

## Криоконсервирование плазмидных штаммов бактерий семейства *Enterobacteriaceae*

UDC 57.043: 579.842.1/. 2

YU.V. PANASENKO<sup>1</sup>, I.P. VYSEKANTSEV<sup>2\*</sup>, S.V. BIRYUKOVA<sup>1</sup>

## Cryopreservation of *Enterobacteriaceae* Bacteria Plasmid Strains

Внехромосомные факторы наследственности (плазмиды) играют большую роль в патогенезе заболеваний, вызываемых бактериями. Они детерминируют факторы патогенности бактериальных клеток:  $\beta$ -лактамазу, гемолизины, адгезины, токсины. Кроме того, с помощью трансформации и конъюгации плазмид передается антибиотикорезистентность к чувствительным штаммам [2, 5]. В связи с этим в медицинской практике большое внимание уделяется созданию коллекций плазмидных штаммов бактерий, особенно клинических изолятов. Такие коллекции могут быть использованы для изучения механизмов антибиотикорезистентности бактерий, проведения исследований антимикробного действия новых антибиотиков и разработки рациональных схем антибиотикотерапии.

В практике коллекций микроорганизмов чаще используют методы поддержания жизнеспособности штаммов путем периодических пересевов с гипотермическим хранением под минеральным маслом и лиофилизацию. При хранении под минеральным маслом высока вероятность контаминации культур и потери штаммов. Во время лиофилизации возможна потеря плазмид бактериальными клетками, некоторые виды бактерий не переносят определенные параметры лиофилизации. Себестоимость лиофилизации на единицу хранения довольно высокая [3].

Последние годы интерес исследователей вызывает возможность криоконсервирования штаммов бактерий, несущих определенные плазмиды. Однако вопросы технологии криоконсервирования и сохранности как генетической структуры плазмид, так и плазмид в бактериальных клетках изучены недостаточно.

Цель исследования – изучение влияния условий криоконсервирования и хранения при температуре

Extrachromosome hereditary factors: plasmids play a great role in bacterial disease pathogenesis. They determine a huge number of pathogenicity factors in such bacterial cells as:  $\beta$ -lactomase, hemolysines, adhesins, toxins. In addition, by means of plasmid transformation and conjugation an antibiotic resistance to sensitive strains is transmitted [1, 2]. Due to this fact a great attention is paid to creating the collections of bacterial plasmid strains, especially clinical isolates. These collections may be used in studying the mechanisms of antibiotic-resistant bacteria, performing research of anti-microbial effect of new antibiotics and elaborating rational protocols for antibiotic therapy.

The method of strain viability maintenance via periodic re-inoculation with hypothermic storage under mineral oil and freeze-drying is the most often used in microorganism collection practice. Under mineral oil storage there is a high probability for culture contamination and strain loss. During freeze-drying a plasmid loss by bacterial cells is possible, some bacteria do not endure freeze-drying parameters, as well as the freeze-drying prime cost per storage unit is quite high [3].

Recently the possibility to cryopreserve bacterial strains with certain plasmids has been of researchers' interest. However, many questions concerning cryopreservation and storage technology of both genetic structure of plasmids and those in bacterial cells have been poorly studied.

This research was aimed to study the effect of cryopreservation and storage conditions under liquid nitrogen temperature on *Escherichia coli* bacteria strains, having the certain plasmids.

Clinical isolates of *E. coli* bacteria, isolated under infections in urinary, respiratory tracts, skin and soft tissues, as well as dysbacteriosis, served the research object. These strains had the Hly-plasmid and R-plasmids to some antibiotics. The plasmide presence

<sup>1</sup>Харьковская медицинская академия последипломного образования

<sup>2</sup>Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН 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>Kharkov Medical Academy of Post-Diploma Education, Chair of Clinical Immunology and Microbiology, Kharkov, Ukraine

<sup>2</sup>Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of 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

жидкого азота на плазмидные штаммы бактерий *Escherichia coli*.

Объектом исследования служили клинические изоляты бактерий *E. coli*, выделенные при инфекциях мочевыводящих путей, дыхательных путей, кожи и мягких тканей, а также дисбактериозе. Эти штаммы имели  $\text{H}\nu$ -плазмиду и R-плазмиды к некоторым антибиотикам. Наличие плазмид в изолятах определяли по стандартным методикам [2, 4].

Замораживали бактерии на программном замораживателе биообъектов (СКТБ с ОП ИПКиК НАН Украины). В качестве сред консервирования использовали мясо-пептонный бульон (МПБ) и МПБ с добавлением ДМСО, сахарозы, сыворотки крови крупного рогатого скота, глицерина. Концентрация криопротекторов составляла 10% (концентрация сыворотки объемна). Жизнеспособность бактерий определяли чашечным методом Коха. Сохранность плазмид в бактериальных клетках исследовали по методикам [2, 4]. Математическую обработку результатов проводили с помощью программы Statistika (StatSoft Inc, США).

Было установлено, что замораживание образцов бактерий, суспендированных только в МПБ, со скоростью 2–10°C/мин до –70°C с последующим погружением в жидкий азот не приводило к достоверной гибели бактериальных клеток. Замораживание погружением криопробирок непосредственно в жидкий азот вызывало снижение количества КОЕ/мл до 65–70%. Добавление в МПБ указанных выше криопротекторов обеспечивало сохранность количества жизнеспособных бактерий на исходном уровне при низких и высоких скоростях охлаждения.

Состав среды криоконсервирования и режим охлаждения не влияли на сохранность плазмид в бактериальных клетках.

Все бактериальные клетки, помимо сохранности в них плазмид, сохраняли также генетически детерминированные ферментативные свойства, используемые для идентификации бактерий этого семейства: способность ферментировать глюкозу и другие сахара и спирты, гидролизировать мочевины, утилизировать цитрат и ацетат, декарбоксиллировать аминокислоты, а также нитратные свойства (восстановление нитратов в нитриты) и образование ацетилметилкарбинола (в реакции Фогеса-Проскауэра) и 2,3-бутиленгликоля (в реакции с метиловым красным) [1].

in isolates was determined using the standard methods [2, 4].

Bacteria were frozen using the programmable freezer for bioobjects (Special Designing and Technical Bureau with Experimental Unit of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine). Meat-peptone broth (MPB) and MPB with DMSO, sucrose, cattle blood serum, glycerol additives were used as preservation media. Cryoprotectant concentration was 10% (volumetric serum concentration). Bacterial viability was determined using the Koch's dish method. Plasmid preservation in bacterial cells was studied using the mentioned above techniques. Results were mathematically processed using the Statistika software (StatSoft Inc, USA).

Freezing of bacterial samples, suspended only with MPB with 2–10°C/min rate down to –70°C with following immersion into liquid nitrogen was established as not resulting in a statistically significant bacterial cell death. Freezing by immersing the cryovials directly into liquid nitrogen caused a decrease in CFU/ml number down to 65–70%. Adding the mentioned above cryoprotectants into MPB provided the integrity of viable bacteria number at the initial level under low and high cooling rates.

Composition of cryopreservation medium and cooling regimen did not affect the plasmid integrity in bacterial cells.

All bacterial cells besides the plasmid integrity also preserved genetically determined enzyme properties used for identifying bacteria of this genera: capability of glucose, other sugars and alcohols fermentation, urea hydrolysis, citrate and acetate utilisation, aminio-acid decarboxylation as well as nitrate properties (nitrate reduction into nitrite) and acetylmethylcarbinol formation (in Voges-Proskauer reaction) and 2,3-buthylene glycol (in reaction with methyl red) [1].

## References:

1. *Bergy's manual of determinative bacteriology* / Ed. by J. Holt, N. Krieg.– Moscow: Mir, 1997.– 185 p.
2. *Pozdeyev O.K. Medical microbiology*.– Moscow, 2001.– 768 p.
3. *Handbook on microbiological and viral research methods* / Ed. by M.O. Birger.– Moscow: Meditsina, 1992.– 464 p.
4. *Particular medical microbiology with techniques of microbiological studies: Manual* / Ed. by A.S. Labinskaya, L.P. Blinkova, A.S. Eschina.– Moscow: Meditsina, 2005.– 598 c.
5. *Hacker J. Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution* // *Molecular Microbiology*.– 1997.– Vol. 23, N6.– P. 1089–1097.

Accepted in 06.05.2008

## Литература

1. *Определитель бактерий Берджи*. Т. 1: Пер. с англ. / Под ред. Дж. Хоулта, Н. Крига и др.– М.: Мир, 1997.– 185 с.

2. Поздеев О.К. Медицинская микробиология.– М., 2001.– 768 с.
3. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования / Под ред. М.О. Биргера.– 3-е изд., перераб. и доп.– М.: Медицина, 1982.– 464 с.
4. Частная медицинская микробиология с техникой микробиологических исследований: Учеб. пособие / Под ред. А.С. Лабинской, Л.П. Блинковой, А.С. Ещиной.– М.: Медицина, 2005.– 598 с.
5. Hacker J. Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution // Molecular Microbiology.– 1997.– Vol. 23, N6.– P. 1089–1097.

*Поступила 06.05.2008*