

Н.К. Коваленко, І.Л. Гармашева, О.П. Лівінська, Л.Т. Олещенко

*Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України,
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ 03143, Україна*

ВПЛИВ КРІОКОНСЕРВАЦІЇ НА ЖИТТЄЗДАТНІСТЬ ТА БІОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ МОЛОЧНОКИСЛИХ БАКТЕРІЙ

Мета. Вивчення впливу кріоконсервації на життєздатність та біологічні властивості пробіотичного штаму *Lactobacillus plantarum* 337Д УКМ В-2627 та підбір для нього найефективнішого режиму кріозаморозки. **Методи.** Життєздатність лактобацил визначали методом серійних розведень, кислотоутворювальну активність – за оцінкою титрованої кислотності при рості в молоці, чутливість до антибіотиків – диско-дифузійним методом. **Результати.** Встановлено, що на ступінь виживання, антибіотикочутливість та кислотоутворювальні властивості штаму *Lactobacillus plantarum* 337Д впливає як склад середовища заморозки, так і режим кріоконсервації. У переважній більшості варіантів кріозаморозки відзначалося зростання кислотоутворювальної здатності кріоконсервованих бактерій та підвищення чутливості до дії антибіотиків. **Висновки.** Оптимальні показники було отримано при використанні суміші бактерійних клітин із сахарозо-желатиновим наповнювачем у співвідношенні 17:3 (v/v) шляхом заморожування зануренням в рідкий азот та 5°C/хв до -40°C із подальшим зануренням в рідкий азот. Життєздатність, кислотоутворювальна активність та антибіотикочутливість штаму *L. plantarum* 337Д залишалися найстабільнішими при використанні суміші бактерійних клітин із сахарозо-желатиновим наповнювачем та середовищем MRS у співвідношенні 1:1:2 (v/v) при швидкості заморожування 40°C/хв.

Ключові слова: молочнокислі бактерії, кріоконсервація, режими заморожування.

Довготривале зберігання мікроорганізмів має велике значення не лише для забезпечення роботи колекцій і банків бактерій різного призначення, а й для успішного збереження біологічної активності штамів мікроорганізмів, біотехнологічних процесів, пов'язаних з промисловим виробництвом пробіотичних препаратів і продуктів.

Відомо, що молочнокислі бактерії (МКБ) можна зберігати при температурі 4°C у нативному стані шляхом періодичних пересівів кожні 1-3 місяці в рідкому чи напіврідкому середовищі MRS. Також широко застосовується метод ліофілізації, що представляє собою висушування бактерійної біомаси в захисному середовищі при низьких температурах. При ліофілізації використовують захисні речовини, які знижують температурний поріг кристалізації вільної води, впливаючи на її структуру. Також вони можуть виступати носіями для мікробних клітин, утворюючи свого роду каркас для їх

мобілізації [1, 9]. Бактерії можуть зберігатися протягом досить тривалого часу – до десятків років. Термін зберігання обмежений швидкістю загибелі клітин. Різні МКБ виживають при ліофілізації неоднаково довго.

Одним із найперспективніших способів довготривалого зберігання є кріоконсервація. Головною перевагою кріоконсервації у порівнянні з ліофілізацією є те, що штами меншою мірою втрачають свої біологічні особливості. Перебування у холодovому анабіозі менше впливає на рівень виживання бактерій. Термін їх зберігання також значно довший. Процедура кріоконсервування мікроорганізмів містить меншу кількість етапів, ніж ліофілізація, що дозволяє скоротити часові затрати на переведення бактерій в стан анабіозу [1]. Саме тому сучасне масштабне виробництво бакконцентратів, пов'язане з використанням мікробного матеріалу, активно практикує кріоконсервовані закваски на основі МКБ.

Успішність кріогенної заморозки також залежить від складу середовища, типу використаних кріопротекторів, швидкісного режиму охолодження тощо. Попри чисельні переваги методу кріоконсервації цей процес представляє собою стрес для мікроорганізмів, що може відобразитися на фізіологічних та технологічних характеристиках бактерій. Тому метою наших досліджень було вивчити вплив кріоконсервації на життєздатність та біологічні властивості МКБ та обрати найефективніший режим кріозаморозки для пробіотичного штаму *Lactobacillus plantarum* 337Д УКМ В-2627.

Матеріали і методи. Об'єктом досліджень був пробіотичний штам *Lactobacillus plantarum* 337Д УКМ В-2627 Української колекції мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України. Цей штам був виділений з шлунково-кишкового тракту людей-довгожителів у 1978-1981 роках під час міжнародної геронтологічної експедиції до високогірних селищ Абхазії – регіону з високим рівнем довголіття [5], показана його висока біологічна активність [6]. Бактеріальну культуру вирощували на середовищі MRS [4].

Отриману біомасу було розділено на чотири групи, що відповідають різним концентраціям клітин та кріопротекторним навантаженням (табл. 1). Зразки кожної групи було розділено на п'ять категорій відповідно до різних режимів заморожування. Виведення із холодovого анабіозу проводили на водяній бані при 37°C [8].

Вживання бактеріальної культури оцінювали шляхом визначення кількості колонієутворюючих одиниць (КУО/мл) до та після кріозаморозки. Також досліджували вплив кріоконсервації на фізіологічну активність МКБ, а саме: кислотоутворення, антибіотикочутливість до та після кріоконсервації.

Здатність до кислотоутворення вивчали шляхом висіву бактерій в пробірки із 5 мл молока [4]. Посівна доза складала 0,01% об'єму. Інкубація тривала протягом 14 діб при 37°C. Вміст пробірок титрували 0,1 н NaOH в присутності фенолфталеїну. Результати виражали в градусах Тернера. Дослід повторювали в дев'яти повторностях. Також враховували час форму-

вання згустку та термін, за який це відбувалося, і частоту його утворення, яку виражали у відсотках.

Таблиця 1

Кріоконсервація бактерій штаму *Lactobacillus plantarum* 337 Д при різних кріопротекторних та концентраційних навантаженнях із застосуванням різних режимів заморозки

Середовище кріоконсервування та концентрація клітин КУО/мл (групи)	Режими кріоконсервації				
	<i>Швидке занурення в рідкий азот</i>	<i>40°С/хв, – рідкий азот</i>	<i>1°С/хв до -40°С, потім – рідкий азот</i>	<i>5°С/хв до -40°С, потім – рідкий азот</i>	<i>10°С/хв до -40°С, потім – рідкий азот</i>
культуральна рідина, 5×10^9	1-1*	1-2	1-3	1-4	1-5
бактерії і сахарозо-желатинове середовище у співвідношенні 17:3, ($1,1 \times 10^{12}$)	2-1	2-2	2-3	2-4	2-5
бактерії і сахарозо-желатинове середовище у співвідношенні 1:1, (6×10^{11})	3-1	3-2	3-3	3-4	3-5
Бактерії, сахарозо-желатинове середовище та МРС у співвідношенні 1:1:2, (2×10^{11})	4-1	4-2	4-3	4-4	4-5

Примітка: 1-1* - бактерії, що були кріоконсервовані в культуральній рідині шляхом швидкого занурення в рідкий азот (перша цифра в назві зразка – номер групи, що відображає середовище заморозки, друга цифра – відповідає режиму кріоконсервації).

При дослідженні антибіотикочутливості використовували диско-дифузійний метод. Після вимірювання величини зон затримки росту штами класифікували як чутливі до антибіотиків, помірно-резистентні й резистентні (табл. 2) [2].

Отримані результати були оброблені методами традиційної статистики з використанням програмного забезпечення Statistika 6.0.

Результати та їх обговорення. Дослідження впливу кріоконсервації на бактеріальну культуру показали, що режими заморозки по-різному впливають на життєздатність клітин та показник кислотоутворення (табл. 3-4).

Порівнюючи отримані результати, можемо побачити, що лише у третій групі (3-2, 3-3, 3-4) відбулося падіння кількості КУО/мл більш, ніж на один порядок. У більшості випадків бактерії зберігали титр в межах порядку, зменшуючись в кількості в два – шість разів. Найстабільнішими залишилися показники у випадках 1-2, 1-3, 1-5, 2-2, 2-5, 4-1, де кількість КУО/мл зменшилась не більш, ніж вдвічі. Найбільш сталий результат спостерігали у випадку зразка 4-1 – $1,67 \times 10^{11}$ у порівнянні з стартовим результатом $2,0 \times 10^{11}$ КУО/мл.

У зразку 3-1 відмічено зростання кількості КУО/мл з $6,0 \times 10^{11}$ до $8,24 \times 10^{11}$. Це може бути пов'язано із утворенням ланцюжків бактеріями, які можуть розриватися при заморожуванні-розморожуванні. Кожен фрагмент формує окрему колонію, таким чином, кількість колонієутворюючих одиниць зростає [9].

Таблиця 2

Критерії інтерпретації чутливості до антибіотиків

Клас	Антибіотик	Зона затримки росту, мм		
		Стойкі	Проміжні	Чутливі
Пеніциліни	Бензилпеніцилін	≤14	15-16	≥17
	Оксацилін	≤10	11-12	≥13
	Ампіцилін	≤14	15-16	≥17
	Карбеніцилін	≤13	14-16	≥17
	Піперацилін	≤17	-	≥18
Карбапенеми	Іміпенем	≤13	14-15	≥16
Глікопептиди	Ванкоміцин	≤14	15-16	≥17
Цефалоспорины	Цефтазідим	≤14	15-17	≥18
Аміноглікозиди	Канаміцин	≤13	14-17	≥18
	Гентаміцин	≤12	13-14	≥15
	Тобраміцин	≤12	13-14	≥15
Лінкозаміди	Лінкоміцин	≤14	15-20	≥21
Макроліди	Еритроміцин	≤13	14-22	≥23
	Азітроміцин	≤12	15-22	≥23
Хлорамфенікол	Хлорамфенікол	≤12	13-17	≥18
Хінони/ Фторхіноли	Норфлоксацин	≤12	13-16	≥17
	Ломефлоксацин	≤18	19-21	≥22
Рифампіцини	Рифампіцин	≤16	17-19	≥20
Нітрофурани	Фурадонін	≤14	15-16	≥17

Чіткої залежності між складом середовища кріоконсервування і виживанням мікробних клітин не помічалось. Не було помічено її і при застосуванні різних режимів заморожування. Результат кріоконсервації скоріше залежить від поєднання цих факторів [11].

При дослідженні впливу холодового стресу на антибіотикочутливість спостерігали незмінність резистентності до аміноглікозидних препаратів у всіх групах (зони затримки росту 10-11 мм), лінкоміцину (10-12 мм), норфлоксацину (10-12 мм), ванкоміцину (10 мм, за винятком 3-1) та ломефлоксацину (10-12 мм). До більшості пеніцилінових антибіотиків штам був чутливий як до кріоконсервації, так і після неї (зони затримки росту перевищували 20 мм). Як виняток – оксацилін, до якого штам є резистентним (зона затримки росту 10 мм), але в другій групі зразки 2-2, 2-3 і 2-5 продемонстрували добре виражену чутливість (зони затримки росту більше 15 мм). Щодо антибіотиків, початкова чутливість до яких визначалась як помірною, а саме ампіцилін, азітроміцин та цефтазідим, то у більшості випадків спостерігалася сенсифілізація. Особливо це було виражено у другій та третій групах зразків.

Початкова чутливість до антибіотичних речовин (зони затримки росту ≥ 25 мм) в основному ніяк не змінювалась (макролідні препарати – еритроміцин і рокситроміцин; рифампіцин,

іміпенем і піперацилін), тільки в окремих випадках спостерігалась її зміна на помірну (бензилпеніцилін та карбеніцилін). Цікаво відмітити те, що до фурадоніну, до якого штамп був резистентним до заморожування (зона затримки росту 10 мм), у всіх зразках спостерігалась добре виражена чутливість, зони затримки росту збільшувались до 20 мм.

Таблиця 3

**Вживання бактерій *Lactobacillus plantarum* 337Д
після кріоконсервації**

Група	Досліджуваний зразок	Початкова кількість КУО/мл	Кількість КУО/мл після кріоконсервації
1	1-1	5,0×10 ⁹	(1,28±0,14)×10 ⁹
	1-2		(3,31±0,12)×10 ⁹
	1-3		(2,62±0,21)×10 ⁹
	1-4		(2,43±0,18)×10 ⁹
	1-5		(3,23±0,2)×10 ⁹
2	2-1	1,1×10 ¹²	(2,24±0,25)×10 ¹¹
	2-2		(5,40±0,19)×10 ¹¹
	2-3		(3,27±0,22)×10 ¹¹
	2-4		(1,84±0,29)×10 ¹¹
	2-5		(5,60±0,3)×10 ¹¹
3	3-1	6,0×10 ¹¹	(8,24±0,24)×10 ¹¹
	3-2		(2,24±0,13)×10 ¹⁰
	3-3		(1,28±0,17)×10 ¹⁰
	3-4		(2,56±0,23)×10 ¹⁰
	3-5		(1,23±0,3)×10 ¹¹
4	4-1	2,0×10 ¹¹	(1,67±0,15)×10 ¹¹
	4-2		(8,53±0,27)×10 ¹⁰
	4-3		(8,20±0,24)×10 ¹⁰
	4-4		(7,40±0,3)×10 ¹⁰
	4-5		(6,93±0,23)×10 ¹⁰

Важливо було дослідити кислотоутворювальні властивості бактерій після кріозаморозки. Ацидогенність, стабільність утворення молочного згустку та термін, за який він формується, – важливі технологічні характеристики, що обов'язково мають бути враховані при різних способах зберігання бактерійних культур і заквасок.

Дані, представлені в табл. 3 та на рис. 1-3, показують, що вихідна кількість утворюваної молочної кислоти штамом *L. plantarum* 337Д становить 92°Т, що відповідає 0,69% молочної кислоти. Лише в окремих випадках відбувалося зниження цього показника – у зразках 1-2, 1-3 та 1-4 – 68,60, 80,00 та 69,00°Т відповідно. У переважній більшості випадків спостерігалось збільшення кількості утворюваної кислоти, максимальний вміст якої було відмічено в зразках 2-1 та 2-4 – 153,27 і 151,77°Т.

Слід відзначити, що середні показники кислотоутворювальної активності у другій групі зразків суттєво перевищують значення в інших групах. В середині кожної групи, взятої окремо, теж спостерігалися відмінності, наприклад, у групі 1 зразки 1-2, 1-3, 1-4 показали досить низькі значення у порівнянні з 1-1, 1-5. В цілому чіткої кореляції між режимом заморозки і кислотоутворювальною здатністю не було виявлено.

Таблиця 4

Кислотоутворення *Lactobacillus plantarum* 337Д при різних середовищах та режимах заморозки

Група	зразок	Кислотність, ° Т
1	1-1	101,33±3,42
	1-2	68,60±5,61
	1-3	80,00±4,43
	1-4	69,10±2,50
	1-5	106,66±3,01
2	2-1	153,27±2,26
	2-2	114,73±5,12
	2-3	126,87±7,31
	2-4	151,77±2,99
	2-5	143,30±4,01
3	3-1	98,10±2,85
	3-2	102,66±2,48
	3-3	90,00±4,21
	3-4	96,66±3,36
	3-5	95,10±3,69
4	4-1	95,26±2,14
	4-2	103,3±3,58
	4-3	104,75±4,31
	4-4	112,6±2,65
	4-5	108,4±4,21
контроль		92±3,40

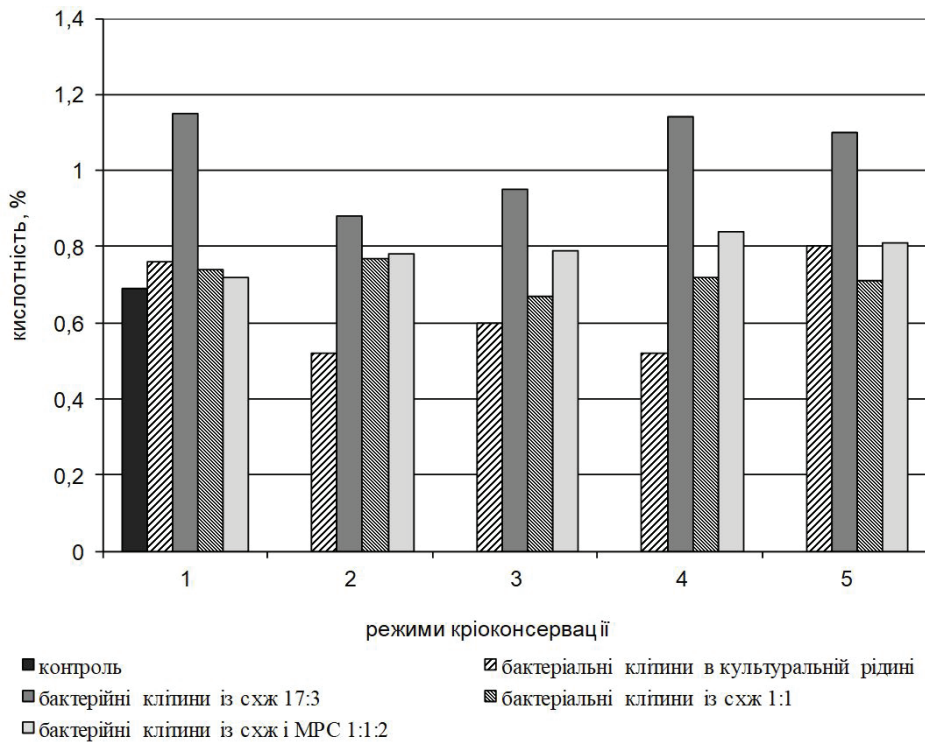


Рис.1. Кислотоутворення *Lactobacillus plantarum* 337Д при використанні різних середовищ та режимів криоконсервації

На рис. 2 представлені дані про час формування молочного згустку. Мінімальний термін його утворення склав 4 доби, що спостерігалось в зразках 2-1, 2-5, 3-2, 3-3, 3-4, 4-2, 4-3. Це відповідало контрольному значенню до кріоконсервування. Найдовше формувалися згустки у першій групі та у випадку 2-2.

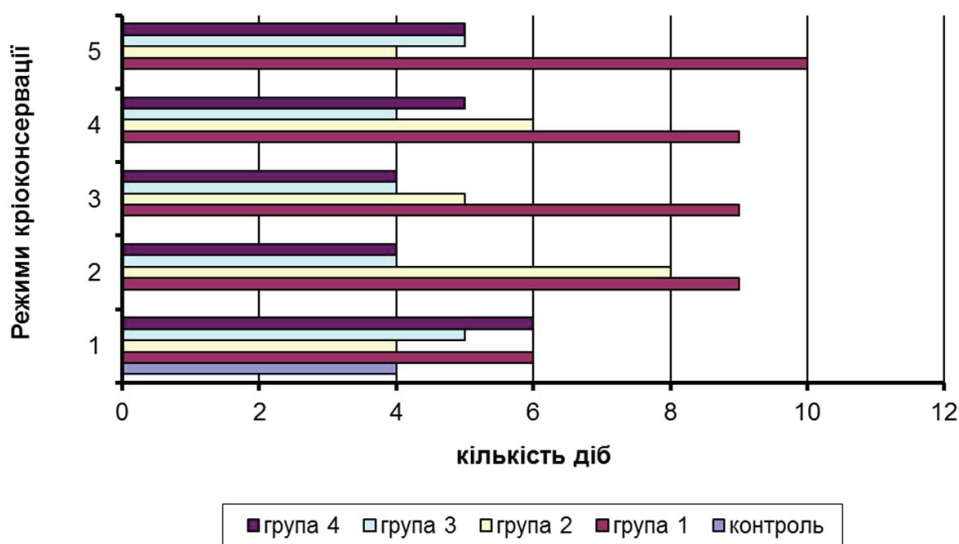


Рис. 2. Швидкість утворення молочного згустку *Lactobacillus plantarum* 337Д при використанні різних середовищ та режимів кріоконсервації

На рис. 3 показано частоту утворення молочного згустку у кожному випадку. Як бачимо з діаграми, згустки формувалися із неоднаковою частотою. Найкраще це відбувалося у третій та четвертій групах. В інших групах лише деякі зразки проявили активність повною мірою – в другій: 2-1, 2-5 та в першій: 1-2, 1-4. Найгірше формувався молочний згусток у групі 1-5.

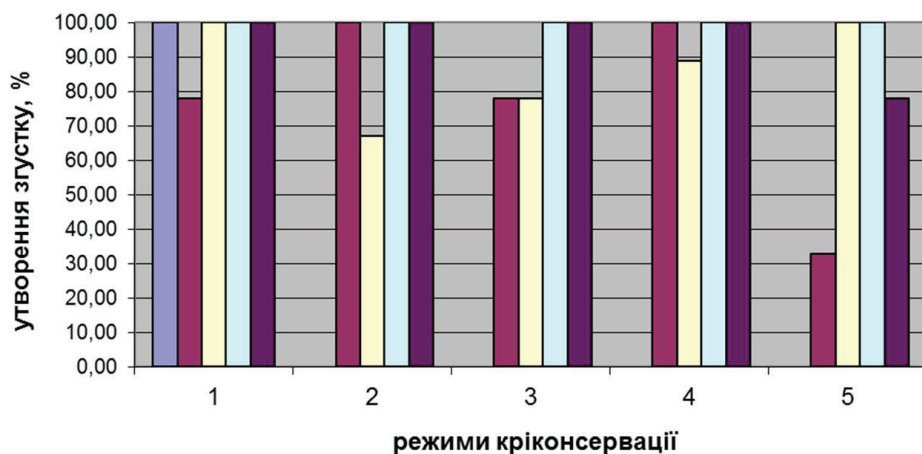


Рис. 3. Утворення молочного згустку *Lactobacillus plantarum* 337Д при використанні різних середовищ та режимів кріоконсервації

Представники виду *Lactobacillus plantarum* є вдалим предметом кріобіологічних досліджень. Пептидоглікан, що входить до складу клітинної стінки та є стійким до заморожування-розморожування, забезпечує клітинам достатню ригідність та запобігання руйнуванню кристалами льоду і осмотичним тиском, що мають місце при кріозаморожуванні [10]. Клітини *Lactobacillus plantarum* не мають цитохромів, що могли б стати додатковою мішенню для кріопшкоджень [3].

Речовини, що входять до складу середовища, вміст води, солей, значення рН та Eh, безумовно, мають вплив на всі життєві показники бактерій. Спеціальні захисні речовини здійснюють кріопротекторну, частково живильну функцію, виконують роль носія, як це спостерігається у випадку сахарозо-желатинової суміші [7, 8].

Аналізуючи вплив складу середовища на ефективність збереження фізіологічних показників бактерійних культур та підсумовуючи отримані дані, можна сказати, що клітини, кріоконсервовані лише в культуральній рідині в концентрації $5,0 \times 10^9$ КУО/мл, хоч і цілком задовільно зберігали свою життєдіяльність, однак поряд з цим мали погіршені кислотоутворювальні властивості.

У другій групі, що характеризувалась найвищою концентрацією клітин та мала найбільш в'язку консистенцію середовища заморозки, спостерігалось суттєвіше зниження життєздатності – кількість КУО/мл знижувалася із $1,1 \times 10^{12}$ до $1,84 \times 10^{11}$ та $2,24 \times 10^{11}$ у зразках 2-4 і 2-1 відповідно. Дослідження антибіотикочутливості показали збільшення зон затримки росту у всіх випадках; у випадку кислотоутворювальних властивостей спостерігалась гетерогенність: в зразках 2-1 і 2-5 збільшувалась кислотність аж до 153,27 і 151,77°Т і стабільні показники утворення молочного згустку, а в зразках 2-2, 2-3, 2-4 хоч і була підвищена кількість утвореної молочної кислоти, але згусток формувався нестабільно.

У групі 3 теж спостерігалась неоднорідність за окремими результатами. У випадках 3-2, 3-4, 3-5 спостерігалось зниження кількості КУО. У зразка 3-1 бачимо незначне збільшення кількості КУО/мл, що, ймовірно, може бути пов'язане із явищем, коли при утворенні кристалів льоду руйнуються та розриваються ланцюжки клітин. Кислотоутворювальні властивості у зразках 3-2 і 3-3 були стабільні. Як і в попередній групі 2, спостерігалось загальне підвищення чутливості до антибіотиків.

У зразках четвертої групи незначною мірою зменшувалась кількість КУО/мл, а також підвищувалось кислотоутворення. Більшість зразків показали стабільні показники при дослідженні антибіотикочутливості. Найстабільнішими показниками серед усіх характеризувався зразок 4-2 – співвідношенні біомаси бактерій і сахарозо-желатинового середовища 1:1 та з додаванням в середовище МРС 1:2 в режимі заморозки 40°С/хв. Мабуть саме така комбінація середовища для кріоконсервації та режиму заморозки виявилася найбільш оптимальною для стабільного зберігання досліджуваного штаму в стані холододового анабіозу. Варто підкреслити, що критерієм для такого висновку є насамперед максимальна стабільність характеристичних ознак штаму.

Таким чином, вплив кріоконсервації на життєздатність МКБ та їх біологічну активність залежить як від складу середовища та наявності кріопротекторів, так і від вихідної концентрації бактерійних клітин.

**Н.К. Коваленко, И.Л. Гармашева, Е.П. Ливинская,
Л.Т. Олещенко**

*Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины,
ул. Академика Заболотного, 154, Киев, 03143, Украина*

ВЛИЯНИЕ КРИОКОНСЕРВАЦИИ НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ И БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ

Резюме

Цель. Изучить влияние криоконсервации на жизнеспособность и биологические свойства пробиотического штамма *Lactobacillus plantarum* 337Д УКМ В-2627 и подбор для него наиболее эффективного режима криозаморозки. **Методы.** Жизнеспособность лактобацилл определяли методом серийных разведений, кислотообразующую активность – по титрованной кислотности при росте в молоке, чувствительность к антибиотикам – диско-диффузионным методом. **Результаты.** Установлено, что на степень выживания, устойчивость к антибиотикам и кислотообразующую активность штамма *Lactobacillus plantarum* 337Д влияет как состав среды заморозки, так и режим криоконсервации. В подавляющем большинстве вариантов криозаморозки отмечалось повышение кислотообразующей активности криоконсервированных бактерий и повышение чувствительности к действию антибиотиков. **Выводы.** Оптимальные показатели были получены при использовании смеси бактериальных клеток с сахарозо-желатиновым наполнителем в соотношении 17:3 (v/v) путем замораживания погружением в жидкий азот и 5°С/мин до -40°С, затем – погружением в жидкий азот. Жизнеспособность, кислотообразующая активность и антибиотикоустойчивость штамма *L. plantarum* 337Д оставались наиболее стабильными при использовании смеси бактериальных клеток в сахарозо-желатиновом наполнителе и среде MRS в соотношении 1:1:2 (v/v) при скорости заморозки 40°С/мин.

Ключевые слова: молочнокислые бактерии, криоконсервация, режимы замораживания.

N.K. Kovalenko, I.L. Garmasheva, O.P. Livinska, L.T. Oleschenko

*Zabolotny Institute of Microbiology and Virology NAS of Ukraine,
Zabolotnogo str, 154, Kyiv, 03143, Ukraine*

INFLUENCE OF CRYOPRESERVATION ON THE VIABILITY AND BIOLOGICAL PROPERTIES OF LACTIC ACID BACTERIA

Summary

Aims. Study of cryopreservation on viability and biological properties of the probiotic strain *Lactobacillus plantarum* 337D UKM B-2627, and selection of the most efficient mode of cryopreservation. **Methods.** The viability of lactobacilli was determined by serial dilution method, lactic acid production – by evaluation of titratable acidity during growth in milk, antibiotic susceptibility- by disc-diffusion method. **Results.** It is established that viability rate, resistance to antibiotic and lactic acid production are influenced as by the medium composition and the mode of cryopreservation as well. In the majority of cryopreservation modes, the acid-producing capacity of cryopreserved bacteria and its sensitivity to antibiotics were enhanced. **Conclusion.** Optimum parameters were obtained by using a mixture of bacterial cells with a sucrose-gelatin medium in a ratio of 17: 3 (v/v) in the freezing mode by immersion in liquid nitrogen and 5 ° C / min

to -40°C , then immersion in liquid nitrogen. The cell viability, lactic acid production and antibiotic susceptibility of *L. plantarum 337D* remained the most stable when using a mixture of bacterial cells in a sucrose-gelatinous medium and MRS in a ratio of 1: 1: 2 (v/v) at the freezing rate $40^{\circ}\text{C} / \text{min}$.

Keywords: lactic acid bacteria, cryopreservation, modes of freezing.

1. *Belous AN, Grischenko VI.* [Cryobiology]. Kyiv: Naukova dumka; 1994. Ukrainian.
2. *Charteris WP, Kelly PM, Morelli L, Collins JK.* Antibiotic susceptibility of potentially probiotic Lactobacillus species. *J Food Prot.* 1998; 61(12):1636-43.
3. *Golovach TM, Pidgorskyi VS, Sudenko VI, Groma LI.* [Deposit and storage of innovative microorganisms]. – Kiev: Znannja Ukrainy; 2004. Ukrainian.
4. *Kvasnikov EI, Nesterenko OA.* Molochnokislye bakterii i puti ih ispolzovaniya. Moscow: Nauka; 1975. Russian.
5. *Kvasnikov EI, Grigorov IUG, Kovalenko NK, Medovar BIA, Shishlevskaia TN.* [Lactic acid bacteria in a digestive tract and nutrition of long-living people in Abkhazia]. *Microbiol Z.* 1984; 46(3):11-18. Ukrainian.
6. *Kovalenko NK, Nemirovskaia LN, Kasumova SA.* [The bacteriocinogenic and lysozyme-synthesizing activity of lactobacilli]. *Microbiol Z.* 1999; 61(6):42-50. Ukrainian.
7. *Osetskyi IA, Kiriliulk AL.* Eksperimentalnoe opredelenie porogovih koncentracij krioprotekturnih veschestv, obespechivavshih ingibirovanie mekhanicheskikh povregdenij kriokonserviruemih objectov. *Probl Cryobiol.* 2005; 15(3): 245-47. Russian.
8. *Pushkar NS, Emets NS, Kalugin Yu.V et al.* [Hydratation of cryoprotectors]. Harkov: Preprint; 1972. Russian.
9. *Pushkar NS.* [Physical and chemical grounds of biological object low temperature preservation. In: Mechanisms of cryodamages and cryoprotection of biological structures.] Kiev: Naukova dumka; 1976. p. 5-11. Russian.
10. *Tsutsayeva AA.* [Cold stress and biological systems]. Kiev: Naukova dumka; 1991. Russian.
11. *Tsutsayeva AA.* Kriokonservacija kletocnih syspenzij. Kiev: Naukova dumka; 1983. Russian.

Отримано 20.01.2017