

## Сохранность биологических свойств бактерий рода *Enterococcus* после криоконсервирования

UDC 57.043:579

M.N. KALASHNYKOVA<sup>1\*</sup>, E.G. PERETYATKO<sup>2</sup>

## Integrity of Biological Properties of *Enterococcus* Bacteria After Cryopreservation

Наиболее распространенными источниками внутрибольничных и гнойно-септических инфекций являются бактерии рода *Enterococcus* [1, 5]. Для разработки методов диагностики, профилактики и терапии заболеваний, вызываемых этими бактериями, необходимо создание коллекций эталонных штаммов и клинических изолятов данных бактерий. Наиболее перспективный метод долгосрочного хранения энтерококков в коллекциях микроорганизмов – криоконсервирование. Работ по криоконсервированию бактерий рода *Enterococcus* в доступной литературе мало и они фрагментарны.

Цель работы – изучение влияния режимов охлаждения и состава консервирующих сред на жизнеспособность бактерий рода *Enterococcus*, а также исследование сохранности их биохимических и некоторых биологических свойств после криоконсервирования.

### Материалы и методы

Объектами исследования служили штаммы *E. faecalis* ATCC № 29213 и клинические штаммы *E. faecium* №113 и №167, выделенные от больных пиелонефритом. Культуры выращивали на энтерококк-агаре в течение 48 ч при 37°C. Бактериальные клетки смывали дистиллированной водой, физиологическим раствором натрия хлорида и сахарным бульоном [4]. Суспензию бактерий вносили (по 1,0 мл) в криопробирки объемом 1,8 мл и замораживали по трем режимам: 1 – быстрое погружение образцов в жидкий азот; 2 – охлаждение со скоростью 1°C/мин от 18 до –40°C с последующим погружением в жидкий азот; 3 – охлаждение со скоростью 2–3°C/мин от 18 до –28°C, выдерживание при этой температуре в течение 15 мин, и последующее погружение в жидкий азот. Образцы хранили в жидком азоте, отогревали на водяной

The most spread sources of intra-hospital and pyo-septic infections are *Enterococcus* bacteria [1, 5]. To develop the methods for diagnosis, prophylaxis and therapy of the diseases, caused by these bacteria it is necessary to establish the collections of reference strains and clinical isolates of these bacteria. Cryopreservation is the most perspective method of long-term storage of enterococci in the collections of microorganisms. The papers devoted to the questions of cryopreservation of *Enterococcus* bacteria in available literature are inconsiderable in number and fragmentary.

The research aim was to study the effect of cooling regimens and composition of preserving media on viability of *Enterococcus* bacteria as well as to investigate the survival of biochemical and biological properties of bacteria after cryopreservation.

### Materials and methods

The research objects were strains of *E. faecalis* ATCC N 29213 and two clinical strains of *E. faecium* N113 and N167 isolated from the patients with pyelonephritis. The cultures were grown on enterococcal agar for 48 hrs at 37°C. Bacterial cells were washed-out with distilled water, physiological solution of NaCl and sugar broth [4]. Bacterial suspension of 1.0 ml volume were introduced into 1.8 ml cryovials and freezing was performed according to 3 regimens: regimen 1 was a rapid plunging of samples into liquid nitrogen; regimen 2 comprised cooling with the rate of 1°C/min from 18°C down to –40°C and following submersion into liquid nitrogen; regimen 3 consisted of cooling with the rate of 2–3°C/min from 18°C down to –28°C, maintaining at this temperature for 15 min and following immersion into liquid nitrogen. The samples were stored in liquid nitrogen and warmed on water bath at 37°C. Bacterial viability was evaluated with Koch dish method

<sup>1</sup>Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

<sup>2</sup>ГУ "Институт микробиологии и иммунологии им. И.И. Мечникова АМН Украины", г. Харьков

\* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию: ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 373-31-26, факс: +38 (057) 373-30-84, электронная почта: cryo@online.kharkov.ua

<sup>1</sup>Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

<sup>2</sup>I.I. Mechnikov Institute of Microbiology and Immunology of the Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

\* To whom correspondence should be addressed: 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +380 57 373 3126, fax: +380 57 373 3084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

бане при 37°C. Жизнеспособность бактерий оценивали чашечным методом Коха [2], а их биохимические свойства изучали с помощью набора EN-COCCUStest (PLIVA-Lachema Diagnostika, Чешская республика). Дополнительно определяли резистентность бактерий к теллуриту калия, каталазную, гемолитическую активность и подвижность [3]. Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью t-критерия Стьюдента, значения  $p \leq 0,05$  считали достоверными.

### Результаты и обсуждение

Жизнеспособность бактерий *Enterococcus faecalis* при замораживании по всем режимам была достоверно ниже исходной ( $p \leq 0,05$ ), кроме бактерий, суспендированных в сахарном бульоне после охлаждения по режиму 3 (оставалась на уровне контроля). При замораживании бактерий *Enterococcus faecium* (штамм № 167), суспендированных в дистиллированной воде и сахарном бульоне, количество живых клеток, замороженных по режиму 3, достоверно снижалось по сравнению с контролем, а в образцах, замороженных по режимам 1 и 2, наблюдалась тенденция к их снижению. При замораживании бактерий в физиологическом растворе большую выживаемость клеток обеспечивало охлаждение по режиму 2 (выживаемость клеток на уровне контроля), более низкую – по режимам 1 и 3.

В экспериментах с бактериями *Enterococcus faecium* (штамм № 113) жизнеспособность клеток, суспендированных в дистиллированной воде по всем режимам, после замораживания оставалась на уровне контроля. Количество живых клеток, суспендированных в физиологическом растворе по режимам 2 и 3, после замораживания также оставалось на уровне контроля, а по режиму 1 достоверно отличалось от него. Напротив, при замораживании исследуемых бактерий в сахарном бульоне количество живых клеток по сравнению с контрольными образцами достоверно отличалось после охлаждения по режимам 2 и 3, а при охлаждении по режиму 1 – оставалось на уровне контроля.

Установлено, что режим охлаждения и состав среды консервирования не влияют на сохранность биохимических свойств криоконсервированных бактерий рода *Enterococcus*. Кроме того, не выявлены изменения каталазной, гемолитической активности, подвижности и резистентности к теллуриту калия.

### Выводы

1. Показана возможность эффективного криоконсервирования бактерий рода *Enterococcus*.
2. На жизнеспособность энтерококков в процессе криоконсервирования оказывают влияние сос-

[2]. Biochemical properties were studied using the EN-COCCUStest kit (PLIVA-Lachema Diagnostika, Czech Republic). Resistance of bacteria to potassium tellurite, catalase and hemolytical activities, motility [3] were additionally determined. The data were statistically processed using t-Student's criterion, the values  $p \leq 0.05$  were considered as statistically significant.

### Results and discussion

When freezing *Enterococcus faecalis* bacteria according to the regimens the viability of bacteria was statistically and significantly lower than initial number ( $p \leq 0.05$ ) except the bacteria suspended on sugar broth after cooling on regimen 3, it remained at the control level. During freezing of *Enterococcus faecium* bacteria N 167, suspended in distilled water and sugar broth, the number of living cells, frozen on regimen 3, statistically significantly reduced compared with the control and in the samples frozen with regimens 1 and 2 had a tendency to the reduction. When freezing the bacteria in physiological solution the cooling on regimen 2 provided high survival (cell survival at the control level) and a lower one according to regimens 1 and 3.

In the experiments with *Enterococcus faecium* bacteria, strain N 113 the viability of cells suspended in distilled water according to all the regimens remained at the control level after freezing. The number of living cells suspended in physiological solution according to regimens 2 and 3 after freezing was also kept at the control level, and for regimen 1 it differed statistically from the control level. On the contrary, when freezing these bacteria in sugar broth the cell number in comparison with the control samples statistically and significantly differed after cooling with regimens 2 and 3, and remained at the control level with regimen 1.

When studying the integrity of biochemical properties of the bacteria under cryopreservation it was established that cooling regimen and composition of preservation medium did not affect the integrity of biochemical properties of the bacteria under study. Moreover, no catalase and hemolytical activities, motility, resistance to potassium tellurite change were revealed.

### Conclusions

1. The possibility of effective cryopreservation of *Enterococcus* bacteria has been shown.

2. Viability of enterococci during preservation is affected by the composition of preserving medium, cooling regimen and initial morphofunctional species cell peculiarities. *Enterococcus faecium* bacteria occurred out to be more resistant to freezing. The features of cell structure of the studied enterococci of this type are likely to provide their higher resistance to physical and chemical factors accompanying the pro-

тав консервирующей среды, режим охлаждения и исходные морфофункциональные видовые особенности клеток.

Более устойчивыми к замораживанию оказались бактерии *Enterococcus faecium*. По-видимому, особенности их строения обеспечивают более высокую по сравнению с бактериями вида *faecalis* резистентность к физико-химическим факторам, сопровождающим процессы охлаждения и отогрева.

3. Замораживание до  $-196^{\circ}\text{C}$  при различных режимах охлаждения и средах криоконсервирования не влияет на биохимические и биологические свойства бактерий рода *Enterococcus*, что свидетельствует об эффективности метода криоконсервирования при долгосрочном хранении бактерий этого рода в коллекциях микроорганизмов.

### Литература

1. Бухарин О.В., Билимова С.И., Чертков К.Л. Механизмы выживания энтерококков в организме хозяина // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунологии.– 2002.– №3.– С. 100–106.
2. Луста К.А., Фикте Б.А. Методы определения жизнеспособности микроорганизмов/ Под ред. В.К. Ерошина.– Пушкино, 1990.– 186 с.
3. Методические рекомендации по выделению и идентификации энтерококков.– Иваново, 1982.– 19 с.
4. Общая и санитарная микробиология с техникой микробиологических исследований: Учеб. пособие / Под ред. А.С. Лабинской, Л.П. Блинковой, А.С. Ещиной.– М.: Медицина, 2004.– 576 с.
5. Dobson S.R., Baker C.J. Enterococcal sepsis in neonates: features by age at onset and occurrence of focal infection // Pediatrics.– 1990.–Vol. 85, N2.– P. 165–171.

Поступила 13.05.2008

cess of cooling-warming, if compared with *faecalis* bacteria.

Freezing down to  $-196^{\circ}\text{C}$  using various cooling regimens and cryopreservation media does not affect biochemical and biological properties of bacteria under study, thereby testifying to the efficiency of application of cryopreservation method at long-term storage of *Enterococcus* bacteria in collections of microorganisms.

### References

1. Bukharin O.V., Bilimova S.I., Chertkov K.L. Mechanisms of survival of enterococci in host organism // Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunologii.– 2002.– N3.– P. 100–106.
2. Lusta K.A., Fikhte B.A. Methods for determining viability of microorganisms/ Ed. by V.K. Eroshin.– Puschino, 1990.– 186 p.
3. Methodical recommendations on isolation and identification of enterococci. – Ivanovo, 1982. – 19 p.
4. General and sanitary microbiology with the technique of microbiological studies: Tutorial manua // Ed. by A.S. Labinskaya, L.P. Blinkova, A.S. Eschina. – Moscow: Meditsina, 2004.– 576 p.
5. Dobson S.R., Baker C.J. Enterococcal sepsis in neonates: features by age at onset and occurrence of focal infection// Pediatrics. –1990.– Vol. 85, N2.– P. 165–171.

Accepted in 13.05.2008