

И.В.Грачева, А.В.Осин

МЕХАНИЗМЫ ПОВРЕЖДЕНИЙ БАКТЕРИЙ ПРИ ЛИОФИЛИЗАЦИИ И ПРОТЕКТИВНОЕ ДЕЙСТВИЕ ЗАЩИТНЫХ СРЕД

ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Российская Федерация

В работе рассмотрены современные представления о механизмах и факторах повреждений бактериальных клеток при лиофилизации и хранении сухих препаратов, представлены сведения о наиболее эффективных лиопротекторах и механизмах их защитного действия. Лиофилизация или высушивание из замороженного состояния – основной метод консервации бактерий в коллекциях культур и биологических ресурсных центрах. В процессе лиофилизации клетки подвергаются действию повреждающих стрессовых факторов. Низкие температуры, кристаллизация воды, осмотический стресс, изменения pH растворов, дегидратация вызывают повреждения клеточных структур и молекул. Окислительные реакции, протекающие в препаратах сухих клеток, изменяют состав и структуру липидов, белков, нуклеиновых кислот и, как следствие, снижают количество живых клеток при хранении. Одним из главных факторов, влияющим на жизнеспособность бактерий после лиофилизации и хранения, является состав защитной среды, с которой смешивают клетки перед консервацией. Использование защитных сред, содержащих углеводы, аминокислоты, восстановленное молоко, желатин и другие компоненты снижает вероятность повреждений клеточных компонентов, увеличивает гарантированный срок хранения бактерий.

Ключевые слова: лиофилизация, бактерии, коллекции культур, защитные среды, жизнеспособность, повреждения.

Корреспондирующий автор: Грачева Ирина Васильевна, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

I.V.Gracheva, A.V.Osin

Mechanisms of Damaging Bacteria during Lyophilization and Protective Activity of Shielding Media*Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation*

Considered are the current views on the mechanisms and factors of bacterial cell degradation during lyophilization and storage of dry preparations. Given are the data on the most effective lyo-protectors and mechanisms of their shielding action. Lyophilization or sublimation from the frozen state is the basic method of bacteria preservation in culture collections and biological resource centers. In the process of lyophilization cells are exposed to damaging stress factors. Low temperatures, water crystallization, osmotic process, pH alterations, and dehydration affect cell cultures and molecules. Oxidative reactions, running in dry cell preparations, change the composition and structure of lipids, proteins, nucleic acids, and, thereby reduce the number of living cells during the storage. One of the key factors that influences bacterial viability after lyophilization and storage is the composition of shielding medium, with which the cells are mixed up before conservation. Utilization of protective media, containing carbohydrates, amino acids, restored milk, gelatin and other components, decreases the probability of cell elements damaging and extends the assured storage life.

Key words: lyophilization, bacteria, culture collections, shielding media, viability, damage.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Corresponding author: Irina V. Gracheva, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Citation: Gracheva I.V., Osin A.V. Mechanisms of Damaging Bacteria during Lyophilization and Protective Activity of Shielding Media. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2016; 3:5–12. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2016-3-5-12

Один из основных принципов поддержания бактерий в коллекционных центрах заключается в минимизации количества генераций штамма от момента его поступления в коллекцию до выдачи заявителю. Для этого разработаны способы хранения бактерий в течение длительного времени без пересевов. Лиофилизация (синонимы – сублимационное высушивание, высушивание из замороженного состояния) является одним из двух методов консервации, рекомендованных для длительного хранения бактерий в биологических ресурсных центрах и коллекциях культур [21]. Многие известные бактериальные виды сохраняют жизнеспособность после 50 лет хранения в высушенном состоянии [2, 3, 29]. Даже единичные

живые клетки, сохранившиеся в сухих препаратах, после подтверждения их аутентичности могут быть использованы для получения следующей генерации штамма. Кроме того, высушивание позволяет получить бактериальный препарат в форме, удобной для пересылки потребителю.

За период, прошедший после первых экспериментов по высушиванию бактерий, усовершенствованы оборудование и технологии, определены факторы, влияющие на жизнеспособность клеток после консервации и хранения. Вместе с тем выживаемость некоторых видов после лиофилизации остается низкой. Результаты совместных исследований четырех ведущих Европейских коллекций культур, посвящен-

ных разработке протоколов лиофилизации бактерий, чувствительных к высушиванию, позволили сделать два важных вывода [33]. Во-первых, идея разработки единого протокола высушивания, одинаково эффективного для всех бактериальных видов, вероятно, утопична. Во-вторых, главным из варьируемых факторов, влияющим на выживание бактерий при высушивании, является состав протективной среды, с которой смешивают клетки перед консервацией.

Подбор защитных сред проводят эмпирически. Это в значительной степени связано с тем, что полностью не определены механизмы повреждения бактериальных клеток при высушивании и хранении сухих препаратов так же, как и механизмы защитного действия лиопротекторов, представления о которых находятся на уровне предположений. Далеки от решения и вопросы, связанные с причинами неодинаковой устойчивости бактерий разных родов, видов и даже штаммов к высушиванию в лабораторных условиях [2, 3, 12, 29, 33].

В работе рассмотрены современные представления о механизмах и факторах повреждений бактерий при сублимационном высушивании и последующем хранении сухих препаратов, представлены сведения о наиболее эффективных лиопротекторах и вероятных механизмах их защитного действия.

Механизмы повреждений бактерий при сублимационном высушивании и хранении сухих препаратов

Лиофилизация позволяет сохранять бактерии в жизнеспособном состоянии в течение длительного, но ограниченного периода. Это связано, во-первых, с гибелью части популяции в процессе консервации. Во-вторых, при хранении сухих препаратов происходит снижение количества жизнеспособных клеток. Сублимационное высушивание – сложный технологический процесс, включающий 3 основных этапа: замораживание клеточной суспензии; первичная сушка, в течение которой замороженная вода удаляется при субнулевых температурах; вторичная сушка, при которой из визуально сухого препарата при положительных температурах удаляется незамороженная вода, прочно связанная с биомолекулами. Повреждения клеток, включая летальные, могут происходить на каждом этапе сублимационного высушивания и при хранении [4].

Повреждения бактерий при замораживании.

Перед высушиванием клеточные суспензии охлаждают до температуры ниже точки полного замораживания защитной среды. Несмотря на то, что сегодня известны основные физико-химические факторы, повреждающие бактерии при замораживании, детально процессы, происходящие в разных типах клеток при разных условиях консервации, до конца неясны и поэтому в литературе обсуждаются несколько моделей криоповреждений – повреждений, вызванных кристаллизацией воды [4, 6, 17, 18, 20, 23].

Наиболее признанной является двухфакторная теория криоповреждений, в соответствии с кото-

рой причины гибели клеток зависят от скорости их охлаждения. При низкой скорости охлаждения большая часть клеток погибает на этапе замораживания от длительного воздействия холодного осмотического шока [6, 17, 20]. Кристаллизация воды изменяет физико-химические свойства растворов – концентрацию, рН, вязкость. Методами электронной криомикроскопии показано, что при охлаждении клеточных суспензий до субнулевых температур между кристаллами льда формируются каналы со сконцентрированным замораживанием раствором и бактериальными клетками [6, 18]. По мере кристаллизации воды концентрация внеклеточного раствора повышается. Так, замораживание раствора 10 % глицерина со скоростью 5 °С мин⁻¹ приводит к повышению его концентрация до 54 % при температуре стеклоперехода –51 °С, а замораживание физиологического раствора к повышению концентрации хлорида натрия до 27 при эвтектической температуре –21 °С [4, 18]. Уменьшение объема клетки, повышение концентрации внутриклеточных солей, фазовые переходы мембранных липидов в ответ на холодовой осмотический шок могут привести к повреждениям белков, клеточных мембран и, как следствие, к гибели бактерий на первом этапе консервации [20, 23].

Изучение динамики гибели бактерий при высоких скоростях охлаждения показывает, что наиболее существенное снижение количества живых клеток происходит на этапе оттаивания вследствие механических повреждений мембран кристаллами внутриклеточного льда, либо осмотического стресса [6, 17, 18]. Протоколы высушивания предусматривают проведение первичной сушки при температуре, исключая оттаивание препарата. Поэтому, с точки зрения выживаемости бактерий после лиофилизации, оптимальным является быстрое замораживание [43].

Выживаемость бактерий после этапа замораживания варьирует в зависимости от их вида и условий охлаждения [32, 41, 43]. Фактическая выживаемость может отличаться от приводимых в работах результатов, поскольку определить количество живых клеток после замораживания без их оттаивания сегодня невозможно. С другой стороны, необходимо учитывать, что нелетальные повреждения клеток при смешивании с защитной средой и замораживании, которые трудно идентифицировать, могут повышать чувствительность бактерий к стрессовым факторам, действующим на следующих этапах сушки [1].

Повреждения бактерий при дегидратации.

Гибель бактериальных клеток после дегидратации может быть следствием денатурации белков, нуклеиновых кислот, изменения структуры мембранных липидов, клеточной стенки. С. Santivarangkna C. et al. методом атомно-силовой микроскопии обнаружены повреждения клеточной стенки *Lactobacillus helveticus* после высушивания [36]. S.B. Leslie. et al. описаны отклонения ИК-спектров белков *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* после высушивания, свидетельствующие об изменении их структуры [26]. Однако основ-

ной мишенью повреждения клеток при дегидратации считаются клеточные мембраны [14, 27, 39].

Косвенным доказательством повреждения клеточных мембран является высокая концентрация внутриклеточных компонентов – ферментов, нуклеиновых кислот, электролитов во внеклеточном растворе после регидратации сухих клеток, повышенная чувствительность первых генераций бактерий к антибиотикам [38]. Причиной таких явлений считается временное нарушение проницаемости мембран дегидратированных клеток, связанное с фазовыми переходами мембранных липидов [14].

Как известно, при физиологически оптимальных условиях мембранные липиды связаны с молекулами воды и находятся в жидкокристаллической фазе. Изменение фазового состояния липидов происходит при снижении температуры или уровня гидратации. Когда вода удалена, например, при высушивании, полярные головки фосфолипидов сближаются, что приводит к усилению ван-дер-ваальсовых взаимодействий между соседними углеводородными цепями, снижению текучести мембран и переходу мембранных липидов в фазу геля при комнатной температуре, т.е. высушивание повышает температуру фазовых переходов липидов (T_m – melting temperature), которая зависит от степени их дегидратации [14]. Изменение T_m при изменении уровня гидратации показано методами дифференциальной сканирующей калориметрии, ИК-спектроскопии на моделях липидов, липосом, изолированных мембран и бактериальных клеток [14, 26]. По данным S.V.Leslie *et al.* высушивание *E. coli* повышает T_m мембранных липидов с 10 до 50 °С, т.е. на 40 °С по сравнению с гидратированными клетками, а *B. subtilis* на 37 °С, с 5 до 42 °С [26].

Изменение T_m – обратимый процесс и при регидратации мембранные липиды подвергаются обратному переходу от фазы геля к жидкокристаллической фазе. Фазовые переходы мембранных липидов происходят не одновременно. Наличие липидов в разных фазах в течение временного периода приводит к нарушению структуры и избирательной проницаемости мембран [14]. Если нарушение избирательной проницаемости при дегидратации, когда основная часть воды удалена, не опасно для клеток, то повышенная проницаемость мембран при регидратации в условиях избытка воды может приводить к потере жизненно важных компонентов – ионов, солей, белков, нуклеотидов и, как следствие, к гибели бактерий.

Повреждения мембран после высушивания обнаружены у разных видов бактерий рода *Lactobacillus* методом окрашивания клеток флуоресцентным красителем – проподиумом иодитом, проникающим в клетки только через поврежденные мембраны [39, 40]. Однако повреждения мембран, вызванные фазовыми переходами, не всегда летальны и при оптимальных условиях регидратации клетки могут восстанавливать их целостность [40].

Повреждения бактерий при хранении. Снижение количества живых клеток в сухих препа-

ратах при стандартизованных условиях хранения происходит с относительно постоянной скоростью [29]. Существенное влияние на скорость инактивации оказывают вид упаковки сухих клеток и условия их хранения [25, 29, 32]. Кроме того, скорость инактивации зависит от вида бактерий, остаточной влажности препарата, состава защитной среды [3, 29, 33]. Количество живых клеток в сухих бактериальных препаратах постепенно снижается, даже при оптимальных условиях хранения, например, в герметично запаянных стеклянных ампулах при температуре 2–4 °С [2, 3, 29].

Идентифицировать процессы, протекающие в сухих клетках при хранении, оценить их влияние на гибель бактерий трудно, даже используя современные методы исследования. Имеющиеся на сегодня экспериментальные данные позволяют считать основной причиной гибели бактериальных клеток реакции свободно-радикального окисления, приводящие к повреждениям белков, нуклеиновых кислот, липидов [4]. Бактериальные клетки имеют эффективные ферментные механизмы защиты от повреждений свободными радикалами. Однако высушивание останавливает все метаболические реакции, и клетка становится не защищенной от повреждений.

Свободные радикалы обнаружены в высушенных препаратах бактерий методом электронного парамагнитного резонанса [22, 24]. Концентрация свободных радикалов в сухих препаратах увеличивается при хранении на фоне снижения количества живых клеток. Основной мишенью повреждений клеток при хранении так же, как и при высушивании, являются мембраны [5, 11]. Перекисное окисление липидов – многостадийная свободно радикальная реакция окисления ненасыщенных остатков жирных кислот, вызывающая химические повреждения мембран. Н.Р.Castro *et al.* методом газовой хроматографии обнаружено снижение u/s индекса (соотношение ненасыщенных и насыщенных жирных кислот в составе мембран) при хранении *Lactobacillus bulgaricus*, которое коррелирует со снижением количества живых клеток [11]. После 90 дней хранения *Weissella paramesenteroides* обнаружен конечный продукт окисления липидов – малоновый альдегид [5]. В то же время С.У.Carlsen *et al.*, используя флуоресцентный липидный зонд, не выявили окисления мембранных липидов после 20 дней хранения *Lactobacillus acidophilus*, несмотря на снижение количества живых клеток [10]. Предположено, что, по крайней мере, в начальный период хранения гибель клеток может быть связана с окислением белков или нуклеиновых кислот.

Хотя эксперименты по выяснению причин гибели высушенных бактерий проведены при неоптимальных условиях их хранения – высокой активности воды и температуре, считается, что эти реакции с низкой скоростью протекают при оптимальных условиях и являются одной из причин гибели лиофилизированных клеток [4, 5, 11, 22, 24]. Снижение

скорости инактивации бактерий, высушенных в присутствии природных и синтетических антиоксидантов, косвенно подтверждает влияние окислительных реакций на гибель бактерий при хранении [5, 24].

Защитные составы для лиофилизации бактерий

Бактериальные виды отличаются по устойчивости к высушиванию в лабораторных условиях. При одинаковых условиях высушивания выживаемость может колебаться от 98 до 1 % и ниже в зависимости от вида [2, 3, 12, 29, 33, 42, 43]. Наиболее устойчивыми являются неподвижные грамположительные бактерии, которые могут быть высушены в воде или буфере без существенной потери жизнеспособности [29]. Наименее устойчивыми являются грамотрицательные подвижные бактерии родов *Aeromonas*, *Aliivibrio*, *Azotobacter*, *Campylobacter*, *Flavobacterium*, *Helicobacter*, *Photobacterium*, *Vibrio* [12, 16, 29, 33, 34, 41]. Анализ скоростей инактивации бактерий, представителей более 40 родов, хранящихся в Международном патентном депозитарии организмов Национального института передовых промышленных технологий и исследований Японии в высушенном состоянии в течение 20 лет, показал отсутствие существенных различий в выживаемости бактерий внутри одного рода [29]. Стандартные отклонения от среднего значения выживаемости видов внутри рода не более $\pm 29,4$. Вместе с тем патогенные виды менее устойчивы при высушивании и хранении, чем непатогенные представители того же рода. Поэтому коллекциям культур рекомендуется адаптировать стандартные протоколы лиофилизации к определенным бактериальным видам, а в случае сервисных коллекций, поддерживающих большое число прокариотических видов, к отдельным родам или таксономическим группам более высокого ранга [33, 35].

Протективные среды должны защищать клетки от повреждений при замораживании, дегидратации, хранении, быть легко высушиваемыми, хорошо растворяться при регидратации, не обладать токсичностью [4]. Большинство защитных составов, рекомендованных для лиофилизации, замораживаются в виде аморфно-кристаллической массы, состоящей из кристаллов воды и остеклованного раствора протектора с включенными в его состав клетками [19, 32]. Считается, что вещества, способные остекловываться при замораживании и сохранять твердое аморфное состояние при высушивании, наиболее эффективны для сохранения биологических материалов в высушенном состоянии [4, 15, 25, 30, 32]. Кристаллизация крио- и лиопротекторов при замораживании и высушивании рассматривается как одна из причин низкой выживаемости бактерий [30, 43].

Спектр эффективных лиопротекторов, соответствующих вышеуказанным свойствам, ограничен – углеводы, некоторые аминокислоты, восстановленное молоко, сыворотки крови, желатин. Комбинации этих соединений в различных концентрациях обе-

спечивают разнообразие защитных составов, используемых в экспериментальных исследованиях и рекомендуемых руководствами по консервации бактерий [3, 9, 12, 13, 16, 33, 34, 42, 43]. Как правило, для лиофилизации используют многокомпонентные составы, включающие вещества с разным механизмом защитного действия.

Важными для разработки протоколов высушивания являются теплофизические свойства защитных составов – температура стеклоперехода T_g' и температура «краха» T_c [16, 19]. T_g' (glass transition temperature) – температура, при которой сконцентрированный замораживанием раствор переходит в твердое некристаллическое состояние. Наибольшая выживаемость после высушивания отмечается, если бактериальную суспензию замораживают до температуры ниже T_g' защитной среды [32, 41]. T_c (collapse temperature) – максимальная температура высушивания, предотвращающая разрушение структуры препарата, сформированной при замораживании [19]. Если в течение первичной сушки температура высушиваемого препарата поднимается выше T_c , происходит его вспенивание – явление, называемое «крах» (collapse).

Углеводы. Защитные свойства низкомолекулярных углеводов при высушивании бактерий подтверждены многочисленными исследованиями [2, 3, 7, 13, 25, 37, 40, 41, 42]. Наиболее эффективными лиопротекторами являются дисахариды [13, 25, 39, 41, 43]. Защитные свойства моносахаров при высушивании и особенно хранении бактерий в высушенном состоянии ниже, чем дисахаридов. Так, выживаемость *Oenococcus oeni* после высушивания в 10 % растворах трегалозы, сахарозы, лактозы, мальтозы, фруктозы, глюкозы соответственно 40,2; 38,2; 32,4; 27,6; 10,2; 9,1 % [43].

Дисахариды используют в концентрациях 5–20 % как однокомпонентные составы и в сочетании с протекторами другой химической природы [9]. По данным большинства работ, защитные свойства дисахаридов возрастают в ряду лактоза-сахароза-трегалоза [13, 25, 32, 41]. Интерес к трегалозе как стабилизатору сухих биологических препаратов был высок в 90-е годы, после обнаружения трегалозы в клетках ангидробиотических организмов, способных без потери жизнеспособности находиться длительное время в дегидратированном состоянии. Было опубликовано большое количество работ, подтверждающих высокие защитные свойства трегалозы при высушивании бактерий. L.M.Crowe. *et al.*, обобщив результаты исследований, сделали вывод, что при оптимальных условиях хранения сухих препаратов трегалоза не имеет существенных преимуществ перед другими дисахаридами [15]. Однако при неоптимальных условиях хранения – высокой температуре и влажности – трегалоза более эффективно защищает сухие клетки от повреждений, благодаря аномально высокой температуре стеклоперехода (T_g), и может быть средой выбора при высушивании бактерий.

Для высушивания пробиотических бактерий с разной степенью успеха используют олигосахариды высокой степени полимеризации и природные полисахариды, например, мальтодекстран, фруктоолигосахарид, галактоолигосахарид [5, 37, 40].

Защитное действие углеводов при замораживании. Дисахариды являются эффективными криопротекторами и используются при криоконсервации микроорганизмов [23]. Механизмы криозащитного действия углеводов разнообразны. Высокое осмотическое давление внеклеточных растворов из-за присутствия углеводов вызывает обезвоживание клеток до замораживания и снижает вероятность образования внутриклеточного льда [1]. Углеводы увеличивают вязкость сконцентрированных замораживанием внеклеточных растворов, что ограничивает подвижность молекул воды и влияет на степень обезвоживания мембран, количество и структуру образующегося льда [18]. Углеводы понижают температуру замораживания растворов, предохраняя клетки от действия высоких концентраций солей [23].

Защитное действие углеводов при высушивании. Углеводы стабилизируют структуру белков и понижают температуры фазовых переходов мембранных липидов. S.B.Leslie *et al.* методом ИК-спектроскопии показали, что высушивание *E. coli*, *B. subtilis* в присутствии трегалозы и сахарозы предотвращает изменение ИК-спектра белков [26]. Предполагают, что углеводы образуют водородные связи с полярно-заряженными группами белков, стабилизируя их структуру в отсутствие воды (гипотеза «водной замены») [14, 30].

Защитное действие углеводов на клеточные мембраны связывают с их способностью понижать температуры фазовых переходов липидов высушенных клеток [14, 26]. Так, температуры фазовых переходов мембранных липидов *E. coli*, *B. subtilis*, высушенных в присутствии сахарозы или трегалозы, по данным ИК-спектроскопии, оставались близкими с таковыми гидратированных клеток [26]. Поэтому мембраны клеток, высушенных в присутствии дисахаридов, находятся в жидкокристаллическом состоянии и не подвергаются фазовым переходам при регидратации.

C.Schwab *et al.*, используя флуоресцентные липидные зонды, показали, что фруктоолигосахарид увеличивает текучесть мембран сухих клеток *Lactobacillus reuteri*, повышая их стабильность при регидратации [37].

Защитное действие углеводов при хранении связывают с их физическим состоянием, а именно со способностью остекловываться при замораживании и сохранять твердое аморфное состояние после высушивания в широком температурном диапазоне [14, 15, 25, 32]. Высушенные бактериальные препараты представляют собой пористую аморфную углеводную массу, в которую включены бактериальные клетки [19, 32]. Вещества в твердой аморфной фазе характеризуются очень высокой вязкостью при температуре ниже температуры стекловых перехода (T_g).

Высокая вязкость среды в аморфном состоянии замедляет скорость химических реакций, требующих молекулярной диффузии и вызывающих изменения в структуре и химическом составе клеточных мембран.

Несмотря на подтверждение важности физического состояния среды, окружающей клетку, стеклование не может полностью предотвратить все химические реакции, протекающие в такой сложной биологической системе, как микроорганизм при хранении, в частности, реакции перекисного окисления липидов [25, 32]. Исследования показывают, что остекловывание защитной среды важно, но не достаточно для стабильности высушенных бактерий. Природа углевода, его свойства более значимы для стабильности клеток, чем физическое состояние окружающей их среды [25].

Экспериментальные данные о физическом состоянии клеточной цитоплазмы бактерий после высушивания, потенциальных внутриклеточных стекловых переходах и их влиянии на устойчивость бактерий при хранении в дегидратированном состоянии на сегодняшний день отсутствуют [8].

Аминокислоты и их производные, витамины. Некоторые аминокислоты, витамины и их соли, такие как глутамат, аспартат, аскорбат натрия, глицин-бетаин, используют в качестве компонентов защитных сред для высушивания бактерий [9, 12, 13, 24, 28, 42, 43]. Аминокислоты и витамины, как правило, включают в состав сред, содержащих углеводы или белковые продукты в концентрациях, не превышающих 1–2 % [9]. Двухкомпонентные водные растворы аминокислот не рекомендованы для лиофилизации из-за низкой эффективности вследствие способности кристаллизоваться при консервации [7, 9, 42]. Вместе с тем G.I.Martos *et al.* опубликованы данные, согласно которым выживаемость *Lactobacillus delbrueckii* после высушивания в 5 % глутамате и аспартате натрия составила соответственно 94 и 95 %, после «ускоренного» хранения при 30 °C – 92 и 99 % [28]. Защитные свойства 2,5 % глутамата натрия при высушивании *O. oeni* и *Lactobacillus brevis* были выше, чем углеводов [43].

Литературные данные о защитных свойствах глицин-бетаина (синонимы – бетаин, 3-метил глицин) также противоречивы. По данным D.Cleland *et al.*, защитное действие 6 % глицин-бетаина было выше, чем контрольных сред сахароза+сывороточный альбумин и трегалоза+декстран при высушивании и последующем хранении *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria gonorrhoeae* [12]. В то же время глицин-бетаин не имел преимуществ перед контрольными средами при лиофилизации *Staphylococcus epidermidis*, *Lactobacillus coryniformis*, *Bifidobacterium animalis* и других [7, 12].

По данным E.S.Bergenholtz *et al.*, выживаемость *L. coryniformis* после высушивания в 5 % растворе бетаина составляет менее 3 %, в 15 % сахарозе – более 45 % [7]. Низкие защитные свойства бетаина,

возможно, связаны с его кристаллизацией при лиофилизации. Кроме того, бетаин снижал защитное действие сахарозы. Чем выше концентрация бетаина в среде, тем ниже выживаемость бактерий после высушивания. Изучение теплофизических свойств сред с разным соотношением бетаина и сахарозы показало, что бетаин понижал температуру стеклоперехода как сконцентрированного замораживанием раствора сахарозы (T_g), так и высушенной сахарозы (T_g).

Глицин-бетаин относится к группе осмопротекторов и, вероятно, защищает клетки от осмотического стресса, которому они подвергаются неоднократно при смешивании с защитной средой, замораживании и регидратации [4, 18]. Защитное действие глутамата, аспартата, аскорбата натрия связывают с их антиоксидантной активностью, способностью защищать клетки от свободно-радикального окисления при хранении [4, 24].

G.I.Martos *et al.* предложен механизм защитного действия глутамата и аспартата натрия при высушивании [28]. Результаты исследований позволили высказать предположение, что глутамат и аспартат натрия встраиваются в поверхностную область мембран и увеличивают подвижность углеводородных цепей жирных кислот. По мнению авторов, именно высокая текучесть дегидратированных мембран стабилизирует сухие бактериальные клетки.

Восстановленное обезжиренное молоко (10–20 %) распространенная среда для сублимационного высушивания бактерий, рекомендована для использования в коллекциях культур [9, 16]. Однако ни в одной работе восстановленное молоко не показало преимуществ в сравнении, например, с низкомолекулярными углеводами [3, 13, 34]. Одной из возможных причин низкой защиты является высокая остаточная влажность сухих препаратов, высушенных в присутствии молока, в сравнении с трегалозой при одинаковом протоколе высушивания [33].

Включение в состав защитной среды дополнительных компонентов может как усиливать, так и снижать протективные свойства молока [16, 41]. Защитное действие восстановленного молока обусловлено его составом, который включает лактозу, аминокислоты, белки. Белки молока способствуют формированию аморфной матрицы. Считается, что именно белки, а не углеводы играют основную роль в формировании биологических стекол в клетках ксероустойчивых организмов при обезвоживании и обеспечивают их высокую стабильность в дегидратированном состоянии [8]. Обезжиренное молоко содержит много видов аминокислот, которые обеспечивают эффективность репарационных процессов при регидратации. Известно, что молоко является хорошей средой регидратации сухих бактериальных препаратов [13, 41].

Желатин – полимер, продукт расщепления коллагена, в настоящее время не используется в качестве самостоятельного стабилизатора бактериальных клеток из-за достаточно низкой выживаемости

при лиофилизации [38]. Его добавляют к углеводам, что повышает защитное действие последних [2, 3, 31]. По данным A.S.Bergenholtz *et al.*, включение желатина в состав защитной среды с трегалозой снижает скорость инактивации вакцинного штамма *Francisella tularensis* LVS при 37 °C с $-3.5 \log$ /неделю до $-0.9 \log$ /неделю [31]. Защитное действие желатина, вероятно, связано со способностью формировать при замораживании-высушивании аморфную фазу с низкой молекулярной подвижностью.

Заключение. Несмотря на то, что лиофилизация позволяет сохранять бактерии в течение длительного времени в жизнеспособном состоянии, сам процесс консервации сопряжен с действием на клетку комплекса повреждающих физико-химических факторов. Низкие температуры, обезвоживание, осмотический стресс, изменения pH растворов способны вызывать повреждения клеточных компонентов – мембран, белков, нуклеиновых кислот. Остановка метаболических процессов в высушенных клетках делает их незащищенными от окислительных реакций при хранении. Применение специальных защитных составов для лиофилизации снижает вероятность повреждений, включая летальные, увеличивает гарантированный срок хранения бактерий. Весомый вклад в понимание процессов, происходящих в бактериальных клетках при высушивании и хранении, внесли флуоресцентные липидные зонды и такие методы, как дифференциальная сканирующая калориметрия, инфракрасная Фурье-спектроскопия, ядерный магнитный резонанс. Продолжение экспериментальных исследований на бактериях разных таксономических групп с использованием новых методов расширит представления о повреждениях клеток при сублимационном высушивании, их влиянии на гибель бактерий, о механизмах защитного действия лиопротекторов и станет основой для разработки оптимальных протоколов консервации, обеспечивающих длительное гарантированное сохранение бактерий в коллекциях культур.

Конфликт интересов. Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Волков В.Я. К вопросу о физиологических и физико-химических механизмах устойчивости микроорганизмов к замораживанию и высушиванию. *Микробиология*. 1994; 63(1):5–15.
2. Гришкина Т.А., Тимофеева Е.В., Спиридонов В.А. Оценка результатов хранения музейных штаммов возбудителя сапа в течение длительного периода. *Пробл. особо опасных инф.* 2004; 1(87):40–2.
3. Куплетская М.Б., Нетрусов А.И. Жизнеспособность лиофилизированных микроорганизмов после 50 лет хранения. *Микробиология*. 2011; 80(6):842–6.
4. Adams G. The Principles of Freeze-Drying. *Methods Mol. Biol.* 2007; 368:15–38. DOI: 10.1007/978-1-59745-362-2_2.
5. Amenan Y.A., Wathelet B., Thonart P. Effect of protective compounds on the survival, electrolyte leakage, and lipid degradation of freeze-dried *Weissella paramesenteroides* LC11 during storage. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2009; 19(8):810–7.
6. Bank H., Mazur P. Visualization of freezing damage. *J. Cell. Biol.* 1973; 5(3):729–42.
7. Bergenholtz A.S., Wessman P., Wuttke A., Hekansson S. A case study on stress preconditioning of a *Lactobacillus* strain prior

- to freeze-drying. *Cryobiology*. 2012; 64:152–9. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2012.01.002.
8. Buitink J., Leprince O. Intracellular glasses and seed survival in the dry state. *C. R. Biol.* 2008; 331(10):788–95. DOI: 10.1016/j.cvi.2008.08.002.
9. Cabri guidelines. Laboratory procedures of microorganisms. Protective suspension media for freezing or (freeze)-drying. Available from: <http://www.cabri.org/guidelines/microorganisms/M300Ap3.html>. Дата обращения 05.11.15.
10. Carlsen C.U., Kurtmann L., Brüggemann D.A., Hoff S., Risbo J., Skibsted L.H. Investigation of oxidation in freeze-dried membranes using the fluorescent probe C11-BODIPY (581/59). *Cryobiology*. 2009; 58:262–7. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2009.01.005.
11. Castro H.P., Teixeira P.M., Kirby R. Changes in the cell membrane of *Lactobacillus bulgaricus* during storage following freeze-drying. *Biotechnol. Lett.* 1996; 18:99–104.
12. Cleland D., Krader P., McCree C., Tang J., Emerson D. Glycine betaine as a cryoprotectant for prokaryotes. *J. Microbiol. Methods*. 2004; 58(1):31–8.
13. Costa E., Usall J., Teixido N., Garsia N., Vinas I. Effect of protective agents, rehydration media and initial cell concentration on viability of *Pantoea agglomerans* strain CPA-2 subjected to freeze-drying. *J. Appl. Microbiol.* 2000; 89:793–800. DOI: 10.1046/j.1365-2672.2000.01182.x.
14. Crowe J.H., Crowe L.M., Hoekstra F.A. Phase transitions and permeability changes in dry membranes during rehydration. *J. Bioenerg. Biomembr.* 1989; 21(1):77–91.
15. Crowe L.M., Reid D.S., Crowe J.H. Is trehalose special for preserving dry biomaterials? *Biophys. J.* 1996; 71:2087–93.
16. Delgado H., Moreira T., Luis L., Garsia H., Martino T.K., Moreno A. Preservation of *Vibrio cholerae* by freeze-drying. *Cryo-Letters*. 1995; 16:91–101.
17. Dumont F., Marechal P.-A., Gervais P. Involvement of two specific causes of cell mortality in freeze-thaw cycles with freezing to -196 °C. *Appl. Environ. Microbiol.* 2006; 72(2):1330–5. DOI: 10.1128/AEM.72.2.1330-1335.2006.
18. Fonseca F., Marin M., Morris G.J. Stabilization of frozen *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* in glycerol suspensions: freezing kinetics and storage temperature effects. *Appl. Environ. Microbiol.* 2006; 72(10):6474–82. DOI: 10.1128/AEM.00998-06.
19. Fonseca F., Passot S., Cunin O., Marin M. Collapse temperature of freeze-dried *Lactobacillus bulgaricus* suspensions and protective media. *Biotechnol. Prog.* 2004; 20:229–38. DOI: 10.1021/bp034136n.
20. Gao D., Critser J.K. Mechanisms of cryoinjury in living cells. *ILAR J.* 2000; 41(4):187–96. DOI: 10.1093/ilar.41.4.187.
21. Guidance for the operation of biological research centres (BRCs) Part 2: Microorganism domain 2007. Available from: <http://www.oecd.org/sti/biotech/38777417>. Дата обращения 05.11.15.
22. Heckly R.J., Dimmick R.L., Windle J.J. Free radical formation and survival of lyophilized microorganisms. *J. Bacteriol.* 1963; 85:961–6.
23. Hubalek Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Cryobiology*. 2003; 46(3):205–29. DOI: 10.1016/S0011-2240(03)00046-4.
24. Kurtmann L., Carlsen C.U., Risbo J., Skibsted L.H. Storage stability of freeze-dried *Lactobacillus acidophilus* (La-5) in relation to water activity and the presence of oxygen and ascorbate. *Cryobiology*. 2009; 58:175–80. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2008.12.001.
25. Kurtmann L., Carlsen C.U., Skibsted L.H., Risbo J. Water activity-temperature state diagrams of freeze-dried *Lactobacillus acidophilus* (La-5): influence of physical state on bacterial survival during storage. *Biotechnol. Prog.* 2009; 25(1):265–70. DOI: 10.1002/btpr.96.
26. Leslie S.B., Israeli E., Lighthart B., Crowe J.H., Crowe L.M. Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying. *Appl. Environ. Microbiol.* 1995; 61(10):3592–7.
27. Lievens L.C., Verbreek M.A.M., Noomen A., van't Riet K. Mechanism of dehydration inactivation of *Lactobacillus plantarum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1994; 41(1):90–4. DOI: 10.1007/BF00166087.
28. Martos G.I., Minahk C.J., de Valdez G.F., Morero R. Effects of protective agents on membrane fluidity of freeze-dried *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. *Let. Appl. Microbiol.* 2007; 45:282–8. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2007.02188.x.
29. Miyamoto-Shinohara Y., Sukenobe J., Imaizumi T., Nakahara T. Survival of freeze-dried bacteria. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 2008; 54(1):9–24. DOI: 10.2323/jgam.54.9.
30. Morgan C.A., Herman N., White P.A., Vesey G. Preservation of microorganisms by drying: a review. *J. Microbiol. Methods*. 2006; 66:183–93. DOI: 10.1016/j.mimet.2006.02.017.
31. Ohtake S., Martin R.A., Saxena A., Lechuga-Ballesteros D., Santiago A.E., Barry E.M., Truong-Le V. Formulation and stabilization of *Francisella tularensis* live vaccine strain. *J. Pharm. Sci.* 2011; 100(8):3076–87. DOI: 10.1002/jps.22563.
32. Pehkonen K.S., Roos Y.H., Miao S., Ross R.P., Stanton C. State transitions and physicochemical aspects of cryoprotection and stabilization in freeze-drying of *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG). *J. Appl. Microbiol.* 2008; 104:1732–43. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2007.03719.x.
33. Peiren J., Buyse J., De Vos P., Lang E., Clermont D., Hamon S., Bégaud E., Bizet C., Pascual J., Ruvira M.A., Macián M.C., Arahal D.R. Improving survival and storage stability of bacteria recalcitrant to freeze-drying: a coordinated study by European culture collections. *Arahal. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2015; 99(8):3559–71. DOI: 10.1007/s00253-015-6476-6.
34. Portner D.C., Leuschner R.G.K., Murray B.S. Optimising the viability during storage of freeze-dried cell preparations of *Campylobacter jejuni*. *Cryobiology*. 2007; 54(3):265–70. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2007.03.002.
35. Prakash O., Nimonkar Y., Shouche Y.S. Practice and prospects of microbial preservation. *FEMS Microbiol. Lett.* 2013; 339(1):1–9. DOI: 10.1111/1574-6968.12034.
36. Santivarangkna C., Wenning M., Foerst P., Kulozik U. Damage of cell envelope of *Lactobacillus helveticus* during vacuum drying. *J. Appl. Microbiol.* 2007(3); 102:748–56. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2006.03123.x.
37. Schwab C., Vogel R., Ganzle M.G. Influence of oligosaccharides on the viability and membrane properties of *Lactobacillus reuteri* TMW1.106 during freeze-drying. *Cryobiology*. 2007; 55(2):108–14. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2007.06.004.
38. Sinskey T.J., Silverman G.J. Characterization of injury incurred by *Escherichia coli* upon freeze-drying. *J. Bacteriol.* 1970; 101(2):429–37.
39. Tymczyszyn E.E., Díaz M.R., Gómez-Zavaglia A., Disalvo E.A. Volume recovery, surface properties and membrane integrity of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* dehydrated in the presence of trehalose or sucrose. *J. Appl. Microbiol.* 2007; 103(6):2410–9. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2007.03482.x.
40. Tymczyszyn E.E., Sosa N., Gerbino E., Hugo A., Gómez-Zavaglia A., Schebor C. Effect of physical properties on the stability of *Lactobacillus bulgaricus* in a freeze-dried galacto-oligosaccharides matrix. *Int. J. Food Microbiol.* 2012; 155(3):217–21. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.02.008.
41. Yang L., Ma Y., Zhang Y. Freeze-drying of live attenuated *Vibrio anguillarum* mutant for vaccine preparation. *Biologicals*. 2007; 35:265–9. DOI: 10.1016/j.biologics.2007.03.001.
42. Zhan Y., Xu Q., Yang M.M., Yang H.T., Liu H.X., Wang Y.P., Guo J.H. Screening of freeze-dried protective agents for the formulation of biocontrol strains *Bacillus cereus* AR156, *Burkholderia vietnamiensis* B418 and *Pantoea agglomerans* 2Re40. *Let. Appl. Microbiol.* 2012; 54(1):10–7. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2011.03165.x.
43. Zhao G., Zhang G. Effect of protective agents, freezing temperature, rehydration media on viability of malolactic bacteria subjected to freeze-drying. *J. Appl. Microbiol.* 2005; 99(2):333–8. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2005.02587.x.

References

1. Volkov V.Ya. [Concerning physiological and physical-chemical mechanisms of microorganism resistance to freezing and drying up processes]. *Mikrobiologiya*. 1994; 63(1): 5–15.
2. Grishkina T.A., Timofeyeva E.V., Spiridonov V.A. [Assessment of the effects of long storage of glanders pathogen museum collection stains]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2004; 1:40–2.
3. Kupletskaya M.B., Netrusov A.I. [Viability of lyophilized microorganism after 50 years of storage]. *Mikrobiologiya*. 2011; 80(6): 842–6.
4. Adams G. The Principles of Freeze-Drying. *Methods Mol. Biol.* 2007; 368:15–38. DOI: 10.1007/978-1-59745-362-2_2.
5. Amenan Y.A., Wathelet B., Thonart P. Effect of protective compounds on the survival, electrolyte leakage, and lipid degradation of freeze-dried *Weissella paramesenteroides* LC11 during storage. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2009; 19(8):810–7.
6. Bank H., Mazur P. Visualization of freezing damage. *J. Cell. Biol.* 1973; 5(3):729–42.
7. Bergenholtz A.S., Wessman P., Wuttke A., Hekansson S. A case study on stress preconditioning of a *Lactobacillus* strain prior to freeze-drying. *Cryobiology*. 2012; 64:152–9. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2012.01.002.
8. Buitink J., Leprince O. Intracellular glasses and seed survival in the dry state. *C. R. Biol.* 2008; 331(10):788–95. DOI: 10.1016/j.cvi.2008.08.002.
9. Cabri guidelines. Laboratory procedures of microorganisms. Protective suspension media for freezing or (freeze)-drying. [Cited 05 Nov 2015]. Available from: <http://www.cabri.org/guidelines/microorganisms/M300Ap3.html>.
10. Carlsen C.U., Kurtmann L., Brüggemann D.A., Hoff S., Risbo J., Skibsted L.H. Investigation of oxidation in freeze-dried membranes using the fluorescent probe C11-BODIPY (581/59). *Cryobiology*. 2009; 58:262–7. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2009.01.005.
11. Castro H.P., Teixeira P.M., Kirby R. Changes in the cell membrane of *Lactobacillus bulgaricus* during storage following freeze-drying. *Biotechnol. Lett.* 1996; 18:99–104.
12. Cleland D., Krader P., McCree C., Tang J., Emerson D. Glycine betaine as a cryoprotectant for prokaryotes. *J. Microbiol. Methods*. 2004; 58(1):31–8.
13. Costa E., Usall J., Teixido N., Garsia N., Vinas I. Effect of protective agents, rehydration media and initial cell concentration on viability of *Pantoea agglomerans* strain CPA-2 subjected to freeze-drying. *J. Appl. Microbiol.* 2000; 89:793–800. DOI: 10.1046/j.1365-2672.2000.01182.x.
14. Crowe J.H., Crowe L.M., Hoekstra F.A. Phase transitions and

- permeability changes in dry membranes during rehydration. *J. Bioenerg. Biomembr.* 1989; 21(1):77-91.
15. Crowe L.M., Reid D.S., Crowe J.H. Is trehalose special for preserving dry biomaterials? *Biophys. J.* 1996; 71:2087-93.
16. Delgado H., Moreira T., Luis L., Garsia H., Martino T.K., Moreno A. Preservation of *Vibrio cholerae* by freeze-drying. *Cryo-Letters.* 1995; 16:91-101.
17. Dumont F., Marechal P.-A., Gervais P. Involvement of two specific causes of cell mortality in freeze-thaw cycles with freezing to -196 °C. *Appl. Environ. Microbiol.* 2006; 72(2):1330-5. DOI: 10.1128/AEM.72.2.1330-1335.2006.
18. Fonseca F., Marin M., Morris G.J. Stabilization of frozen *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* in glycerol suspensions: freezing kinetics and storage temperature effects. *Appl. Environ. Microbiol.* 2006; 72(10):6474-82. DOI: 10.1128/AEM.00998-06.
19. Fonseca F., Passot S., Cunin O., Marin M. Collapse temperature of freeze-dried *Lactobacillus bulgaricus* suspensions and protective media. *Biotechnol. Prog.* 2004; 20:229-38. DOI: 10.1021/bp034136n.
20. Gao D., Critser J.K. Mechanisms of cryoinjury in living cells. *ILAR J.* 2000; 41(4):187-96. DOI: 10.1093/ilar.41.4.187.
21. Guidance for the operation of biological research centres (BRCs) Part 2: Microorganism domain 2007. [Cited 05 Niv 2015]. Available from: <http://www.oecd.org/sti/biotech/38777417>.
22. Heckly R.J., Dimmick R.L., Windle J.J. Free radical formation and survival of lyophilized microorganisms. *J. Bacteriol.* 1963; 85:961-6.
23. Hubalek Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Cryobiology.* 2003; 46(3):205-29. DOI: 10.1016/S0011-2240(03)00046-4.
24. Kurtmann L., Carlsen C.U., Risbo J., Skibsted L.H. Storage stability of freeze-dried *Lactobacillus acidophilus* (La-5) in relation to water activity and the presence of oxygen and ascorbate. *Cryobiology.* 2009; 58:175-80. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2008.12.001.
25. Kurtmann L., Carlsen C.U., Skibsted L.H., Risbo J. Water activity-temperature state diagrams of freeze-dried *Lactobacillus acidophilus* (La-5): influence of physical state on bacterial survival during storage. *Biotechnol. Prog.* 2009; 25(1):265-70. DOI: 10.1002/btpr.96.
26. Leslie S.B., Israeli E., Lighthart B., Crowe J.H., Crowe L.M. Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying. *Appl. Environ. Microbiol.* 1995; 61(10):3592-7.
27. Lievens L.C., Verbreek M.A.M., Noomen A., van't Riet K. Mechanism of dehydration inactivation of *Lactobacillus plantarum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1994; 41(1):90-4. DOI: 10.1007/BF00166087.
28. Martos G.I., Minahk C.J., de Valdez G.F., Morero R. Effects of protective agents on membrane fluidity of freeze-dried *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. *Let. Appl. Microbiol.* 2007; 45:282-8. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2007.02188.x.
29. Miyamoto-Shinohara Y., Sukenobe J., Imaizumi T., Nakahara T. Survival of freeze-dried bacteria. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 2008; 54(1):9-24. DOI: 10.2323/jgam.54.9.
30. Morgan C.A., Herman N., White P.A., Vesey G. Preservation of microorganisms by drying: a review. *J. Microbiol. Methods.* 2006; 66:183-93. DOI: 10.1016/j.mimet.2006.02.017.
31. Ohtake S., Martin R.A., Saxena A., Lechuga-Ballesteros D., Santiago A.E., Barry E.M., Truong-Le V. Formulation and stabilization of *Francisella tularensis* live vaccine strain. *J. Pharm. Sci.* 2011; 100(8):3076-87. DOI: 10.1002/jps.22563.
32. Pehkonen K.S., Roos Y.H., Miao S., Ross R.P., Stanton C. State transitions and physicochemical aspects of cryoprotection and stabilization in freeze-drying of *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG). *J. Appl. Microbiol.* 2008; 104:1732-43. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2007.03719.x.
33. Peiren J., Buyse J., De Vos P., Lang E., Clermont D., Hamon S., Bégaud E., Bizet C., Pascual J., Ruvira M.A., Macián M.C., Arahal D.R. Improving survival and storage stability of bacteria recalcitrant to freeze-drying: a coordinated study by European culture collections. *Arahal. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2015; 99(8):3559-71. DOI: 10.1007/s00253-015-6476-6.
34. Portner D.C., Leuschner R.G.K., Murray B.S. Optimising the viability during storage of freeze-dried cell preparations of *Campylobacter jejuni*. *Cryobiology.* 2007; 54(3):265-70. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2007.03.002.
35. Prakash O., Nimonkar Y., Shouche Y.S. Practice and prospects of microbial preservation. *FEMS Microbiol. Lett.* 2013; 339(1):1-9. DOI: 10.1111/1574-6968.12034.
36. Santivarangkna C., Wenning M., Foerst P., Kulozik U. Damage of cell envelope of *Lactobacillus helveticus* during vacuum drying. *J. Appl. Microbiol.* 2007(3); 102:748-56. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2006.03123.x.
37. Schwab C., Vogel R., Ganzle M.G. Influence of oligosaccharides on the viability and membrane properties of *Lactobacillus reuteri* TMW1.106 during freeze-drying. *Cryobiology.* 2007; 55(2):108-14. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2007.06.004.
38. Sinskey T.J., Silverman G.J. Characterization of injury incurred by *Escherichia coli* upon freeze-drying. *J. Bacteriol.* 1970; 101(2):429-37.
39. Tymczyszyn E.E., Díaz M.R., Gómez-Zavaglia A., Disalvo E.A. Volume recovery, surface properties and membrane integrity of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* dehydrated in the presence of trehalose or sucrose. *J. Appl. Microbiol.* 2007; 103(6):2410-9. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2007.03482.x.
40. Tymczyszyn E.E., Sosa N., Gerbino E., Hugo A., Gómez-Zavaglia A., Schebor C. Effect of physical properties on the stability of *Lactobacillus bulgaricus* in a freeze-dried galacto-oligosaccharides matrix. *Int. J. Food Microbiol.* 2012; 155(3):217-21. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.02.008.
41. Yang L., Ma Y., Zhang Y. Freeze-drying of live attenuated *Vibrio anguillarum* mutant for vaccine preparation. *Biologicals.* 2007; 35:265-9. DOI: 10.1016/j.biologics.2007.03.001.
42. Zhan Y., Xu Q., Yang M.M., Yang H.T., Liu H.X., Wang Y.P., Guo J.H. Screening of freeze-dried protective agents for the formulation of bio-control strains *Bacillus cereus* AR156, *Burkholderia vietnamiensis* B418 and *Pantoea agglomerans* 2Re40. *Let. Appl. Microbiol.* 2012; 54(1):10-7. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2011.03165.x.
43. Zhao G., Zhang G. Effect of protective agents, freezing temperature, rehydration media on viability of malolactic bacteria subjected to freeze-drying. *J. Appl. Microbiol.* 2005; 99(2):333-8. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2005.02587.x.

Authors:

Gracheva I.V., Osin A.V. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Об авторах:

Грачева И.В., Осин А.В. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Поступила 24.12.16.