

УДК 57.043:579.83/88

О.В. Книш<sup>1\*</sup>, О.В. Пахомов<sup>2</sup>, А.М. Компанієць<sup>2</sup>,  
В.П. Полянська<sup>3</sup>, С.В. Зачепило<sup>3</sup>

## Життєздатність *Bifidobacterium bifidum* 1 за впливу гіпотермії, одноразового та повторних циклів заморожування-відтавання

UDC 57.043:579.83/88

O.V. Knysh<sup>1\*</sup>, O.V. Pakhomov<sup>2</sup>, A.M. Kompaniets<sup>2</sup>,  
V.P. Polianska<sup>3</sup>, S.V. Zachepylo<sup>3</sup>

## Viability of *Bifidobacterium bifidum* 1 Under Hypothermia, Single and Repeated Freeze-Thaw Cycles

**Реферат:** Досліджено життєздатність бактерій пробіотичного штаму *Bifidobacterium bifidum* 1 за впливу гіпотермії, одноразового та повторних циклів заморожування-відтавання (термоциклювання). Зразки суспензій біфідобактерій одразу після виділення або після добового гіпотермічного зберігання заморожували трьома способами до кінцевої температури  $(-23 \pm 1)$  або  $(-196 \pm 1)^\circ\text{C}$ . Після повільного заморожування зразків до  $(-23 \pm 1)^\circ\text{C}$  спостерігали більші кількісні втрати біфідобактерій, ніж після швидкого заморожування прямим зануренням у рідкий азот. Зберігання зразків за гіпотермічних умов та одноразове заморожування-відтавання супроводжувалися значним пригніченням добового приросту біомаси біфідобактерій і посиленням утворення ними біоплівки. Десятиразове термоциклювання найбільш несприятливим для виживання способом не призводило до загибелі всіх клітин у суспензіях: життєздатними залишалися до 35% біфідобактерій. Показники здатності біфідобактерій до нарощування біомаси зберігалися на рівні 35%, а здатності до біоплівкоутворення – на рівні 43,7–65,5% від відповідних показників свіжовиділених клітин.

**Ключові слова:** біфідобактерії, життєздатність, заморожування-відтавання, термоциклювання, добовий приріст біомаси, біоплівкоутворення.

**Abstract:** The viability of bacteria of the *Bifidobacterium bifidum* 1 probiotic strain under hypothermia, single and repeated freeze-thaw cycles (thermal cycling) was studied. Samples of bifidobacterial suspensions were frozen immediately after isolation or after daily hypothermic storage in three ways to the final temperature of either  $(-23 \pm 1)$  or  $(-196 \pm 1)^\circ\text{C}$ . After slow freezing of the samples down to  $(-23 \pm 1)^\circ\text{C}$ , bigger quantitative losses of bifidobacteria were observed if compared with those after rapid freezing by a direct immersion into liquid nitrogen. Storage of the samples under hypothermia and a single freeze-thaw was accompanied with a strong inhibition of the daily growth of bifidobacteria biomass and an increased formation of biofilms. Ten-fold thermal cycling in the most unfavorable way for survival did not lead to the death of all cells in suspensions. Up to 35% of bifidobacteria remained viable. Indices of the bifidobacteria ability to enhance biomass remained at the level of 35%, and the ability to form biofilm was kept at the level of 43.7–65.5% of the corresponding indices for freshly isolated cells.

**Key words:** bifidobacteria, viability, freeze-thaw, thermal cycling, daily biomass growth, biofilm formation

Біфідобактерії – одна з важливих складових мікробної спільноти кишечника людини. Вони відіграють основну роль у забезпеченні колонізаційної резистентності слизових оболонок, збереженні та відновленні мікробного балансу кишечника, розвитку імунної системи, модуляції імунної відповіді та в інших життєво важливих фізіологічних процесах [8, 9].

Втрата біфідобактерій негативно позначається на здоров'ї людини. З метою відновлення їх чисельності в організмі людини традиційно призначають пробіотичні штами у вигляді фармацевтичних засобів, харчових домішок і ферментованих

Bifidobacteria are ones of the important components of the human gut microbial community. They play a major role in ensuring the colonization resistance of mucous membranes, preservation and restoration of intestinal microbial balance, development of the immune system, modulation of immune response and other vital physiological processes [8, 9].

The loss of bifidobacteria negatively affects the human health. To restore their number in human body, the probiotic strains are traditionally prescribed as pharmaceuticals, food additives and fermented dairy products. A promising approach to correct the

<sup>1</sup>ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова Національної академії медичних наук України», м. Харків, Україна

<sup>2</sup>Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

<sup>3</sup>Українська медична стоматологічна академія, м. Полтава

<sup>1</sup>Mechnikov Institute of Microbiology and Immunology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

<sup>2</sup>Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

<sup>3</sup>Ukrainian Medical Stomatological Academy, Poltava, Ukraine

\*Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію:

вул. Пушкінська, 14/16, м. Харків, Україна 61057;  
тел.: (+38 057) 731-31-51  
електронна пошта: knysh\_oksana@ukr.net

\*To whom correspondence should be addressed:

14/16, Pushkinska str., Kharkiv, Ukraine 61057;  
tel.: +380 57 731 3151  
e-mail: knysh\_oksana@ukr.net

Надійшла 10.07.2019

Прийнята до друку 07.09.2020

Received 10, July, 2019

Accepted 07, September, 2020

© 2020 O.V. Knysh, 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.

молочних продуктів. Перспективним підходом до корекції мікроекологічних порушень є використання метабіотиків. Застосування біологічно активних структурних компонентів і метаболітів, завдяки яким пробіотики реалізують свої корисні ефекти, дозволяє швидко досягти бажаного ефекту, уникнути негативних наслідків і побічних ефектів, пов'язаних із використанням живих клітин [9, 11, 13].

Структурні компоненти і внутрішньоклітинні метаболіти бактеріальних клітин можна отримати різними методами [10]. Останні відрізняються між собою за природою руйнівних чинників, механізмом і глибиною пошкодження клітин, що зумовлює отримання різних за складом кінцевих продуктів. Основною причиною руйнування і загибелі клітин під час заморожування-відтавання є пошкодження мембранних структур кристалами льоду та високими концентраціями внутрішньо- і позаклітинних розчинів. Внесок кожного з чинників пошкодження залежить від швидкості температурних змін та типу клітин [6]. Чутливість до заморожування-відтавання залежить від видової належності, фази росту, концентрації клітин та складу середовища [1, 7].

Багаторазове циклічне заморожування-відтавання молочно-кислих бактерій може бути застосоване для одержання суспензій, збагачених біологічно активними речовинами і сполуками бактеріального походження, а також для селекції стійких до стресу бактеріальних клітин [4].

Мета роботи – порівняння кількісної збереженості бактерій пробіотичного штаму *Bifidobacterium bifidum* 1 після одноразового та повторних циклів заморожування-відтавання різними способами та оцінка життєздатності клітин після заморожування-відтавання найбільш несприятливим для виживання способом.

### Матеріали та методи

У дослідженнях використовували пробіотичний штам *B. bifidum* 1 з препарату «Біфідумбактерин» («Віво-Актив», Україна). Ліофілізат регідратували та культивували протягом 20–24 годин за температури  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$  у тїогліколевому середовищі («Biolife», Італія). Після перевірки чистоти культури мікробну масу тричі відмивали від поживного середовища 0,9%-м розчином натрію хлориду. Готували суспензію клітин із оптичною густиною 10,0 одиниць за шкалою Мак-Фарланда у фізіологічному розчині натрію хлориду за допомогою денситометра «Densi-La-Meter» («Lachema», Чехія). Суспензію заморожували одразу після отримання або попереднього збе-

microecological disorders is the use of metabolites. The application of biologically active structural components and metabolites, due to which probiotics implement their beneficial effects, allows to quickly achieve the desired effect, avoid the negative consequences and side effects associated with the use of living cells [9, 11, 13].

Structural components and intracellular metabolites of bacterial cells can be obtained by different techniques [10]. The latter differ in the nature of destructive factors, mechanism and depth of cell damage, resulting in various compositions of the final products. The main cause of cell destruction and death during freeze-thawing is damage to membrane structures by ice crystals and high concentrations of intracellular and extracellular solutions. The contribution of each of the damage factors depends on the rate of temperature changes and cell type [6]. Freeze-thaw sensitivity depends on species, growth phase, cell concentration and medium composition [1, 7].

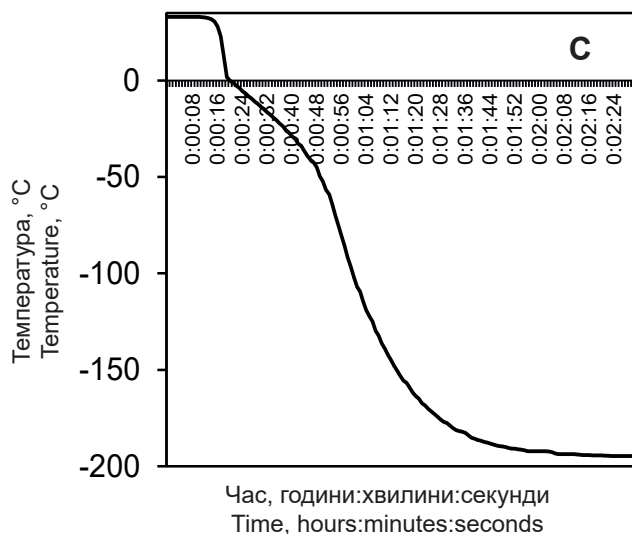
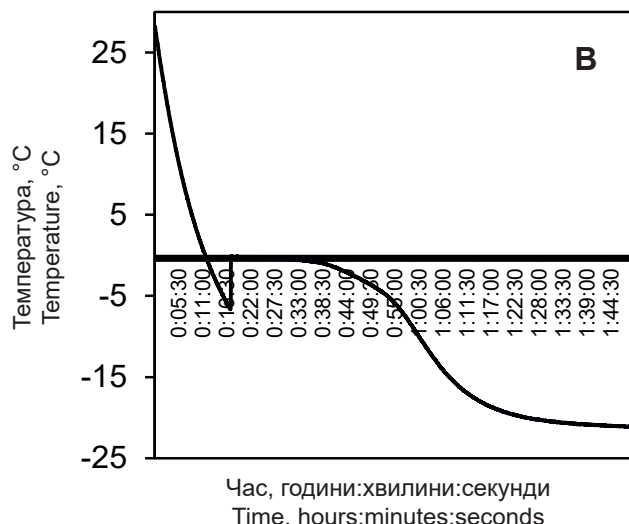
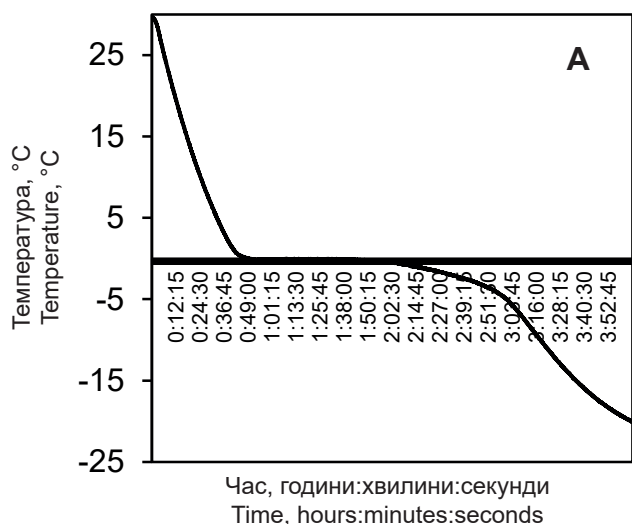
Repeated cycles of lactic acid bacteria freeze-thaw can be used to obtain the suspensions enriched with biologically active substances and compounds of bacterial origin, as well as for the selection of stress-resistant bacterial cells [4].

The aim of this research was to compare the quantitative preservation of bacteria of the *Bifidobacterium bifidum* 1 probiotic strain after single and repeated freeze-thaw cycles in different ways and to assess the viability of cells after freeze-thawing in the most unfavorable for survival way.

### Materials and methods

The studies utilized a probiotic strain of *B. bifidum* 1 derived from the Bifidumbacterin drug (Vivo-Active, Ukraine). The lyophilisate was rehydrated and cultured for 20–24 hrs at  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$  in thioglycollate medium (Biolife, Italy). After examining the culture purity, the microbial mass was washed three times from the nutrient medium with 0.9% sodium chloride solution. A suspension of cells with an optical density equivalent to 10.0 McFarland standard in physiological sodium chloride solution was prepared using a Densi-La-Meter densitometer (Lachema, Czech Republic). The suspension was frozen immediately after obtaining or pre-storage under hypothermia  $(6 \pm 2)^\circ\text{C}$  for 24 hrs. The microbial suspension was frozen as follows: A – 50 ml samples in flasks were frozen to a final temperature  $(-23 \pm 1)^\circ\text{C}$  for four hours; B – 1.5 ml samples in cryovials were frozen to the final temperature  $(-23 \pm 1)^\circ\text{C}$  for one hour; C – 4.5 ml samples in cryovials were frozen by direct immersion into liquid nitrogen to





**Рис. 1.** Термограми заморожування зразків способами А, В та С.

**Fig. 1.** Thermograms of freezing samples by methods A, B and C.

рігання за гіпотермічних умов ( $6 \pm 2$ )°C упродовж 24 годин. Мікробну суспензію заморожували наступними способами: А – зразки об'ємом 50 мл у флаконах заморожували до кінцевої температури ( $-23 \pm 1$ )°C впродовж чотирьох годин; В – зразки об'ємом 1,5 мл у кріоампулах заморожували до кінцевої температури ( $-23 \pm 1$ )°C упродовж години; С – зразки об'ємом 4,5 мл у кріоампулах заморожували прямим зануренням у рідкий азот до кінцевої температури ( $-196 \pm 1$ )°C, якої досягали за 2–3 хв.

Зміну температури зразка реєстрували шляхом запису термограми за допомогою мідь-константанової термопари, зафіксованої у його центрі (рис. 1).

Заморожені зразки відігрівали на водяній бані за температури ( $37 \pm 1$ )°C до повного відтавання. Цикли заморожування-відтавання здійснювали 1, 5 та 10 разів.

Кількість життєздатних біфідобактерій у зразках визначали методом серійних розведень, який передбачав висів матеріалу (1,0 мл) з кожного

a final temperature ( $-196 \pm 1$ )°C, achieved in 2–3 minutes.

The change in temperature of the sample was registered by the thermogram using a copper-constantan thermocouple fixed in its center (Fig. 1).

Frozen samples were warmed in a water bath at ( $37 \pm 1$ )°C until complete thawing. Freeze-thaw cycles were performed 1, 5 and 10 times.

The number of viable bifidobacteria in the samples was determined by serial dilutions, which involved the material inoculation (1.0 ml) from each dilution ( $10^{-1}$  to  $10^{-10}$ ) in parallel tubes with a high column (9.0 ml) of bifidum medium (Farmaktiv, Ukraine), culture inoculations for 72 hours at a temperature of ( $37 \pm 1$ )°C and subsequent counting of the number of colonies. The number of colony-forming units (CFU) was expressed as decimal logarithm ( $\lg$  CFU / ml). Quantitative losses of viable bacteria were calculated by the formula:

$$(A - B) / A \times 100\%,$$

where A is the number of viable cells ( $\lg$  CFU / ml) before freeze-thaw/ hypothermic storage, B – after freeze-thaw/hypothermic storage.

Daily biomass gain (DBG) and biofilm formation of *B. bifidum* were studied in sterile 96-well polystyrene microtiter plates (Ltd Eximcargotrade, Ukraine). Tryptic soy broth (HiMedia, India) and bifidobacteria suspensions after freeze-thaw/ hypothermic storage were added to the test wells in a 9:1 ratio. Tryptic soy broth and suspensions of freshly isolated bifidobacteria in the same ratio were added to the wells of the positive control.



розведення (від  $10^{-1}$  до  $10^{-10}$ ) у паралельні пробірки з високим стовпчиком (9,0 мл) біфідум-середовища («Фармактив», Україна), культивуванням посівів упродовж 72 годин за температури ( $37 \pm 1$ )°C та наступним підрахунком кількості колоній. Кількість колонієутворюючих одиниць (КУО) виражали в десятковому логарифмі (lg КУО/мл). Кількісні втрати життєздатних бактерій розраховували за формулою:

$$(A - B) / A \times 100\%,$$

де А – кількість життєздатних клітин (lg КУО/мл) до заморожування-відтавання / гіпотермічного зберігання, В – після заморожування-відтавання/гіпотермічного зберігання.

Дослідження добового приросту біомаси (ДПБ) та біоплівкоутворення *B. bifidum* проводили в стерильних 96-лункових полістирольних мікротитрувальних планшетах («Ексімкар-готрейд», Україна). Триптиказо-соевий бульйон («HiMedia», Індія) та суспензії біфідобактерій після заморожування-відтавання / гіпотермічного зберігання додавали в дослідні лунки у співвідношенні 9:1. У лунки позитивного контролю вносили триптиказо-соевий бульйон і суспензії свіжовиділених біфідобактерій у такому ж співвідношенні. Лунки негативного контролю клітин не містили. Планшет накривали кришкою та витримували в анаеробних статичних умовах за температури ( $37 \pm 1$ )°C протягом 24 годин. Оптичну густину (ОГ) вмісту лунок вимірювали при 578 нм із використанням мікропланшетного аналізатора «Lisa Scan EM» («Erba Lachema s.r.o.», Чехія). Після вимірювання ОГ вмісту лунок планшети продовжували витримувати за вищезазначених умов впродовж 24 годин. Здатність біфідобактерій до біоплівкоутворення досліджували згідно з методикою, описаною раніше [3]. Обчислювали індекси пригнічення / стимуляції ДПБ і біоплівкоутворення.

Експерименти проводили тричі. Кожен зразок досліджували в п'яти повторах. Визначали середні значення отриманих показників зі стандартними відхиленнями.

Отримані дані статистично обробляли за допомогою програмного забезпечення «Excel 2010» («Microsoft», США). Здійснювали однофакторний дисперсійний аналіз (ANOVA) та подальше множинне порівняння за допомогою критерію Стюдента з поправкою Бонферроні. Відмінності між отриманими показниками вважали статистично значущими при  $p < 0,05$ .

Wells did not contain negative cell control. The plate was covered and kept under anaerobic static conditions at ( $37 \pm 1$ )°C for 24 hours. The optical density (OD) of the well contents was measured at 578 nm using a 'Lisa Scan EM' microplate reader (Erba Lachema s.r.o., Czech Republic). After measuring the OD of the wells content, the plates continued to be maintained under the above conditions for 24 hours. The ability of bifidobacteria to biofilm formation was investigated as described previously [3]. The DBG inhibition / stimulation and biofilm formation values were calculated.

The experiments were performed three times. Each sample was examined in five replicates. The means of the obtained indices with standard deviations were determined.

The findings were statistically processed using the software Excel 2010 (Microsoft, USA). One-way analysis of variance (ANOVA) and subsequent multiple comparisons were performed using the Bonferroni-corrected Student's t test. The differences between the obtained indices were considered significant at  $p < 0.05$ .

## Results and discussion

At the first stage of this research the effect of different freeze-thaw techniques on the content of viable bifidobacteria in suspensions of freshly isolated cells and the suspensions stored under hypothermia was studied. The use of the traditional method of counting the number of CFU is stipulated by the fact that culture ability, *i. e.* the ability of cells to form colonies in a nutrient medium, is an evidence of their viability [5]. The findings presented in the Table 1 indicate the dependence of the quantitative losses of bifidobacteria on the number of cycles and the method of freezing-thawing of the suspension. The way A was the least favorable for the survival of bifidobacteria, because the loss of viable cells was the largest. This value as a result of freeze-thaw of the bifidobacteria, which were pre-stored during the day under hypothermic conditions, did not differ significantly from that of freshly isolated cells. None of these ways of thermal cycling led to the complete loss of viable cells. Therefore, the resulting thermal cycling suspension consisted of viable and dead bifidobacteria, cell debris and contents released from the destroyed cells.

Thus, the slow freezing, which created the conditions for the implementation of the 'effects of the solution', was more unfavorable for the survival of bifidobacteria. The results of our study are well agreed with the data of other authors, *i. e.* rapid





## Результати та обговорення

На першому етапі досліджень вивчали вплив різних способів заморожування-відтавання на вміст життєздатних біфідобактерій у суспензіях свіжовиділених клітин та суспензіях, які зберігалися за гіпотермічних умов. Застосування традиційного методу підрахунку кількості КУО обумовлене тим, що культурабельність (здатність клітин утворювати колонії в поживному середовищі) є доказом їх життєздатності [5]. Результати досліджень, наведені в таблиці, свідчать про залежність кількісних втрат біфідобактерій від числа проведених циклів та способу заморожування-відтавання суспензії. Найменш

freezing or direct immersion into liquid nitrogen provide minimal loss of bacteria viability [2, 4, 7]. The findings confirm that the damage of bacterial cells is caused by osmotic imbalance rather than the formation of intracellular ice.

Damage to frozen and thawed microorganisms, first of all, is revealed by their impaired ability to reproduce in a nutrient medium [1]. Therefore, at the second stage of research, the ability of bifidobacteria to increase the biomass and biofilm formation after freeze-thaw was studied in the most unfavorable way for survival.

Figure 2 shows the changes in the DBG of bifidobacteria after daily hypothermic storage

Показники кількісних втрат *B. bifidum* після одного та повторних циклів заморожування-відтавання  
Indices of quantitative losses of *B. bifidum* after single and repeated freeze-thaw cycles

Спосіб заморожування Freezing method	Кількість циклів заморожування-відтавання Number of freezing-thaw cycles					
	1		5		10	
	СВ F	Г H	СВ F	Г H	СВ F	Г H
	Відсоток втрачених клітин, % Percentage of lost cells, %					
A	13,3 ± 3,7	16,1 ± 0,6	54,2 ± 2,2	51,5 ± 3,5	64,6 ± 3,4	62,7 ± 4,0
B	4,7 ± 4,5	9,6 ± 5,7	43,8 ± 4,4	37,6 ± 1,2	53,0 ± 1,3	50,9 ± 5,5
C	-2,9 ± 4,3*	3,6 ± 6,2*	35,4 ± 3,1*	32,9 ± 2,6*	46,5 ± 2,2*	43,8 ± 3,2*

**Примітки:** СВ – суспензія свіжовиділених клітин; Г – суспензія клітин, що зберігалася за гіпотермічних умов впродовж 24 годин; \* – відмінності значущі відносно показників кількісних втрат після заморожування способом А,  $p < 0,05$ .

**Notes:** F – suspension of freshly isolated cells; H – cell suspension stored in hypothermic conditions during 24 hours; \* – differences are significant with respect to the indices of quantitative losses after freezing by method A,  $p < 0.05$ .

сприятливим для виживання біфідобактерій виявився спосіб А, оскільки втрата життєздатних клітин була найбільшою. Даний показник у результаті заморожування-відтавання біфідобактерій, які попередньо зберігалися впродовж доби за гіпотермічних умов, значуще не відрізнявся від такого свіжовиділених клітин. Жоден із вказаних способів термоциклювання не призводив до повної втрати життєздатних клітин. Отже, отримана в результаті термоциклювання суспензія складалася з життєздатних і мертвих біфідобактерій, клітинного дебрису та вивільненого зі зруйнованих клітин вмісту.

Таким чином, повільне заморожування, яке створювало умови для реалізації «ефектів розчину», виявилось більш несприятливим для

and freezing-thawing. The DBG inhibition index after one-, five-, and ten-fold freeze-thaw cycles for the suspensions of freshly isolated cells was 45.4; 54.5 and 65% respectively. After daily storage under hypothermic conditions, the DBG suppression index was 13.2%. Pre-storage under hypothermic conditions did not significantly affect the DBG of bifidobacteria. Thus, the DBG inhibition index for these cells after one, five and ten freeze-thaw cycles was 47.2; 59.7 and 64.9%, respectively.

The DBG inhibition index after storage of bifidobacteria under hypothermic conditions and a single freeze-thaw was higher (13.2 and 45.4–47.2%) than the quantitative cell loss rate (7 and 13.3–16.1%), determined the traditional CFU calcu-



виживання біфідобактерій. Результати нашого дослідження добре узгоджуються з даними інших авторів: швидке заморожування або пряме занурення в рідкий азот забезпечують мінімальні втрати життєздатності бактерій [2, 4, 7]. Отримані результати є підтвердженням того, що пошкодження бактеріальних клітин зумовлене, скоріше, осмотичним дисбалансом, ніж формуванням внутрішньоклітинного льоду.

Пошкодження мікроорганізмів, які піддавалися заморожуванню-відтаванню, перш за все, виявляють за порушенням їх здатності до розмноження у поживному середовищі [1]. Тому на другому етапі досліджень вивчали здатність біфідобактерій до нарощування біомаси та біоплівкоутворення після заморожування-відтавання найбільш несприятливим для виживання способом.

На рис. 2 продемонстровано зміни ДПБ біфідобактерій після добового гіпотермічного зберігання та заморожування-відтавання. Індекс пригнічення ДБП після одно-, п'яти- та десятиразового заморожування-відтавання суспензії свіжовиділених клітин становив 45,4; 54,5 та 65% відповідно. Після добового зберігання за гіпотермічних умов індекс пригнічення ДПБ був 13,2%. Попереднє зберігання за гіпотермічних умов суттєво не впливало на ДПБ біфідобактерій після заморожування-відтавання. Так, індекс пригнічення ДПБ цих клітин після одного, п'яти та десяти циклів заморожування-відтавання становив 47,2; 59,7 та 64,9% відповідно.

Індекс пригнічення ДПБ після зберігання біфідобактерій за гіпотермічних умов та одноразового заморожування-відтавання був вищим (13,2 та 45,4–47,2%), ніж показник кількісних втрат клітин (7 та 13,3–16,1%), визначений традиційним методом підрахунку КУО, а після повторних циклів заморожування-відтавання він відповідав кількісним втратам клітин. Одержані результати свідчать про високу здатність клітин, які залишилися живими після термоциклоування, до нарощування біомаси. За описаних умов експерименту був можливим стимуляторний вплив на ДПБ досліджуваних клітин дериватів пробіотиків, які вивільнилися у позаклітинне середовище зі зруйнованих клітин після заморожування-відтавання. Стимуляторний вплив на ДПБ *B. bifidum* безклітинних екстрактів, які містять деривати цього мікроорганізму, був виявлений нами раніше [3].

Як показано на рис. 3, зберігання суспензії біфідобактерій за гіпотермічних умов упродовж доби значно підвищувало їх здатність до біо-

lating, and after repeated freezing-thaw cycles, it corresponded to the quantitative loss of cells. The obtained results indicate a high ability of cells that survived after thermal cycling to increase biomass. Under the described experimental conditions, it was possible to stimulate the DBG of the studied cells of probiotic derivatives, which were released into the extracellular environment from the destroyed cells after freeze-thaw. Stimulatory effect on DBG of *B. bifidum* cell-free



**Рис. 2.** Добовий приріст біомаси свіжовиділених біфідобактерій (■) і бактерій, які зберігалися впродовж 24 годин за гіпотермічних умов (□), до та після одного або повторних циклів заморожування-відтавання способом А. Відмінності значущі відносно показників проліферативної активності клітин контрольних груп: \* – свіжовиділених клітин; # – клітин, які зберігалися впродовж 24 годин за гіпотермічних умов,  $p < 0,05$ .

**Fig. 2.** Daily increase in biomass of freshly isolated (■) and stored during 24 hours under hypothermic conditions (□) bifidobacteria before and after single or repeated freeze-thaw cycles by method A. The differences are significant with respect to the indices of proliferative activity of cells of control groups: \* – freshly isolated; # – stored during 24 hours under hypothermic conditions (H),  $p < 0.05$ .

extracts containing derivatives of this microorganism was found by us earlier [3].

As Fig. 3 shows, the bifidobacteria suspension storage under hypothermic conditions during the day significantly increased their ability to form biofilms, while the stimulation index was 165.2%. After a single freeze-thaw, the ability of biofilm formation of freshly isolated cells increased by 96%, and the cells stored under hypothermic conditions did by 85.2%. This rate in suspensions sub-



плівкоутворення, при цьому індекс стимуляції становив 165,2%. Після одноразового заморожування-відтавання здатність до біоплівкоутворення свіжовиділених клітин підвищувалася на 96%, а клітин, які зберігалися за гіпотермічних умов, – на 85,2%. Даний показник у суспензіях, які піддали п'яти циклам заморожування-відтавання, суттєво не відрізнявся від такого у суспензіях свіжовиділених бактерій і був помірним, незважаючи на значні кількісні втрати клітин (51,5–54,2%). Біоплівкоутворення біфідобактерій після десятиразового термоциклювання ставало слабким, але індекс пригнічення біоплівкоутворення був дещо нижчим (56,3%), ніж кількісні втрати клітин (62,7–64,6%). Отримані дані свідчать про те, що зберігання зразків за гіпотермічних умов, одноразове та повторне заморожування-відтавання стимулюють біоплівкоутворення біфідобактерій.

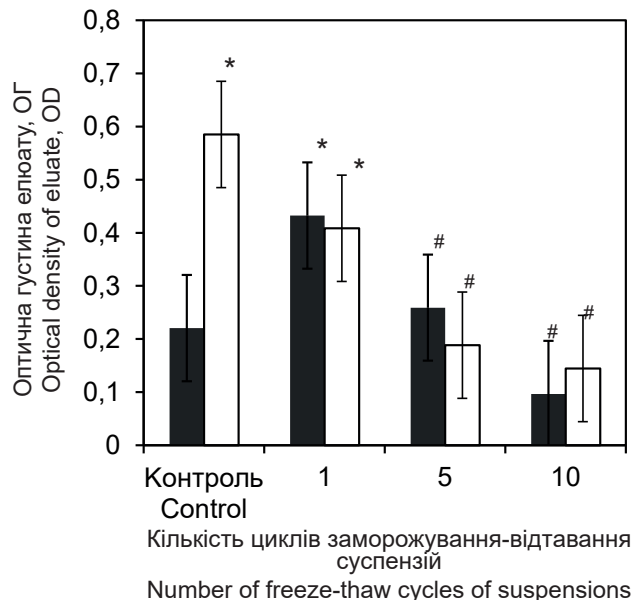
Підвищення здатності біфідобактерій до біоплівкоутворення можна пояснити фізико-хімічними змінами клітинних поверхонь і функціонування регуляторних сигнальних систем [12]. Такі перебудови могли відбуватися як за впливу фізико-хімічних чинників заморожування-відтавання, так і структурних компонентів та внутрішньоклітинних метаболітів пошкоджених пробіотичних клітин, присутніх у середовищі культивування і здатних стимулювати даний процес [3]. З'ясування механізму стимуляції біоплівкоутворення потребує окремого дослідження.

Результати дослідження вказують на можливість застосування термоциклювання з метою отримання біологічно активних дериватів пробіотичних бактерій, дозволяють оцінити втрати та ступінь пошкодження біфідобактерій після одноразового та повторних циклів заморожування-відтавання різними способами. У подальшому планується дослідити компонентний склад позаклітинного середовища суспензій, отриманих у результаті термоциклювання.

## Висновки

1. Встановлено, що способи заморожування-відтавання з повільним заморожуванням до кінцевої температури ( $-23 \pm 1$ )°C спричиняють більші кількісні втрати біфідобактерій, ніж спосіб швидкого заморожування до кінцевої температури ( $-196 \pm 1$ )°C прямим зануренням у рідкий азот.

2. Зберігання за гіпотермічних умов та одноразове заморожування-відтавання супроводжуються значним пригніченням добового приросту біфідобактерій і посиленням утворення ними біо-



**Рис. 3.** Біоплівкоутворення свіжовиділених біфідобактерій (■) і бактерій, що зберігалися впродовж 24 годин за гіпотермічних умов (□), до та після одного або повторних циклів заморожування-відтавання способом А. Відмінності значущі відносно показників біоплівкоутворення клітин контрольних груп: \* – свіжовиділених клітин; # – клітин, що зберігалися впродовж 24 годин за гіпотермічних умов,  $p < 0,05$ .

**Fig. 3.** The biofilm formation by freshly prepared (■) and stored during 24 hour under hypothermic conditions (□) bifidobacteria before and after single or repeated freeze-thaw cycles by method A. The differences are significant with respect to the indices of biofilm formation by cells of control groups: \* – freshly isolated (F); # – stored during 24 hours under hypothermic conditions (H),  $p < 0.05$ .

jected to five freeze-thaw cycles did not differ significantly from that in the suspensions of freshly isolated bacteria and was moderate, despite significant quantitative cell losses (51.5–54.2%). The biofilm formation of bifidobacteria became weak after ten thermal cycles, but the index of biofilm inhibition was slightly lower (56.3%) if compared with the quantitative loss of cells (62.7–64.6%). The obtained data indicate that storage of samples under hypothermic conditions, single and repeated freeze-thawing stimulate the biofilm formation of bifidobacteria.

The increase in the ability of bifidobacteria to biofilm formation can be explained with physicochemical changes in cell surfaces and the functioning of regulatory signaling systems [12]. Such rearrangements could occur under the influence of the freeze-thaw physicochemical factors, as well as structural components and intracellular metabolites of damaged probiotic cells present in the culture medium and able to stimulate this process [3]. The mechanism of biofilm stimulation needs to be elucidated.



плівок. Одержані дані свідчать про те, що зазначені умови сприяють переходу біфідобактерій від планктонної до біоплівкової форми існування.

3. Десятиразове заморожування-відтавання (термоциклювання) не призводить до втрати всіх життєздатних клітин у суспензіях. Біфідобактерії після термоциклювання характеризуються збереженою здатністю до нарощування біомаси та утворення біоплівки.

## Література

1. El-Kest SE, Marth EH. Freezing of *Listeria monocytogenes* and other microorganisms: a review. *J Food Prot.* 1992; 55(8):639–48.
2. Fonseca F, Marin M, Morris GJ. Stabilization of frozen *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* in glycerol suspensions: freezing kinetics and storage temperature effects. *Appl Environ Microbiol.* 2006; 72(10): 6474–82.
3. Knysh OV. Bifidogenic properties of cell-free extracts derived from probiotic strains of *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus reuteri*. *Regulatory Mechanisms in Biosystems.* 2019; 10(1): 124–8.
4. Kwon YW, Bae J-H, Kim S-A, Han NS. Development of freeze-thaw tolerant *Lactobacillus rhamnosus* gg by adaptive laboratory evolution. *Front Microbiol* [Internet]. 2018 Nov 20 [cited 2020 May 15]; 9: 2781 Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2018.02781/full>
5. Lahtinen SJ, Gueimonde M, Ouwehand AC, et al. Probiotic bacteria may become dormant during storage. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. 2005; 71(3):1662–3.
6. Mazur P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *American Journal of Physiology-Cell Physiology.* 1984; 247(3):C125–C142.
7. Novik G, Sidarenka A, Rakhuba D, Kolomiets E. Cryopreservation of bifidobacteria and bacteriophages in Belarusian collection of non-pathogenic microorganisms. *Journal of Culture Collections.* 2009; 6(1): 76–84.
8. O'Callaghan A, van Sinderen D. Bifidobacteria and their role as members of the human gut microbiota. *Front Microbiol* [Internet]. 2016 Jun 15 [cited 2020 May 15]; 7: 925. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2016.00925/full>
9. Sarkar A, Mandal S. Bifidobacteria – insight into clinical outcomes and mechanisms of its probiotic action. *Microbiological Research.* 2016; 192: 159–71.
10. Shehadul Islam M, Aryasomayajula A, Selvaganapathy PR. A review on macroscale and microscale cell lysis methods. *Micromachines (Basel)* [Internet]. 2017 [cited 2020 May 15]; 8(3):83. Available from: <https://www.mdpi.com/2072-666X/8/3/83/htm>
11. Singh A, Vishwakarma V, Singhal B. Metabiotics: the functional metabolic signatures of probiotics: current state-of-art and future research priorities – metabiotics: probiotics effector molecules. *Advances in Bioscience and Biotechnology.* 2018; 09(04):147–89.
12. Speranza B, Liso A, Corbo MR. Use of design of experiments to optimize the production of microbial probiotic biofilms. *Peer J* [Internet]. 2018 Jul 10 [cited 2020 May 15]; 6:e4826. Available from: <https://peerj.com/articles/4826/>
13. Suez J, Elinav E. The path towards microbiome-based metabolite treatment. *Nature Microbiology* [Internet].

The results of this study indicate the possibility of using thermal cycling to obtain biologically active derivatives of probiotic bacteria, enable to assess the loss and degree of damage to bifidobacteria after single and repeated freeze-thaw cycles in different ways. In the future it is planned to investigate the component composition of the extracellular medium of the suspensions obtained by thermal cycling.

## Conclusions

1. The freeze and thaw techniques involving the slow freezing down to the final temperature ( $-23 \pm 1$ )°C were established to cause bigger quantitative losses of bifidobacteria than the one with rapid freezing down to the final temperature ( $-196 \pm 1$ )°C by a direct immersion into liquid nitrogen.

2. Storage under hypothermic conditions and one-time freeze-thaw are accompanied by a significant inhibition of the daily growth of bifidobacteria and increased formation of biofilms. The obtained data indicate that these conditions promote the transition of bifidobacteria from planktonic to biofilm form of existence.

3. Ten-fold freeze-thaw (thermal cycling) does not lead to the loss of all viable cells in suspensions. Bifidobacteria after thermal cycling are characterized with the preserved ability to increase the biomass and to form biofilms.

## References

1. El-Kest SE, Marth EH. Freezing of *Listeria monocytogenes* and other microorganisms: A Review. *J Food Prot.* 1992; 55(8):639–48.
2. Fonseca F, Marin M, Morris GJ. Stabilization of frozen *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* in glycerol suspensions: freezing kinetics and storage temperature effects. *Appl Environ Microbiol.* 2006; 72(10):6474–82.
3. Knysh OV. Bifidogenic properties of cell-free extracts derived from probiotic strains of *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus reuteri*. *Regulatory Mechanisms in Biosystems.* 2019; 10(1):124–8.
4. Kwon YW, Bae J-H, Kim S-A, Han NS. Development of freeze-thaw tolerant *Lactobacillus rhamnosus* gg by adaptive laboratory evolution. *Front Microbiol* [Internet]. 2018 Nov 20 [cited 2020 May 15]; 9: 2781 Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2018.02781/full>
5. Lahtinen SJ, Gueimonde M, Ouwehand AC, et al. Probiotic bacteria may become dormant during storage. *Appl Environ Microbiol.* 2005; 71(3):1662–3.
6. Mazur P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *American Journal of Physiology-Cell Physiology.* 1984; 247(3): C125–C142.
7. Novik G, Sidarenka A, Rakhuba D, Kolomiets E. Cryopreservation of bifidobacteria and bacteriophages in Belarusian collection of non-pathogenic microorganisms. *Journal of Culture Collections.* 2009; 6(1): 76–84.





2017 May 25 [cited 2020 May 15]; 2: 17075. Available from: <https://www.nature.com/articles/nmicrobiol201775>

8. O'Callaghan A, van Sinderen D. Bifidobacteria and their role as members of the human gut microbiota. *Front Microbiol* [Internet]. 2016 Jun 15 [cited 2020 May 15]; 7:925. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2016.00925/full>
9. Sarkar A, Mandal S. Bifidobacteria – insight into clinical outcomes and mechanisms of its probiotic action. *Microbiological Research*. 2016; 192:159–71.
10. Shehadul Islam M, Aryasomayajula A, Selvaganapathy PR. A review on macroscale and microscale cell lysis methods. *Micromachines (Basel)* [Internet]. 2017 [cited 2020 May 15]; 8(3):83. Available from: <https://www.mdpi.com/2072-666X/8/3/83/htm>
11. Singh A, Vishwakarma V, Singhal B. Metabiotics: the functional metabolic signatures of probiotics: current state-of-art and future research priorities – metabiotics: probiotics effector molecules. *Advances in Bioscience and Biotechnology*. 2018; 9(4):147–89.
12. Speranza B, Liso A, Corbo MR. Use of design of experiments to optimize the production of microbial probiotic biofilms. *Peer J* [Internet]. 2018 Jul 10 [cited 2020 May 15]; 6:e4826. Available from: <https://peerj.com/articles/4826/>
13. Suez J, Elinav E. The path towards microbiome-based metabolite treatment. *Nature Microbiology* [Internet]. 2017 May 25 [cited 2020 May 15]; 2: 17075. Available from: <https://www.nature.com/articles/nmicrobiol201775>

