

Сохранность иммобилизованных в гелях клеток *Escherichia coli* M-17 при низких температурах

Т.В. Дорофеева, Е.В. Кудокотцева

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Preservation of *Escherichia coli* M-17 Cells Immobilised in Gels Under Low Temperatures

T.V. Dorofeyeva, E.V. Kudokotseva

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine
of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

В комплексной терапии и профилактике дисбиозов ЖКТ широко используют микроорганизмы – пробиотики, в том числе штамм *Escherichia coli* M-17.

В настоящее время разрабатывают пробиотические препараты IV поколения – синбиотики, иммобилизованные в гелях или на сорбентах. Для хранения препаратов пробиотиков применяют лиофилизацию и различные низкие температуры. Сохранность микроорганизмов, иммобилизованных в гелях при низких температурах, находится на стадии изучения.

Целью исследования было изучение жизнеспособности клеток *E. coli* M-17, иммобилизованных в блоках и гранулах гелей альгината натрия и *k*-каррагинана после хранения в течение 6 месяцев при температурах 4, –20, –80, –196°C.

Объектом исследования был штамм бактерий *E. coli* M-17. Бактерии иммобилизовали в блоках и гранулах альгината натрия и *k*-каррагинана и замораживали в криопробирках («Nunc», США) с рабочим объемом 1,8 мл по 1,5 мл клеток и по 10 гранул соответственно. Контролем служила суспензия бактериальных клеток в ростовой среде М9. В работе использовали следующие режимы замораживания: охлаждение со скоростью 1 и 20 град/мин до –40°C с последующим погружением в жидкий азот, а также с неконтролируемой скоростью до –196°C.

Установлено, что при охлаждении клеток *E. coli* M-17 в среде М9 со скоростями 1 и 20 град/мин до –40°C и последующим погружением в жидкий азот и при замораживании с неконтролируемой скоростью до –196°C жизнеспособность бактерий (*Ig* КОЕ/мл) составляла 9,25 ± 0,04; 9,44 ± 0,04; 9,50 ± 0,03 соответственно, что незначимо отличалось от контроля.

Охлаждение иммобилизованных бактерий в гелях 1% альгината и 1% *k*-каррагинана при указанных выше режимах замораживания значимо не влияло на жизнеспособность клеток.

Для изучения влияния условий хранения на жизнеспособность клеток образцы помещали в холодильные камеры с температурными режимами 4, –20, –80°C, а часть образцов замораживали путем погружения в жидкий азот.

После хранения на протяжении 6 месяцев при –80 и –196°C количество жизнеспособных свободных и иммобилизованных клеток *E. coli* M-17 значимо не изменилось, а при 4 и –20°C – значимо уменьшилось. Наиболее низкие показатели жизнеспособности свободных и иммобилизованных бактерий отмечали после хранения при –20°C.

Полученные результаты свидетельствуют о защитной функции гелей альгината натрия и *k*-каррагинана при низких температурах.

Probiotic microorganisms, including *Escherichia coli* M-17 strain are widely used in a combined therapy and prevention of gastrointestinal dysbiosis.

Currently there are developed the probiotic preparations of IV generation: sinbiotics, immobilized in gels or sorbents. To store the probiotic preparations one applies freeze-drying and storage at different low temperatures. The integrity of microorganisms immobilized in gels at low temperatures is under study.

The research was aimed to study the viability of *E. coli* M-17 cells immobilized in blocks and granules of sodium alginate and *k*-carrageenan gels after storing within 6 months at 4, –20, –80, and –196°C.

The object of the study was bacteria *E. coli* M-17 strain. The bacteria were immobilized in blocks and granules of sodium alginate and *k*-carrageenan, and frozen in 1.8 ml cryovials (Nunc, USA) by 1.5 ml of cells and 10 granules respectively. Suspension of bacterial cells in M9 growth medium served as the control. In research we used the following freezing regimens: cooling with 1 and 20 deg/min rate down to –40°C followed by immersion into liquid nitrogen, as well as with uncontrolled rate down to –196°C.

It was established that cooling *E. coli* M-17 cells in M9 medium with rates of 1 and 20 deg/min to –40°C followed by immersion in liquid nitrogen and freezing with uncontrolled rate down to –196°C resulted in following indices of bacterial viability (*Ig* CFU/ml): 9.25 ± 0.04; 9.44 ± 0.04; 9.50 ± 0.03, respectively, that was insignificantly different from the control.

Cooling of immobilized bacteria in 1% alginate and 1% *k*-carrageenan gels under the mentioned above cooling regimens did not significantly affect a cell viability.

To study the effect of storage conditions on cell viability the samples were placed into cold-storage chambers with temperature regimens of 4, –20, –80°C, and some samples were frozen by immersion in liquid nitrogen.

After storing within 6 months at –80 and –196°C the number of viable free and immobilized cells of *E. coli* M-17 was not significantly changed, but in case of 4 and –20°C it significantly decreased, the lowest levels of viability of free and immobilized bacteria was noted after storage at –20°C.

The results indicate a protective function of sodium alginate and *k*-carrageenan gels at low temperatures.

