

## ВИВЧЕННЯ ВПЛИВУ КРІОКОНСЕРВУВАННЯ НА ЗБЕРЕЖЕННЯ ЖИТТЄЗДАТНОСТІ МІКРООРГАНІЗМІВ РОДУ *ESCHERICHIA* І *STAPHYLOCOCCUS*

Перетятко О.Г.<sup>1</sup>, Ягниюк Ю.А.<sup>1</sup>, Пахомов О.В.<sup>2</sup>,  
Скляр Н.І.<sup>1</sup>, Крестецька С.Л.<sup>1</sup>, Большакова Г.М.<sup>1</sup>,  
Холодна Т.В.<sup>1</sup>, Маркович І.Г.<sup>3</sup>,  
Калініченко С.В.<sup>1</sup>, Панченко Л.О.<sup>1</sup>.

ДУ «Інститут мікробіології та імунології  
ім. І.І. Мечникова Національної академії медичних  
наук України», м. Харків<sup>1</sup>  
Інститут проблем кріобіології і кріомедицини  
Національної академії наук України<sup>2</sup>  
Національна академія медичних наук України, м.  
Київ<sup>3</sup>

Необхідною умовою підтримання колекцій мікроорганізмів є забезпечення довготривалого збереження штамів у функціонально повноцінному стані без змін їх фенотипу та генотипу. Стабільність біологічних властивостей колекційних штамів мікроорганізмів обумовлює можливість їх цільового використання у різних галузях біотехнології та медицини [1, 2]. Згідно з чисельними науковими публікаціями, кріоконсервування визнано одним з найефективніших способів довготривалого зберігання мікроорганізмів [3, 4].

На сьогодні стрімкий розвиток кріобіології, обумовлений, насамперед, можливістю використання найсучаснішого обладнання у вигляді програмних заморозувачів, сховищ, транспортних резервуарів дозволяє проводити подальші дослідження з пошуку більш оптимальних режимів кріоконсервації. Крім того, використання кріопротекторних сполук при заморожуванні мікроорганізмів забезпечує нові можливості щодо ефективного захисту клітин від холодового шоку та альтерації [5]. При низькотемпературному зберіганні бактерій використовуються кріопротектори двох типів: проникні кріопротектори – сполуки, які легко проходять крізь мембрану клітин й забезпечують внутрішньоклітинний захист мікроорганізмів (гліцерин, диметилсульфоксид); непроникні кріопротектори – сполуки, які забезпечують захисну дію головним чином ззовні мембрани не проникаючи у клітину (сахароза, манніт, глюкоза, лактоза, сорбіт, декстрин, поліетиленгліколь, полівініловий спирт) [4].

Кріопротекторний ефект цих речовин пов'язують з багатьма факторами. Проникні кріопротектори можуть знижувати кількість вимороженої води, сприяти формуванню дрібних кристалів та склуванню, знижувати «ефекти розчинів» на біологічні об'єкти під час охолодження-відігріву [6]. Для більшості об'єктів вони дуже ефективні, але доволі часто проявляють токсичну дію по відношенню до них, особливо при використанні неоптимальних концентрацій чи режимів охолодження-відігріву [7]. Непроникні кріопротектори збільшують в'язкість та тенденцію до переохолодження, забезпечують помірну дегідратацію клітин під час охолодження-відігріву,

пригнічують формування зародків кристалів, їх ріст, форму та рекристалізацію [8-10]. Було також показано, що вони можуть підвищувати стійкість плазматичних мембран до дії низьких температур [11]. Грамнегативні бактерії більш чутливі до впливу градієнту температур, ніж грампозитивні, що, скоріш за все, пов'язано з структурою і хімічним складом їх клітинних мембран [4], тому дослідження впливу кріоконсервування на різні за морфофункціональними показниками мікроорганізми і пошук оптимальних для конкретного виду мікроорганізмів режимів консервування та складу консервуючого середовища, які б забезпечували високу життєздатність та стабільність біологічних властивостей є актуальним завданням сучасної мікробіології.

**Метою дослідження** було вивчення впливу режимів охолодження, складу кріозахисного середовища та термінів низькотемпературного зберігання на життєздатність мікроорганізмів різних видів: *E. coli* (грамнегативні) та *Staphylococcus spp.* (грампозитивні).

**Матеріали і методи.** Об'єктами досліджень були 10 штамів (5 штамів *Escherichia coli* та 5 штамів *Staphylococcus spp.*), вилучених з клінічного матеріалу від хворих на гнійно-запальні захворювання. Мікроорганізми вирощували на м'ясо-пептонному агарі (МПА) при 37 С впродовж 24 год, культури змивали кріозахисним середовищем. Мікробну суспензію з вихідною концентрацією 10<sup>9</sup> бактеріальних клітин в 1 мл вносили в кріопробірки (Corning, США). Для кріоконсервування досліджених штамів мікроорганізмів використовували різні за механізмом кріопротекторної дії середовища:

*кріозахисне середовище 1* – м'ясо-пептонний бульйон з додаванням глюкози у кінцевій концентрації 1 %;

*кріозахисне середовище 2* – м'ясо-пептонний бульйон з гліцерином у кінцевій концентрації 10 %.

Вибір концентрацій кріопротекторів обумовлений результатами наших попередніх досліджень та даними інших дослідників [4, 5, 12]. Час перебування клітин у кріозахисному середовищі до початку процесу охолодження складав 60 хв. Охолодження зразків здійснювали за двома режимами: режим 1 – пряме занурення зразків у рідкий азот (швидке заморожування до температури -196°C); режим 2 – охолодження за допомогою програмного заморозувача ЗП-10 (СКТБ з ДВ Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАНУ, Україна). Швидкість охолодження від +20 до -70°C складала 10°C/хв, з температурною зупинкою при -70°C впродовж 10 хв та подальшим зануренням у рідкий азот (-196°C). Контроль процесів охолодження здійснювали за допомогою мідь-константанової терморпарі, розташованої у центрі зразка, що охолоджувався.

Терморпару було підключено до модуля аналогового вводу «ОВЕН МВ-110», з якого дані передавалися на перетворювач інтерфейсів «ОВЕН АС4» і далі – на персональний комп'ютер. Дані записували і аналізували за допомогою програм «Owen Process Vanager 1.2» та «Owen Report Wiewer 1.2».

Обладнання та програмне забезпечення виготовлено компанією «Овен» (Російська Федерація).

Відігрів зразків здійснювали на водяній бані при температурі +37°C впродовж 120 секунд. Перевірку життєздатності досліджених штамів мікроорганізмів після трьох та шести місяців зберігання у рідкому азоті проводили за чашечним методом Коха [13]. Статистичну обробку отриманих даних проводили з використанням комп'ютерних програм Microsoft Excel 2007, STATISTICA 6.0 (Tulsa, США).

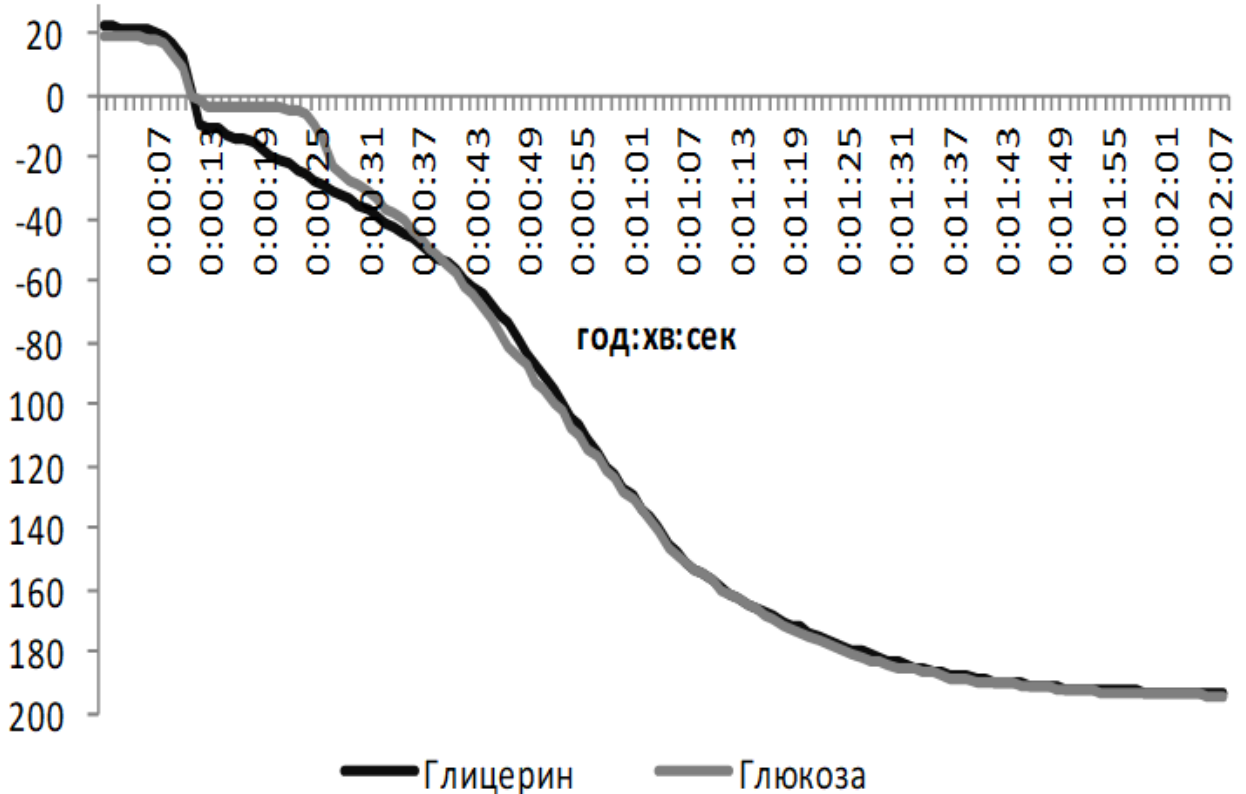


Рис. 1. Термограма охолодження при використанні криозахисного середовища з глицерином та глюкозою, а також режиму швидкого заморожування біоб'єктів (режим 1)

Слід зауважити, що розчин, який містив глицерин у якості криопротектору, сприяв переохолодженню зразків та знижував температуру кристалізації криозахисного середовища при використанні обох режимів охолодження. Це явище може пом'якшити вплив «ефектів розчину» на бактеріальні клітини та сприяти їх виживаності. Крім того, за даними деяких авторів [6, 11], глицерин може значною мірою впливати на ріст кристалів та зменшувати вірогідність пошкодження клітин крупними кристалами льоду. Механізм захисної дії глицерину також пояснюється його адсорбцією на клітинній мембрані та інтерколяцією між молекулами ліпідів, що підвищує стійкість мембран, при цьому криозахисні речовини послаблюють ефект кристалізації, змінюючи її характер [1, 6, 7].

**Результати досліджень та їх обговорення.**  
На рис 1 і 2 показано термограми охолодження зразків з двома типами криозахисного середовища кріоконсервованими за режимом 1 і 2, відповідно.

Результати вивчення впливу режиму охолодження та складу консервуючого середовища на життєздатність мікроорганізмів роду *Staphylococcus* та *Escherichia* після трьох- та шестимісячного зберігання у рідкому азоті наведено у табл. 1. Аналіз результатів показав, що у рекультивованих після трьохмісячного зберігання зразках кількість життєздатних клітин варіювала у межах від  $(2,4 \pm 0,11) \times 10^6$  до  $(2,6 \pm 0,2) \times 10^9$  колонієутворюючих одиниць (КУО)/мл.

При проведенні статистичної обробки отриманих даних встановлено достовірні відмінності у показниках виживання досліджених штамів мікроорганізмів при використанні різних криопротекторних середовищ.

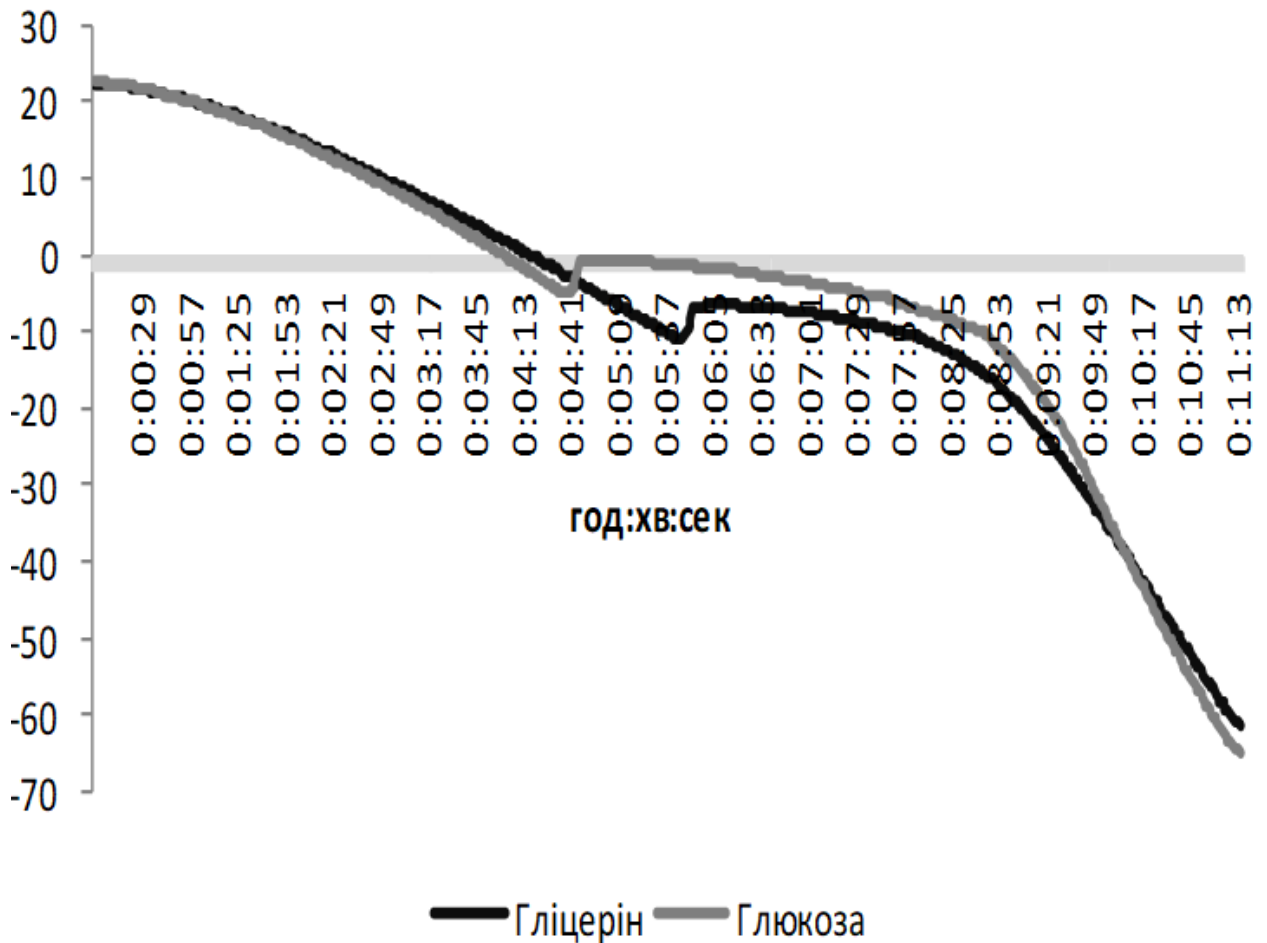


Рис. 2. Термограма охолодження при використанні кріозахисного середовища з гліцерином та глюкозою, а також режиму повільного заморожування біооб'єктів (режим 2)

Таблиця 1. Показники життєздатності штамів *Staphylococcus spp.* та *E. coli* при різних способах кріоконсервування

Назва штаму	Термін зберігання	Кількість КУО/мл			
		Режим 1		Режим 2	
		гліцерин	глюкоза	гліцерин	глюкоза
<i>S. aureus</i> 392	3 міс	$(2,6 \pm 0,20) \times 10^9$	$(4,4 \pm 0,18) \times 10^8$	$(2,3 \pm 0,17) \times 10^9$	$(5,2 \pm 0,12) \times 10^7$
	6 міс	$(2,4 \pm 0,18) \times 10^9$	$(3,9 \pm 0,15) \times 10^8$	$(2,5 \pm 0,18) \times 10^9$	$(4,9 \pm 0,10) \times 10^7$
<i>S. epidermidis</i> 296	3 міс	$(3,2 \pm 0,17) \times 10^8$	$(8,1 \pm 0,06) \times 10^6$	$(3,1 \pm 0,15) \times 10^8$	$(3,6 \pm 0,09) \times 10^8$
	6 міс	$(3,0 \pm 0,15) \times 10^8$	$(8,4 \pm 0,11) \times 10^6$	$(3,3 \pm 0,16) \times 10^8$	$(2,9 \pm 0,08) \times 10^8$
<i>S. aureus</i> 787	3 міс	$(9,6 \pm 0,20) \times 10^7$	$(9,9 \pm 0,22) \times 10^6$	$(9,4 \pm 0,23) \times 10^7$	$(1,0 \pm 0,09) \times 10^7$
	6 міс	$(8,4 \pm 0,16) \times 10^7$	$(9,3 \pm 0,18) \times 10^6$	$(9,0 \pm 0,19) \times 10^7$	$(1,2 \pm 0,11) \times 10^7$
<i>S. aureus</i> 456 (16571)	3 міс	$(2,0 \pm 0,14) \times 10^9$	$(7,4 \pm 0,18) \times 10^8$	$(1,9 \pm 0,09) \times 10^9$	$(4,9 \pm 0,12) \times 10^8$
	6 міс	$(1,8 \pm 0,16) \times 10^9$	$(7,6 \pm 0,21) \times 10^8$	$(1,7 \pm 0,11) \times 10^9$	$(5,1 \pm 0,16) \times 10^8$
<i>S. aureus</i> 1601(16556)	3 міс	$(9,6 \pm 0,18) \times 10^8$	$(8,9 \pm 0,06) \times 10^8$	$(7,7 \pm 0,09) \times 10^8$	$(9,6 \pm 0,09) \times 10^7$
	6 міс	$(9,4 \pm 0,16) \times 10^8$	$(8,4 \pm 0,11) \times 10^8$	$(7,9 \pm 0,16) \times 10^8$	$(9,2 \pm 0,15) \times 10^7$
<i>E. coli</i> 492	3 міс	$(1,4 \pm 0,17) \times 10^8$	$(8,5 \pm 0,09) \times 10^7$	$(1,3 \pm 0,21) \times 10^8$	$(6,2 \pm 0,09) \times 10^6$
	6 міс	$(1,2 \pm 0,12) \times 10^8$	$(7,9 \pm 0,10) \times 10^7$	$(1,5 \pm 0,18) \times 10^8$	$(6,0 \pm 0,14) \times 10^6$
<i>E. coli</i> 493	3 міс	$(1,9 \pm 0,11) \times 10^9$	$(5,6 \pm 0,17) \times 10^8$	$(1,7 \pm 0,03) \times 10^9$	$(5,6 \pm 0,08) \times 10^6$
	6 міс	$(2,0 \pm 0,14) \times 10^9$	$(5,0 \pm 0,17) \times 10^8$	$(2,2 \pm 0,11) \times 10^9$	$(5,1 \pm 0,12) \times 10^6$
<i>E. coli</i> 610	3 міс	$(3,5 \pm 0,08) \times 10^7$	$(1,5 \pm 0,09) \times 10^7$	$(3,8 \pm 0,06) \times 10^7$	$(2,4 \pm 0,11) \times 10^6$
	6 міс	$(3,0 \pm 0,12) \times 10^7$	$(1,8 \pm 0,10) \times 10^7$	$(4,1 \pm 0,15) \times 10^7$	$(2,6 \pm 0,13) \times 10^6$

<i>E. coli</i> Д (01050)	3 міс	$(1,9 \pm 0,2) \times 10^8$	$(8,1 \pm 0,08) \times 10^7$	$(1,7 \pm 0,09) \times 10^8$	$(7,1 \pm 0,09) \times 10^7$
	6 міс	$(2,2 \pm 0,08) \times 10^8$	$(7,8 \pm 0,14) \times 10^7$	$(1,3 \pm 0,11) \times 10^8$	$(6,8 \pm 0,14) \times 10^7$
<i>E. coli</i> 145 (01026)	3 міс	$(7,6 \pm 0,12) \times 10^8$	$(4,8 \pm 0,29) \times 10^8$	$(6,9 \pm 0,06) \times 10^8$	$(2,9 \pm 0,09) \times 10^8$
	6 міс	$(7,8 \pm 0,10) \times 10^8$	$(4,1 \pm 0,15) \times 10^8$	$(6,1 \pm 0,12) \times 10^8$	$(3,1 \pm 0,14) \times 10^8$

Так, при використанні режиму заморожування № 1 й додаванні у поживне середовище кріопротектору гліцерину середнє значення кількості життєздатних бактеріальних клітин складало  $9,0 \times 10^8$  КУО/мл, що статистично значимо перевищувало зазначений показник, що було отримано при використанні у якості кріопротектору глюкози –  $3,3 \times 10^8$  КУО/мл ( $p < 0,05$ ) (рис. 3). Більш виразний кріопротекторний ефект гліцерину зафіксовано також при режимі заморожування № 2 – середня кількість

життєздатних клітин після рекультивациі складала  $8,1 \times 10^8$  КУО/мл, у той час як при використанні глюкози –  $1,3 \times 10^8$  КУО/мл ( $p < 0,05$ ).

Слід зазначити, що середні показники кількості колонієутворюючих одиниць при рекультивациі штамів кишкової палички і стафілококів, які зберігались у рідкому азоті впродовж 3-х та 6-ти місяців статистично не відрізнялись (рис. 3).

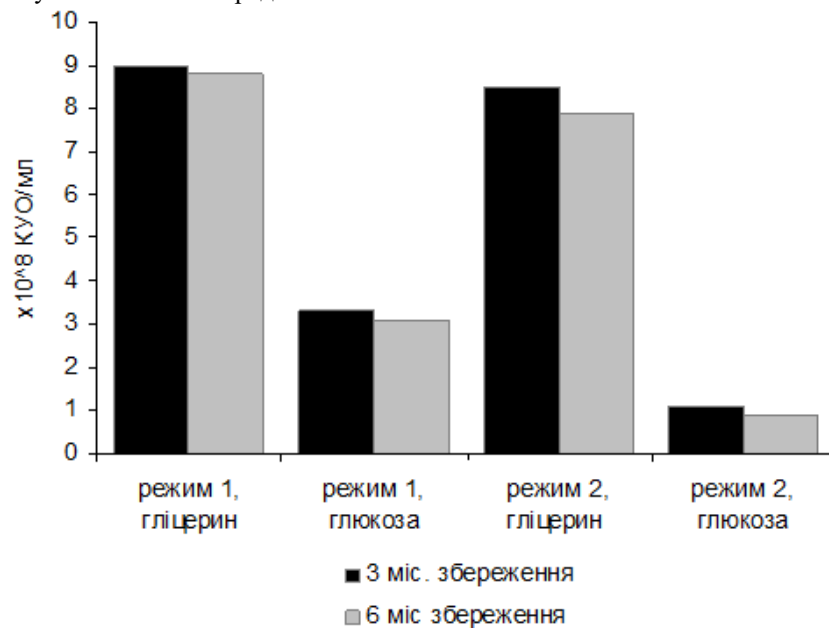


Рис. 3. Середні показники кількості життєздатних клітин при використанні різних способів кріоконсервування та при різних термінах зберігання мікроорганізмів

Для оцінки ефективності різних режимів кріоконсервування також розраховували показник виживаності (відсоток життєздатних клітин у рекультивованих зразках відносно кількості КУО у зразках до кріоконсервування).

Встановлено, що при використанні режиму охолодження № 1 показник виживаності бактерій, суспендованих у поживному середовищі з гліцерином в середньому складав  $(90,0 \pm 3,8) \%$  при трьохмісячному зберіганні та  $(88,8 \pm 3,2) \%$  при шестимісячному зберіганні, що майже у 3 рази перевищувало аналогічний показник при використанні кріопротекторного середовища з глюкозою –  $(33,0 \pm 6,1) \%$  та  $(31,0 \pm 5,9) \%$  відповідно ( $p < 0,05$ ). При застосуванні поживного середовища з гліцерином, достовірних відмінностей між показниками виживаності у залежності від виду мікроорганізму не виявлено. Але, при використанні середовища з глюкозою більш стійкими до заморожування за режимом одноетапного охолодження виявились стафілококи: середній показник виживаності

стафілококів після 3-х місяців зберігання у 1,7 разів перевищував аналогічний показник кишкової палички –  $(41,7 \pm 5,8) \%$  проти  $(24,2 \pm 4,6) \%$  та у 1,9 разів – після 6-ти місяців зберігання ( $(40,1 \pm 5,2) \%$  проти  $(21,7 \pm 4,1) \%$  відповідно) ( $p < 0,05$ ).

При режимі заморожування № 2 за умов використання гліцерину через 3 місяці зберігання зразків середній показник виживаності сягав  $(81,0 \pm 5,1) \%$ , через 6 місяців –  $(79,0 \pm 4,8) \%$ , у той час, як при використанні глюкози – лише  $(13,8 \pm 3,0) \%$  та  $(13,5 \pm 2,9) \%$  відповідно ( $p < 0,05$ ). При аналізі результатів впливу даного режиму заморожування на мікроорганізми різних видів зберігалась така ж тенденція, як і при режимі заморожування № 1. А саме, показники виживаності стафілококів і кишкових паличок, суспендованих у середовищі з гліцерином статистично не відрізнялись, тоді як у середовищі з глюкозою середній показник виживання стафілококів у 2,7 разів перевищував середній показник виживання кишкових паличок ( $p < 0,05$ ). Отримані нами результати узгоджуються з даними інших дослідників

[4, 14], якими встановлено, що особливості будови мікроорганізмів, а саме наявність товстої клітинної стінки поверх плазматичної мембрани сприяє більш виразному кріопротекторному ефекту глюкози при заморожуванні грампозитивних бактерій.

Слід відзначити, що при використанні середовища з гліцерином показники виживаності при застосуванні різних режимів охолодження статистично не відрізнялись ( $p > 0,05$ ). Тоді, як при використанні кріопротекторного середовища з глюкозою середнє значення показнику виживання бактерій при заморожуванні зразків за режимом № 1 у 2,4 рази перевищувало аналогічний показник при заморожуванні зразків за режимом № 2 ( $p < 0,05$ ). Так після 3-х місяців зберігання у середовищі з глюкозою показник виживання бактерій, заморожених за режимом № 1 складав ( $33,0 \pm 5,4$ ) %, за режимом № 2 – ( $13,8 \pm 3,8$ ) %; через 6 місяців зберігання – ( $31,0 \pm 4,8$ ) % та ( $13,5 \pm 3,6$ ) % відповідно.

Таким чином, аналіз проведених досліджень показав, що при додаванні у поживне середовище гліцерину вибір режиму заморожування істотно не впливав на показники виживання рекультивованих штамів – середня кількість життєздатних клітин при одномоментному зануренні культур у рідкий азот та при двоетапному низькотемпературному заморожуванні статистично не відрізнялась ( $p > 0,05$ ). У той час як при додаванні у середовище глюкози при використанні першого режиму заморожування середнє значення кількості колонієутворюючих одиниць у три рази перевищувало показник, розрахований при застосуванні другого режиму ( $p < 0,05$ ). Термін зберігання зразків у рідкому азоті не впливав на кількість життєздатних клітин при рекультивації штамів.

#### Висновки.

1. Підтверджено ефективність кріоконсервування, як методу збереження колекційних штамів мікроорганізмів роду *Staphylococcus* та *Escherichia*. Всі взяті у дослід кріоконсервовані штами кишкової палички і стафілококів рекультивовано після 3-х та 6-ти місяців зберігання у рідкому азоті.
2. На життєздатність бактерій у процесі кріоконсервування впливали склад консервуючого середовища, режим охолодження та видова приналежність мікроорганізмів.
3. Оптимальним кріопротектором для заморожування бактерій роду *Staphylococcus* та *Escherichia*, як при одноетапному, так і при двоетапному режимі охолодження виявився гліцерин.
4. При використанні кріопротекторного середовища з глюкозою більш ефективним виявився режим одноетапного охолодження; більш стійкими до охолодження у середовищі з глюкозою були стафілококи.

#### The effects of cryopreservation conditions on viability of escherichia and staphylococcus genus

Peretyatko O.G., Yagnuk Y.A., Pakhomov A.V., Sklyar N.I., Krestetska S.L., Bolshakova G.M.,

#### Cholodna T.V., Markovich I.G., Kalinichenko S.V., Panchenko L.A.

Maintaining the collections of microorganisms requires the long-term conservation of strains in viable state without changes in their biological properties. Cryopreservation is considered as one of the most effective means of long-term storage of microorganisms. The use of cryoprotective compounds ensures new possibilities to protect microbial cells from cold shock and alterations at freezing procedure. Specification of the preservation methods adapted for a specific type of microorganisms, that would provide high viability and stability of biological properties, is an actual task of modern microbiology. **Objective.** This study aimed to investigate the effect of cooling regiments, composition of conservation medium, and low temperature storage on the viability of different types of microorganisms. **Methods.** The study was conducted on 5 strains of *E.coli* and 5 strains of *Staphylococcus spp.* Cryoprotective mediums comprising 1% glucose or 10 % glycerol were used for deep freezing. Two cooling modes were used: mode 1 - direct immersion of the samples in liquid nitrogen; mode 2 - cooling with programmable freezer from 20 to  $-70^{\circ}\text{C}$  with a speed of  $10^{\circ}\text{C} / \text{min}$ , followed by a temperature stop at  $-70^{\circ}\text{C}$  for 10 min and further immersion. The samples were thawed in a water bath at a temperature of  $+37^{\circ}\text{C}$  for 120 seconds. Viability of tested strains was tested by the Koch method after 3 and 6 month of storage in liquid nitrogen. Statistical analysis was performed with nonparametric methods using MX Excel 2007 and STATISTICA 6.0 software. **Results.** Significant strain-specific differences in survival rates were established. At both cooling modes adding of the glycerol as a cryoprotectant provided significantly higher viability of bacterial cells then adding of glucose. The average number of viable cells after freezing was  $8.1 \times 10^8 \text{CFU} / \text{ml}$  vs  $1.3 \times 10^8 \text{CFU} / \text{ml}$  for glycerol and glucose respectively ( $p < 0,05$ ). There was no significant difference in viability of strains after deep frozen storage for 3 and 6 month. All strains had similar viability rates when glycerol was used as a cryoprotectant. *Staphylococci* were less vulnerable to freezing stress at both cooling modes when medium with glucose was used. **Conclusion.** High efficiency of one step deep freezing with 10 % glycerol as a method for preserving of *Staphylococcus* and *Escherichia* collection strains has been demonstrated. The viability of bacteria during cryopreservation was influenced by the composition of the preserving medium, the cooling mode and the species and stain-specific morpho-functional features. Glycerine was found to be the optimal cryoprotectant at both single-stage and two-stage cooling mode. The one stage freezing was much more preferable when a cryoprotective medium with glucose was used. Duration of the sample storage in liquid nitrogen did not affect the number of viable cells. **Keywords:** cryopreservation; freezing; cryopreserving formulation; staphylococci; *Escherichia*.

#### References

1. Gerna R. Kh. Storage of microorganisms . Methods of General Bacteriology Ed. F. Gerhardt. Moscow. 1983. Vol. 1. 210 p.
- 2 Safronova VI., Ocedkin YS., Sviridova OV., Vorobiev NI. Methods of conservation of collection cultures of microorganisms : guidelines . SSI RSRIAM. 2007. 32 p.
3. Heylen K., Hoefman S., Vekeman B., Peiren JP. Safeguarding bacterial resources promotes biotechnological innovation . Appl Biotechnol Microbiol. 2012. Vol. 94(3). P.565-574. doi: 10.1007/s00253-011-3797.
4. Ohapkina VY., Shabalin BA. Methods for maintaining microbial cultures . Applied and Theoretical Ecology. 2009. No. 1. P. 18-27.
5. Pokhilenko VD., Baranov AM., Detushev NV. Methods of long-term storage of collection cultures of microorganisms and development trends . News of higher educational institutions. Volga region. 2009. No. 4. P. 99-118.
6. Pegg DE. Principles of Cryopreservation . Preservation of Human oocytesCRC Press. 2009. P. 34-46.
7. Best BP. Cryoprotectant toxicity: facts, issues, and questions . Rejuvenation research. 2015. Vol. 18, № 5. P. 422-436.
8. Wang X., Xu H. Incorporation of DMSO and dextran-40 into a gelatin/alginate hydrogel for controlled assembled cell cryopreservation. Cryobiology. 2010 Dec;61(3):345-51. doi: 10.1016/j.cryobiol.2010.10.161. Epub 2010 Nov 3.
9. Lv F., Liu B., Li W., Jaganathan GK. Devitrification and recrystallization of nanoparticle-containing glycerol and PEG-600 solutions. Cryobiology. 2014 Feb; 68(1):84-90. doi: 10.1016/j.cryobiol.2013.12.006. Epub 2013 Dec 25.
10. Burkey AA., Riley CL., Wang LK., Hatridge TA., Lynd NA. Understanding Poly(vinyl alcohol)-Mediated Ice Recrystallization Inhibition through Ice Adsorption Measurement and pH Effects. Biomacromolecules. 2018 Jan 8;19(1):248-255. doi: 10.1021/acs.biomac.7b01502. Epub 2017 Dec 21.
11. Meryman HT. Review of biological freezing. In 'Cryobiology'. Academic Press, New York, 1966. P. 63.
12. Peretyatko EG., Kalashnikova MN., Mironenko LG., Vysekantsev IP., Gurina TM. Effect of Cryopreservation Conditions on Preservation of Viability and Biological Properties in *Enterococcus* bacteria . Bulletin of problems of biology and medicine. 2008. Vol. 3. P. 26-30.
13. Nikitina EV., Grate OA. Methods of General and Special Microbiology: Textbook. Kazan. state technol. 2006. 213 p.
14. Vysekantsev IP., Kudokotseva OV., Petrenko TF., Gurina TM. Effect of Storage Temperature Variations on Viability of Cryopreserved Cells of Pro- and Eukaryotes . Problems of cryobiology. 2005. Vol. 15, №1. P. 33-41.