

УДК 579.22/24.086.13:602.3

М.Є. Романько^{1*}, В.О. Ушкалов², А.П. Палій¹, А.П. Палій³,
Р.В. Петров⁴, Л.П. Лівощенко⁴, Є.М. Лівощенко⁴

Фізіологічна активність бактерій *Salmonella* spp. після ліофілізації та регідратації

UDC 579.22/24.086.13:602.3

M.Y. Romanko^{1*}, V.O. Ushkalov², A.P. Paliy¹, A.P. Paliy³, R.V. Petrov⁴,
L.P. Livoshchenko⁴, Ye.M. Livoshchenko⁴

Physiological Activity of *Salmonella* spp. Bacteria After Lyophilization and Rehydration

Ключові слова: дихальна активність, клітина, ліофілізація, мембранні фракції, H⁺-АТФ-азна активність, регідратація.
Key words: respiratory activity, cell, lyophilization, membrane fractions, H⁺-ATPase activity, rehydration.

Ліофілізація мікроорганізмів передбачає етапи заморожування та висушування [4], які є екстремальними чинниками та викликають різні uszkodження клітин. Досліджувалися такі фізико-хімічні характеристики клітин, як швидкість та глибина заморожування біомаси, формування та локалізація кристалів льоду, концентрування розчинених речовин, фазові переходи ліпідів у мембранах тощо [5]. Вживання мікробних клітин у даних екстремальних умовах потребує затрат енергії, яка за відсутності позаклітинних поживних речовин генерується за рахунок власних ресурсів клітини. При цьому важливу роль відіграє вихідний стан структурних компонентів мембран, а також функціональний статус клітини в цілому [1]. Не менш значущою є природа структурних uszkodжень мікробних клітин та їх загальний статус [6].

Однією з основних фундаментальних задач сучасних біотехнологій залишається дослідження впливу екстремальних низьких температур на перебудову метаболізму та фізіологічні реакції клітин, від стану яких залежить життєздатність штамів мікроорганізмів, які можуть бути використані для виробництва імунобіологічних засобів та діагностичних тест-систем за умов їх тривалого зберігання.

Метою роботи було вивчення впливу ліофілізації та регідратації на деякі фізіологічні показники

Lyophilization of microorganisms foresees their freezing and drying [6], being the extreme factors and able to cause various damages to cells. Here, we have studied the physical and chemical characteristics of cells such as: the rate and depth of biomass freezing, formation and localization of ice crystals, concentration of dissolved substances, lipid phase transitions in membranes, *etc.* [2]. The survival of microbial cells under these extreme conditions needs the energy consumption, generated at the expense of own resources of a cell if no extracellular nutrients are present. In this case, both an initial state of membrane structural components and the functional status of cell as a whole are of a great importance [1]. The nature of structural damages to microbial cells and their general status are equally significant [4].

One of the main fundamental tasks in current biotechnologies is to study the effect of extreme low temperatures on metabolic rearrangements and physiological responses of cells, the state of which determines the viability of microbial strains, that can be used to manufacture the immune biological agents and diagnostic test systems under their long-term storage.

The purpose of this study was to investigate the impact of lyophilization and rehydration on some physiological indices of functional activity of *Salmonella* spp. cells: *Salmonella enterica* subsp. *enterica*

¹Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», м. Харків

²Національний університет біоресурсів та природокористування України, м. Київ

³Державний біотехнологічний університет, м. Харків

⁴Сумський національний аграрний університет, м. Суми

¹ National Scientific Center "Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine", Kharkiv

² National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, Kyiv

³ State Biotechnological University, Kharkiv

⁴ Sumy National Agrarian University, Sumy

***Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію:**

вул. Пушкінська, 83, м. Харків, Україна 61023;
тел.: (+38 068) 225-34-34
електронна пошта: marina_biochem@ukr.net

***To whom correspondence should be addressed:**

83, Pushkinska str., Kharkiv, Ukraine 61023;
tel.: +380 66 225 3434
e-mail: marina_biochem@ukr.net

Надійшла 09.02.2021

Прийнята до друку 18.05.2022

Received 09, February, 2021

Accepted 18, May, 2022

© 2022 M.Y. Romanko, *et al.* Published by the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted reuse, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

функціональної активності клітин *Salmonella* spp.: *Salmonella dublin* (штам 12), *Salmonella typhimurium* (штам 16), *Salmonella enteritidis* (штам 34). Біомасу нативних (контроль) та після ліофілізації/регідратації клітин мікроорганізмів із дотриманням умов асептики накопичували на м'ясо-пептонному бульйоні (МПБ) з 1% глюкози, рН 7,4. У кожній серії досліджень концентрація мікробних клітин у біомасі становила $(10,0 \pm 0,5) \times 10^9$ колонієутворюючих одиниць ((КУО)/мл).

Ліофільне висушування біомаси клітин прокаріотів проводили з додаванням аліквоти стерильного захисного середовища Файбича (1:1), яке містило 10% сахарози та 1% желатину, на ліофільній установці «ALPHA 1-4 LD-2» (MartinChrist, Німеччина) згідно з чинними вимогами (ДСТУ ISO 13408-3:2006. Асептична обробка виробів, призначених для охорони здоров'я. Ліофілізація). Препарати ліофілізатів бактеріальних клітин зберігали за температури -20°C протягом 24 годин. Повторного заморожування препаратів не допускали. Регідратацію біомаси бактеріальних клітин проводили шляхом додавання до ліофілізатів МПБ з вмістом 5% печінкової води, 2% середовища 199, 1% глюкози та культивували за температури $(37,0 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ із подальшим пересіванням на відповідне агаризоване середовище. Біологічні характеристики культур *Salmonella* spp. контролювали за відновленням дихальної активності ізольованих бактеріальних клітин та H^+ -АТФ-азної активності у сумарних мембранних фракціях клітин [2, 3].

Препарати сумарних мембранних фракцій (СМФ) клітин сальмонел одержували за схемою: ресуспендування клітин у середовищі виділення (0,25 М сахарози, 25 мМ Трис-НСІ, 2 мМ ЕДТА, рН 7,4), оброблення ультразвуком за допомогою ультразвукового диспергатора УЗДН-1 (Spectrometer 65, Україна), 22 кГц, сила анодного струму 0,4–0,7 А, резонансні умови), диференційне центрифугування при 10 000g, збирання осаду, ресуспендування у середовищі (10 мМ Трис-НСІ, 4 мМ MgCl_2 , 1 мМ дитіотрейтолу, рН 7,4). Препарати СМФ аналізували за вмістом білка при зберіганні за температури -20°C через 24 години. Стандартним білком для побудови калібрувальної кривої був бичачий сироватковий альбумін.

Стан фізіологічних показників клітин прокаріотів до (контроль) та одразу після ліофілізації/регідратації оцінювали за такими показниками: інтенсивністю росту культур *Salmonella* spp. у динаміці 25 годин, яку виражали у вигляді кінетичних кривих; інтенсивністю ендогенного дихання — визначення інтенсивності питомої дихальної активності (питома ДА) в ізольованих клітинах та питомої H^+ -АТФ-азної активності — у СМФ клітин [2, 3].

serotype Dublin (*S. dublin*) (strain 12), *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotype *Typhimurium* (*S. typhimurium*) (strain 16), *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotype *Enteritidis* (*S. enteritidis*) (strain 34). The biomass of native (control) microbial cells and those after lyophilization and rehydration was accumulated under aseptic conditions in meat-peptone broth (MPB) with 1% glucose, pH 7.4. In each experimental series, the concentration of microbial cells in biomass was $(10.0 \pm 0.5) \times 10^9$ colony-forming units ((CFUs/ml)).

Prokaryotic cell biomass was lyophilized with adding an aliquot of Faibich sterile protective medium (1:1), containing 10% sucrose and 1% gelatin, using the 'ALPHA 1-4 LD-2' freeze-drier (MartinChrist, Germany) according to the current requirements (DSTU ISO 13408-3:2006. Aseptic processing of products intended for health care. Lyophilization). Specimens of bacterial cell lyophilisates were stored at -20°C for 24 hrs. Repeated freezing of the specimens was not allowed. Bacterial cell biomass was rehydrated by supplementing lyophilisates with MPB, containing 5% liver broth, 2% medium 199, 1% glucose and cultured at $(37.0 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ with further inoculation to the appropriate agar medium. Biological characteristics of *Salmonella* spp. cultures were monitored by restored respiratory activity of isolated bacterial cells and H^+ -ATPase activity in total membrane fractions of cells [3, 5].

Specimens of total membrane fractions (TMFs) of *Salmonella* cells were procured according to the following scheme: cell resuspension in the isolation medium (0.25 M sucrose, 25 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, pH 7.4), ultrasonic treatment with an ultrasonic disperser UZDN-1 (Spectrometer 65, Ukraine), 22 kHz, 0.4–0.7 A anode current strength, resonant conditions), differential centrifugation at 10,000g, pellet collection, resuspension in the medium (10 mM Tris-HCl, 4 mM MgCl_2 , 1 mM dithiothreitol, pH 7.4). The TMFs samples were analysed for protein content when stored at -20°C in 24 hrs. For plotting a calibration curve, the bovine serum albumin was used as the standard protein.

State of physiological indices of prokaryotic cells prior to (control) and immediately after lyophilization and rehydration was evaluated by the following indices: the growth intensity of *Salmonella* spp. culture in dynamics within 25 hrs, expressed as kinetic curves; the intensity of endogenous respiration, *i. e.* detection of specific respiratory activity (specific RA) intensity in isolated cells and the specific H^+ -ATPase activity in TMFs cells [3, 5].

The results were statistically processed using the 'Excel 2003' software (Microsoft, USA) using the Student's t-test ($p < 0.05$). In order to obtain



Статистичний аналіз результатів проводили за допомогою програми «Excel 2003» (Microsoft, США) з використанням t-критерію Стюдента ($p < 0,05$). Для одержання статистично значущих результатів під час виконання досліджень на ізольованих СМФ клітин зазначені параметри визначали у 5-кратній повторності з трьома паралельними пробами зразків.

За результатами дослідження встановлено, що кінетичні криві росту культур дослідних штамів *Salmonella* spp. до (контроль) та після ліофілізації/регідратації у динаміці 25 годин культивування за характером кривизни є подібними та класичними для швидкорослих мікроорганізмів.

Тривалість лог-фази росту *Salmonella* spp. як до (контроль), так й після ліофілізації/регідратації, дорівнювала у середньому 1,5–2,0 години. Поступове накопичення біомаси та максимальну кількість утворення клітин усіх дослідних штамів реєстрували включно до 25-ї години культивування, що відповідає за прийнятою класифікацією фаз розвитку бактеріальних популяцій фазі експоненціального росту (лог-фаза). При цьому для періодичних культур нативних клітин усіх штамів *Salmonella* spp. лог-фаза тривала з 3-ї по 7-му годину відповідно.

Для регідратованих клітин дослідних штамів *Salmonella* spp. лог-фаза тривала довше за часом — з 6-ї по 8-му годину, у подальшому динаміка росту культур була подібною для усіх штамів. Цей факт свідчить про рівновагу між кількістю утворення та кількістю померлих бактерій, що притаманно стаціонарній фазі росту. При цьому кількість накопичення біомаси нативних клітин (контроль) перевищувала таку після ліофілізації/регідратації: максимальна кількість їх утворення досягала через 25 годин культивування у середньому $(10,2 \pm 0,3) \times 10^9$ КУО/мл, а після регідратації — $(6,3 \pm 0,2) \times 10^9$ КУО/мл. Таким чином, зберігання культур *Salmonella* spp. у ліофілізованому стані призводить до зниження інтенсивності приросту біомаси усіх дослідних штамів після регідратації. Внаслідок зберігання бактеріальної біомаси у більшості ліофілізованих штамів зареєстровано пригнічення питомої ДА порівняно з контрольним рівнем (до ліофілізації/регідратації) (табл. 1).

Отже, значуще зниження рівня питомої ДА у регідратованих клітин *S. enteritidis* 34 і *S. typhimurium* 16 складало 33,6 і 232,0% ($p < 0,05$) відповідно. Визначено, що для регідратованих клітин *S. dublin* 12 рівень ендогенної ДА статистично не змінювався та наближався до контрольного. Після додавання дихального субстрату до середовища інкубації в кінцевій концентрації 1% за об'ємом встановлено, що рівень питомої ДА значно підвищився у регідрато-

the significant results during studies in the isolated TMFs cells, the specified parameters were determined in 5-fold replication with three parallel samplings.

Based on these findings, the kinetic growth curves of the studied *Salmonella* spp. strain cultures prior to (control) and after lyophilization/rehydration in dynamics of a 25-hour culture were established to be similar and typical for fast-growing microorganisms by the nature of curvature.

Duration of log-phase growth for *Salmonella* spp. both before (control) and after lyophilization/rehydration was 1.5–2.0 hrs. Gradual accumulation of biomass and the maximum number of cell formation of all the studied strains were recorded up to the 25th hour of culture, which corresponded to the phase of exponential growth (log phase) according to the accepted grading of growth phases of bacterial populations. Herewith, for the native cell batch cultures of all *Salmonella* spp. strains, the log phase lasted from the 3rd to 7th hour, respectively.

For rehydrated cells of the studied *Salmonella* spp. strains, the log phase lasted longer in time: from the 6th to 8th hour; the dynamics of culture growth was similar for all the strains. This fact testified to a balance between the number of formed and dead bacteria, inherent in the stationary phase of bacterial growth. Herewith, in terms of biomass accumulation, the native cells (control) exceeded those after lyophilization/rehydration, *i. e.* the maximum amount of their formation reached on average $(10.2 \pm 0.3) \times 10^9$ CFUs/ml after 25-hour culture, and it did $(6.3 \pm 0.2) \times 10^9$ CFUs/ml after rehydration. Thus, the storage of *Salmonella* spp. cultures in a lyophilized state resulted in a decreased intensity of their biomass growth for all studied strains after rehydration. Most lyophilized strains showed the inhibition of specific RA if compared with the control level (prior to lyophilization/rehydration) due to bacterial biomass storage (Table 1).

Thus, a significant decrease in specific RA level in rehydrated cells of *S. enteritidis* 34 and *S. typhimurium* 16 was 33.6 and 232.0% ($p < 0.05$), respectively. It was determined that for rehydrated *S. dublin* 12 cells, the level of endogenous RA remained significantly unchanged and approached the control one. After supplementing the incubation medium with respiratory substrate in a final concentration of 1% by volume, the level of specific RA was found to be significantly increased in rehydrated bacterial cells of all studied strains. For rehydrated cells of the studied *Salmonella* spp. strains there was recorded an enhancement of respiration intensity by 2.2–2.7 times on average ($p < 0.05$) relative to the cell index of these strains without glucose supplement. The established fact testified to the dependence of



Таблиця 1. Питома дихальна активність клітин дослідних штамів *Salmonella* spp. у стаціонарній фазі росту до (контроль) та після ліофілізації/регідратації ($M \pm m$; $n = 5$)

Table 1. Specific respiratory activity of the studied *Salmonella* spp. cell strains in stationary phase of bacterial growth prior to (control) and after lyophilization/rehydration ($M \pm m$; $n = 5$)

Дослідні штами <i>Salmonella</i> spp. Studied strains of <i>Salmonella</i> spp.	Питома ДА, мгО ₂ /л·хв·мг Specific RA, mgO ₂ /l·min·mg		
	Нативні клітини (контроль) Native cells (control)	Після ліофілізації/регідратації After lyophilization/rehydration	
		без додавання дихального субстрату without supplemented respiratory substrate	з додаванням дихального субстрату (глюкоза 1 %) with supplemented respiratory substrate (1 % glucose)
<i>S. enteritidis</i> 34	2,260 ± 0,010	1,500 ± 0,010*	3,40 ± 0,09**
<i>S. dublin</i> 12	1,050 ± 0,003	0,920 ± 0,003	1,99 ± 0,03**
<i>S. typhimurium</i> 16	3,520 ± 0,040	1,060 ± 0,005*	2,83 ± 0,07**

Примітка: Різниця значуща відносно показника контролю (*) та клітин без додавання дихального субстрату (#), $p < 0,05$.

Note: Difference is significant relative to the control (*) and the cells free of respiratory substrate supplement (#), $p < 0.05$.

ваних клітин бактерій усіх дослідних штамів. Для регідратованих клітин дослідних штамів *Salmonella* spp. реєстрували посилення інтенсивності дихання у середньому в 2,2–2,7 рази ($p < 0,05$) відносно показника клітин цих штамів без додавання глюкози. Встановлений факт свідчить про залежність дихальної активності клітин від типу субстрату та технологічну можливість її коригування.

Значення активності мембранної Н⁺-АТФ-ази клітин дослідних штамів *Salmonella* spp. після ліофілізації/регідратації значуще зростали відносно її контрольного рівня. Виявляється, що підвищення ензиматичної активності клітин *S. enteritidis* 34; *S. dublin* 12 і *S. typhimurium* 16 складає у середньому 236,2; 194,1 і 284,0% ($p < 0,05$) відповідно (табл. 2).

Можна зазначити, що різниця трансмембранного потенціалу на мембранах регідратованих клітин *Salmonella* spp. усіх дослідних штамів у процесі відтворення їхньої життєздатності забезпечується лише ензиматичною системою Н⁺-АТФ-ази, яка знаходиться у більш активному функціональному стані, ніж у нативних клітин таких штамів. При цьому кінетика цих клітин є основним молекулярним механізмом генерації зростання.

Отже, за результатами визначення фізіологічних показників репродуктивної та енергоперетворювальної систем (за інтенсивністю приросту біомаси клітин, індукцією мембранної Н⁺-АТФ-ази та достатнім рівнем ендогенної ДА) встановлено, що клітини *S. dublin* 12 можуть потенційно проявляти кріорезистентність за умов ліофілізації/регід-

cell respiratory activity on the substrate type and technological possibility of its adjustment.

The membrane H⁺-ATP-ase activity of the studied *Salmonella* spp. strain cells after lyophilization/rehydration was significantly increased relative to its control level. A raise in enzymatic activity of *S. enteritidis* 34; *S. dublin* 12 and *S. typhimurium* 16 cells was found to average 236.2; 194.1 and 284.0% ($p < 0.05$), respectively (Table 2).

We can note that the difference in transmembrane potential on the rehydrated cell membranes in all the studied *Salmonella* spp. strains during reproducing their viability is provided by the H⁺-ATP-ase enzymatic system only, which functional state is more active than in native cells of these strains. At the same time, their kinetics is the main molecular mechanism for growth generation

So, proceeding from the results of detecting physiological indices of reproductive and energy-transforming systems (the intensity of cell biomass growth, membrane H⁺-ATP-ase induction and sufficient level of endogenous RA), the *S. dublin* 12 cells were established as potentially capable to show the cryoresistance under lyophilization/rehydration. It is obvious, that the generators of transmembrane potential of *S. dublin* cells of this strain are in a more active functional state than others, since ATPase kinetics is the main molecular mechanism for the formation of its value generation. We can assume that during lyophilization and rehydration, the structural and functional damages to *S. dublin* strain cells will be less significant as compared with other cells of this species.



Таблиця 2. Питома Н⁺-АТФ-азна активність мембранної фракції клітин дослідних штамів *Salmonella* spp. до (контроль) та після ліофілізації/регідратації ($M \pm m$; $n = 5$)

Table 2. Specific H⁺-ATPase activity of membrane fraction of the studied *Salmonella* spp. strain cells prior to (control) and after lyophilization/rehydration ($M \pm m$; $n = 5$)

СМФ клітин прокариотів дослідних штамів TMFs of prokaryotic cells of studied strains	Питома активність Н ⁺ -АТФ-ази, мкМольР _i /хв мг білка Specific H ⁺ -ATPase activity, $\mu\text{MolP}_i/\text{min mg of protein}$	
	СМФ нативних клітин (контроль) TMFs of native cells (control)	СМФ клітин після ліофілізації/регідратації TMFs of cells after lyophilization/rehydration
<i>S. enteritidis</i> 34	2,32 \pm 0,90	7,80 \pm 0,12*
<i>S. dublin</i> 12	3,40 \pm 0,05	10,00 \pm 0,95*
<i>S. typhimurium</i> 16	2,50 \pm 0,15	9,60 \pm 0,40*

Примітка: * — різниця значуща відносно нативних клітин, $p < 0,05$.

Note: * – difference is significant relative to native cells, $p < 0.05$.

ратації. Очевидно, що генератори трансмембранного потенціалу клітин *S. dublin* цього штаму знаходяться в активнішому функціональному стані, ніж інші, оскільки кінетика АТФ-ази є основним молекулярним механізмом формування генерації його величини. Можна припустити, що під час ліофілізації та регідратації структурно-функціональні пошкодження клітин штаму *S. dublin* будуть менші порівняно з іншими клітинами цього виду.

Таким чином, визначена у клітин штамів *S. enteritidis* 34 і *S. typhimurium* 16 стимуляція Н⁺-АТФ-ази на тлі гальмування активності ендogenous дихання є доказом впливу ліофілізації/регідратації на стан основних структурних компонентів їхніх мембран (ліпідів і протеїнів) під час активного відновлення життєздатності. У даному випадку у мембранах клітин цих штамів можна очікувати на значні структурно-функціональні перебудови, які будуть негативно впливати на їхній біологічний потенціал (проліферативна активність, вірулентність, імуногенність тощо).

Отримані результати свідчать про індивідуальний (у межах одного таксономічного виду мікроорганізмів) характер впливу процесів ліофілізації/регідратації на функціональний стан клітин прокариотів. Визначені фізіолого-біохімічні реакції клітин прокариотів дослідних штамів внаслідок ліофілізації та регідратації будуть знижувати проліферативну активність цих мікроорганізмів, що підвищить собівартість технологій біологічного виробництва та спричинить значні економічні збитки. Дана проблема спонукає науковців до пошуку речовин, які є потенційними модуляторами фізіолого-біохімічних реакцій мікроорганізмів та можуть регулювати накопичення біомаси клітин промислових штамів.

Thus, the stimulation of H⁺-ATPase detected in *S. enteritidis* 34 and *S. typhimurium* 16 strain cells jointly with the activity inhibition of endogenous respiration evidences the lyophilization/rehydration impact on the state of main structural components of their membranes (lipids and proteins) during active recovery of viability. In this case, we may expect the significant structural and functional rearrangements in cell membranes of these strains, which will negatively affect their biological potential (proliferative activity, virulence, immunogenicity, etc.).

Our findings testify to an individual (within one taxonomic species of microorganisms) character of the lyophilization/rehydration impact on functional state of prokaryotic cells. The identified physiological and biochemical responses of prokaryotic cells of the studied strains resulted from lyophilization and rehydration will reduce the proliferative activity of these microorganisms, that may augment the cost of biological production technologies and cause significant economic losses. This issue encourages the scientists to search for the substances being the potential modulators of physiological and biochemical reactions of microorganisms and capable of regulating the biomass accumulation of industrial strain cells.

References

1. Dubinina YY, Pustugina AV. [Oxidative modification of proteins, its role in pathological conditions]. Ukr Biokhim Zh. 2008; 80(6): 5–18. Russian.
2. Kharchuk IA. [Cryostasis: basic concepts and the accompanying processes]. Ekologiya morya. 2005; 70: 62–78. Russian.
3. Prohorova MI. [Biochemical research methods (lipid and energy metabolism)]. Leningrad: Leningrad State University; 1989. 272 p. Russian.



Література

1. Дубинина ЕЕ, Пустыгина АВ. Окислительная модификация протеинов, её роль при патологических состояниях. Украинський біохімічний журнал. 2008; 80(6): 5–18.
2. Прохорова МИ. Методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен). Ленинград: ЛГУ; 1989. 272 с.
3. Трахтенберг ІМ, Ульберг ЗР, Чекман ІС, та ін. Оцінка безпеки лікарських нанопрепаратів. Методичні рекомендації. Київ; 2013. 108 с.
4. Уховський ВВ, Палій АП, Тарасов ОА, та ін. Застосування гліцерину та ДМСО для кріоконсервування лептоспір *Leptospira interrogans*. Проблеми кріобіології і кріомедицини. 2019; 29(1):102–6.
5. Харчук ІА. Анабиоз: основные понятия и сопровождающие его процессы (обзор). Экология моря. 2005; 70: 62–78.
6. Rezaeinejad S, Ivanov V. Heterogeneity of *Escherichia coli* population by respiratory activity and membrane potential of cells during growth and long-term starvation. Microbiol Res. 2011; 66(2): 129–35.
4. Rezaeinejad S, Ivanov V. Heterogeneity of *Escherichia coli* population by respiratory activity and membrane potential of cells during growth and long-term starvation. Microbiol Res. 2011; 66 (2): 129–35.
5. Trakhtenberh IM, Ul'berh ZR, Chekman IS, et al. [Assessment of safety of medicinal nanopreparations]. Guidelines. Kyiv; 2013. 108 p. Ukrainian.
6. Ukhovskyi VV, Paliy AP, Tarasov OA, et al. Using of glycerol and DMSO for *Leptospira interrogans* cryopreservation. Probl Cryobiol Cryomed. 2019; 29(1): 102–6.

