

Криоконсервирование бактерий рода *Enterococcus*

М.Н. КАЛАШНИКОВА¹, Е.Г. ПЕРЕТЯТКО²

¹Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

²Институт микробиологии и иммунологии им. И.И. Мечникова АМН Украины, г. Харьков

Cryopreservation of *Enterococcus* bacteria

M.N. KALASHNIKOVA¹, E.G. PERETYATKO²

¹Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

²Institute of Microbiology and Immunology named after I.I. Mechnikov

of the Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

Бактерии рода *Enterococcus* часто являются этиологическим фактором внутрибольничных и гнойно-септических инфекций. Для решения вопросов диагностики, этиотропной терапии и специфической профилактики этих заболеваний необходимо создание коллекций клинических изолятов энтерококков. В существующих коллекциях наиболее часто используются хранение под минеральным маслом с периодическими пересевами и лиофилизация. Технологии криоконсервирования бактерий этого рода в настоящее время не разработаны.

Цель исследования – изучение влияния режимов и состава среды консервирования на сохранность бактерий рода *Enterococcus*. Объектами исследования служили эталонный штамм *Enterococcus faecalis* ATCC №29213 и 2 клинических изолята *Enterococcus faecium* №167 и №113. В качестве сред консервирования использовали дистиллированную воду, физиологический раствор NaCl и сахарный бульон. Замораживание проводили по трем режимам: режим 1 – быстрое погружение образцов в жидкий азот; режим 2 – охлаждение со скоростью 1°C/мин от 18 до –40°C с последующим погружением в жидкий азот; режим 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. Жизнеспособность бактерий оценивали чашечным методом Коха, биохимические свойства изучали с помощью набора EN-COCCUStest. Каталазную и гемолитическую активность, подвижность, резистентность бактерий к теллуриту калия определяли общепринятыми методами.

При изучении влияния режимов охлаждения и состава среды консервирования на жизнеспособность бактерий было установлено, что сохранность бактерий *E. faecalis* на исходном уровне обеспечивало замораживание по режиму 3 в сахарном бульоне; бактерий *E. faecium* №167 – замораживание по режимам 1 и 2 в дистиллированной воде и сахарном бульоне; бактерий *E. faecium* № 113 – замораживание по всем трем режимам в дистиллированной воде, по режимам 2 и 3 – в физиологическом растворе, по режиму 1 – в сахарном бульоне. В остальных условиях эксперимента жизнеспособность всех трех видов бактерий была ниже исходной. Замораживание по разным режимам и в разных средах консервирования не влияло на исходные биохимические и биологические свойства бактерий.

В результате проведенных экспериментов показана возможность эффективного криоконсервирования бактерий рода *Enterococcus*. Криоконсервирование обеспечивает сохранность исходных генетически детерминированных биохимических и биологических свойств бактерий этого рода.

Enterococcus bacteria are frequently etiological factor of hospital and pyo-septic infections. For solving the tasks of diagnostics, etiotropic therapy and specific prophylaxis of these diseases it is necessary to establish the collections of clinical isolates of enterococci. In the existing collections the storage under mineral oil with periodical replating and lyophilization are the most frequently used. Cryo-preservation protocols for the bacteria of these species for this moment have not been developed.

The research aim of this study was investigation of the effect of regimens and composition of cryopreservation medium on the integrity of *Enterococcus* bacteria. The research objects were reference strain *Enterococcus faecalis* ATCC N29213 and 2 clinical isolates *Enterococcus faecium* N167 and N113. As the cryopreservation media there were used distilled water, physiological solution NaCl and sugar broth. Freezing was performed according to three regimens: regimen 1 comprised rapid plunging of the samples into liquid nitrogen; regimen 2 consisted in cooling with the rate of 1°C/min from 18 to –40°C with following plunging into liquid nitrogen; regimen 3 included the cooling with the rate of 2–3°C/min from 18 to –28°C, maintenance at this temperature for 15 min and following plunging into liquid nitrogen. Bacteria viability was estimated with Koch plate method, biochemical properties were studied using the kit EN-COCCUStest. Catalase and hemolytical activity, motility, resistance of bacteria to potassium tellurite was found with traditional methods.

When examining the effect of cooling regimens and the cryopreservation media compositions on viability of bacteria there has been established that the integrity of *E. faecalis* bacteria at initial level was provided with freezing according to regimen 3 in sugar broth; freezing on regimens 1 and 2 in distilled water and sugar broth for bacteria *E. faecium* N167; *E. faecium* N113 for the one on all three regimens in distilled water, according to regimens 2 and 3 in physiological solution, on regimen 1 in sugar broth. In the rest experimental conditions the viability of three bacteria types was lower versus initial one. Freezing on different regimens and various cryopreservation media did not affect initial biochemical and biological properties of bacteria.

In the result of performed experiments there was shown the possibility of effective cryopreservation of *Enterococcus* bacteria. Cryopreservation provides the integrity of initial genetically determined biochemical and biological properties of bacteria of this genus.