

УДК 57.043:547.42

UDC 57.043:547.42

Кинетические параметры роста *E. coli* после глубокого замораживания в присутствии диэтилсульфоксида

Ш.А. МАРКАРЯН¹, К.А. БАГРАМЯН¹, В.Б. АРАКЕЛЯН²

¹Ереванский государственный университет, ²Ереванский физический институт

Kinetic Parameters of *E. coli* Growth After Deep Freezing at Diethyl Sulfoxide Presence

MARKARIAN S.A.¹, BAGRAMYAN K.A.¹, ARAKELYAN V.B.²

¹Yerevan State University, ²Yerevan Physics Institute

Исследовали удельную скорость роста и лаг-фазу *E. coli* до и после глубокого замораживания при температуре -196 °С в присутствии диэтилсульфоксида (ДЭСО) в 10%-й концентрации. Результаты сопоставлены с данными, полученными при исследовании традиционных криопротекторов глицерина и диметилсульфоксида (ДМСО). Показано, что в физиологических условиях криопротекторы уменьшают удельную скорость роста, причем наиболее сильное воздействие оказывает ДЭСО. После замораживания удельная скорость роста увеличивается, в условиях контроля и в присутствии глицерина, ДМСО и ДЭСО ее величина практически одинакова. Показано, что наличие ДЭСО в культуральной жидкости практически ликвидирует лаг-фазу как до, так и после замораживания *E. coli*.

Ключевые слова: ДЭСО, криопротектор, *E. coli*.

Досліджували питому швидкість зростання і лаг-фазу *E. coli* до і після глибокого заморожування при температурі -196°C у присутності диетилсульфоксиду (ДЕСО) в 10%-й концентрації. Результати зіставлені з даними, які отримані при дослідженні традиційних криопротекторів гліцерину і диметилсульфоксиду (ДМСО). Показано, що в фізіологічних умовах криопротектори зменшують питому швидкість зростання, причому найбільш сильний вплив має ДЕСО. Після заморожування питома швидкість зростання збільшується, в умовах контролю і в присутності гліцерину, ДМСО і ДЕСО її величина практично однакова. Доведено, що наявність ДЕСО у культуральній рідині практично ліквідує лаг-фазу як до, так і після заморожування *E. coli*.

Ключові слова: ДЕСО, криопротектор, *E. coli*.

Specific growth rate and lag-phase of *E. coli* before and after their deep freezing under -196°C temperature at the presence of diethyl sulfoxide (DESO) in 10% concentration were investigated. The results were compared with the data obtained during investigations of traditional cryoprotectants of glycerol and dimethyl sulfoxide (DMSO). It is shown, that under physiological conditions the cryoprotectants reduce a specific growth rate, moreover the strongest effect is caused by DESO. After freezing the specific growth rate is increased and its value is practically equal under control conditions and at the presence of glycerol, DMSO and DESO. It is demonstrated, that the DESO presence in a cultural liquid practically declines the lag-phase both before and after *E. coli* freezing.

Key words: DESO, cryoprotectant, *E. coli*.

Известно, что наиболее надежным методом хранения микроорганизмов является метод криоконсервирования [7,10] при температуре жидкого азота, когда останавливаются обменные и биохимические реакции и отсутствует жидкая фаза. Для этой цели применяют криопротекторы, которые, смешиваясь с водой, уменьшают температуру ее кристаллизации при понижении температуры. Криозащитные свойства веществ часто связывают с их способностью образовывать водородные связи с молекулами воды и прочные комплексы с ионными компонентами раствора, способствующие уменьшению размеров кристаллов льда при замерзании жидкой фазы клетки,

Адрес для корреспонденции: Маркарян Ш.А., Химический факультет Ереванского государственного университета, Ереван, 375049 Армения; тел.: 374-1-555172, факс: 374-1-576421, e-mail: shmarkar@ysu.am

It is known, that the most reliable method for microorganism storage is cryopreservation [7, 10] at the temperature of liquid nitrogen, when the metabolic and biochemical reactions stop and there is no liquid phase.

For this purpose one applies cryoprotectants, which, after mixing with water, reduce the temperature of its crystallisation at the temperature decrease. Cryoprotective properties of substances are often related to their capability to form hydrogen bonds with water molecules and solid complexes with ion components of solution, contributing to a decrease in the ice crystal sizes at the cell liquid phase freezing, to the elimination of damaging effect of both osmotic pressure and

Address for correspondence: Markarian S.A., Faculty of Chemistry, Yerevan State University, Yerevan, 375049 Armenia; tel: 374-1-555172, fax: 374-1-576421, e-mail: shmarkar@ysu.am

снятию повреждающего действия как осмотического давления, так и возрастающей при замораживании клетки концентрации электролита. Наиболее часто применяемые криопротекторы глицерин и ДМСО обладают ярко выраженной способностью образовывать водородные связи с молекулами воды, растворяясь в ней в любых соотношениях [1,14]. Проведенные недавно раманспектроскопические исследования водных растворов ДЭСО показали, что имеет место очень сильное взаимодействие между молекулами ДЭСО и H₂O, еще более сильное, чем взаимодействие между самими молекулами ДЭСО в чистом ДЭСО [9]. Эти исследования показали также, что взаимодействие между молекулами ДЭСО и H₂O сильнее, чем между ДМСО и H₂O, и следует ожидать, что ДЭСО окажется более эффективным криопротектором, чем ДМСО.

Материалы и методы

Модельным объектом для изучения последствий криогенного воздействия часто использовали различные штаммы *E. coli*. Предварительные исследования показали, что ДЭСО более эффективно, чем глицерин и ДМСО, сохраняет мембранный потенциал *E. coli* после замораживания-отогрева [4]. В работах [7,8] была исследована зависимость выживаемости *E. coli* при замораживании от условий криоконсервирования в присутствии глицерина и ДМСО. Представляется целесообразным получение более детальной информации о физиологическом состоянии выживших клеток на основании исследования удельной скорости роста и лаг-фазы [2]. Цель данной работы – выявление криопротекторных свойств ДЭСО и сравнительное исследование влияния глубокого замораживания на кинетические параметры роста *E. coli* (удельную скорость роста и лаг-фазу) в присутствии глицерина, ДМСО и ДЭСО.

Дикий тип K-12 (1), *E. coli* были выращены анаэробно, как описано в [13]. Для замораживания клетки, выросшие до логарифмической стадии роста, осаждали с помощью центрифугирования, после чего бактерии суспензировали в 50 мМ трис-буфере, pH 7,5 до конечной концентрации 10¹² клеток/мл. Замораживание-отогрев проводили в оптимальном для *E. coli* режиме – одноэтапный режим охлаждения до температуры жидкого азота -196 °С со скоростью 40°С/мин и быстрый разогрев в водяной бане при температуре 41°С [7]. Наши предварительные эксперименты по выживаемости *E. coli* показали, что эффективными концентрациями для ДМСО являются 10-15%, а для ДЭСО - меньше 5-10%. Поэтому оптимальной была выбрана 10%-я концентрация. Как хими-

increasing electrolyte concentration during cell freezing. The most often applied glycerol and DMSO cryoprotectants have a pronounced capability to form hydrogen bonds with water molecules, by dissolving in it under any ratios [1, 14]. The recent Raman spectroscopic investigations of DESO aqueous solutions demonstrated, that there was a very strong interaction between DESO and H₂O molecules, that was much stronger than between DESO molecules themselves in pure DESO [9]. These investigations shown also that the interaction between DESO and H₂O molecules was stronger, than between DMSO and H₂O, and it should be expected that DESO would be more efficient cryoprotectant than DMSO.

Materials and methods

Different strains of *E. coli* were often used as a model object for studying the cryogenic effect consequences. Preliminary investigations demonstrated, that DESO protected *E. coli* membrane potential after freeze-thawing more efficiently than glycerol and DMSO [4]. In the papers [7, 8] there was investigated the dependence of *E. coli* survival during freezing on cryopreservation conditions at glycerol and DMSO presence. It seems to be expedient to obtain more detailed information about physiological state of survived cells basing on the investigations of specific growth rate and lag-phase [2]. The aim of this work was to reveal the cryoprotective properties of DESO and a comparative study of the deep freezing effect on kinetic parameters of *E. coli* growth (specific growth rate and lag-phase) at the presence of glycerol, DMSO and DESO.

E. coli K-12 (1) wild type was grown in anaerobic way as it is described in the paper [13]. For freezing the cells, grown up to logarithmic growth stage, were sedimented by centrifugation, afterwards the bacteria were suspended in 50 mM of Tris-buffer, pH7.5, up to the final concentration of 10¹² cells/ml. Freeze-thawing was carried-out in optimal regimen for *E. coli*: one-stage cooling regimen up to temperature of liquid nitrogen -196°C with a rate of 40°C/min and a prompt thawing on water bath at 4°C [7]. Our preliminary experiments on *E. coli* survival rate demonstrated, that efficient concentrations for DMSO were 10-15% and for DESO less than 5-10%. Therefore 10% concentration was chosen as an optimal one. As a chemical reagent DESO is not industrially produced. It was obtained by a synthetic way basing on the patented method [5]. Before usage, DMSO and DESO were thoroughly purified and distilled under vacuum, a middle fraction was used for the sample preparation. The preparation purity made not less than 99%.

Microbiological investigations were carried-out using the classical methods [11, 13].

The obtained experimental results on kinetics of

ческий реагент ДЭСО промышленность не выпускает. Он был получен синтетическим путем на основе запатентованного метода [5]. Перед употреблением ДМСО и ДЭСО были тщательно очищены и перегнаны под вакуумом, для приготовления образцов была использована средняя фракция. Чистота препарата составляла не менее 99%.

Микробиологические исследования проводили классическими методами [11,13].

Полученные экспериментальные результаты по кинетике роста *E.coli* в начальной стадии описываются уравнением [2]:

$$N(t) = N_0 \times \exp(\mu(\tau-t)),$$

где $N(t)$ - число клеток в момент времени t ;
 N_0 - число клеток в начальный момент времени;
 μ - удельная скорость роста; τ - лаг-фаза.

Результаты и обсуждение

Сопоставление уравнения с экспериментальными данными позволяет определить параметры μ и τ . Вначале эти параметры были определены в физиологических (при температуре 37°C) условиях, без криопротекторов и в присутствии криопротекторов ДМСО, ДЭСО и глицерина в 10%-й концентрации. Полученные результаты представлены в таблице. Из таблицы видно, что наличие криопротекторов в среде роста в 10%-й концентрации приводит к уменьшению удельной скорости роста по сравнению с контролем. Причем наименьшая удельная скорость роста наблюдается в присутствии ДЭСО. Поскольку, как известно [3], возможной причиной уменьшения удельной скорости роста *E. coli* может быть изменение свойств плазматической мембраны, то полученные результаты могут объясняться как

E. coli growth in initial stage are described with the equation [2]:

$$N(t) = N_0 \times \exp(\mu(\tau-t)),$$

where $N(t)$ is a number of cells in the moment of time t ; N_0 is cell number in an initial moment of time; μ is a specific growth rate; τ is lag-phase.

Results and discussion

Comparison of the equation with experimental data permits to determine the μ and τ parameters. At the beginning these parameters were determined under physiological conditions (at 37°C) without and in the presence of DMSO, DESO and glycerol cryoprotectants in 10% concentration. The results obtained are presented in the Table. The table shows that the presence of cryoprotectants in the growth medium in 10% concentration results in a decrease in a specific growth rate in comparison with the control. Moreover the lowest specific growth rate is observed at the DESO presence. Since, as it is known [3], the change in the plasmatic membrane properties can be a possible cause of a decrease in *E. coli* specific growth rate, the obtained results can be explained as a result of cryoprotectant modifying effect on the membranes. The cause of membrane modification can be the fact that cryoprotectants, especially DESO, affect the system of hydrogen bonds at the interface of membrane-electrolyte solution. The Table shows that the strongest effect is caused by DESO that coordinates with the measurement results of membrane potential in *E. coli* [4]. The lag-phase analysis on the growth curves demonstrates, that in the medium with DESO their duration is practically reduced to zero. In the media with DMSO and glycerol the lag-phase duration is considerably higher than in the control (in 8 times higher in case of DMSO). Proceeding from the fact

Влияние криопротекторов на удельную скорость роста μ и лаг-фазу τ *E. coli* до и после глубокого замораживания
 Effect of cryoprotectants on specific growth rate μ and lag-phase τ of *E. coli* before and after deep freezing

Параметры Parameters	Температура Temperature	Контроль (без криопротекторов) Control (without cryoprotectants)	Криопротекторы Cryoprotectants		
			Глицерин Glycerol	ДМСО DMSO	ДЭСО DESO
$\mu, \text{ч}^{-1}$	37°C	0,54±0,06	0,41±0,03	0,39±0,01	0,11±0,01
μ, hr^{-1}	Глубокое замораживание Deep freezing	0,76±0,04	0,72±0,03	0,73±0,04	0,75±0,02
$\tau, \text{ч}$	37°C	0,12±0,02	0,32±0,06	1,04±0,25	0,04±0,01
τ, hr	Глубокое замораживание Deep freezing	0,41±0,02	0,26±0,01	0,36±0,01	0

Примечание: Криопротекторы ДМСО, ДЭСО и глицерин использовали в 10%-й концентрации, в контрольных экспериментах бактерии суспензировали в трис-буфере, pH 7,5.

Notes: DMSO, DESO and glycerol cryoprotectants were used in 10% concentration, in the control experiments bacteria were suspended in Tris-buffer, pH 7,5.

следствие модифицирующего действия криопротекторов на мембраны. Причиной модификации мембраны может быть то, что криопротекторы, особенно ДЭСО, действуют на систему водородных связей на границе раздела мембрана – раствор электролита. Как видно из таблицы, наиболее сильное воздействие оказывает ДЭСО, что согласуется и с результатами измерения мембранного потенциала у *E. coli* [4]. Анализ лаг-фаз на кривых роста показывает, что в среде, содержащей ДЭСО, их продолжительность практически сводится к нулю. В средах, содержащих криопротекторы ДМСО и глицерин, продолжительность лаг-фазы значительно больше, чем в контроле (в случае ДМСО более чем в 8 раз). Исходя из того, что в культуральной среде отсутствует ингибитор роста и длительность лаг-фазы не коррелирует с мембранной активностью криопротекторов (как это видно из таблицы), то можно предположить, что причиной появления лаг-фазы являются адаптационные процессы в клетке [3].

Были определены удельная скорость роста и лаг-фаза у *E. coli* после глубокого замораживания как с криопротекторами, так и без них (таблица). Из таблицы видно, что после замораживания удельная скорость роста увеличивается и практически не зависит ни от типа криопротектора ни от того, применялся криопротектор в процессе замораживания или нет. Такой тип ответа характерен при стрессовых воздействиях. Эти данные согласуются с результатами работы [13], в которой исследовался синтез белка у *E. coli* после холодового воздействия (-196°C) и холодового шока.

Выводы

Полученные в работе [6] данные позволили авторам утверждать, что *E. coli* обладает “универсальным” механизмом ответа на стрессовые воздействия внешних факторов, в том числе и холодовых. Отметим, что часто экстремальные температуры стимулируют значительную ферментативную активность клеток [12]. Продолжительность лаг-фазы в среде, не содержащей криопротектор, самая большая. При использовании ДЭСО лаг-фаза отсутствует. В случае применения ДМСО и глицерина знак τ в формуле изменился. Такое сложное и неоднозначное изменение продолжительности лаг-фазы после замораживания, на наш взгляд, является следствием действия, по крайней мере, двух факторов – стимуляции ферментативной активности клеток при воздействии экстремальных температур и влиянии криопротекторов на адаптационные процессы в клетке.

that in cultural medium there is no growth inhibitor and the lag-phase duration does not correlate with membrane activity of cryoprotectants (as it is seen from the Table), it can be assumed that the cause of lag-phase occurrence is adaptation processes in a cell [3].

There were determined the specific growth rate and lag-phase in *E. coli* after deep freezing both with and without cryoprotectants (Table). The Table shows that after freezing the specific growth rate increases and does not practically depend on either the type of cryoprotectant or the fact of applying cryoprotectant during freezing. Such a reaction is typical during stress effects. These data coordinate with the results of work [13], where there was studied the protein synthesis in *E. coli* after cold effect (-196°C) and cold shock.

Conclusions

The data obtained in the work [6] allowed to the authors to confirm that *E. coli* had the unique “universal” response mechanism on stress effects of external factors, including cold ones. It should be noted, that extreme temperatures often stimulate the considerable enzyme activity of cells [12]. The lag-phase duration without cryoprotectant is the biggest. There is no lag-phase during DESO usage. In case of DMSO and glycerol application the τ was changed in the formula. From our point of view, such a complicated and versatile change in the lag-phase duration after freezing results from at least two factors: stimulation of cell enzyme activity under the effect of extreme temperatures and the influence of cryoprotectants on adaptation process in cell.

The work was supported by the International Science and Technology Center (ISTC, grant A 199).

References

1. Belous A.M., Gordienko E.A., Rozanov L.F. Freezing and cryoprotection.– M.: Vysshaya shkola, 1987.– 80 p.
2. Varfolomeyev S.D., Gurevich K.G. Biokinetics.– M.: Vysshaya shkola, 1999.– 720 p.
3. Varfolomeyev S.D., Kalyuzhny S.V. Biotechnology.– M.: Vysshaya shkola, 1990.– 296 p.
4. Markarian S.A., Bagramyan K.A., Arakelyan V.B. Membrane potential of *E. coli* after deep freezing at the presence of DMSO and DESO // Biophysika.– 2002.– Vol.47, N2.– P. 315-317.
5. Markarian S.A., Tadevosyan N. Ts. Method of diethyl sulfoxide purification. Patent of Armenia, 2002.– P.20010141.
6. Mikulinsky Yu.E., Kotlyarov A.O., Tsutsayeva A.A. Induction of protein synthesis, similar to heat shock proteins in *E. coli* under the effect of cold influence // Cryobiology.– 1987.– Vol.3, N3.– P. 50-51.
7. Tsutsayeva A.A., Vysekantsev I.P. Cryopreservation of *Escherichia coli* bacteria: Cryobiology and biotechnology.– Kiev: Naukova Dumka, 1987.– P. 65-74.
8. Tsutsayeva A.A., Safonova T.S., Vysekantsev I.P. et al. Effect of cell physiological state of *Escherichia coli* on sensitivity to low temperature effect // Mikrobiologiya.– 1980.– Vol.49, N1.– P. 179-181.

Работа выполнена при поддержке фонда МНТЦ, грант А - 199.

Литература

1. Белоус А.М., Гордиенко Е.А., Розанов Л.Ф. Замораживание и криопротекция. – М.: Высш. школа, 1987. – 80 с.
2. Варфоломеев С.Д., Гуревич К.Г. Биокинетика. – М.: Высш. школа, 1999. – 720 с.
3. Варфоломеев С.Д., Калужный С.В. Биотехнология. – М.: Высш. школа, 1990. – 296 с.
4. Маркарян Ш.А., Баграмян К.А., Аракелян В.Б. Мембранный потенциал *E. coli* после глубокого замораживания в присутствии ДМСО и ДЭСО // Биофизика. – 2002. – Т.47, N 2. – С. 315-317.
5. Маркарян Ш.А., Тадевосян Н.Ц. Способ очистки диэтилсульфоксида. Пат. Республики Армения, 2002. – P20010141.
6. Микулинский Ю.Е., Котляров А.О., Цуцаева А.А. Индукция синтеза белков, подобных белкам теплового шока у *E. coli* под влиянием холодового воздействия // Криобиология. – 1987. – Т.3, N 3. – С. 50-51.
7. Цуцаева А.А., Высеканцев И.П. Криоконсервирование бактерий *Escherichia coli*: Криобиология и биотехнология. – Киев: Наук. думка, 1987. – С. 65-74.
8. Цуцаева А.А., Сафонова Т.С., Высеканцев И.П. и др. Влияние физиологического состояния клеток *Escherichia coli* на чувствительность к действию низких температур // Микробиология. – 1980. – Vol.49, N1. – С. 179-181.
9. Bonora S., Torreggiani A., Markarian S.A., Fagnano C. European Congress on Molecular Spectroscopy. – September, Lille, France, 2002. – P. 90.
10. Heckly R.J., Preservation of microorganisms // Advanced Applied Microbiology. – 1978. – Vol.24. – P. 1-53.
11. Kapelyants A.S., Kell D. Rapid assessment of bacterial viability and vitality using rodamine 123 and flow cytometry // Journal Applied Bacteriology. – 1992. – Vol.72. – P. 410-422.
12. Souzu H. Proceedings: The phospholipid degradation and cellular death caused by freeze-thawing or freeze-drying of yeast // Cryobiology. – 1973. – Vol.10. – P. 427-431.
13. Trchounian A., Bagramyan K., Poladyan A. Formate hydrogen lyase are needed for proton-potassium exchange though the F_0F_1 -ATPase and the Trk system in anaerobically grown and glycolysing *Escherichia coli* // Current Microbiology. – 1997. – Vol.35. – P. 201-206.
14. Yu Z.W., Quinn P.J. Dimethyl sulphoxide: a review of its applications in cell biology // Bioscience Reports. – 1994. – Vol.14. – P. 259-281.

Accepted in 04.04.2003

Поступила 04.04.2003