

# Новые подходы к повышению эффективности криоконсервирования микроорганизмов с использованием биологических эффектов оксидантов

И.А. БУРЯК

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

## New Approaches to Increase Cryopreservation Efficiency for Microorganisms Using Biological Effects of Oxidants

I.A. BURYAK

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

Способность клеток к выживанию в цикле замораживания-оттаивания зависит не только от влияния защитных сред и температурных режимов при криовоздействиях, но и от подготовки клеток перед замораживанием, а также условий внешней среды после замораживания. На выживание микроорганизмов в цикле замораживания-оттаивания влияют состав суспендирующего раствора, фаза роста, условия культивирования перед замораживанием.

Цель работы – изучение возможностей вовлечения естественных защитных сил микроорганизмов в их выживание в цикле замораживания-оттаивания, что дополнило бы известные методы искусственной криозащиты. В основе предлагаемого подхода лежит использование реакций клеток на действие оксидантов. Спектр биологических эффектов оксидантов чрезвычайно широк и зависит от дозы окислителей. Установлено, что низкие дозы различных оксидантов оказывают митогенное действие на делящиеся клетки в культуре. В то же время средние дозы оксидантов приводят к временной остановке роста клеток, которая является результатом экспрессии генов, отвечающих за защиту и репарацию клеток. При этом в клетках синтезируются также белки теплового шока. В работе исследовали влияние озона на жизнеспособность дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, подвергнутых криоконсервированию. Суспензии дрожжей в физиологическом растворе замораживали до  $-196^{\circ}\text{C}$  погружением в жидкий азот и оттаивали на водяной бане при  $30^{\circ}\text{C}$ . Затем в суспензии дрожжей вводили дозированные количества озона и через 30 мин производили посев на агаризованную питательную среду. Жизнеспособность клеток оценивали по количеству сформировавшихся макроколоний. Установлено, что в диапазоне низких концентраций озона (менее  $0,13 \text{ мг O}_3/\text{л}$  или  $2,2 \text{ мг O}_3/\text{кл}$ ) повышается жизнеспособность дрожжей. В диапазоне концентраций  $0,13\text{--}0,38 \text{ мг O}_3/\text{л}$  (дозы  $2,2\text{--}6,3 \text{ мг O}_3/\text{кл}$ ) не наблюдали ни повышение жизнеспособности деконсервированных дрожжей, ни их инактивацию, т.е. имела место задержка роста культуры.

Таким образом, на примере озона показано, что в криобиологии могут быть использованы оксиданты в определенных низких дозах для повышения пролиферативной активности микроорганизмов после замораживания-оттаивания. Перспективным для криобиологии может быть также использование средних доз оксидантов для временной остановки роста клеток с целью их стабилизации перед процедурой криоконсервирования.

Cell ability to survive during freeze-thawing cycle depends not only in the action of cryoprotective media and temperature regimens at cryoeffects, but also on preparing the cells prior to freezing, as well as the environmental conditions after freezing. Composition of suspending solution, growth phase, culturing conditions prior to freezing affect the survival of microorganisms in freeze-thawing cycle.

The research aim is to study the possible involvement of natural protective forces of microorganisms into their survival during freeze-thawing, that would supplement the traditional methods of artificial protection. In the base of proposed approach is the use of cell reactions on the effect of oxidants. The spectrum of biological effects of oxidants is quite wide and depends on the dose of oxidants. It has been found that low doses of different oxidants render mitogenic effect on dividing cells in culture. At the same time the medium doses of oxidants result in provisional termination of cell growth, resulting from expression of genes responsible for cell protection and reparation. Herewith heat shock proteins are also synthesized in the cells. In the research there was studied the ozone effect on viability of *Saccharomyces cerevisiae*, subjected to cryopreservation. Yeast suspensions in physiological solution were frozen down to  $-196^{\circ}\text{C}$  by plunging into liquid nitrogen and thawed on water bath at  $30^{\circ}\text{C}$ . Then into yeast suspensions there were introduced dosed amounts of ozone and in 30 min the seeding on agarized nutritive medium was performed. Cell viability was assessed on the number of formed macrocolonies. It has been established that within the range of low ozone concentrations (less than  $0.13 \text{ mg O}_3/\text{l}$  or  $2.2 \text{ mg O}_3/\text{cell}$ ) the yeast viability increases. Within the concentration range of  $0.13\text{--}0.38 \text{ mg O}_3/\text{l}$  (doses of  $2.2\text{--}6.3 \text{ mg O}_3/\text{cell}$ ) neither increase of frozen-thawed yeast nor their inactivation were found, i.e. there was delay in culture growth.

Thus, exemplifying ozone it has been shown that in cryobiology there may be used oxidants under certain low doses to increase proliferative activity of microorganisms after freeze-thawing. The perspective for cryobiology may be also the use of average doses of oxidants for provisional termination of cell growth to stabilize them prior to cryopreservation procedure.