

## Фено- і генотипові ознаки виділених із різних біотопів клінічних штамів *Escherichia coli* після кріоконсервування та зберігання під вазелиновою олією

UDC

Yu.V. VOYDA<sup>1\*</sup>, S.V. BIRYUKOVA<sup>1</sup>, I.P. VYSEKANTSEV<sup>2</sup>

### Effect of Cryopreservation and Storage under Mineral Oil on Pheno- and Genotype Features of *Escherichia coli* Clinical Strains Isolated from Different Biotopes

Встановлено розбіжності в антибіотикочутливості штамів *Escherichia coli*, які було виділено з різних біотопів. Показано, що зберігання при  $-196^{\circ}\text{C}$  протягом 5 років (термін спостереження) бактерій, заморожених під захистом 10%-го розчину диметилсульфоксиду, не впливає на спектр антибіотикорезистентності бактерій. При зберіганні під шаром вазелинової олії при температурі  $6\dots 8^{\circ}\text{C}$  з періодичними пересівами частина штамів втрачала резистентність до  $\beta$ -лактамних антибіотиків, що пов'язується з втратою специфічних плазмід.

**Ключові слова:** бактерії *Escherichia coli*, біотоп, антибіотикочутливість, плазмиди, кріоконсервування.

Установлены различия в антибиотикочувствительности штаммов *Escherichia coli*, выделенных из разных биотопов. Показано, что хранение при  $-196^{\circ}\text{C}$  в течение 5 лет (срок наблюдения) бактерий, замороженных под защитой 10%-го раствора диметилсульфоксида, не влияет на спектр антибиотикорезистентности бактерий. При хранении под слоем вазелинового масла при температуре  $6\dots 8^{\circ}\text{C}$  с периодическими пересевами часть штаммов теряла резистентность к  $\beta$ -лактамным антибиотикам, что связано с потерей специфических плазмид.

**Ключевые слова:** бактерии *Escherichia coli*, биотоп, антибиотикочувствительность, плазмиды, кріоконсервирование.

The differences between the spectra of sensitivity to antibiotics of *Escherichia coli* strains isolated from different biotopes were found. It was found that storage at  $-196^{\circ}\text{C}$  during 5 years (observation term) of bacteria frozen under protection of 10% dimethyl sulfoxide solution did not change the spectrum of antibiotic resistance. After storage under the layer of mineral oil at the temperature of  $6\dots 8^{\circ}\text{C}$  and subculturing some strains lost their resistance to  $\beta$ -lactams, that was probably due to the loss of specific plasmids.

**Key words:** *Escherichia coli*, biotope, antibiotic sensitivity, plasmids, cryopreservation.

Генетична пластичність збудників інфекційних хвороб, висока здатність до трансформації плазмід призводять до формування штамів з новими біологічними властивостями, в першу чергу це їх стійкість до дії протимікробних препаратів. Антибіотикорезистентність бактерій кодується в основному позахромосомними факторами спадковості (R-плазмідами) і частково – хромосомними генами.

Для вирішення проблем антибіотикорезистентності, вивчення механізмів патогенезу інфекційних захворювань та генетичних досліджень, зокрема при розробці біотехнологій з метою відбору нових штамів-продуцентів, створюють колекції плазмідних штамів бактерій. Умовою існування таких колекцій є збереження генетичного матеріалу в стані, максимально близькому до початкового.

Кріоконсервування є найбільш перспективним методом довгострокового зберігання мікроорганізмів.

Genetic plasticity of infectious agents, and their high ability to transformation of plasmids result in formation of strains with new biological properties, first of all in terms of their resistance to antimicrobial preparations. Antibiotic resistance of bacteria is coded mainly by extrachromosomal factors of inheritance (R-plasmids) and partially by chromosome genes.

The collections of bacterial plasmid strains are created to solve the problems of antibiotic resistance, for studying pathogenetic mechanisms of infectious diseases and genetic investigations, in particular during development of biotechnologies to select new strains-producers. The condition for existence of these collections is the preservation of genetic material in the state maximally close to the initial one.

Cryopreservation is the most perspective method of long-term storage of microorganisms [2–4, 6–8]. But there are only few publications on its impact on

<sup>1</sup>Харківська медична академія післядипломної освіти МОЗ України

<sup>2</sup>Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

\* Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію: вул. Корчагінців, 58, м. Харків, Україна 61176; електронна пошта: y060281@yandex.ru

<sup>1</sup>Kharkiv Medical Academy of Postgraduate Education of the Ministry of Health Care of Ukraine, Kharkov, Ukraine

<sup>2</sup>Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

\* To whom correspondence should be addressed: 58, Korchagin-sev str., Kharkov, Ukraine 61176; e-mail: y060281@yandex.ru

мів [2, 4, 6–8]. На цей час існують лише поодинокі публікації щодо його впливу на життєздатність плазмідних штамів бактерій та збереженість плазмід в клітинах.

Метою роботи було порівняльне вивчення спектрів антибіотикочутливості клінічних штамів *Escherichia coli*, виділених із різних біотопів, після довгострокового зберігання шляхом кріоконсервування та пересівів у напіврідкому м'ясопептонному агарі.

### Матеріали та методи

Для дослідження було відібрано 120 штамів *E. coli*, виділених з патологічного матеріалу: 38 вилучено з сечовивідних шляхів; 44 – з статевих шляхів; по 2 – з дихальних шляхів і ділянок шкіри та м'яких тканин; 34 – з кишечника осіб з дисбактеріозом. В якості контролю використано 25 штамів *E. coli*, виділених з кишечника здорових осіб.

Збереженість плазмід визначали двома методами – за фенотиповими маркерами бактерій на селективних середовищах і по збереженню структури та кількості плазмід, встановлених за допомогою електрофорезу.

Чутливість бактерій *E. coli* до антибактеріальних препаратів визначали диско-дифузійним методом Кеурбу-Вауер з використанням стандартних комерційних дисків (НИЦФ, Росія та ТОВ «Аспект», Україна) на середовищі Мюллер-Хінтона («HiMedia», Індія). Продукцію β-лактамаз розширеного спектра дії (БЛРС) досліджували методом «подвійних дисків». Результати роботи інтерпретували відповідно до Наказу МОЗ України [3].

Плазмідний спектр клінічних ізолятів *E. coli* вивчали за допомогою лужного методу [5]. Молекулярну масу плазмідних ДНК визначали за калібровочною кривою, яку складали за параметрами маркерної плазмиди Lambda-pUC mix Marker 4 («Fermentas», Canada).

Довгострокове зберігання вилучених штамів здійснювали: 1 – у напіврідкому м'ясопептонному агарі (МПА) під шаром вазелінової олії при температурі 6...8 °С (термін зберігання – 5 років з пересівами кожні 6 місяців); 2 – у кріоконсервованому стані при температурі –196 °С (термін зберігання – 5 років). Початкова концентрація клітин *E. coli* складала 10<sup>7</sup>–10<sup>8</sup> КУО/мл. Кріопротектором був 10%-й водний розчин диметилсульфоксиду (ДМСО). До суспензії бактерій у співвідношенні 1:1 додавали розчин ДМСО з концентрацією 20%. Після еквілібрації з кріопротектором протягом 30 хв при кімнатній температурі бактерійні суспензії вносили в кріопробірки («Nunc», Данія) об'ємом 1,8 мл та заморожували у рідкому азоті.

Отримані результати досліджень статистично обробляли за допомогою комп'ютерної програми «SPSS Statistics 17.0». Рівень достовірної вірогідності складав  $p < 0,05$  [1].

viability of bacterial plasmid strains and preservation of plasmids in cells.

Research aim was to compare the antibiotic sensitivity spectra of *Escherichia coli* clinical strains isolated from different biotopes after long-term storage by cryopreservation and subculturing in semiliquid meat infused agar.

### Materials and methods

For investigation we have selected 120 *E. coli* strains isolated from pathological material, 38 from urinary tract, 44 from reproductive tracts, by 2 from respiratory tract, skin and soft tissues, 34 from intestine of patients with dysbacteriosis. As a control we used 25 strains of *E. coli* isolated from intestine of healthy persons.

Preservation of plasmids was assessed by two methods: bacterial phenotype markers in selective media and preservation of structure and number of plasmids assessed by electrophoresis.

Sensitivity of *E. coli* bacteria to antibacterial medications was assessed by Keurby-Bauer's disc diffusion method using standard discs (Research Center of Pharmacotherapy, Russia and Aspect Ltd, Ukraine) in Mueller-Hinton Broth (HiMedia, India). Production of extended spectrum β-lactamases (ESBLs) was studied by double-disc method. The results of investigation were interpreted according to the Order of the Ministry of Health Care of Ukraine [3].

Plasmid spectrum of *E. coli* clinical isolates was studied by alkaline method [5]. Molecular mass of plasmid DNA was determined with calibration curve plotted by the parameters of marker plasmid Lambda-pUC mix Marker 4 (Fermentas, Canada).

Long-term storage of isolated strains was performed by the following methods: in semiliquid meat infused agar (MIA) under the layer of mineral oil at 6...8 °C (time of storage was 5 years with subculturing every 6 months) and in frozen state at –196 °C (time of storage was 5 years). Initial concentration of *E. coli* cells was 10<sup>7</sup>–10<sup>8</sup> CFUs/ml. As a cryoprotectant we used 10% aqueous solution of dimethyl sulfoxide (DMSO). 20% DMSO solution was added in 1:1 ratio to bacterial suspension. After 30 min of equilibration with cryoprotectant solution at room temperature the bacterial suspensions were placed into 1.8 ml cryotubes (Nunc, Denmark) and frozen in liquid nitrogen.

The obtained results were statistically processed with SPSS Statistics 17.0 software. The level of significance was set as  $p < 0.05$  [1].

### Results and discussion

Overall results of studying the antibiotic resistance of the *E. coli* isolated strains have been summarized and are presented in the Table. The differences in antibiotic sensitivity of strains derived from different biotopes have been found.

## Результати та обговорення

Сумарні результати вивчення антибіотикорезистентності виділених штамів *E. coli* узагальнено і представлено в таблиці. Встановлено розбіжності в антибіотикочутливості штамів, вилучених з різних біотопів.

В ході дослідження серед 31,7% (46/145) штамів *E. coli* із зниженою чутливістю до одного з цефалоспоринових III було виявлено групу (18,6% від загальної кількості або 27/145) штамів *E. coli*, які продукували БЛРС, що обумовлювало відповідний рівень резистентності до пеніцилінів і цефалоспоринових II-III покоління. Причому більшість БЛРС-продукуючих штамів було виділено з сечі – 55,6% (15/27).

Встановлено високу розповсюдженість поліантибіотикорезистентних штамів *E. coli*: від (49,2 ± 9,8)% серед виділених з кишечника здорових осіб до (87,2 ± 5,4)% – серед уропатогенних штамів. Усі штами, які було виділено з дихальних шляхів і ділянок шкіри та м'яких тканин, характеризувалися множинною резистентністю до вивчених антибіотиків, що властиво госпітальним штамам.

Показано, що кріоконсервування та довгострокове зберігання протягом 5 років не впливало на чутливість штамів *E. coli*, виділених із різних біотопів, до антибактеріальних препаратів (таблиця). На відміну від кріоконсервування після періодичних пересівів культур, які зберігали у напіврідкому МПА під шаром вазелінового масла при температурі 6...8°C, виявлено, що профіль антибіотикорезистентності БЛРС-продукуючих штамів через рік зберігання (другий пересів) змінився у 77,8% таких ізолятів. При вивченні властивостей штамів, які синтезують БЛРС, методом «подвійних дисків» встановлено, що з 27 штамів тільки у 6 був наявний синтез БЛРС (рисунок).

При дослідженні плазмідного профілю 12 штамів *E. coli*, виділених із сечовивідних шляхів та вагіни, було виявлено, що вони мали від 1 до 8 плазмід з розмірами 1–24 kbp. Для 66,7% таких штамів була характерна множинність вмісту плазмід (тобто більше 3). У більшості випадків одночасно з великими плазмідами в клітинах одного й того ж штаму містились невеликі кільцеві замкнуті ДНК з дискретними розмірами від 1 до 4,2 kbp. У всіх штамів *E. coli* виявлялася плазміда розміром 19,3 kbp, причому ці штами мали високий рівень резистентності до антибіотиків (до 6–10 антибіотиків одночасно).

Результати вивчення плазмідного профілю штамів *E. coli* після кріоконсервування та зберігання методом періодичних пересівів корелюють з описаними вище фенотиповими проявами антибіотикорезистентності.

Всі штами згідно з електрофореграмами ДНК після кріоконсервування зберігали кількість та спектр плазмідних ДНК. Після зберігання методом

The investigation revealed that 31.7% (46/145) of *E. coli* strains with a decreased sensitivity to the one of cephalosporins III contained the group (18.6% of total number or 27/145) of *E. coli* strains which produced the ESBLs. This stipulated the resistance to penicillins and cephalosporins of II–III generation. Moreover, the most ESBL-producing strains have been isolated from urine (55.6% or 15/27).

A high distribution of polyantibiotic resistant *E. coli* strains has been noted: from (49.2 ± 9.8)% among isolated from intestine of healthy persons to (87.2 ± 5.4)% among uropathogenic strains. All strains derived from respiratory tract, skin and soft tissues were characterized by multiple resistance to the studied antibiotics, inherent to the hospital strains.

It was found that 5 years of long term storage of cryopreserved *E. coli* strains derived from different biotopes did not affect their sensitivity to antibacterial preparations (Table). Unlike the cryopreservation the subculturing of the cultures stored in semiliquid MIA under the layer of mineral oil at 6...8°C resulted in the changes in the antibiotic resistance profile of ESBL-producing strains after one year of storage (the second transfer) in 77.8% of the isolates. Assessment of ESBL synthesizing strains by double-disc method showed that only 6 from 27 strains possessed ESBL synthesis (Figure).

Investigation of plasmid profile of 12 *E. coli* strains isolated from urinary tract and vagina revealed that these had 1 to 8 plasmids of 1–24 kbp. Multiple plasmids (*i. e.* more than 3) were characteristic for 66.7% of these strains. In most cases the cells of the same strain along with large plasmids had small closed circular DNA with discrete sizes from 1 to 4.2 kbp. Plasmid of 19.3 kbp was revealed in all the *E. coli* strains, and moreover these strains had a high level of antibiotic resistance (up to 6–10 antibiotics simultaneously).

The results of assessing the plasmid profile of *E. coli* strains after cryopreservation and subculturing correlated with the above-mentioned phenotypic manifestations of antibiotic resistance.

Analysis of DNA electrophoregrams showed that all the strains preserved a number and spectrum of plasmid DNA after cryopreservation. It was found that storage by subculturing resulted in disappearing of some plasmids in several strains, *e. g.* M1/284 bacterial strain lost the plasmid of 4.2 kbp; M475 did the plasmid of 5.5 kbp; MA1 lost the 7.7 kbp plasmid; and B132 did the 23 kbp plasmid.

Thus, the clinic strains of *E. coli* derived from different human biotopes had various spectrum of sensitivity to antibiotics. The most part of resistant strains was revealed in *E. coli* isolates from urine, especially at complicated infection of urinary tract. The most sensitive to antibacterial medications were the strains isolated from intestine of healthy people.

Антибіотикорезистентність штамів *E. coli*, виділених з різних біотопів (загальна кількість зразків  $n = 145$ )  
Antibiotic resistance of *E. coli* strains, isolated from different biotopes (total number of strains  $n = 145$ )

Антибіотик Antibiotic	Початковий спектр антибіотикорезистентності, Initial spectrum of resistance to antibiotics			Спектр антибіотикорезистентності після 5-річного зберігання Spectrum of resistance to antibiotics after 5 years of storage					
	R	I	S	Кріоконсервування Cryopreservation			Періодичні пересіви Perpetual transfer		
				R	I	S	R	I	S
β-лактами β-lactams									
Ампіцилін Ampicillin	129	6	10	129	6	10	122	7	16
Амоксицилін Amoxycillin	135	4	6	135	4	6	112	23	10
Амоксиклав Amoxyclav	110	14	21	110	14	21	60	34	51
Цефазолін Cefazolin	70	38	37	70	38	37	70	38	37
Цефалотин Cephalothin	112	21	12	112	21	12	99	24	22
Цефалексин Cephalexin	53	31	61	53	31	61	53	31	61
Цефуроксим Cefuroxim	105	17	23	105	17	23	100	18	27
Цефотаксим Cefotaxim	46	35	64	46	35	64	40	37	68
Цефтріаксон Ceftriaxone	33	19	93	33	19	93	28	20	97
Цефтазидим Ceftazidime	35	16	94	35	16	94	31	16	98
Іміпенем Imipenem	3	2	140	3	2	140	3	2	140
Аміноглікозиди Aminoglycosides									
Гентаміцин Gentamicin	32	51	62	32	51	62	32	51	62
Нетилміцин Netilmicin	21	30	94	21	30	94	21	30	94
Амікацин Amikacin	11	18	116	11	18	116	11	18	116
Фторхінолони Fluoroquinolones									
Ципрофлоксацин Ciprofloxacin	17	11	117	17	11	117	17	11	117
Норфлоксацин Norfloxacin	32	36	77	32	36	77	32	36	77
Офлоксацин Ofloxacin	23	15	107	23	15	107	23	15	107
Перфлоксацин Perfloxacin	16	12	117	16	12	117	16	12	117
Гатифлоксацин Gatifloxacin	6	5	134	6	5	134	6	5	134
Тетрацикліни Tetracyclines									
Тетрациклін Tetracycline	89	28	28	89	28	28	89	28	28

**Примітка:** R – стійкі штами; I – помірно стійкі штами; S – чутливі штами.

**Note:** R – number of resistant strains; I – strains with intermediate resistance; S – sensitive strains.

періодичних пересівів було встановлено, що ряд штамів втратив деякі плазмід: бактерії штаму M1/284 – плазмиду з розміром 4,2 kbp; M475 – плазмиду з розміром 5,5 kbp; MA1 – плазмиду з розміром 7,7 kbp; B132 – плазмиду з розміром 23 kbp.

Таким чином, клінічні штами *E. coli*, виділені з різних біотопів людини, мають різний спектр чутливості до антибіотиків. Найбільша частка резистентних штамів зустрічалась у ізолятів *E. coli* в сечі, особливо при ускладненій інфекції сечовивідної системи. Більш чутливими до антибактеріальних препаратів були штами, виділені з кишечника здорових людей.

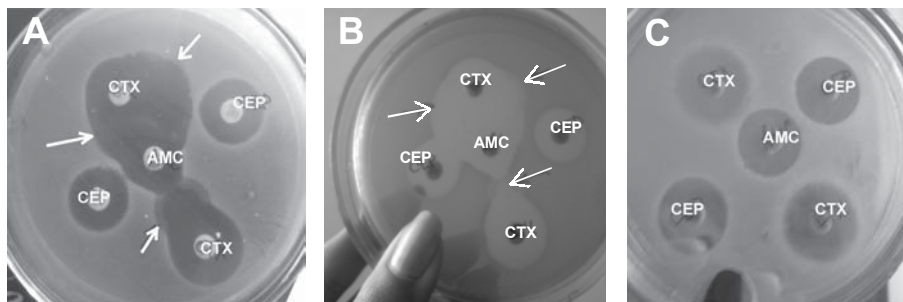
Відомо, що плазмід, які детермінують синтез  $\beta$ -лактамази, мають розміри 5,4 та 7,6 kbp [9]. Виявлені в нашому дослідженні плазмід також відносяться до цього класу. Після зберігання протягом 5 років при температурі  $-196^{\circ}\text{C}$  усі штами *E. coli* мали фенотипові спектри антибіотикорезистентності та плазмідний профіль. Це свідчить про те, що криоконсервування клітин *E. coli* в 10%-му розчині ДМСО забезпечує збереження генетичної стабільності бактерій та не призводить до структурних змін плазмід або їх втрат.

В процесі зберігання у напіврідкому МПА під шаром вазелінової олії при температурі  $6\text{--}8^{\circ}\text{C}$  частина штамів *E. coli* втрачала плазмід, в тому числі ті, які детермінують синтез БЛРС. Вірогідно, що відсутність фенотипово виявленої  $\beta$ -лактамазної активності у штамів M475 і MA1, виділених з сечовивідних шляхів, обумовлена втратою саме плазмід. У зв'язку з цим цей метод зберігання не відповідає вимогам до методів консервування бактерій при створенні колекцій мікроорганізмів.

## Висновки

1. Показано високу розповсюдженість детермінант резистентності до антибіотиків серед ізолятів *E. coli* – представників нормальної мікрофлори, що робить їх потенційним джерелом поширення антибіотикорезистентності серед свого виду та споріднених видів бактерій різних таксономічних груп.

2. Більшість вивчених штамів *E. coli* має декілька плазмід, при цьому у полірезистентних (до 6–10 антибіотиків одночасно) досліджуваних штамів виявлялась плазмід розміром 19,3 kbp.



Виявлення продукції БЛРС за допомогою методу «подвійних дисків» до (А) та після 5-річного зберігання штамів *E. coli* при  $-196^{\circ}\text{C}$  (В) або у напіврідкому МПА під шаром вазелінової олії при температурі  $6\text{--}8^{\circ}\text{C}$  (С). Стрілками позначено розширення зони затримки росту навколо диска з цефалоспорином III покоління напроти диска, що містить клавуланову кислоту. Позначення дисків: AMC – амоксицилін/клавуланова кислота (20/10 мг), CTX – цефотаксим (30 мг), CEP – цефподоксим (10 мг).

Revealing the ESBL production by double-disc method prior to (A) and after storage during 5 years at  $-196^{\circ}\text{C}$  (B) and in semiliquid MIA under the layer of mineral oil at  $6\text{--}8^{\circ}\text{C}$  (C). Arrows point to the extended zone of growth inhibition around the disc with cephalosporin of III generation opposite the disc containing clavulanic acid. Notations of discs: AMC – amoxicillin/clavulanic acid (20/10 mg), CTX – cefotaxime (30 mg), CEP – cefpodoxime (10 mg).

It has been known that size of plasmids determining the synthesis of  $\beta$ -lactamase is either 5.4 or 7.6 kbp [9]. The plasmids revealed in our research are referred to this class too. After the storage during 5 years at  $-196^{\circ}\text{C}$  all the *E. coli* strains had phenotypic spectra of antibiotic resistance and plasmid profile. This testifies to the fact that freeze-thawing of *E. coli* cells in 10% DMSO provides preservation of genetic stability of bacteria and does not result in structural changes of plasmids or their loss.

The storage in semiliquid MIA under the layer of mineral oil at  $6\text{--}8^{\circ}\text{C}$  led to a deprivation of plasmids in some of *E. coli* strains, including those determining synthesis of ESBLs. Seemingly, the lack of phenotypic  $\beta$ -lactamase activity in M475 and MA1 strains isolated from urinary tract was resulted from the deprivation of plasmids. That is why this way of storage does not comply the requirements to the methods of bacteria preservation in banks and creation of microbial collections.

## Conclusion

1. It was shown a high distribution of antibiotic resistance determinants among isolates of *E. coli* (representatives of normal microflora) that could be the potential source of antibiotic resistance distribution among the same species as well as the related bacterial species of different taxonomic groups.

2. The most part of the studied *E. coli* strains has several plasmids, moreover in polyresistant (up to 6–10 antibiotics simultaneously) strains under study the plasmid of 19.3 kbp was revealed.

3. It was experimentally found that storage of isolated strains in 10% DMSO at  $-196^{\circ}\text{C}$  for 5 years

3. Експериментально доведено, що зберігання виділених штамів у 10%-му водному розчині ДМСО при сталій температурі  $-196^{\circ}\text{C}$  протягом 5 років (термін спостереження) забезпечило збереження спектрів чутливості до антибактеріальних препаратів та плазмідний профіль (кількість та розмір плазмід).

4. Встановлено, що при зберіганні у напіврідкому МПА під шаром вазелінової олії при температурі  $6...8^{\circ}\text{C}$  шляхом періодичних пересівів на протязі всього строку спостереження (5 років) у деяких штамів змінювався спектр чутливості до  $\beta$ -лактамних антибіотиків.

Подальші дослідження в даному науковому напрямку дозволять впровадити в практику створення колекцій мікроорганізмів технології довгострокового зберігання плазмідних штамів бактерій та забезпечити молекулярно-генетичні дослідження механізмів антибіотикорезистентності та її подолання у патогенних та умовно-патогенних представників різних таксонів.

*Дослідження виконували в рамках проекту Державного Фонду фундаментальних досліджень Міністерства освіти і науки № 14.4/027 «Кріоконсервування штамів мікроорганізмів – об'єктів нових біотехнологій» (номер держреєстрації 0107U006895).*

## Література

1. Ашмарин И. П., Воробьев А. А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. – Л.: МедГиз, 1962. – 180 с.
2. Марценюк В. Ф., Кадникова Н.Г. Жизнеспособность и биологические свойства *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* и *Candida albicans* после хранения в жидком азоте в течение трех лет // Цитология. – 2004. – Т. 46, №9. – С. 819–824.
3. Наказ МОЗ України № 167 від 05.04.2007 «Про затвердження методичних вказівок щодо визначення чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів». – Київ: МОЗ України, 2007. – 63 с.
4. Холодовой стресс и биологические системы / Под ред. А. А. Цуцаевой. – Київ: Наук. думка, 1991. – 176 с.
5. Birnboim H. C., Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant DNA // Nucleic Acids Res. – 1979. – Vol. 7, №6. – P. 1513–1523.
6. Breese M.D., Sharp R.J. Storage of *Escherichia coli* strains containing plasmid DNA in liquid nitrogen // J. Appl. Bacteriol. – 1980. – Vol. 48, №1. – P. 63–68.
7. Cryogenic Preservation of Bacteria // ATCC Connection. – 2006. – Vol. 26, №1. – [електронний документ: веб-сайт] atcc.org/portals/1/pdf/atccv26no1.pdf (30.11.2012).
8. Sidiyakina T. M., Golimbet V. E. Viability and genetic stability of the bacterium *Escherichia coli* HB101 with the recombinant plasmid during preservation by various methods // Cryobiology. – 1991. – Vol. 28, №3. – P. 251–254.
9. Messai Y., Benhassine T., Naim M. et al. Prevalence of  $\beta$ -lactams resistance among *Escherichia coli* clinical isolates from a hospital in Algiers // Rev. Esp. Quimioterap. – 2006. – Vol. 19, №2. – P. 144–151.

(observation term) provided the preservation of spectra of sensitivity to antibacterial medications as well as their plasmid profile (plasmid number and size).

4. It was established that the storage in semiliquid MIA under the layer of mineral oil at  $6...8^{\circ}\text{C}$  and corresponding subculturing during the whole observation term (5 years) resulted in changed spectrum of sensitivity to  $\beta$ -lactam antibiotics.

The further investigations will enable to implement the technology of long-term storage of plasmid strains of bacteria into the practice of creation of microbial collections and to provide the molecular genetic investigations of antibiotic resistance mechanisms and its overcoming in pathogenic and opportunistic pathogenic agents of different taxons.

*The research was performed within the frames of the Project supported by State Fund for Fundamental Research of the Ministry of Education and Science of Ukraine (Nr. 14.4/027 'Cryopreservation of microbial strains as the objects of new technologies', State registration Nr. 0107U006895).*

## References

1. Ashmarin I.P., Vorobyev A.A. Statistical methods in microbiological investigations. – Leningrad: MedGiz, 1962. – 180 p.
2. Martsenyuk V.F., Kadnikova N.G. Viability and biological properties of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* after storage in liquid nitrogen during three years // Tsitologiya. – 2004. – Vol. 46, N9. – P. 819–824.
3. Order of the Ministry of Health Care of Ukraine N167 dated of 05.04.2007 About approval of microhodical recommendations 'Examination of sensibility of microorganisms to antibacterial preparations'. – Kyiv, 2007. – 63 p.
4. Cold stress and biological systems / Ed. by A.A. Tsutsaeva. – Kyiv: Naukova Dumka, 1991. – 176 p.
5. Birnboim H. C., Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant DNA // Nucleic Acids Res. – 1979. – Vol. 7, N6. – P. 1513–1523.
6. Breese M.D., Sharp R.J. Storage of *Escherichia coli* strains containing plasmid DNA in liquid nitrogen // J. Appl. Bacteriol. – 1980. – Vol. 48, N1. – P. 63–68.
7. Cryogenic Preservation of Bacteria // ATCC Connection. – 2006. – Vol. 26, N1. – [electronic document: web site] atcc.org/portals/1/pdf/atccv26no1.pdf (30.11.2012).
8. Sidiyakina T. M., Golimbet V. E. Viability and genetic stability of the bacterium *Escherichia coli* HB101 with the recombinant plasmid during preservation by various methods // Cryobiology. – 1991. – Vol. 28, N3. – P. 251–254.
9. Messai Y., Benhassine T., Naim M. et al. Prevalence of  $\beta$ -lactams resistance among *Escherichia coli* clinical isolates from a hospital in Algiers // Rev. Esp. Quimioterap. – 2006. – Vol. 19, N2. – P. 144–151.

*Accepted 04.12.2012*

*Надійшла 04.12.2012*