

## Чувствительность клеток перевиваемой клеточной линии СПЭВ и грибов *Candida albicans* к процессам вне- и внутриклеточной кристаллизации

Л.Ф. РОЗАНОВ, И.П. ВЫСЕКАНЦЕВ, Т.Ф. ПЕТРЕНКО, И.Ф. КОВАЛЕНКО, С.В. КОШИЙ  
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

## Cell Sensitivity of Recultured Cellular SPEV Line and *Candida albicans* Fungi to Extra- and Intracellular Crystallisation Processes

L.F. ROZANOV, I.P. VYSEKANTSEV, T.F. PETRENKO, I.F. KOVALENKO, S.V. KOSCHIJ  
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of the Ukraine, Kharkov

Исследованы с помощью поляризационно-интерференционной микроскопии процессы замораживания-отогрева суспензий клеток СПЭВ и грибов *C. albicans*. Установлено, что клетки СПЭВ высокочувствительны к внутриклеточному кристаллообразованию, которое в значительной мере зависит от уровня переохлаждения клеточной суспензии до начала кристаллизации во внеклеточной среде. Клетки *C. albicans* более устойчивы к инициации внутриклеточного кристаллообразования, что обеспечивает им более высокую криорезистентность.

**Ключевые слова:** кристаллообразование, замораживание, дрожжеподобные грибы, криопротекторы, скорость охлаждения, криомикроскопия.

Проведено дослідження за допомогою поляризаційно-інтерференційної мікроскопії процесів заморожування-відігрівання суспензії клітин СПЕВ і грибів *C. albicans*. Установлено, що клітини СПЕВ високочутливі до внутрішньоклітинного кристалоутворення, яке в значній мірі залежить від рівня переохладження клітинної суспензії до початку кристалізації в позаклітинному середовищі. Клітини *C. albicans* більш стійкі до ініціації внутрішньоклітинного кристалоутворення, що забезпечує їм більш високу криорезистентність.

**Ключові слова:** кристалоутворення, заморожування, дріжджоподібні гриби, криопротектори, швидкість охолодження, криомікроскопія.

The freeze-thawing processes of SPEV cell suspensions and *C. albicans* fungi were investigated with a polarizing-interference microscopy. The SPEV cells were found out to be highly sensitive to an intracellular crystal formation, which depended in a considerable extent on the level of cell suspension supercooling prior to crystallisation beginning in an extracellular medium. *C. albicans* cells are more resistant to initiation of an intracellular crystal formation, that provides them a higher cryoresistance.

**Key-words:** crystal formation, freezing, yeast-like fungi, cryoprotectants, cooling rate, cryomicroscopy.

Широкое использование перевиваемых культур, дрожжей и дрожжеподобных грибов в биотехнологических производствах, медицине, ветеринарии, сельском хозяйстве, молекулярно-биологических исследованиях [2,3,9] обусловило необходимость разработки эффективных способов консервирования этих биологических объектов. Единственным методом длительного хранения перевиваемых клеточных культур, как и других клеток высших эукариот, является криоконсервирование [3,10], позволившее создать банки клеточных культур, обеспечивающих длительную сохранность жизнеспособности клеток, их генетических структур и биологических свойств, а также позволяющих максимально снизить риск контаминации клеточных культур микроорганизмами.

Для хранения дрожжей и дрожжеподобных грибов с различной эффективностью используют криоконсервирование, лиофилизацию, L-высушивание, тепловую сушку, хранение при низких темпе-

A wide usage of recultured cultures, yeast and yeast-like fungi in biotechnology, medicine, veterinary, agriculture, molecular and biological investigations [2, 3, 9] has stipulated the necessity to develop the efficient ways for these biological objects cryopreservation. The cryopreservation is a unique method for a long-term storage of both recultured cell cultures and other superior eukaryotic cells [3, 10], permitted to establish the banks of cell cultures, providing a long-term preservation of cell viability, their genetic structures and biological properties, as well as allowing to maximally reduce the risk for cell cultures to be contaminated with microorganisms.

The cryopreservation, freeze-drying, L-drying, heat drying, storage under low temperatures are used with a different efficiency to preserve the yeast and yeast-like fungi [3, 7, 8]. The most efficient among the mentioned above storage ways for yeast and yeast-like fungi is also cryopreservation, especially when the matter is an integrity of initial genetic properties.

**Адрес для корреспонденции:** Высеканцев И.П., Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 772-01-26, факс: +38 (057) 772-00-84, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

**Address for correspondence:** Vysekantsev I.P., Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the Natl. Acad. Sci. of Ukraine, 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +380 57 772 0126, fax: +380 57 772 0084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

ратурах [3, 7, 8]. Наиболее эффективным из перечисленных способов хранения дрожжей и дрожжеподобных грибов также является криоконсервирование, особенно когда речь идет о сохранности исходных генетических свойств.

Как известно, скорость охлаждения и состав среды консервирования являются определяющими при фазовых переходах воды и влияют на физико-химические процессы, вызывающие повреждение клеток при замораживании-отогреве [1]. Чувствительность клеток к указанным физико-химическим процессам во многом зависит от их структурной организации [3].

Показатели сохранности жизнеспособности клеток после криоконсервирования не удовлетворяют исследователей. Поэтому остается актуальным вопрос изучения механизмов криоповреждения и криозащиты клеток эукариотов.

Цель настоящего исследования – сравнительное изучение чувствительности клеток перевиваемой клеточной линии СПЭВ и дрожжеподобных грибов *C. albicans* к процессам вне- и внутриклеточного кристаллообразования.

### Материалы и методы

Объектами исследования служили клетки перевиваемой клеточной культуры СПЭВ (эмбриональная почка свиньи) и дрожжеподобных грибов *C. albicans* ATCC 885-653.

Перевиваемую клеточную линию СПЭВ выращивали в культуральных матрасах в среде 199 с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки и 100 ед/мл канамицина. Клетки инкубировали при 37°C до образования монослоя, затем переводили их в суспензионное состояние, обрабатывая монослой смесью раствора Версена с трипсином (4:1). Одну часть суспензии клеток ресуспендировали в ростовой среде, вторую – в ростовой среде с 10%-м раствором диметилсульфоксида (ДМСО). Концентрация клеток составляла  $1 \times 10^6$  кл/мл. ДМСО добавляли к суспензии клеток согласно разработанным методам криоконсервирования клеточных культур [3, 10]. Жизнеспособность клеток культуры СПЭВ оценивали микроскопически с использованием 0,4%-го раствора трипанового синего [4].

Грибы *C. albicans* выращивали на скошенной агаризованной среде Сабуро [4] в течение 48 ч при 37°C. Клетки грибов смывали с поверхности агара жидкой средой Сабуро и готовили суспензии с концентрацией  $1 \times 10^6$  КОЕ/мл в жидкой среде Сабуро без добавок и в среде Сабуро с добавлением 10% сахарозы. Жизнеспособность грибов определяли “чашечным методом” Коха [6].

Cooling rate and composition of preservation medium are known to be determinant during water phase transitions and affect the physical and chemical processes, causing a cell damage under freeze-thawing [1]. Cell sensitivity to the mentioned physical and chemical processes mostly depends on their structural organisation [3].

The integrity indices of cell viability after cryopreservation do not satisfy the researchers. Therefore there is still actual the question on studying the cryodamage and cryoprotection mechanisms of eukaryotic cells.

The aim of this investigation was a comparative study of cell sensitivity of recultured SPEV cell line and *C. albicans* yeast-like fungi to the processes of extra- and intracellular crystal formation.

### Materials and methods

The research object was the cells of recultured SPEV (pig's embryonic kidney) cell culture and *C. albicans* ATCC 885-653 yeast-like fungi.

Recultured SPEV cell culture was cultivated in cultural flasks in 199 medium with addition of 10% embryonic calf serum and 100 Units/ml of kanamycin. Cells were incubated under 37°C up to a monolayer formation, then they were transferred into a suspension state by treating monolayer with the Versen's solution and trypsin mixture (4:1). One part of cell suspension was resuspended in a growth medium, the second one in a growth medium with 10% dimethyl sulfoxide (DMSO) solution. Cell concentration made  $1 \times 10^6$  cells/ml. DMSO was added into a cell suspension according to the elaborated methods for cell culture cryopreservation [3, 10]. The viability of SPEV culture cells was estimated with microscope by means of trypan blue 0.4% solution [4].

*C. albicans* fungi were cultivated in Sabouraud's agar slope [4] during 48 hrs under 37°C. We washed-out the fungi cells out of agar surface by a liquid Sabouraud's medium and prepared the suspensions with  $1 \times 10^6$  CFU/ml concentration in a liquid Sabouraud's medium without additives and in that with 10% sucrose addition. Fungi viability was determined using the Koch's "dish method" [6].

Cell freeze-thawing processes were investigated using the MPI-5 polarizing - interference microscope with a fitted cryodevice on a subject table. A subject glass of cryodevice was cooled using the programmable cooling rate equipment. The sample temperature was controlled with a glass-fitted thermocouple. The processes, occurring during cell suspension freezing were recorded with MCD-3 motion-picture camera. Cell suspensions were placed on a cryodevice subject glass, overlaid with a cover glass and frozen with

Процессы замораживания-оттаивания клеток исследовали с использованием поляризационно-интерференционного микроскопа МПИ-5, на предметном столике которого была смонтирована криоприставка. Предметное стекло криоприставки охлаждали при помощи устройства, программирующего скорость охлаждения. Температуру образца контролировали термопарой, вмонтированной в стекло. Процессы, происходящие при замораживании клеточных суспензий, регистрировали кинокамерой МКУ-3. Клеточные суспензии помещали на предметное стекло криоприставки, накрывали покровным стеклом и замораживали с различными скоростями охлаждения до  $-30^{\circ}\text{C}$ . Образцы отогревали со скоростью  $5^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ .

### Результаты и обсуждение

Процессы, которые происходят в суспензиях клеток СПЭВ при замораживании-отогреве, изучали при скоростях охлаждения от 1 до  $5^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ . Установлено, что в диапазоне указанных скоростей процессы вне- и внутриклеточного кристаллообразования в основном контролируются уровнем переохлаждения суспензий до начала кристаллизации. Результатом большого первоначального переохлаждения было образование нестабильных мелкокристаллических структур, которые подвержены рекристаллизации в процессе медленного замораживания. С небольшой задержкой после образования внеклеточного льда, в период начала укрупнения его мелкокристаллической структуры, в результате общего переохлаждения суспензии происходит образование внутриклеточного льда, о чем свидетельствует резкое потемнение клеток, связанное с рассеянием света мелкими частицами льда.

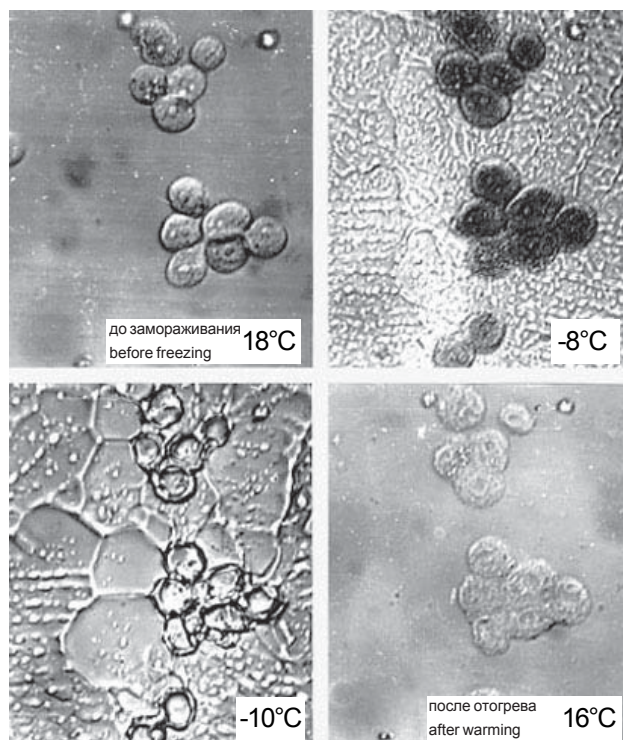
На рис. 1 представлен процесс медленного замораживания незащищенной криопротектором суспензии клеток СПЭВ. В данном случае клеточная суспензия была переохлаждена к началу замерзания до  $-7^{\circ}\text{C}$ . Образованные в результате общего переохлаждения суспензии структуры внутриклеточного льда при охлаждении со скоростью  $1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$  увеличиваются, а иногда и плавятся на этапе дальнейшего замораживания. Результатом внутриклеточного кристаллообразования являются незначительное набухание и выраженное обесцвечивание клеток СПЭВ при отогреве. У поврежденных при внутриклеточной кристаллизации клеток отмечали явные признаки потери внутриклеточного содержимого во внеклеточной среде, что свидетельствует о грубых нарушениях структуры плазматических мембран клеток СПЭВ. При охлаждении со скоростью

different cooling rates down to  $-30^{\circ}\text{C}$ . The thawing of samples was conducted with  $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$  rate.

### Results and discussion

The processes, occurring in SPEV cell suspensions during freeze-thawing were studied under cooling rates from 1 to  $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ . The processes of extra- and intracellular crystal formation within the range of mentioned rates were found to be controlled mainly by the level of the suspension overcooling prior to crystallisation beginning. The result of a great initial overcooling was the formation of unstable small-crystal structures, which underwent a recrystallisation during slow freezing process. With a slight delay after extracellular ice formation within the period of beginning in its small-crystal structure enlargement as a result of total suspension overcooling, the intracellular ice formation occurred, that was testified by a sharp cell darkening, related to light dispersion by small ice particles.

The Fig.1 shows the process of slow freezing of cryoprotectant-free SPEV cell suspension. In this case a cell suspension was overcooled to the beginning of freezing down to  $-7^{\circ}\text{C}$ . Formed as a result of total suspension overcooling the structures of intracellular ice during cooling with  $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$  rate increase, and



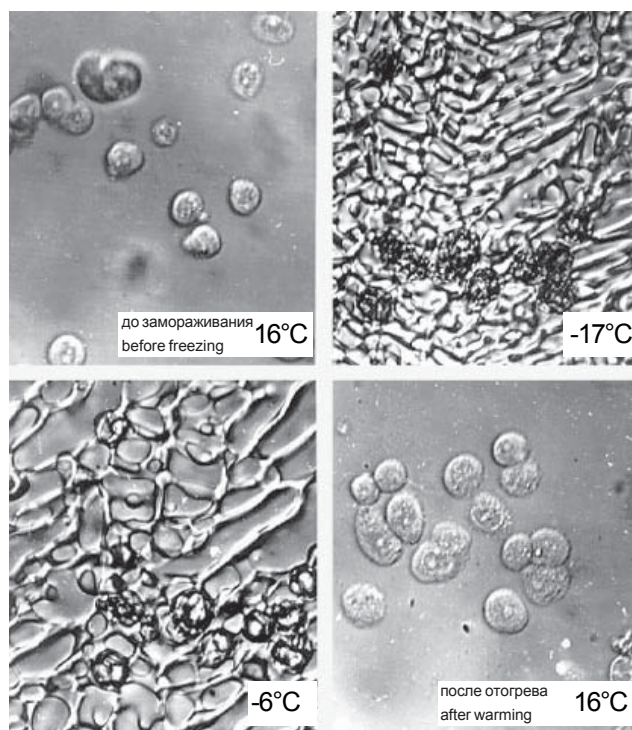
**Рис. 1.** Динамика замораживания суспензии незащищенных криопротектором клеток СПЭВ со скоростью  $1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ .

**Fig. 1.** Dynamics of freezing of cryoprotectant free SPEV cells with  $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$  rate.

5°C/мин рекристаллизационные изменения структуры внутриклеточного льда завершались на этапе отогрева (рис.2). В этом случае результатом внутриклеточного образования льда также были глубокие изменения мембранных структур. При замораживании клеток под защитой ДМСО внутриклеточная кристаллизация, которая возникала в условиях охлаждения со скоростью 5°C/мин, приводила к менее выраженным изменениям клеток СПЭВ после отогрева (рис.3), по сравнению с незащищенной суспензией. Снижение скорости охлаждения до 1°C/мин увеличивало вероятность для клеток, замороженных с ДМСО, избежать внутриклеточной кристаллизации (рис.4). В этом случае дегидратация позволяла клеткам СПЭВ предотвращать внутриклеточную кристаллизацию и не приводила к заметным изменениям их структуры. Проведенные исследования свидетельствуют о высокой чувствительности клеток СПЭВ к внутриклеточной кристаллизации, к которой в диапазоне малых скоростей охлаждения 1-5°C/мин приводит переохлаждение суспензии до начала кристаллизации во внеклеточной среде.

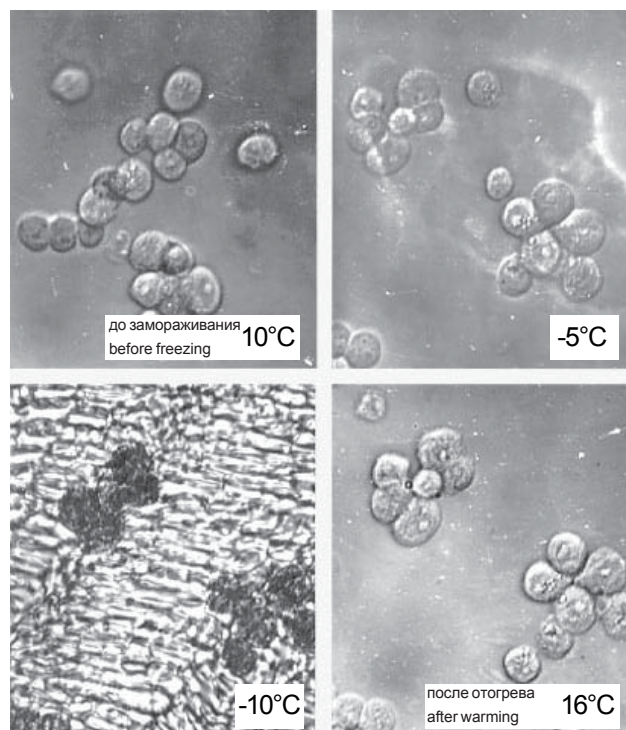
В опытах по изучению процессов замораживания-отогрева грибов *C. albicans* было показано, что внутриклеточное кристаллообразование в незащищенных криопротектором клетках наблю-

sometimes, melt at the stage of following freezing. The result of intracellular crystal formation is a slight swelling and manifested SPEV cells decoloration during thawing. In damaged during intracellular crystallisation cells there were observed the evident signs of loss in intracellular content into an extracellular medium, that testified to the rough impairments of SPEV cell plasmatic membranes. During cooling with 5°C/min rate the recrystallisation changes in an intracellular ice structure were completed at thawing stage (Fig. 2). In this case the result of intracellular ice formation were deep changes in membrane structures. During cell freezing under DMSO protection an intracellular crystallisation, occurring under cooling with 5°C/min rate resulted in less manifested changes in SPEV cells after thawing (Fig. 3) in comparison with an unprotected suspension. A decrease in cooling rate down to 1°C/min increased the probability for cells, frozen with DMSO, to avoid an intracellular crystallisation (Fig. 4). In this case the dehydration allowed the SPEV cells to prevent an intracellular crystallisation and did not result in visible changes in their structure. The conducted investigations testify to a high sensitivity of SPEV cells to an intracellular crystallisation, to that the suspension overcooling resulted before crystallisation beginning into an extracellular medium within the range of low cooling rates of 1-5°C/min.



**Рис. 2.** Динамика замораживания-отогрева незащищенной криопротектором суспензии клеток СПЭВ. Скорость охлаждения 5°C/мин.

**Fig. 2.** Dynamics of freeze-thawing of cryoprotectant free SPEV cell suspension with 5°C/min cooling rate.

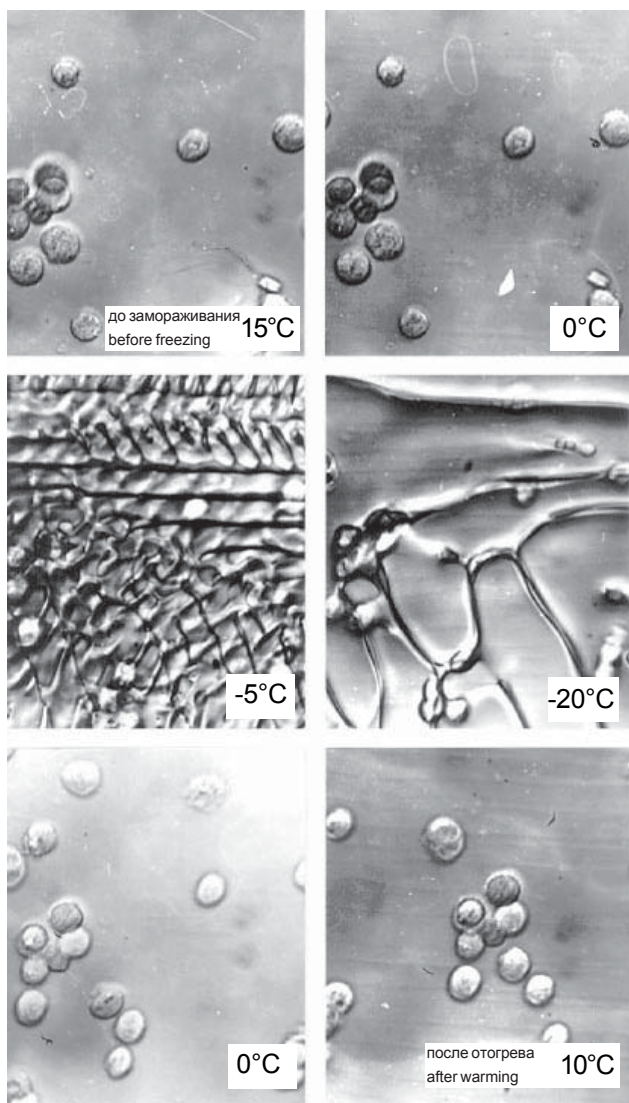


**Рис. 3.** Динамика замораживания-отогрева суспензии клеток СПЭВ под защитой ДМСО. Скорость охлаждения 5°C/мин.

**Fig.3.** Dynamics of freeze-thawing of SPEV cell suspension under DMSO protection with 5°C/min cooling rate.

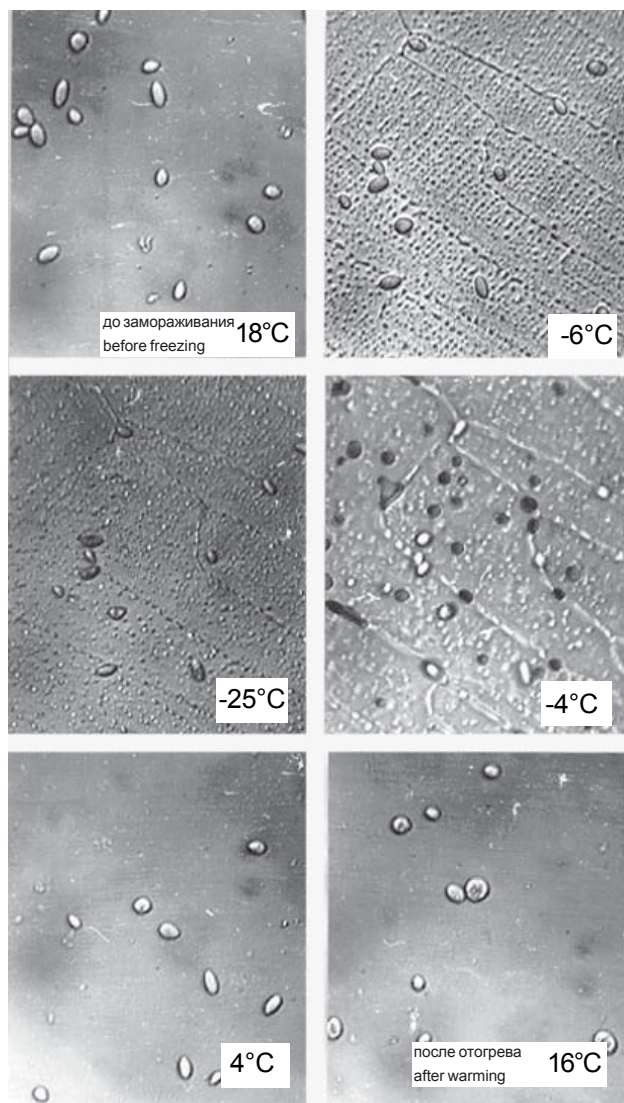
дается лишь в редких случаях. На рис.5 приведены данные о динамике процессов, которые происходят при охлаждении суспензий дрожжевых клеток со скоростью 15°C/мин. Как следует из наблюдаемого процесса, выбранная нами скорость охлаждения позволяла ограничить дегидратацию дрожжей и не приводила к внутриклеточному кристаллообразованию. При отогреве в суспензиях дрожжей иногда наблюдалось появление пузырьков воздуха (темные везикулы). В этой серии экспериментов выраженных признаков деструкции клеток после отогрева не отмечали. Снижение скорости охлаждения до 5-6°C/мин приводило к дегидратации незащищенных клеток *C. albicans* (рис. 6). При отогреве объем клеток восстанавливался без заметных изменений структуры. Внесение в среду

In the experiments on studying the freeze-thawing processes in *C.albicans* fungi there was shown, that an intracellular crystal formation in cryoprotectant-free cells was observed only in rare cases. The Fig.5 shows the data about dynamics of processes, occurring under cooling the yeast cell suspensions with 15°C/min rate. As it proceeds from the process observed the selected by us cooling rate allowed to limit the yeast dehydration and did not result in an intracellular crystal formation. The appearance of air vesicles (dark vesicles) was sometimes observed in yeast suspensions during thawing. In these experimental series no manifested signs of cell destruction after thawing were observed. A decrease in cooling rate down to 5-6°C/min resulted in the unprotected *C.albicans* cell dehydration (Fig. 6). Under thawing the cell volume recovered without



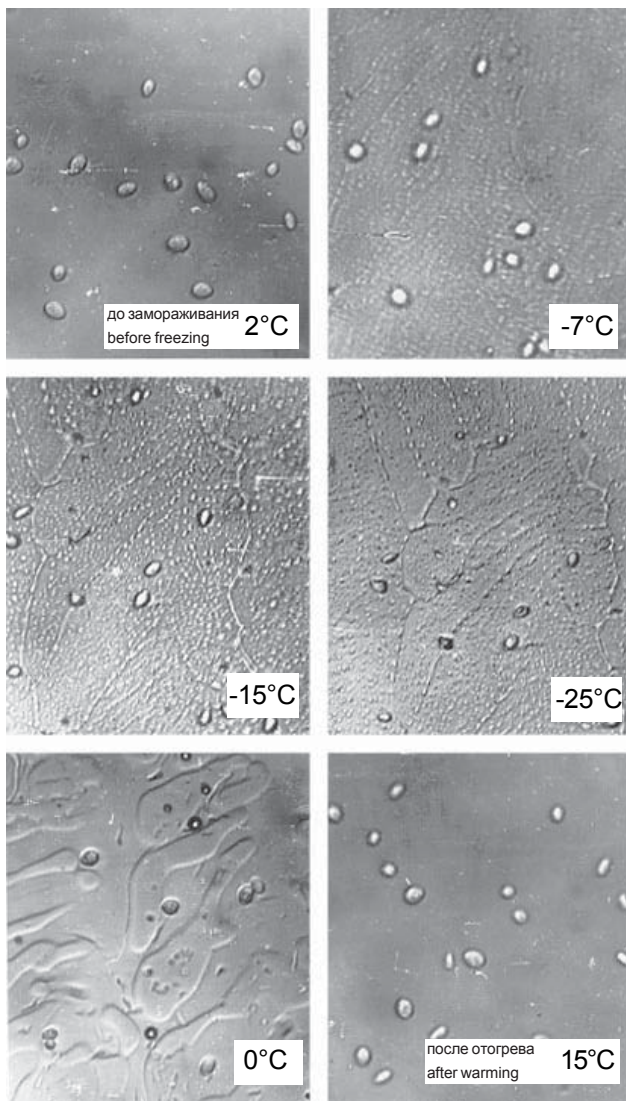
**Рис. 4.** Динамика замораживания-отогрева суспензии клеток СПЭВ под защитой ДМСО. Скорость охлаждения 1°C/мин.

**Fig.4.** Dynamics of freeze-thawing of SPEV cell suspension under DMSO protection with 1°C/min cooling rate.



**Рис.5.** Динамика замораживания-отогрева незащищенной суспензии дрожжей. Скорость охлаждения 15°C/мин.

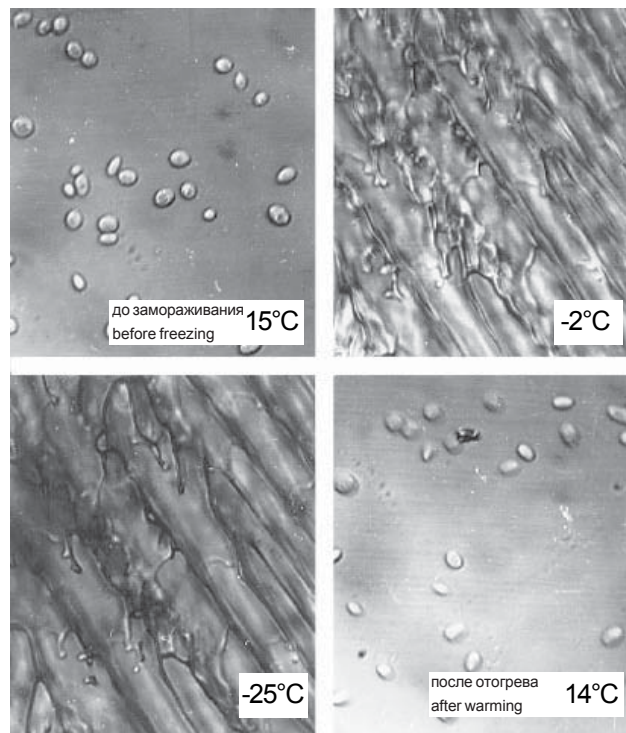
**Fig. 5.** Dynamics of freeze-thawing of cryoprotectant free yeast suspension with 15°C/min cooling rate.



**Рис. 6.** Динамика замораживания-отогрева незащищенной суспензии дрожжей. Скорость охлаждения 5-6°C/мин.

**Fig. 6.** Dynamics of freeze-thawing of cryoprotectant free yeast suspension with 5-6°C/min cooling rate.

консервирования сахарозы не приводило к заметной дегидратации дрожжей до замораживания, а скорость охлаждения 25°C/мин способствовала снижению уровня переохлаждения суспензий (рис. 7). Об этом свидетельствует не только повышение температуры начала кристаллообразования в поле зрения микроскопа, но и образование укрупненных структур внеклеточного льда. Отсутствие признаков внутриклеточного кристаллообразования в этом случае коррелирует с отсутствием признаков деструкции клеток. Снижение скорости охлаждения до 7°C/мин и наличие сахарозы (рис. 8), наоборот, вызывает рост уровня переохлаждения до начала кристаллизации, о чем свидетельствовало появление мелкокристаллических структур внеклеточного льда. Признаков



**Рис. 7.** Динамика замораживания-отогрева защищенной сахарозой суспензии дрожжей. Скорость охлаждения 25°C/мин.

**Fig. 7.** Dynamics of freeze-thawing of sucrose-protected yeast suspension with 25°C/min cooling rate.

any visible structural changes. The sucrose introduction into the preservation medium did not result in a visible yeast dehydration before freezing and a cooling rate of 25°C/min contributed to a decrease in the suspension overcooling level (Fig. 7). This is testified not only by the temperature increase before crystallisation in a visual field of microscope, but by the formation of enlarged extracellular ice structures as well. The absence of signs of intracellular crystal formation in this case correlates with that of cell destruction signs. A decrease in cooling rate down to 7°C/min and the sucrose presence (Fig. 8), in contrast, causes the growth of overcooling level before the crystallisation beginning, that was testified by the appearance of extracellular ice small-crystal structures. No signs of intracellular ice formation were observed. During thawing some cells get dark, that could be considered as the sign of intracellular crystal formation. In these series of experiments the cells with the evident destructive signs were absent as well.

The results of the investigations performed testify to the fact, that the processes in intracellular crystal formation in a considerable extent depend on the overcooling level of cell suspension before the crystallisation beginning into an extracellular medium and on cell ultrastructural organisation. Cells of SPEV recultured cell line are more sensitive to freezing in

образования внутриклеточного льда при этом не наблюдали. При отогреве некоторые клетки темнели, что можно расценивать как признак внутриклеточного кристаллообразования. В этой серии экспериментов клетки с явными признаками разрушения отсутствовали.

Результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что процессы внутриклеточного кристаллообразования в значительной мере зависят от уровня переохлаждения клеточной суспензии до начала кристаллизации во внеклеточной среде и от ультраструктурной организации клеток. Клетки перевиваемой клеточной линии СПЭВ более чувствительны к замораживанию по сравнению с клетками *C. albicans*. Добавление в среду консервирования ДМСО в комбинации с соответствующим режимом охлаждения позволяет избежать внутриклеточной кристаллизации или существенно ее уменьшить. Клетки *C. albicans* более устойчивы к инициации внутриклеточного кристаллообразования, что, очевидно, является одной из причин их более высокой криорезистентности по сравнению с клетками СПЭВ.

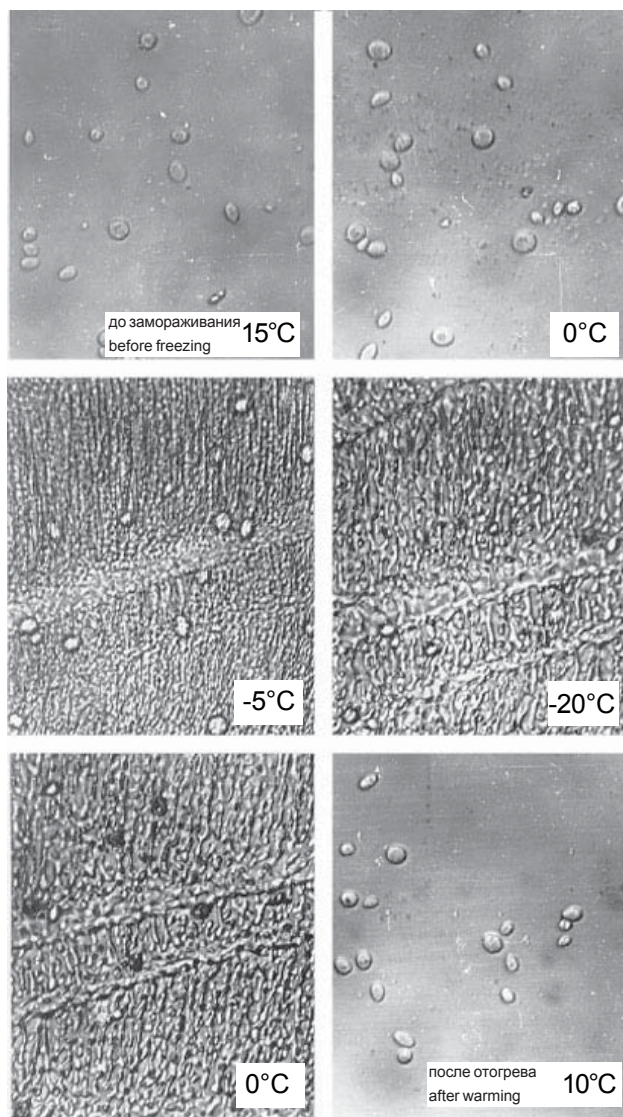
### Выводы

Таким образом, полученные данные показывают, что различная чувствительность клеток эукариотов к процессам замораживания с разными скоростями может быть связана с их различной способностью избегать внутриклеточного кристаллообразования, обусловленной особенностями строения клеток.

### Литература

1. *Актуальные проблемы криобиологии* / Под общ. ред. Н.С. Пушкаря.– Киев: Наук.думка,1981.– 608 с.
2. *Быков В.А., Маныков М.Н., Панфилов В.И. и др. Производство белковых веществ.*– М.: Высш. школа, 1987.– 142 с.
3. *Криобиология и биотехнология* / Под общ. ред. А.А. Цуцаевой.– Киев: Наук.думка,1987.– 216 с.
4. *Культура животных клеток. Методы* / Под ред. Р. Фрешни.– М.: Мир,1989.– 332 с.
5. *Лабинская А.С. Микробиология с техникой микробиологических исследований.*– М.: Медицина, 1978.– 394 с.
6. *Луста К.А., Фихте Б.А. Методы определения жизнеспособности микроорганизмов.*– Пущино, 1990.– 186 с.
7. *Методи одержання чистих культур мікроорганізмів та їх довгострокового зберігання в колекціях* / Під ред. О.П. Сельнікова.– Київ, 2001.– 76 с.
8. *Сидякина Т.М. Консервация микроорганизмов.*– Пущино, 1985.– 63 с.
9. *Шлегель Г. Общая микробиология.* – М.: Мир,1987.- 567с.
10. *Wewetzer K., Dilmaghani K. Exposure to Dimethyl Sulfoxide at 37°C Prior to Freezing Significantly Improves the Recovery of Cryopreserved Hybridoma Cells // Cryobiology.– 2001.- Vol. 43.– P. 288-292.*

Поступила 17.02.2004



**Рис. 8.** Динамика замораживания-отогрева защищенной сахарозой суспензии дрожжей. Скорость охлаждения 7°C/мин.

**Fig. 8.** Dynamics of freeze-thawing of sucrose-protected yeast suspension with 7°C/min cooling rate.

comparison with *C.albicans* cells. DMSO addition into the preservation medium combined with the corresponding cooling regimen allows to avoid an intracellular crystallisation or to considerably reduce it. *C.albicans* cells are more resistant to the initiation of intracellular crystal formation, that obviously is one of the causes of their higher cryoresistance in comparison with SPEV cells.

### Conclusions

Thus, the data obtained demonstrate, that different sensitivity of eukaryotic cells to freezing processes with different rates can be related to their different capability to avoid an intracellular crystal formation, stipulated by the peculiarities of cell structure.

## References

1. *Actual problems of cryobiology* / Edited by Pushkar N.S.– Kiev: Naukova dumka, 1981.– 608 p.
2. *Bykov V.A., Manykov M.N., Panfilov V.I. et al.* Production of protein substances.– Moscow: Vysshaya shkola, 1987.– 142 p.
3. *Cryobiology and biotechnology* / Edited by Tsutsayeva A.A.– Kiev: Naukova Dumka, 1987.– 21 p.
4. *Culture of animal cells. Methods* / Edited by Freshni R.– Moscow: Mir, 1989.– 332p.
5. *Labinskaya A.S.* Microbiology with technique of microbiological investigations.– Moscow: Meditsina, 1978.– 394 p.
6. *Lusta K.A., Fikhte B.A.* Methods for determination of microorganisms' viability.– Puschino, 1990.– 186 p.
7. *Methods for procurement of pure cultures of microorganisms and their long-term storage in collections* / Edited by Selnikov O.P.– Kiev, 2001.– 76 p.
8. *Sidyakina T.M.* Microorganisms' preservation.– Puschino, 1985.– 63 p.
9. *Shlegel G.* General microbiology.– Moscow: Mir, 1987.– 567 p.
10. *Wewetzer K., Dilmaghani K.* Exposure to Dimethyl Sulfoxide at 37°C Prior to Freezing Significantly Improves the Recovery of Cryopreserved Hybridoma Cells // *Cryobiology.*- 2001.- Vol. 43.- P. 288-292.

*Accepted in 17.02.2004*