

Изучение жизнеспособности микроорганизмов и сохранности структурных участков их ДНК, амплифицируемых в ПЦР, после низкотемпературного хранения в различных условиях

И.П. ВЫСЕКАНЦЕВ, Е.А.ОМЕЛЬЧЕНКО, Т.М. ГУРИНА

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Study of Microorganisms' Viability and Integrity of Structural Sites of Their DNA, Amplified in PCR After Low-Temperature Storage under Different Conditions

VYSEKANTSEV I.P., OMELCHENKO E.A., GURINA T.M.

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

Полученные экспериментальные данные свидетельствуют, что при низкотемпературном консервировании циклические изменения температуры хранения от -196 до -100°C могут вызывать дополнительную гибель микробных клеток. В микробных клетках, хранившихся при постоянной температуре жидкого азота и в условиях колебания температуры хранения в указанном диапазоне, сохраняются структурные участки ДНК, обеспечивающие амплификацию в полимеразной цепной реакции (ПЦР) специфических фрагментов.

Ключевые слова: микроорганизмы, криоконсервирование, ДНК, ПЦР.

Одержані експериментальні дані свідчать, що циклічні зміни температури зберігання від -196 до -100°C можуть викликати додаткову загибель клітин мікробів. У мікробних клітинах, які зберігались при постійній температурі рідкого азоту і в умовах коливання температури зберігання в зазначеному діапазоні, зберігаються структурні ділянки ДНК, що забезпечують ампліфікацію в полімеразній ланцюговій реакції специфічних фрагментів.

Ключові слова: мікроорганізми, криоконсервування, ДНК, ПЦР.

The obtained experimental data testify to the fact that under low temperature preservation the cyclic changes in storage temperature from -196 to -100°C can result in additional death of microbial cells. In microbial cells, stored under liquid nitrogen constant temperature and under conditions of storage temperature variation within the mentioned range, there are preserved the DNA structural sites, providing the amplification in polymerase chain reaction (PCR) of specific fragments.

Key words: microorganisms, cryopreservation, DNA, PCR.

Опыт эксплуатации низкотемпературных банков биологических объектов показывает, что при использовании жидкого азота как криогенного носителя трудно избежать изменений его уровня в хранилищах, что может приводить к колебаниям температуры хранения. Вопрос о возможности возникновения различных повреждений в биологических объектах в процессе их хранения при низких температурах до настоящего времени остается открытым.

В связи с вышесказанным нами проведены исследования по изучению жизнеспособности микроорганизмов и сохранности структурных участков их ДНК, амплифицируемых в ПЦР, после низкотемпературного хранения при постоянной и изменяющейся температурах хранения.

Материалы и методы

Объектами исследования были клинические изоляты бактерий *Streptococcus pyogenes* и аспорогенных дрожжей *Candida albicans*, идентифицированные по морфологическим, культурным,

Адрес для корреспонденции: Высеканцев И.П., Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 7720126, факс: +38 (057) 7720084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

The exploitation experience in low temperature banks of biological objects shows, that when using liquid nitrogen as a cryogenic carrier it is difficult to avoid the changes in its level in the storehouses, that can result in storage temperature changes. The question on a possible appearance of different damages in biological objects has remained open.

Owing to the mentioned above we carried-out the investigations on studying the microorganisms' viability and integrity of structural sites of their DNA, amplified in PCR after low temperature storage under constant and changing storage temperatures.

Materials and methods

The objects for investigations were clinical isolates of *Streptococcus pyogenes* bacteria and *Candida albicans* asporogenous yeasts, identified by morphological, cultural, biochemical and serological properties at the Chair of Clinical Microbiology and Immunology of Kharkov Medical Academy of Post-Diploma Education of the Ministry of Health Care of Ukraine. Genetically isolated strains were identified

Address for correspondence: Vysekantsev I.P., Institute for Problems of Cryobiology&Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, 23, Pereyaslavkaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel: +38 (057) 7720126, fax: +38 (057) 7720084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

биохимическим и серологическим свойствам на кафедре клинической микробиологии и иммунологии ХМАПО МОЗ Украины. Генетическую идентификацию выделенных штаммов проводили с помощью ПЦР на базе ООО “Вирола” (г.Харьков).

Бактерии *S. pyogenes* выращивали при 37°C в течение 40 ч на кровяном агаре [1] в атмосфере с повышенным содержанием CO₂, грибы *C. albicans* – при 22°C и в течение 48 ч на агаризованной среде Сабуро [1]. Смывали микробные клетки с агаризованных сред физиологическим раствором NaCl и мясо-пептонным бульоном (МПБ) [1]. В качестве криопротектора использовали ДМСО (“Макрохимия”, Россия) в конечной концентрации 5%. Время эквilibрации микроорганизмов с ДМСО – 10 мин.

Суспензии микроорганизмов вносили по 1 мл в криопробирки “Nunc” (Германия) с рабочим объемом 1 мл. Образцы замораживали погружением криопробирок в жидкий азот. Контрольные образцы хранили погруженными в жидкий азот в течение 2-х недель, опытные – в условиях циклически изменяющейся температуры хранения. Один цикл состоял из хранения в течение 8 ч в парах жидкого азота при температуре –100°C и в течение 16 ч – в жидком азоте. Сохранность микроорганизмов исследовали после 10 циклов изменения температуры хранения. Отогревали образцы на водяной бане при 30°C. Жизнеспособность микробов оценивали чашечным методом Коха по способности образовывать макроколонии на агаризованных средах [2]. Сохранность структуры участков ДНК, служащих матрицами для амплификации в ПЦР [3], изучали в соответствии с инструкциями по применению наборов для амплификации. В исследованиях использовали наборы “Ампли Сенс-50 Streptococcus species” и “Ампли Сенс-50 Candida albicans-500” (Центральный институт эпидемиологии МЗ России, Москва). Длина участков ДНК для амплификации специфических фрагментов составляла для *S. pyogenes* 763 пары нуклеотидов (п.н.) рибосомального гена стрептококков, для *C. albicans* – 500 п.н. ДНК *C. albicans*. Амплификацию проводили в амплификаторе “Терцик” (ДНК технология, Россия). Анализ продуктов амплификации производили по стандартным протоколам разделением фрагментов ДНК в 2%-м агарозном геле с последующей оценкой в трансиллюминаторе “Флюскан” (Россия) [5].

Статистическую обработку полученных результатов проводили по общепринятым в биологии методам [4].

Результаты и обсуждение

Было установлено, что в процессе криоконсервирования часть микробных клеток погибала на этапе замораживания-отогрева (табл. 1,2). Добавление в среду консервирования ДМСО

by PCR at the “Virola” Ltd. (Kharkov).

S. pyogenes bacteria were cultured at 37°C during 40 hrs on blood agar [1] in the atmosphere with an increased CO₂ content, *C. albicans* fungi were cultured at 22°C during 48 hrs on the Saburo agarised media [1].

Microbial cells were washed-out from agarised media with NaCl physiological solution and meat-pentone broth (MPB) [1]. DMSO (“Makrokhimiya”, Russia) under final 5% concentration was used as a cryoprotectant. Suspensions of microorganisms were introduced by 1 ml in the “Nunc” (Germany) cryotubes with 1 ml operating volume. The samples were frozen by means of cryotube immersion into liquid nitrogen. The control samples were stored immersed in liquid nitrogen during 2 weeks, as for the experimental ones, they were stored under conditions of cyclic changes in storage temperature. One cycle comprised the storage for 8 hrs in vapours of liquid nitrogen at the temperature of –100°C and during 16 hrs in liquid nitrogen. The integrity of microorganisms was examined after 10 cycles of the change in storage temperature. The samples were thawed on water bath at 30°C.

The viability of microbes was estimated using the Koch plate method by the capability to form macrocolonies on the agarised media [2]. The structure integrity of DNA sites, being the matrix for amplification in PCR [3], was studied according to the application instructions of the kits for amplification. In the investigations we used the “Ampli Sens-50 Streptococcus species” and “Ampli Sens-50 Candida Albicans-500” kits (Central Institute of Epidemiology of the Ministry of Health Care of Russia, Moscow). The length of DNA sites for amplifying specific fragments made for *S. pyogenes* 763 pairs of nucleotides (p.n.) of ribosomal gene of streptococcus, 500 p.n. DNA *C. albicans* for *C. albicans*. The amplification was carried-out in “Tertsik” amplifcator (DNA technology, Russia). The analysis of amplification products was performed by the standard protocols using the separation of DNA fragments in 2% agarose gel with following estimation in the transilluminator “Fluskan” (Russia) [5].

Statistical processing of the results obtained was done according to the routinely accepted methods in biology [4].

Results and discussion

It was established that during the process of cryopreservation a part of microbial cells died at the stage of freeze-thawing (Table 1, 2). The DMSO adding into the medium of preservation statistically increased the number of viable cells. After the frozen samples storage in liquid nitrogen their number did not change. The storage under conditions of cyclic

Таблица 1. Жизнеспособность и сохранность амплифицируемого в ПЦР участка ДНК дрожжей *Candida albicans* после хранения в жидком азоте и 10 циклов изменения температуры хранения
Table 1. Viability and integrity of the amplified in PCR DNA site of *C. albicans* yeasts after storage in liquid nitrogen and 10 cycles of the change in storage temperature

Среда консервирования Preservation medium	Условия эксперимента Experiment conditions	Количество КОЕ/мл $\bar{x} \pm S\bar{x}$ Number of CFU/ml $\bar{x} \pm S\bar{x}$	Уровень доверительной вероятности между средними значениями Level of confidence probability between the mean values		Наличие (+) или отсутствие (-) синтеза ампликонов Presence (+) or absence (-) of amplicon synthesis
			до замораживания и в других вариантах before freezing and in other variants	после кратковременного замораживания и хранения в разных условиях after short-term freezing and storage under different conditions	
МПБ MPB	До замораживания Before freezing	$(1,45 \pm 0,4) \times 10^9$	–	–	+
	Кратковременное замораживание Short-term freezing	$(1,55 \pm 0,4) \times 10^8$	<0,05	–	+
	Хранение в жидком азоте Storage in liquid nitrogen	$(1,55 \pm 0,5) \times 10^8$	<0,05	0,05	+
	10 циклов изменения температуры хранения 10 cycles of the storage temperature change	$(6,0 \pm 0,4) \times 10^7$	<0,05	<0,05	+
МПБ + 5% ДМСО MPB + 5% DMSO	До замораживания Before freezing	$(2,4 \pm 0,3) \times 10^9$	–	–	+
	Кратковременное замораживание Short-term freezing	$(5,5 \pm 0,4) \times 10^8$	<0,05	–	+
	Хранение в жидком азоте Storage in liquid nitrogen	$(5,2 \pm 0,3) \times 10^8$	<0,05	0,05	+
	10 циклов изменения температуры хранения 10 cycles of the storage temperature change	$(2,3 \pm 0,4) \times 10^8$	<0,05	<0,05	+
Физиологический раствор Physiological solution	До замораживания Before freezing	$(6,0 \pm 0,3) \times 10^8$	–	–	+
	Кратковременное замораживание Short-term freezing	$(2,5 \pm 0,5) \times 10^7$	<0,05	–	+
	Хранение в жидком азоте Storage in liquid nitrogen	$(2,5 \pm 0,4) \times 10^7$	<0,05	0,05	+
	10 циклов изменения температуры хранения 10 cycles of the storage temperature change	$(0,9 \pm 0,3) \times 10^7$	<0,05	<0,05	+
Физиологический раствор + 5% ДМСО Physiological solution + 5% DMSO	До замораживания Before freezing	$(2,0 \pm 0,4) \times 10^8$	–	–	+
	Кратковременное замораживание Short-term freezing	$(5,1 \pm 0,4) \times 10^7$	<0,05	–	+
	Хранение в жидком азоте Storage in liquid nitrogen	$(5,0 \pm 0,5) \times 10^7$	<0,05	0,05	+
	10 циклов изменения температуры хранения 10 cycles of the storage temperature change	$(2,9 \pm 0,3) \times 10^7$	<0,05	<0,05	+

Условные обозначения: \bar{x} – среднее арифметическое; $S\bar{x}$ – среднее квадратическое отклонение.

Legends: \bar{x} – arithmetic mean; $S\bar{x}$ – standard deviation.

Таблица 2. Жизнеспособность и сохранность амплифицируемого в ПЦР участка ДНК бактерий *S. pyogenes* после хранения в жидком азоте и 10 циклов изменения температуры хранения

Table 2. Viability and integrity of the amplified in PCR DNA site of *S. pyogenes* bacteria after storage in liquid nitrogen and 10 cycles of the change in storage temperature

Среда консервирования Preservation medium	Условия эксперимента Experiment conditions	Количество КОЕ/мл $\bar{x} \pm S\bar{x}$ Number of CFU/ml $\bar{x} \pm S\bar{x}$	Уровень доверительной вероятности между средними значениями Level of confidence probability between the mean values		Наличие (+) или отсутствие (-) синтеза ампликонов Presence (+) or absence (-) of ampli con synthesis
			до замораживания и в других вариантах before freezing and in other variants	после кратковременного замораживания и хранения в разных условиях after short-term freezing and storage under different conditions	
МПБ MPB	До замораживания Before freezing	$(7,0 \pm 0,4) \times 10^9$	–	–	+
	Кратковременное замораживание Short-term freezing	$(4,0 \pm 0,3) \times 10^8$	<0,05	–	+
	Хранение в жидком азоте Storage in liquid nitrogen	$(3,75 \pm 0,5) \times 10^8$	<0,05	0,05	+
	10 циклов изменения температуры хранения 10 cycles of the storage temperature change	$(8,0 \pm 0,4) \times 10^7$	<0,05	<0,05	+
МПБ + 5% ДМСО MPB + 5% DMSO	До замораживания Before freezing	$(9,4 \pm 0,5) \times 10^9$	–	–	+
	Кратковременное замораживание Short-term freezing	$(1,55 \pm 0,40) \times 10^9$	<0,05	–	+
	Хранение в жидком азоте Storage in liquid nitrogen	$(2,0 \pm 0,5) \times 10^9$	<0,05	0,05	+
	10 циклов изменения температуры хранения 10 cycles of the storage temperature change	$(7,0 \pm 0,3) \times 10^8$	<0,05	<0,05	+
Физиологический раствор Physiological solution	До замораживания Before freezing	$(5,6 \pm 0,3) \times 10^9$	–	–	+
	Кратковременное замораживание Short-term freezing	$(6,0 \pm 0,4) \times 10^7$	<0,05	–	+
	Хранение в жидком азоте Storage in liquid nitrogen	$(5,7 \pm 0,5) \times 10^7$	<0,05	0,05	+
	10 циклов изменения температуры хранения 10 cycles of the storage temperature change	$(9,0 \pm 0,4) \times 10^6$	<0,05	<0,05	+
Физиологический раствор + 5% ДМСО Physiological solution + 5% DMSO	До замораживания Before freezing	$(8,5 \pm 0,3) \times 10^9$	–	–	+
	Кратковременное замораживание Short-term freezing	$(9,4 \pm 0,3) \times 10^8$	<0,05	–	+
	Хранение в жидком азоте Storage in liquid nitrogen	$(9,1 \pm 0,4) \times 10^8$	<0,05	0,05	+
	10 циклов изменения температуры хранения 10 cycles of the storage temperature change	$(2,1 \pm 0,4) \times 10^8$	<0,05	<0,05	+

Условные обозначения: \bar{x} – среднее арифметическое; $S\bar{x}$ – среднее квадратическое отклонение.

Legends: \bar{x} – arithmetic mean; $S\bar{x}$ – standard deviation.

достоверно повышало количество жизнеспособных клеток. После хранения замороженных образцов в жидком азоте их количество не изменялось. Хранение в условиях циклически изменяющейся температуры в указанном выше диапазоне приводило к дополнительной гибели клеток. Наличие в консервирующей среде криопротектора ДМСО и в этом случае обеспечивало более высокую сохранность количества жизнеспособных клеток.

При постановке ПЦР с бактериями *S.pyogenes* и дрожжами *C.albicans*, хранившимися в различных консервирующих средах при постоянной температуре жидкого азота и в условиях температуры, циклически изменяющейся от -196 до -100°C , получены соответствующие амплифицированные специфические фрагменты.

Выводы

Представленные результаты исследований показывают, что в процессе криоконсервирования гибель микробных клеток может происходить не только на этапах замораживания-отогрева, но и на этапе хранения при циклическом изменении температуры хранения от -196 до -100°C . Наличие в среде консервирования криопротектора ДМСО уменьшает повреждающее действие физико-химических факторов, приводящих к гибели микробных клеток во время замораживания-отогрева и при хранении в условиях изменяющейся температуры. В микробных клетках, подвергавшихся замораживанию до -196°C , хранению при температуре жидкого азота и колебанию температуры хранения от -196 до -100°C , сохраняются структурные участки ДНК, обеспечивающие амплификацию в ПЦР специфических фрагментов.

Литература

1. Лабинская А.С. Микробиология с техникой микробиологических исследований.– М.: Медицина, 1978.– 394 с.
2. Луста К.А., Фихте Б.А. Методы определения жизнеспособности микроорганизмов.– Пущино: ОНТИ НЦБИ АН СССР, 1990.– 186 с.
3. Молекулярная клиническая диагностика. Методы / Под ред. С.Херрингтона, Дж.Макги.– М.: Мир, 1999.– 558 с.
4. Приседський Ю.Г. Статистична обробка результатів біологічних експериментів: Навч. посіб.– Донецьк: Донец. держ. ун-т, 1999.– 210 с.
5. Энциклопедия клинических лабораторных тестов/ Под ред. Норберта Тица.– М.: Лабинформ, 1997.– 960 с.

Поступила 04.06.2002

changes in temperature at the mentioned above range resulted in the additional cell death. The presence in a preserving medium of DMSO cryoprotectant provided a higher integrity of viable cell number in this case as well.

When performing the PCR with *S.pyogenes* bacteria and *C.albicans* yeasts, stored in different preserving media at a constant temperature of liquid nitrogen and under conditions of cyclic changes in temperature from -196 to -100°C , the corresponding amplified specific fragments were obtained.

Conclusions

Thus, the presented results of investigations demonstrate, that during cryopreservation the death of microbial cells can occur not only at the stages of freeze-thawing, but at that of storage at a cyclic change in storage temperature from -196 to -100°C . The presence of DMSO cryoprotectant in the preservation medium reduces the damaging effect of physical and chemical factors, resulting in a death of microbial cells during freeze-thawing and at the storage under changing temperature conditions. In microbial cells, subjected to freezing down to -196°C , to storage at the temperature of liquid nitrogen and to temperature change from -196 to -100°C , there are kept the DNA structural sites, providing the amplification in PCR of specific fragments.

References

1. Labinskaya A.S. Microbiology with the technique of microbiological investigations.– Moscow: Meditsina, 1978.– 394 p.
2. Lusta K.A., Fikhte B.A. Methods for determining the microorganisms viability.– Puschino: Scientific and Technical Information Department of the Scientific Centre of Biological Investigations, 1990.– 186 p.
3. Diagnostic molecular pathology. A practical approach / Ed. by S.Herrington, J.O'D. McGee.– Moscow: Mir, 1999.– 558 p.
4. Prisedsky Yu.G. Statistical proceeding of the results of biological experiments: Manual.– Donetsk: Donetsk State University, 1999.– 210 p.
5. Encyclopaedia of clinical laboratory tests / Ed. by Norbert Tietz.– Moscow: Labinform, 1997.– 960 p.

Accepted in 04.06.2002