. держ. ун-т, 1999.– 210 с.
9. Холодовой стресс и биологические системы / Под ред. А.А. Цуцаевой.– Киев: Наук.думка, 1991.– 176 с.
10. *Hubalek Z.* Cryopreservation of Microorganisms at Ultra - Low Temperatures.– Prague: Akademia, 1996.– P. 368-374.
11. *Simione F.P., Brown E.M.* "ATCC Preservation Methods: Freezing and Freeze-Drying", 2nd ed. American Type Culture Collection-Rockville, MD, 1991.– P. 37-45.

Поступила 18.05.2003

stage of cooling the death of a part of bacteria is possible, which is managed to be avoided by the cooling regimen selection. The possibility of MPB usage with sucrose or DMSO adding as the preservation medium during bacteria cryopreservation was shown.

References

1. Cryobiology and biotechnology/Ed. by Tsutsayeva A.A.– Kiev: Naukova dumka, 1987.– 216 p.
2. *Labinskaya A.S.* Microbiology with the technique of microbiological studies.– M.: Meditsina, 1978.– 394 p.
3. *Lusta K.A., Fikhte B.A.* Methods for determination of microorganisms' viability.– Puschino 1990.– 186 p.
4. Medical microbiology. Part I / Ed. by Korolyuk A.M., Sbojchakova V.B.– St. Petersburg, 1999.– 272 p.
5. Patent 37995 A Ukraine, IPC[7] C12 N1/04, A 61L2/18. Way for storage and transportation of biomaterial / Vysekantsev I.P., Gurina T.M.– Applied 15.05.2000.– Published 15.05.2001. Bull N4. II.– P.1.133.
6. *Pidgorsky V.S., Golovach T.M., Sudenko V.I.* Deposition of microorganisms when patenting innovations and its consequences for innovator // Microbiol. Zhurnal.– 2001.– Vol.63, N1.– P.56-61.
7. *Pozdeyev O.K.* Medical microbiology / Ed. by Pokrovsky V.I.– M.: GEOTAR-MED, 2001.– 768 p.
8. *Prisedsky Yu.G.* Statistical processing of results of biological experiments: Manual.– Donetsk: Donetsk State University, 1999.– 210 p.
9. Cold stress and biological systems/ Ed. by Tsutsayeva A.A.– Kiev: Naukova Dumka, 1991.– 176 p.
10. *Hubalek Z.* Cryopreservation of microorganisms at ultra-low temperatures.– Prague: Akademia, 1996.– P. 368-374.
11. *Simione F.P., Brown E.M.* "ATCC Preservation Methods: Freezing and Freeze-Drying", 2nd ed. American Type Culture Collection-Rockville, MD, 1991.– P. 37-45.

Accepted in 18.05.2003