

Механізми кріпошкодження дріжджових грибів *Saccharomyces cerevisiae* при заморожуванні у водному розчині диметилсульфоксиду з постійною швидкістю у контейнерах циліндричної форми

UDC 577.35

O.V. SAKUN

Cryoinjury Mechanisms in the Yeast Fungi *Saccharomyces cerevisiae* During Freezing in Dimethyl Sulfoxide Aqueous Solution at a Constant Rate in Cylindrical Containers

Визначено колонієутворюючу здатність дріжджових грибів *S. cerevisiae*, суспендованих у розчині “10% диметилсульфоксиду – 0,135M NaCl – вода”, після заморожування зі швидкостями 1, 5 та 10°C/хв. Методом точкової термографії встановлено залежність локальної середньої швидкості охолодження у зразку, який заморожувався, на етапі кристалізації клітинної суспензії від швидкості охолодження кріоносія в кріостаті та відстані від осі контейнерів циліндричної форми з діаметрами 10, 20 і 30 мм. Висока колонієутворююча здатність мікроорганізмів *S. cerevisiae* спостерігається, якщо значна кількість клітин, які містяться в контейнері для заморожування, на етапі кристалізації охолоджується зі швидкостями 4–8°C/хв. Максимальне значення колонієутворюючої здатності мікроорганізмів *S. cerevisiae* досягається при заморожуванні в контейнері діаметром 20 мм за швидкості охолодження холодоносія в кріокамері 5°C/хв.

Ключові слова: *S. cerevisiae*, швидкість охолодження, режими охолодження, контейнер, колонієутворююча здатність.

Определена колониеобразующая способность дрожжевых грибов *S. cerevisiae*, суспендированных в растворе “10% диметилсульфоксида – 0,135M NaCl – вода”, после замораживания со скоростями 1, 5 и 10°C/мин. Методом точечной термографии установлена зависимость локальной средней скорости охлаждения в замораживаемом образце на этапе кристаллизации клеточной суспензии от скорости охлаждения крионосителя в криостате и расстояния от оси контейнеров цилиндрической формы с диаметрами 10, 20 и 30 мм. Высокая колониеобразующая способность микроорганизмов *S. cerevisiae* наблюдается, если значительное количество клеток, находящихся в контейнере для замораживания, на этапе кристаллизации охлаждается со скоростями 4–8°C/мин. Максимальное значение колониеобразующей способности микроорганизмов *S. cerevisiae* достигается при замораживании в контейнере с диаметром 20 мм при скорости охлаждения хладоносителя в криокамере 5°C/мин.

Ключевые слова: *S. cerevisiae*, скорость охлаждения, режимы охлаждения, контейнер, колониеобразующая способность.

The colony-forming ability of the yeast fungi *S. cerevisiae* suspended in 10% (vol. %) dimethyl sulfoxide – 0.135 M NaCl – water solution after freezing at the rates of 1, 5 and 10°C/min was determined. The method of multi-point thermography demonstrated the dependence of the average cooling rate in a frozen sample on the crystallisation stage of cell suspension on the coolant cooling rate in the cryostat and on the distance from the axles of cylindrical containers with the diameters of 10, 20 and 30 mm. The high colony-forming ability of the microorganisms *S. cerevisiae* was observed if a considerable amount of cells in a freezing container is cooled at the rates 4–8°C/min on the crystallization stage. The maximal colony-forming ability of the microorganisms *S. cerevisiae* was achieved if they were frozen in a container with the diameter of 20 mm at the coolant cooling rate of 5°C/min in the cryochamber.

Key words: *S. cerevisiae*, cooling rates, cooling regimens, container, colony-forming ability.

Найбільш поширеним способом підтримки мікроорганізмів є їх періодичний пересів на свіже живильне середовище [1]. Проте проблема ефективного за кінцевими результатами, а також обґрунтованого за затратами праці і коштів консервування культур мікроорганізмів зростає по мірі збільшення їх кількості та різноманітності. Для тривалої підтримки життєздатності і стабільності властивостей мікроорганізмів використовується заморожування за низьких та наднизьких температур. Ефективність цього способу залежить від вибору режимів заморожування. Як правило, використовуються

The most spread way of microorganism preservation is a periodic passage to fresh nutrient medium [1]. Nevertheless the challenge of both efficient by final results and substantiated by labor and financial costs preservation of microorganism cultures becomes more vital as quantity and variety of microorganisms grow. Freezing at low and ultralow temperatures is used for long-term preservation of microorganism viability and stability of their properties. Efficiency of this technique depends on a freezing regimen. As a rule linear and fragmentary linear cooling programs are used, when coolant temperature changes at a con-

Національний технічний університет “Харківський політехнічний інститут”

* Адреса для кореспонденції: вул. Фрунзе, 21, Харків, Україна, 61002; тел.: (+38 057) 700-15-64, факс: (+38 057) 707-66-01

National Technical University “Kharkiv Polytechnical Institute”, Kharkov, Ukraine

* Address for correspondence: 21, Frunze str., Kharkov, Ukraine 61002; tel.:+380 57 700 1564, fax: +380 57 707 6601

лінійні та кусочно-лінійні програми охолодження, при реалізації яких температура холодоносія змінюється з постійною швидкістю під час усього процесу кріоконсервування або має різні значення, залишаючись сталою на окремих його етапах [2].

Механізми кріозахисної дії лінійних режимів заморожування досить добре досліджені і теоретично обґрунтовані двофакторною теорією кріопшкодження клітин [8]. Основна її суть полягає в тому, що під час охолодження суспензії, яка кріоконсервується, на клітинні компоненти одночасно впливають два типи факторів. Перший – внутрішньоклітинна кристалізація – пов'язаний із руйнівною дією кристалів льоду, які утворюються всередині клітин і механічно пошкоджують елементи протоплазми. Другий – ефекти розчину – обумовлений токсичною дією на клітинні компоненти висококонцентрованих розчинів, які утворюються внаслідок зменшення частки рідкої фази води у внутрішньоклітинному та позаклітинному середовищах у ході кристалізації суспензії. Із підвищенням швидкості охолодження збільшується відсоток клітин, які ушкоджуються за рахунок внутрішньоклітинної кристалізації, тоді як несприятлива дія на клітини другого типу зменшується. Зниження швидкості охолодження призводить до збільшення частки клітин у суспензії, які ушкоджуються за рахунок ефектів розчину.

Вирішальне значення для забезпечення оптимального режиму заморожування суспензії клітин має вибір швидкості її охолодження, при якій спільний вплив кріошкодуючих факторів обох типів є мінімальним. Значення цього параметра залежить від морфологічних і функціональних особливостей клітин певного виду, а також від діаграми плавлення кріозахисного розчину [7]. Для дріжджових грибів *Saccharomyces cerevisiae*, суспендованих у 10%-му розчині диметилсульфоксиду (ДМСО) у фізіологічному середовищі (0,135 М NaCl – вода), оптимальна швидкість охолодження окремої клітини, яка знаходиться в певній точці об'єму зразка, становить близько 4–5°C/хв [5]. У діапазоні швидкостей охолодження $\leq 3^\circ\text{C}/\text{хв}$ кріопшкодження клітин відбувається тільки за рахунок ефектів розчину, а при швидкостях охолодження $\geq 6^\circ\text{C}/\text{хв}$ – переважно в результаті внутрішньоклітинної кристалізації. Залежність сумарного внеску цих чинників у кріопшкодження клітин має порівняно широкий мінімум у діапазоні швидкостей охолодження 4–8°C/хв.

Розмір і геометрична форма контейнера, в якому заморожується зразок, впливають на розподіл швидкості охолодження в різних його точках. Різниця між температурою в камері програмного охолоджувача та в центрі зразка зростає по мірі збільшення діаметра контейнера [4]. Цей ефект найчас-

stant rate during the whole cryopreservation procedure or varies remaining constant at its certain stages [2].

Cryoprotective mechanisms of linear freezing regimens are studied well enough and theoretically substantiated by the two-factor theory of cell cryoinjury [8]. Its basic essence lies in the fact that when suspension is cooled, cellular components are influenced by two types of factors simultaneously. The first factor, intracellular crystallization, is associated with disruptive action of ice crystals, which emerge in the cell and damage mechanically the protoplasmic elements. The second one, solution effects, is attributed to toxic impact on cellular components of high-concentrated solutions, which are formed due to the reduction of liquid phase portion in intracellular and extracellular mediums in the course of crystallization. As a cooling rate grows, percentage of cells damaged because of intracellular crystallization increases, while the other unfavorable factor action lessens. A drop in cooling rate results in an increased percentage of cells damaged due to solution effects.

Selection of a cooling rate, at which the combined influence of cryodamaging factors of both types would be minimal, is of crucial importance for providing an optimal regimen for freezing cell suspensions. Significance of this parameter depends on morphological and functional peculiarities of cells as well as on the diagram of cryoprotective solution melting [7]. For the yeast fungi *S. cerevisiae* suspended in 10% dimethyl sulfoxide (DMSO) solution on physiological medium (0.135 M NaCl – water) the optimal cooling rate for a single cell, which is located in a certain point of the sample volume, is approximately 4–5°C/min [5]. Within the cooling rate range of $\leq 3^\circ\text{C}/\text{min}$ cryoinjuries of cells occur owing to solution effects only, and when cooling rates are $\geq 6^\circ\text{C}/\text{min}$, cryoinjuries of cells occur mainly because of intracellular crystallization. The dependence of ultimate contribution of these factors to cryoinjuries of cells is characterized by a relatively wide minimum within the cooling rate range of 4–8°C/min.

The size and geometric shape of a container, in which a sample is frozen, affect cooling rate distribution inside this freezing sample. The bigger the diameter of a container is, the greater difference between temperatures in the chamber of a program freezer and in the center of a sample is [4]. This effect is mostly not considered by researchers, when they interpret experimental results and estimate efficiency of freezing samples of large volume by viability indices registered for smaller (satellite) samples.

The aim of the work is the analysis of cryoinjury mechanisms of the yeast fungi *S. cerevisiae* suspension in the solution “10% dimethyl sulfoxide – 0.135 M NaCl – water” in the process of freezing in cylindrical containers by linear programs of cooling

тіше не враховують дослідники при трактуванні результатів експериментів та оцінці ефективності заморожування зразків більшого об'єму за показниками життєздатності клітин, отриманими при заморожуванні менших за об'ємом (сателітних) зразків.

Мета роботи – аналіз механізмів кріопшкоджень суспензії дріжджових грибів *S. cerevisiae* в розчині “10% диметилсульфоксиду – 0,135 М NaCl – вода” під час заморожування в контейнерах циліндричної форми за лінійними програмами охолодження з урахуванням розкиду режимних параметрів у зразку.

Матеріали і методи

Дослідження проведено на дріжджових клітинах *S. cerevisiae* – промисловий штам (раса 608, РІХП, С.-Петербург). Культуру клітин вирощували на скошеному сусло-агаровому середовищі при 30°C протягом 48 годин. Вихідна концентрація клітин у суспензії складала 10⁵ КУО/мл. Для заморожування використовували суспензію клітин під захистом 10% (об'єм/об'єм) ДМСО.

Зразки заморожували за допомогою пристрою УОП-6 (СКТБ з ДВ ІПКіК НАНУ), призначеного для програмного охолодження й відігрівання біологічного матеріалу в контейнерах. Заморожування та реєстрацію температурного поля зразків здійснювали в герметичних контейнерах циліндричної форми діаметрами: 30, 20 і 10 мм, виготовлених з термостійкого пластику з товщиною стінок 1 мм. Об'єм зразків у контейнерах становив 20, 10 та 1,8 мл відповідно. Для заморожування-відігрівання зразків використовували одночасно 4 контейнери однакового розміру. Розподіл температурного поля контролювали в одному з цих контейнерів. Для реєстрації температури застосовували мідь-константанові термопари, які з'єднували за диференціальною схемою. В контейнерах усіх розмірів термопари (ТП) встановлювали на рівні середини зразка: біля внутрішньої стінки контейнера – ТП 1, в центрі – ТП 3, посередині між ТП 1 та 3 – ТП 2 (рис. 1). Початкова температура усіх зразків становила 18°C.

Зразки заморожували зі швидкостями 1, 5 та 10°C/хв до досягнення температури –100°C на осьовій термопарі, після чого охолоджені зразки занурювали у рідкий азот і витримували їх до досягнення температури рідкого азоту. Управління роботою УОП-6 здійснювалось за показаннями термометра опору, встановленого в камері охолодження поза зразками. Усі зразки відігрівали у водяній ванні при температурі 30°C. Термограми, які реєструвались кожною термопарою, відображались на 12-розрядному автоматичному самописці потенціометра КСП-4 з періодичністю опитування кожної термопари 16 с.

with consideration for dispersion of regimen parameters inside samples.

Materials and methods

The research was carried out on the yeast cells *S. cerevisiae*, an industrial strain (race 608 granted by Russian Institute of Bakery Industry, St. Petersburg). The cell culture was grown on slant wort agar-agar at 30°C for 48 hours. The yield of cells in suspension was 10⁵ CFU/ml. Cell suspension was frozen under protection of 10% (vol/vol) DMSO.

The samples were frozen on the device UOP (Special Designing and Technical Bureau of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine) designed for program cooling and heating biological material in containers. Freezing and registering temperature field in samples were performed in leak-proof cylindrical containers of the diameters of 30, 20 and 10 mm and the wall thickness of 1 mm made from thermoresistant plastic. The sample volumes in the containers were 20, 10 and 1.8 ml respectively. Four containers of the same size were used simultaneously for freeze-thawing the samples. The temperature field distribution was monitored in one of them. Copper-constantan thermocouples connected according to the differential scheme were used for measuring temperature. In containers of all the sizes thermocouples (TC) were placed on the middle level of the sample: near the inner wall – TC 1, in the center – TC 3 and TC 2 in the middle between TC 1 and TC 3 (Fig. 1). The start temperature in all the samples was 18°C.

The samples were frozen at the rates of 1, 5 and 10°C/min to –100°C on the axial thermocouple. Then the samples were submerged in liquid nitrogen and exposed until temperatures in the center of a big sample attained liquid nitrogen temperature value. UOP-6

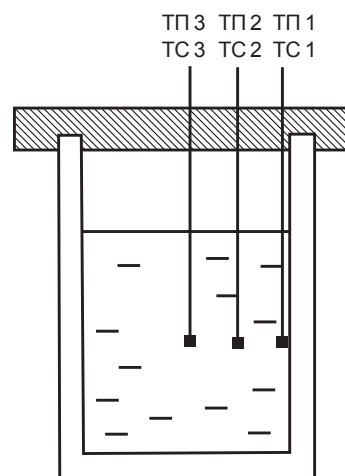


Рис. 1. Розміщення ТП у контрольних контейнерах.

Fig. 1. TC location in the control containers.

Життєздатність клітин дріжджів оцінювали чашковим методом Коха за кількістю макроколоній, які сформувалися на агаризованих середовищах [3].

Теоретичний аналіз процесів, які відбуваються в суспензії клітин у процесі її кристалізації, проводили на підставі теорії фазових перетворень у розчинах [6], спираючись на загальні положення двофакторної теорії кріопшкодження клітин [8].

Статистичну обробку експериментальних результатів здійснювали стандартним методом з використанням t-критерію Стьюдента при ймовірності влучення у довірчий інтервал $P \geq 0,95$.

Результати та обговорення

У табл. 1 подано отримані нами експериментальні дані щодо колонієутворюючої здатності замороженої-відігрітої суспензії мікроорганізмів *S. cerevisiae* у розчині диметилсульфоксиду при різних швидкостях охолодження за показниками датчика, розміщеного у камері заморожувача. У процесі заморожування клітинної суспензії реєстрували залежності температури від часу у трьох точках зразка, як описано вище. Із результатів табл. 2 видно, що за однакових діаметрі зразка та швидкості охолодження кріоносія біля зовнішньої поверхні кон-

Таблиця 1. Колонієутворююча здатність дріжджових грибів *S. cerevisiae*, суспендованих у розчині "10% диметилсульфоксиду – 0,135М NaCl – вода", після заморожування зі швидкостями 1, 5 та 10°C/хв і відігрівання у водяній ванні при температурі 30°C у циліндричних контейнерах

Table 1. Colony-forming ability of the yeast fungi *S. cerevisiae* suspended in the solution "10% dimethyl sulfoxide – 0.135 M NaCl – water" after freezing at the rates of 1, 5 and 10°C/min and thawing in a water bath at 30°C in cylindrical containers

Діаметр контейнера, мм Container diameter, mm	Швидкість охолодження, °C/хв Cooling rate, °C/min	Колонієутворююча здатність, % від контролю Colony-forming ability, % related to the control
30	1	79,2 ± 8,5
	5	55,0 ± 10,1
	10	16,2 ± 9,5
20	1	71,8 ± 12,4
	5	93,4 ± 10,1
	10	35,1 ± 13,8
10	1	59,4 ± 11,5
	5	60,2 ± 14,7
	10	22,5 ± 8,7

functioning was controlled with a resistance thermometer installed in the chamber of cooling outside of the samples. All the samples were heated in a water bath at 30°C. The thermograms registered by each thermocouple were displayed on a 12-bit automatic curve recorder of potentiometer KSP-4 every 16 sec for each thermocouple.

The yeast viability was assessed by Koch's plating technique by quantity of macrocolonies, which formed on agar-agar media [3].

The theoretical analysis of the processes occurring in cell suspension during crystallization was performed in terms of the theory of phase transformations in solutions [6] basing on the general principles of the two-factor theory of cell cryoinjuries [8].

The experimental results were statistically processed according to the standard method with the Student t-test with the probability of falling into the confidence interval of $P \geq 0.95$.

Results and discussion

The experimental data on colony-forming ability of the microorganism *S. cerevisiae* suspension frozen-thawed in dimethyl sulfoxide solution at different cooling rates by the readings of the detector placed in the freezer chamber are presented in Table 1. The dependence of temperature vs. time was registered in three points of the sample during freezing cell suspension as it was described above. With reference to Table 2 it is seen that when the samples were of the same diameter and cooling rate of the coolant near the outer surface of the container was the same, the cooling rates in all the points of the sample had approximately equal values until crystallization started in cell suspension and then after the temperature of –40°C. Herewith at the same cooling rate of the outer surface of the container in all the points inside the samples of bigger diameters cooling rates before crystallization were lower as compared to those in the samples of smaller diameters, and within the temperature range of –40... –100°C they, *vice versa*, were higher in comparison with those in the samples of smaller diameters. Besides, in the containers of all the sizes the cooling rates on the inner wall did not differ significantly from the cooling rate of nitrogen vapor in the cryochamber before crystallization. At the same time the average cooling rate at crystallization stage grows two-four fold, as the distance from the container wall increases. The dispersion of this parameter rises, as the size of a container and cooling rate of its outer wall increase. Thus, cooling regimens of cells located in different points of a frozen sample differ considerably. In its turn an increase in the dispersion of the average cooling rate in a sample at crystallization stage results in deviations of the cooling rate of growing quantity of cells from the optimal value. Using the data from Table 2 we determined the dependence

Таблиця 2. Залежність локальної швидкості охолодження до початку кристалізації, швидкості охолодження в діапазоні температури $-40\dots-100^{\circ}\text{C}$ та середньої швидкості охолодження на етапі кристалізації від швидкості охолодження кріоносія в кріостаті та відстані від осі контейнера циліндричної форми

Table 2. Dependences of the local cooling rate before crystallization, the cooling rate within the temperature range of $-40\dots-100^{\circ}\text{C}$ and the average cooling rate at crystallization stage on the cooling rate of the coolant and on the distance from the cylindrical container axle

Термопара Thermocouple	Швидкість охолодження кріоносія в кріостаті, $^{\circ}\text{C}/\text{хв}$ Cooling rate of the coolant in the cryostat, $^{\circ}\text{C}/\text{min}$	Швидкість охолодження до початку кристалізації, $^{\circ}\text{C}/\text{хв}$, у контейнері діаметром, мм Cooling rate before crystallization, $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ in a container of the diameter, mm			Швидкість охолодження в діапазоні температури $-40\dots-100^{\circ}\text{C}$, $^{\circ}\text{C}/\text{хв}$, у контейнері діаметром, мм Cooling rate within the temperature range of $-40\dots-100^{\circ}\text{C}$, $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ in a container of the diameter, mm			Середня швидкість охолодження на етапі кристалізації, $^{\circ}\text{C}/\text{хв}$, у контейнері діаметром, мм Average cooling rate at crystallization stage, $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ in a container of the diameter, mm		
		10	20	30	10	20	30	10	20	30
1	1	1,1 \pm 0,05	0,94 \pm 0,04	1,0 \pm 0,04	1,1 \pm 0,02	1,1 \pm 0,04	0,83 \pm 0,05	1,1 \pm 0,04	0,97 \pm 0,03	1,1 \pm 0,05
	5	4,1 \pm 0,2	3,0 \pm 0,05	3,1 \pm 0,2	7,5 \pm 0,04	12,0 \pm 0,7	15,5 \pm 0,3	5,5 \pm 0,3	4,3 \pm 0,05	5,1 \pm 0,3
	10	7,8 \pm 0,6	5,8 \pm 0,07	6,1 \pm 0,3	25,5 \pm 1,6	29,9 \pm 1,3	32,9 \pm 1,4	10,3 \pm 0,7	8,2 \pm 0,09	8,0 \pm 0,6
2	1	1,2 \pm 0,05	0,97 \pm 0,04	1,0 \pm 0,03	1,1 \pm 0,03	1,4 \pm 0,06	0,87 \pm 0,04	1,1 \pm 0,1	1,3 \pm 0,03	1,2 \pm 0,04
	5	4,1 \pm 0,1	3,1 \pm 0,06	3,3 \pm 0,2	7,6 \pm 0,04	12,3 \pm 1,1	15,5 \pm 0,8	10,6 \pm 1,2	6,8 \pm 0,7	12,1 \pm 0,7
	10	8,0 \pm 0,2	5,8 \pm 0,02	6,2 \pm 0,3	25,5 \pm 1,4	30,1 \pm 1,7	32,9 \pm 1,7	20,3 \pm 1,0	14,6 \pm 0,8	15,9 \pm 1,3
3	1	1,2 \pm 0,06	0,97 \pm 0,03	1,2 \pm 0,1	1,2 \pm 0,08	1,2 \pm 0,02	0,86 \pm 0,03	1,2 \pm 0,07	2,3 \pm 0,1	2,1 \pm 0,1
	5	4,1 \pm 0,3	3,3 \pm 0,03	3,4 \pm 0,4	7,5 \pm 0,2	12,2 \pm 0,9	15,5 \pm 0,9	13,3 \pm 0,8	8,1 \pm 0,3	16,1 \pm 0,6
	10	8,0 \pm 0,3	6,0 \pm 0,04	6,6 \pm 0,8	25,5 \pm 1,1	30,0 \pm 1,8	32,9 \pm 1,8	25,3 \pm 0,9	21,7 \pm 1,7	36,5 \pm 1,9

Примітка: відстань до осі контейнера діаметром 10 мм: ТП 1 – 5 мм, ТП 2 – 2,5 мм, ТП 3 – 0 мм; діаметром 20 мм: ТП 1 – 10 мм, ТП 2 – 5 мм, ТП 3 – 0 мм; діаметром 30 мм: ТП 1 – 15 мм, ТП 2 – 7,5 мм, ТП 3 – 0 мм.

Note: distance to the axle of the container of the diameter of 10 mm: TC 1 – 5 mm, TC 2 – 2.5 mm, TC 3 – 0 mm; of the diameter of 20 mm: TC 1 – 10 mm, TC 2 – 5 mm, TC 3 – 0 mm; of the diameter of 30 mm: TC 1 – 15 mm, TC 2 – 7.5 mm, TC 3 – 0 mm.

тейнера швидкість охолодження в усіх точках зразка має приблизно рівні значення до початку кристалізації в клітинній суспензії і після температури -40°C . При цьому за однакової швидкості охолодження зовнішньої поверхні контейнера в усіх точках всередині зразка більшого діаметра швидкість охолодження до початку кристалізації була меншою, ніж у зразках з меншим, а в діапазоні температур $-40\dots-100^{\circ}\text{C}$ навпаки – більшою порівняно зі швидкістю охолодження зразків з меншим діаметром. Крім того, в контейнерах усіх розмірів швидкість охолодження до початку кристалізації на внутрішній стінці вірогідно не відрізняється від швидкості охолодження парів азоту в кріокамері. У той же час середня швидкість охолодження зразка на етапі кристалізації по мірі віддалення від стінки контейнера зростає у 2–4 рази. Розкид цього параметра збільшується при збільшенні розміру контейнера і швидкості охолодження його зовнішньої поверхні. Таким чином, режими охолодження клітин, розташованих у різних точках зразка, який заморожується, суттєво відрізняються. У свою чергу, збільшення розкиду середньої швидкості охолодження клітин у зразку на етапі його кристалізації

of the average cooling rate at crystallization stage in each point of the sample on its distance from the container axle under different freezing conditions by approximation of this dependence with the quadratic function by the least square method (Fig. 2). One can see that the cooling rate in a sample of cylindrical shape at crystallization stage of suspension increases considerably in proportion to receding from the container wall to its axle. Such distribution of cooling rates and theoretical data on contribution of intracellular crystallization and solution effects to ultimate cryoinjuries of the yeast cells *S. cerevisiae* [5] explain quite satisfactory the obtained experimental results on the colony-forming ability of the microorganism *S. cerevisiae* (Table 1), if one takes into account the distribution of the average cooling rate at crystallization stage of these cells (Table 2). Indeed, at the cooling rate of the coolant of $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ near the inner walls of the containers of the diameters of 10, 20 and 30 mm cell injuries are about 30%. The cooling rates in the container of the diameter 10 mm are almost the same (about $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$) both on the wall and on the axle; and in the containers of the diameters 20 mm and 30 mm they increase approximately two-fold, approaching the optimal value.

призводить до відхилення швидкості охолодження від оптимального значення все більшої кількості клітин. За даними табл. 2 визначали залежність середньої швидкості охолодження на етапі кристалізації у кожній точці зразка від її відстані до осі контейнера за різних умов заморожування шляхом апроксимації цієї залежності квадратичною функцією методом найменших квадратів (рис. 2). Як видно, швидкість охолодження в зразку циліндричної форми на етапі кристалізації суспензії значно збільшується по мірі віддалення від стінки контейнера до його осі. Такий розподіл швидкостей охолодження та теоретичні дані про внесок внутрішньоклітинної кристалізації та ефектів розчину у сумарне кріопшкодження дріжджових клітин *S. cerevisiae* [5] цілком задовільно пояснюють отримані експериментальні результати щодо колонієутворюючої здатності мікроорганізмів *S. cerevisiae* (табл. 1), якщо врахувати розподіл середньої швидкості охолодження на етапі кристалізації цих клітин (табл. 2). Дійсно, при швидкості охолодження холодоносія $1^{\circ}\text{C}/\text{хв}$ біля внутрішньої стінки контейнерів діаметрами 10, 20 і 30 мм пошкодження клітин становить біля 30%. Швидкість охолодження в контейнері діаметром 10 мм має майже однакове значення (близько $1^{\circ}\text{C}/\text{хв}$) як на стінці, так і на осі, а в контейнерах діаметрами 20 і 30 мм збільшується приблизно у 2 рази, наближаючись до оптимального значення.

Максимальне значення колонієутворюючої здатності мікроорганізмів *S. cerevisiae* (близько 90% від контролю) досягається при їх заморожуванні в контейнері діаметром 20 мм за швидкості охолодження холодоносія в кріокамері $5^{\circ}\text{C}/\text{хв}$. Це пояснюється тим, що при цьому режимі охолодження переважна більшість клітин охолоджується зі швидкостями, близькими до оптимальних. При швидкості охолодження $10^{\circ}\text{C}/\text{хв}$ для зразків у контейнерах діаметрами 10, 20 і 30 мм усереднена за об'ємом зразка збереженість клітин має порівняно невелике значення. Як видно з даних табл. 1 і 2, при цій швидкості охолодження значна кількість клітин охолоджується зі швидкостями, далекими від оптимальних значень.

Таким чином, на підставі сформульованої нами теоретичної моделі [5] та отриманих експериментальних даних проведено аналіз механізмів кріопшкодження суспензії дріжджових грибів *S. cerevisiae* в розчині “10% диметилсульфоксиду – 0,135 M NaCl – вода” під час заморожування в контейнерах циліндричної форми за лінійними програмами охолодження з урахуванням розкиду режимних параметрів усередині зразка. Очевидно, запропоновані в роботі підходи до оцінки режимів кріоконсервування суспензії дріжджових грибів *S. cerevisiae* під захистом ДМСО можуть бути застосовані й для інших клітинних суспензій.

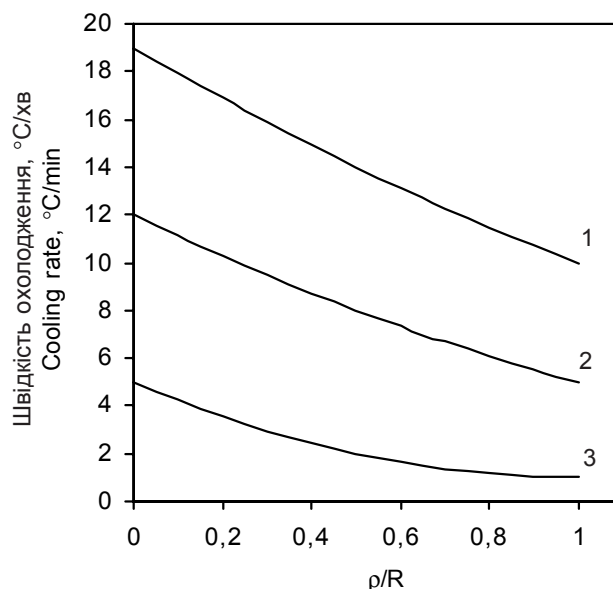


Рис. 2. Розподіл середньої швидкості охолодження на етапі кристалізації суспензії мікроорганізмів *S. cerevisiae*, суспендованих у досліджуваному розчині в циліндричному контейнері діаметром 30 мм при швидкості охолодження холодоносія біля зовнішньої стінки контейнера: 1 – $10^{\circ}\text{C}/\text{хв}$; 2 – $5^{\circ}\text{C}/\text{хв}$; 3 – $1^{\circ}\text{C}/\text{хв}$. (ρ/R – відношення відстані визначеної точки у зразку від осевої лінії контейнера до його радіуса).

Fig. 2. Distribution of the average cooling rate at crystallization stage of the microorganism *S. cerevisiae* suspended in the studied solution in the cylindrical container of the diameter of 30 mm at the cooling rate of the coolant near the container outer wall: 1 – $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$; 2 – $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$; 3 – $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$. (ρ/R – relation of the distance from the indicated point in the sample to the container axle to the container radius).

The maximal colony-forming ability of the microorganism *S. cerevisiae* (about 90% related to the control) is achieved when they are frozen in a container of the diameter of 20 mm at the cooling rate of the coolant in the cryochamber of $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$. This is explained by the fact that this regimen of cooling provides cooling rates close to optimal ones for most of cells. At the cooling rate of $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ for the samples in containers of the diameters 10, 20 and 30 mm the sample volume averaged integrity of cells was relatively low. With reference to Tables 1 and 2 it is seen that at this cooling rate a considerable quantity of cells are cooled at the rate far from being optimal.

Thus, basing on the theoretical model developed by us [5] and the experimental data obtained the mechanisms of cryoinjury of the yeast fungi *S. cerevisiae* suspension in the solution “10% dimethyl sulfoxide – 0.135 M NaCl – water” in the process of freezing in cylindrical containers by linear programs of cooling with consideration for dispersion of regimen parameters inside samples were analyzed. Evidently the approaches suggested in the work for estimation of cryopreservation regimens of the yeast fungi *S. cerevisiae* suspension protected with DMSO can be also applied for other cell suspensions.

Висновки

Експериментально підтверджена адекватність висунутих модельних уявлень щодо кріопшкодження клітин при заморожуванні суспензії мікроорганізмів *S. cerevisiae* у розчині “диметилсульфоксид – NaCl – вода” за лінійними програмами охолодження.

Методом багатоточкової термографії показано, що розподіл швидкості охолодження в контейнерах із суспензією мікроорганізмів *S. cerevisiae* є неоднорідним і значно впливає на їх колонієутворюючу здатність після заморожування-відігрівання;

Чашковим методом Коха визначена колонієутворююча здатність мікроорганізмів *S. cerevisiae* після заморожування-відігрівання в 10%-му розчині диметилсульфоксиду з використанням лінійних режимів охолодження.

Література

1. Аркадьева Э.А. Факторы, влияющие на жизнеспособность и свойства микроорганизмов при различных методах хранения // Научн. докл. высш. школы. Биол. науки.– 1983.– №4.– С. 93–105.
2. Гордиенко Е.А., Пушкар Н.С. Физические основы низкотемпературного консервирования клеточных суспензий.– Киев: Наук. думка, 1994.– 143 с.
3. Лабинская В.С. Микробиология с техникой микробиологических исследований.– М.: Медицина, 1978.– 394 с.
4. Марущенко В.В., Гордиенко Е.А. Влияние разброса скоростей охлаждения в замораживаемом образце на колониобразующую способность *Saccharomyces cerevisiae* // Вісник ХНАУ.– 2009.– Вип 17, №2.– С. 96–101.
5. Сакун О.В., Гордієнко О.І. Теоретична оцінка значення оптимальної з погляду двохфакторної теорії кріопшкодження швидкості охолодження при лінійних режимах заморожування клітинної суспензії // Біофізичний вісник.– 2009.– Вип. 22.– С. 123–129.
6. Френкель Я.И. Кинетическая теория жидкости.– Л.: Наука, 1975.– 592 с.
7. Cocks F.H., Brower W.E. Phase diagram relationship in cryobiology// Cryobiology.– 1974.– Vol. 11, N4.– P. 340–358.
8. Mazur P., Leibo S.P., Chu E.H. A two-factor hypothesis to freezing hamster tissue – culture cells // Experim. Cell Research.– 1972.– Vol. 71, N2.– P. 345–355.

Поступила 04.03.2010
Рецензент Є.О. Гордієнко

Conclusions

Adequacy of the proposed model conception on cell cryoinjuries of the yeast fungi *S. cerevisiae* suspension in the solution “dimethyl sulfoxide – NaCl – water” in the process of freezing in cylindrical containers by linear programs of cooling was confirmed experimentally.

The method of multi-point thermography showed that distribution of cooling rates in the containers with the *S. cerevisiae* microorganism suspension was inhomogeneous and affected greatly its colony-forming ability after freezing-thawing.

The microorganism *S. cerevisiae* colony-forming ability was assessed by Koch’s plating technique after freezing-thawing in 10% dimethyl sulfoxide solution by linear regimens of cooling.

References

1. Arkadyeva E.A. Factors influencing viability and properties of microorganisms under different storage methods// Nauchnyye doklady vysshey shkoly. Biol. nauki.– 1983.– N4.– P. 93–105.
2. Gordiyenko Ye. A., Pushkar N.S. Physical bases of low temperature preservation of cell suspensions.– Kiev: Naukova Dumka, 1994.– 143 p.
3. Labinskaya V.S. Microbiology with equipment for microbiological investigations.– Moscow: Meditsina, 1978.– 394 p.
4. Maruschenko V.V., Gordiyenko Ye.A. Influence of dispersion of cooling rates in a frozen sample on the colony-forming ability of *Saccharomyces cerevisiae* // Visnyk KNAU.– 2009.– Issue 17, N2.– P.96–101.
5. Sakun O.V., Gordiyenko O.I. Theoretical assessment of the optimal cooling rate at linear regimens of freezing cell suspension in the context of the two-factor theory of cryoinjuries // Biophysical Bulletin.– 2009.– Issue 22, N1.– P. 123–129.
6. Frenkel Ya.I. Kinetic theory of liquids.– L.: Nauka, 1975.– 592 p.
7. Cocks F.H., Brower W.E. Phase diagram relationship in cryobiology// Cryobiology.– 1974.– Vol. 11, N4.– P. 340–358.
8. Mazur P., Leibo S.P., Chu E.H. A two-factor hypothesis to freezing hamster tissue – culture cells // Experim. Cell Research.– 1972.– Vol. 71, N2.– P. 345–355.

Accepted in 04.03.2010