

И.В.Грачева, Т.В.Валова, Г.В.Григорьева

## ТРАДИЦИОННЫЕ И НОВЫЕ ЗАЩИТНЫЕ СРЕДЫ ДЛЯ НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОЙ КОНСЕРВАЦИИ БАКТЕРИЙ

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

Представлены литературные данные об эффективности консервации бактерий при температурах от  $-20$  до  $-196$  °С в защитных средах, содержащих рекомендованные руководствами криопротекторы – глицерин, диметилсульфоксид, а также углеводы, вещества белковой природы. Главное внимание уделено публикациям, посвященным результатам длительного хранения бактерий при субнулевых температурах, оптимизации защитных сред для патогенных бактерий и использованию соединений с потенциальной криозащитной активностью. Сделан вывод о необходимости апробации рекомендуемых сред для поддерживаемых видов бактерий и используемой температуры хранения. Одним из направлений совершенствования технологий низкотемпературной консервации является поиск природных протекторов, обеспечивающих выживание бактерий в стрессовых условиях, включая низкие температуры, и возможность включения их в состав криозащитных сред. Приведены результаты успешного использования глицин-бетаина, полисахаридов арктических микроорганизмов для низкотемпературной консервации бактерий.

*Ключевые слова:* низкотемпературная консервация, бактерии, криопротекторы, защитные среды.

I.V.Gracheva, T.V.Valova, G.V.Grigor'eva

### Traditional and Modern Protective Media for the Low-Temperature Bacteria Preservation

*Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov*

Presented are the literature data on the efficiency of bacteria preservation at temperatures ranging from  $-20$  to  $-196$  °C in the protective media containing such cryoprotectors as glycerol, dimethyl sulfoxide, carbo-hydrates, substances of protein origin specified by regulatory guidelines. Most of the focus is on the publications reporting the results of the long-term bacteria preservation at sub-zero temperatures, optimization of the protective media for pathogenic bacteria, and usage of the compounds with potential cryoprotective activity. Noted is the necessity for approbation of the specified protective media for the conserved bacteria species at the applied preserving temperatures. One of the approaches to the enhancement of the low-temperature preservation techniques is a search for natural protectors, which can provide for surviving of bacteria in the unfavorable conditions, including low temperatures, and a search for possibility to integrate these natural protectors into the cryoprotective media. Displayed are the results of effective application of glycerol-betaine, and polysaccharides of Arctic microorganisms for the low-temperature bacteria preservation.

*Key words:* low-temperature preservation, bacteria, cryoprotectors, protective media.

Вступление микробиологии в бактериологический период развития поставило перед исследователями задачу сохранения выделенных культур микроорганизмов. Было разработано много способов длительной консервации, одним из которых является низкотемпературная консервация – замораживание и хранение бактерий при субнулевых температурах. При низкотемпературной консервации клетки подвергаются воздействию не только низких температур в диапазоне от  $-20$  до  $-196$  °С, но и комплекса стрессовых физико-химических факторов, возникающих вследствие фазовых переходов воды, таких как образование кристаллов льда, высокие концентрации внутри- и внеклеточных растворов, изменение рН среды, осмотические, концентрационные градиенты и другие [3, 6]. Согласно существующим сегодня представлениям основными причинами гибели клеток при замораживании-оттаивании являются повреждение мембранных структур кристаллами внутриклеточного льда и вторичные повреждения высокими концентрациями внутри- и внеклеточных растворов

(рисунок). Вклад каждого из факторов в развитие криоповреждений зависит от типа клетки и скорости охлаждения клеточных суспензий. Использование для консервации специальных сред с криопротекторами позволяет снизить количество криоповреждений и обеспечить сохранение максимально большого количества живых, структурно и функционально неповрежденных клеток. Большинство гипотез защитного действия традиционных криопротекторов основаны на свойствах последних уменьшать количество льда, изменять размеры и структуру кристаллов, понижать температуру замерзания растворов [3, 17].

Целью данной работы является рассмотрение положительного и отрицательного опыта применения защитных сред разного состава для низкотемпературной консервации бактерий. Главное внимание уделено публикациям, посвященным результатам длительного хранения бактерий при субнулевых температурах, оптимизации защитных сред для патогенных бактерий и использованию соединений с потенциальной криозащитной активностью.



Механизмы криповреждения интактных клеток [18]

**Традиционные защитные среды для низкотемпературной консервации бактерий.** Начало активного использования защитных сред для хранения микроорганизмов при субнулевых температурах связано с публикацией в 1949 г. С.Polge, A.U.Smith, A.S.Parkes работы о защитной роли глицерина в сохранении эукариотических клеток после замораживания. Много соединений изучено на способность защищать клетки от повреждений низкими температурами. Накопленный материал позволяет рекомендовать среды, эффективные для консервации бактерий. Современные руководства по консервации бактерий предлагают несколько вариантов защитных сред, включающих в качестве криопротекторов глицерин или диметилсульфоксид [10, 26]. Однако спектр применяемых криопротекторов значительно шире [17].

Для низкотемпературной консервации бактерий чаще всего используют глицерин в концентрациях 5–25 % в составе водных растворов, жидких питательных сред, в сочетании с другими криозащитными веществами [17]. Лучшей средой для консервации патогенных бактерий, имеющих медицинское значение, по сообщению R.K.A.Feltham *et al.* является бульон Oxoid с 10 % глицерина [14]. Выживаемость *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Bacillus thuringiensis*, *Pseudomonas putida*, *Staphylococcus aureus* после криоконсервации в 10–15 % растворах глицерина при использовании оптимальных программ замораживания составляет 67–100 % [1, 6, 8, 20]. Результаты криохранения *E. coli* с рекомбинантными плазмидами в течение 11 лет в 10 % глицерине, опубликованные G.L.Koenig, показывают, во-первых, отсутствие достоверного снижения количества живых

клеток в процессе хранения, во-вторых, сохранение в популяциях большинства штаммов структурно неповрежденных плазмид у 100 % тестированных клонов [20]. Наличие в популяциях некоторых штаммов бесплазмидных клеток G.L.Koenig связывает с неадекватной подготовкой культур для хранения, которая должна включать обязательную селекцию клонов с высоким уровнем устойчивости к маркерным антибиотикам плазмид.

Глицерин обеспечивает длительное сохранение бактерий при более высоких температурах в диапазоне от –20 до –80 °С. Например, количество живых клеток *Haemophilus influenzae* после года хранения в питательном бульоне с 25 % глицерина при –70 °С составляло 68 % [9]. Включение в защитную среду дополнительно обезжиренного восстановленного молока, глюкозы, дрожжевого экстракта позволило сохранить 86 % клеток за тот же период наблюдения. По сообщению M.Votava *et al.* оптимальной средой хранения *Haemophilus spp.* при –70 °С является триптиказо-соевый бульон с 10 % глицерина и 40 % лошадиной сыворотки [27]. Штаммы *Campylobacter jejuni* сохраняют жизнеспособность в течение года хранения в бульоне с 15 % глицерина при –85 °С после 6 циклов замораживания-оттаивания [16]. Вирулентные свойства *Flavobacterium psychrophilum* сохранялись практически на исходном уровне после двух лет хранения в бульоне с 10 % глицерина при –80 °С [22].

Диметилсульфоксид (ДМСО) – второй по частоте использования компонент защитных сред, более токсичен для бактериальных клеток, чем глицерин, и требует особых условий работы [3, 17]. Используется

в концентрациях не выше 5–10 % в составе водных растворов, жидких питательных сред [10]. Для *Mycobacterium phlei* 10 % ДМСО был лучшей средой для криоконсервации – обеспечивал выживание 100 % клеток [5]. Для *Streptomyces ruber* ДМСО менее эффективен, чем глицерин – выживаемость сразу после криоконсервации составляла 92 и 100 % соответственно. M.N.Cilmouq *et al.* отмечают низкие защитные свойства ДМСО для грамотрицательных анаэробных бактерий [15].

Из группы углеводов для хранения бактерий при субнулевых температурах используют глюкозу, сахарозу, лактозу, трегалозу в концентрациях 5–15 % [17]. Считается, что углеводы обладают менее выраженными криозащитными свойствами, чем глицерин или ДМСО, поэтому их рекомендуют применять в сочетании с другими протекторами. Однако защитное действие сахарозы сопоставимо с таковым глицерина и ДМСО для криоконсервации *P. putida*, *E. coli* и *B. thuringiensis* [1, 6]. Наши исследования показали одинаковую эффективность сред с лактозой и глицерином для хранения *V. cholerae* при –70 °С. Среда Файбича с 10 % сахарозы успешно использована для криоконсервации *Y. pestis* [2]. При низкотемпературном хранении *H. influenzae* сахароза (10 %) и лактоза (6 %) менее эффективны, чем глицерин [9].

Гемолизированная кровь, сыворотки крови животных изучены на способность защищать бактериальные клетки от повреждений при замораживании. Согласно исследованиям R.Gorman *et al.* дефибрированная гемолизированная кровь лошади более эффективная среда хранения *C. jejuni* при –85 °С, чем коммерческая криосистема, содержащая гипертонический криоконсервирующий раствор, после 9 месяцев хранения в котором живые клетки не обнаружены [16]. Защитное действие крови было ниже, чем питательного бульона с 15 % глицерина. Напротив, для *Streptococcus pneumoniae* гемолизированная кровь более предпочтительная среда хранения при –70 °С, чем глицериновый бульон [25].

При разработке безотмывочных технологий консервации бактерий, используемых в пищевой и медицинской промышленности, в качестве протективных сред успешно применяют питательные среды для культивирования, защитные свойства которых обусловлены их компонентами – пептоном, триптоном, дрожжевым экстрактом. Выживаемость промышленных штаммов бактерий родов *Streptococcus*, *Bacillus*, *Bifidobacterium* сразу после криоконсервации в питательных средах составила 51–100 % [4, 7]. После криоконсервации штаммы *Bifidobacterium adolescentis* сохраняли основные производственные показатели [4]. Отмечено лишь обратимое повышение у культур первой генерации чувствительности к антибиотикам, кислотному стрессу, увеличение продолжительности логарифмической фазы. По мнению авторов, изменения связаны с нарушением целостности и избирательной проницаемости цитоплазматической мембраны в результате нелетальных криопов-

реждений и активным протеканием в клетках репаративных процессов. После 15–20 лет криохранения производственных штаммов в питательных средах не отмечено достоверного снижения количества живых клеток, их продуктивной активности и дополнительного изменения признаков [7].

Защитные свойства питательных сред, а также сред с восстановленным молоком менее выражены при хранении бактерий в диапазоне температур от –20 до –80 °С [9]. Например, после года хранения *H. influenzae* в бульоне при –70 °С количество живых клеток снизилось до 20 %, в бульоне с 25 % глицерина выживало 100 % клеток [10]. Вместе с тем недавние исследования, проведенные сотрудниками нескольких лабораторий США, выявили определенные преимущества использования восстановленного молока для хранения бактерий при субнулевых температурах [13]. Основным методом консервации патогенных бактерий было хранение при –80 °С в питательных средах с 15 % глицерина или 10 % восстановленного молока. Из-за перебоев в электроснабжении в Новом Орлеане после ураганов Катрина и Рита размороженные образцы вынужденно хранились при температуре 28–30 °С. Через месяц наибольшее количество штаммов было восстановлено именно из сред с восстановленным молоком. Позднее проведены эксперименты, которые подтвердили, что включение в защитные среды восстановленного молока увеличивает период сохранения клетками *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli*, *Salmonella enterica* жизнеспособности после размораживания и хранения при температурах 25–30 °С. Живые клетки таких видов, как *C. jejuni*, *S. pyogenes*, не были обнаружены в образцах с глицерином уже после 5 дней хранения, в то время как их концентрация в пробах с молоком составила не менее 10<sup>6</sup> КОЕ/мл через 49 дней хранения в вышеуказанных условиях.

**Новые защитные среды для низкотемпературной консервации бактерий.** Несмотря на успешное применение для консервации бактерий защитных сред с рассмотренными выше криопротекторами, проводятся исследования, направленные на поиск новых природных нетоксичных для клеток соединений, включая естественные протекторы, обеспечивающие выживание микроорганизмов в стрессовых условиях.

К группе таких веществ относится глицин-бетаин. Первоначально он был идентифицирован как органический осмопротектор, участвующий в поддержании объемного гомеостаза клеток в средах с высокими концентрациями осмотически активных веществ, а позднее у него выявлены криозащитные свойства. В отличие от глицерина и ДМСО глицин-бетаин не токсичен для бактериальных клеток. Считают, что он предотвращает холодовую агрегацию белков, поддерживает оптимальную текучесть мембран при низких температурах, обеспечивая их полноценное функционирование при физиологически не оптимальных температурах [11].

Экспериментальных данных о защитной роли глицин-бетаина при низкотемпературной консервации еще недостаточно. В работе D.Cleland *et al.* представлены результаты изучения протективного действия 6 % водных растворов глицин-бетаина на галофильные археобактерии при криоконсервации, согласно которым он так же эффективен, как и 10 % растворы глицерина [12]. К сожалению, в работе не представлены результаты по криоконсервации бактерий, имеющих медицинское значение. Однако среды с глицин-бетаином более эффективно защищали *Neisseria gonorrhoeae* и *S. pneumoniae* при сублимации – высушивании из замороженного состояния, чем традиционные среды с обезжиренным молоком, трегалозой и декстраном.

Защитное действие глицин-бетаина подтверждено исследованиями V.M.Sheehan *et al.* [23]. Выживаемость клеток *Lactobacillus salivarius* с гибридной плазмидой, содержащей гены транспортной системы глицин-бетаина *L. monocytogenes betL*, после хранения при –20 и –70 °С выше, чем у бесплазмидного штамма. Повышенную устойчивость клеток к замораживанию связывают с накоплением в клетках глицин-бетаина.

В работе С.Н.Филипповой и соавт. на наличие криозащитных свойств для бактерий изучен 4н-гексилрезорцин – химический аналог бактериального фактора  $d_1$ , выполняющий в клетках функцию аутоиндуктора анабиоза [5]. При накоплении до порогового значения в среде роста фактора  $d_1$ , например, в стационарной фазе, происходит понижение функциональной активности клеток, переход вегетирующих клеток в состояние метаболического покоя, характеризующееся повышенной устойчивостью к стрессовым факторам. Исследования показали, что в концентрациях, не оказывающих значительного токсического действия на клетки, 4н-гексилрезорцин не обладает выраженными защитными свойствами для бактерий.

В последние годы большое внимание уделяется изучению механизмов устойчивости к низким температурам и замораживанию психрофильных микроорганизмов и мезофильных, часть жизненного цикла которых может проходить при низких температурах [11, 18, 19, 21]. Знание механизмов устойчивости может стать основой для совершенствования методов низкотемпературной консервации живых организмов. Большой потенциал для низкотемпературной консервации могут иметь белки холодовой акклиматизации, криопротективные липополисахариды, белки-антифризы, вещества, контролирующее образование и рост кристаллов льда, которые выявлены у психрофильных микроорганизмов, населяющих экологические ниши Арктики и Антарктики [11, 18]. Сегодня некоторые из них используются в экспериментальных исследованиях с хорошими результатами. Защитные свойства полисахарида (P-21653), выделенного из арктической бактерии *Pseudoalteromonas arctica*, были выше, чем глице-

рина при замораживании клеток *E.coli* до –70 °С [19]. После трех циклов замораживания-оттаивания в присутствии 0,1, 0,5, 1 % P-21653 жизнеспособность сохранили соответственно 83, 91, 98 % клеток *E. coli*, а в 20 % глицерине только 43 %. Собственный экзополисахарид арктической бактерии *Colwellia psychrerythraea* лучше защищал клетки от гибели при замораживании до –80 °С, чем глицерин [21]. Исследования S.Shimodori показали, что защитное действие низкомолекулярного белка, выделенного из раковины креветки *Metapenaeus eusis*, приблизительно в 100 раз выше, чем глицерина, ДМСО при замораживании *Vibrio cholerae* до –20 °С [24].

В заключение хочется отметить, что рекомендованные составы криозащитных сред должны быть апробированы, а при необходимости оптимизированы для поддерживаемых видов бактерий и выбранной температуры хранения. Несмотря на то, что ведущей тенденцией в современной криобиологии является отход от эмпирических принципов исследования, подбор защитных сред для бактерий проводят опытным путем. Выбор защитной среды должен основываться на высоком уровне выживаемости клеток после консервации и в течение последующего хранения, стабильности фенотипических свойств и генетической организации. Проводимые исследования должны учитывать накопленный опыт и современные представления о механизмах, лежащих в основе криоповреждений и криозащиты.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Высеканцев И.П., Крашенинникова Т.К., Олехнович Е.В., Степанюк Л.В. Консервирование бактерий *Pseudomonas putida* при низких температурах. Микробиология. 1992; 77(5):1098–9.
2. Кадетов В.В., Терентьев А.Н., Высеканцев И.П., Анисимов Б.И., Морозова Л.Н., Милотин А.В. Методические аспекты биологической безопасности при консервировании биологического материала для микробиологических исследований. Клини. лаб. диагн. 1999; 8:22–4.
3. Пушкарь Н.С., Шраго М.И., Белоус А.М., Калугин Ю.В. Криопротекторы. Киев: Наукова думка; 1978. 204 с.
4. Сидоренко А.В., Новик Г.И., Высеканцев И.П. Криоконсервация бактерий рода *Bifidobacterium* в стерильных питательных средах в качестве криопротекторов. Микробиология. 2009; 78(5):33–40.
5. Филиппова С.Н., Сургучева Н.А., Кузнецов В.Д., Эль-Регистан Г.И., Гальченко В.Ф. Оптимизация защитных сред для хранения актиномицетов в жидком азоте. Микробиология. 2007; 76(4):573–6.
6. Цуцаева А.А., Попов В.Г., Сытник К.М., Бражников А.М., Иткин Ю.А., Манульский В.Д. и др. Криобиология и биотехнология. Киев: Наукова думка; 1987. 214 с.
7. Цуцаева А.А., Ананьина А.Е., Бальбердина Л.М., Степанюк Л.В., Павленко Н.В. Опыт долгосрочного хранения промышленных штаммов микроорганизмов. Микробиология. 2008; 77(5):696–700.
8. Цуцаева А.А., Сафонова Т.С., Микулунский И.И., Воробьева И.И., Иткин Ю.А. Влияние низких температур (–196 °С) и криопротекторов на некоторые виды бактерий. Микробиология. 1978; XLVII(3):446–9.
9. Aulet de Saab O.C., de Castillo M.C., de Ruiz Holgado A.P., de Nader O.M. Comparative study of preservation and storage of *Haemophilus influenzae*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2001; 96(4):583–6.
10. Cabri guidelines. Laboratory procedures for microorganisms. Protective suspension media for freezing or (freeze)-drying. [Cited 25 Oct 2011]. Available from: <http://www.cabri.org/guidelines/microorganisms/M300Ap3.html>
11. Chattopadhyay M.K. Bacterial cryoprotectants. Resonance. 2002; 11:59–63.
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. *Cody W.L., Wilson J.M., Hendrixson D.R., Mcler K.S., Hagman K.E., Ott C.M. et al.* Skim milk enhances the preservation of thawed  $-80^{\circ}\text{C}$  bacterial stocks. *J. Microbiol. Methods.* 2008; 75(1):135–8.

14. *Feltham R.K.A., Power A.K., Pell P.A., Sneath P.H.A.* A simple method for the storage of bacteria at  $-70^{\circ}\text{C}$ . *J. Appl. Bacteriol.* 1978; 44:313–6.

15. *Gilmour M.N., Turner G., Berman R.G., Krenzer A.K.* Compact liquid nitrogen storage system yielding high recoveries of gram-negative anaerobes. *Appl. Environ. Microbiol.* 1978; 35(1):84–8.

16. *Gorman R., Adley C.C.* An evaluation of five preservation techniques and conventional freezing temperatures of  $-20^{\circ}\text{C}$  and  $-85^{\circ}\text{C}$  for long-term preservation of *Campylobacter jejuni*. *Lett. Appl. Microbiol.* 2004; 38:306–10.

17. *Hubalec Z.* Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Cryobiology.* 2003; 46(3):205–29.

18. *Kawahara H.* Cryoprotectants and ice-binding proteins. In: Margesin R. et al., editors. *Psychrophiles: from biodiversity to biotechnology.* Springer Berlin Heidelberg; 2008. P. 229–46.

19. *Kim S.J., Yim J.H.* Cryoprotective properties of exopolysaccharide (P-21653) produced by the antarctic bacterium, *Pseudoalteromonas arctica* KOPRI 21653. *J. Microbiol.* 2007; 45(6):510–4.

20. *Koenig G.L.* Viability of and plasmid retention in frozen recombinant *Escherichia coli* over time: a ten-year prospective study. *Appl. Environ. Microbiol.* 2003; 11:6605–9.

21. *Marx J.G., Carpenter S.D., Deming J.W.* Production of cryoprotectant extracellular polysaccharide substances (EPS) by the marine psychrophilic bacterium *Colwellia psychrerythraea* strain 34H under extreme conditions. *Can. J. Microbiol.* 2009; 55(1):63–72.

22. *Michel C., Garcia C.* Virulence stability in *Flavobacterium psychrophilum* after storage and preservation according to different procedures. *Vet. Res.* 2003; 34:127–32.

23. *Sheehan V.M., Sleator R.D., Fitzgerald G.F., Hill C.* Heterologous expression of betL, a betaine uptake system, enhances the stress tolerance of *Lactobacillus salivarius* UCC118. *Appl. Environ. Microbiol.* 2006; 72(3):2170–7.

24. *Shimodori S., Moriya T., Kohashi O., Faming D., Amako K.* Extraction from prawn shells of substances cryoprotective for *Vibrio cholerae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 1989; 55:2726–8.

25. *Siberry G., Brahmadathan K.N., Pandian R., Lalitha M.K., Steinhoff M.C., John T.J.* Comparison of different culture media and storage temperatures for the long-term preservation of *Streptococcus pneumoniae* in the tropics. *Bull. World Health Organisation.* 2001;

79(1):43–7.

26. *Tindall B.J.* Vacuum-drying and cryopreservation of prokaryotes. *Methods Mol. Biol.* 2007; 368:73–97.

27. *Votava M., Stritecká M.* Preservation of *Haemophilus influenzae* and *Haemophilus parainfluenzae* at  $-70^{\circ}\text{C}$ . *Cryobiology.* 2001; 43(1):85–7.

**References (Presented are the Russian sources in the order of citation in the original article)**

1. *Vysekantsev I.P., Krashenninikova T.K., Olekhovich E.V., Stepanyuk L.V.* [Preservation of the bacteria *Pseudomonas putida* at low temperatures]. *Mikrobiologia.* 1992; 77(5):1098–9.

2. *Kadetov V.V., Terent'ev A.N., Vysekantsev I.P., Anisimov B.I., Morozova L.N., Milyutin A.V.* [Methodological aspects of biosafety of work on preservation of biological materials for microbiological investigations]. *Klin. Lab. Diagnost.* 1999; 8:22–4.

3. *Pushkar' N.S., Shrago M.I., Belous A.M., Kalugin Yu.V.* [Cryoprotectors]. Kiev: Naukova Dumka; 1978. 204 p.

4. *Sidorenko A.V., Novik G.I., Vysekantsev I.P.* [Cryopreservation of bacteria Bifidobacterium in sterile nutrient media as cryoprotectors]. *Mikrobiologia.* 2009; 78(5):33–40.

5. *Filippova S.N., Surgucheva N.A., Kuznetsov V.D., El'-Registan G.I., Gal'chenko V.F.* [Optimization of protective media for actinomycete storage in liquid nitrogen]. *Mikrobiologia.* 2007; 76(4):573–6.

6. *Tsutsaeva A.A., Popov V.G., Sytnik K.M., Brazhnikov A.M., Itkin Yu.A., Manul'sky V.D., et al.* [Cryobiology and Biotechnology]. Kiev; Naukova Dumka; 1987. 214 p.

7. *Tsutsaeva A.A., Anan'ina A.E., Balyberdina L.M., Stepanyuk L.V., Pavlenko N.V.* [Experience in the long-term preservation of microorganisms' production strains]. *Mikrobiologia.* 2008; 77(5):696–700.

8. *Tsutsaeva A.A., Safonova T.S., Mikulinsky I.I., Vorob'eva I.I., Itkin Yu. A.* [Effect of low temperatures ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) and cryoprotectors on a number of bacteria species]. *Mikrobiologia.* 1987; XLVII(3):446–9.

**Authors:**

*Gracheva I.V., Valova T.V., Grigor'eva G.V.* Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". Universitetskaya St., 46, Saratov, 410005, Russia. E-mail: rusrapi@microbe.ru

**Об авторах:**

*Грачева И.В., Валова Т.В., Григорьева Г.В.* Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Поступила 30.01.11.