

## Стимулирующее действие малых доз озона на рост микроорганизмов

И.А. БЕЛЫХ, В.Д. ЗИНЧЕНКО, И.П. ВЫСЕКАНЦЕВ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

## Stimulating Effect of Ozone Low Doses on Microorganisms' Growth

I.A. BELYKH, V.D. ZINCHENKO, I.P. VYSEKANTSEV

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

Озон в дозированных количествах добавляли в ростовую среду бактерий *Esherichia coli* или дрожжеподобных грибов *Candida albicans* и наблюдали за кинетикой роста микроорганизмов в зависимости от его количества. Обнаружено, что при дозе озона в ростовой среде 0,3-0,5 мг/л отмечается стимуляция роста микроорганизмов, при более высоких дозах – угнетение роста. Если грибы *Candida albicans* подвергнуть замораживанию до  $-196^{\circ}\text{C}$  и оттаиванию, то при добавлении озона в ростовую среду перед замораживанием наблюдается более интенсивный рост грибов после оттаивания.

**Ключевые слова:** озон, микроорганизмы, стимуляция роста, криоконсервирование, ростовая среда.

Озон в дозованих кількостях додавали в ростове середовище бактерій *Esherichia coli* або дріжджеподібних грибів *Candida albicans* і спостерігали за кінетикою росту мікроорганізмів у залежності від його кількості. Виявлено, що при дозі озону 0,3-0,5 мг/л спостерігається стимуляція росту мікроорганізмів, при більш високих дозах – пригнічення росту. Якщо гриби *Candida albicans* піддати заморожуванню до  $-196^{\circ}\text{C}$  і відтаванню, то при додаванні озону в ростове середовище перед заморожуванням відзначається більш інтенсивний ріст грибів після відтавання.

**Ключові слова:** озон, мікроорганізми, стимуляція росту, криоконсервування, ростове середовище.

Ozone in dosed amount was added to growth medium of *Esherichia coli* bacteria or *Candida albicans* yeast-like fungi and the kinetics of microorganism growth depending on its amount was under observation. With the ozone dose of 0.3-0.5 mg/l in growth medium there was found the growth stimulation of microorganisms, with higher doses the growth suppression was found. If *Candida albicans* fungi are subjected to freezing down to  $-196^{\circ}\text{C}$  and then to thawing, then with adding ozone to growth medium before freezing more intensive fungi growth after thawing is noted.

**Key-words:** ozone, microorganisms, growth stimulation, cryopreservation, growth medium.

Стимулирующее действие малых доз озона на биологические объекты активно изучается исследователями, начиная с 70-х годов. Этот интерес исследователей связан с использованием озона как терапевтического средства [11-14]. Было показано, что на уровне организма теплокровных животных озон в малых дозах способствует активации метаболизма, проявляет иммуномодулирующие свойства [9,10], под его действием обнаруживаются антигипоксический и детоксикационный эффекты [6]. В последние годы установлено, что в присутствии озона усиливается потребление глюкозы тканями и органами, уменьшается содержание недоокисленных метаболитов в плазме [13]. Отмечено, что под действием озона увеличивается активность глутатионовой системы, формирующей внутриклеточную антиоксидантную защиту организма против активации свободнорадикальных реакций [8, 12].

Вместе с тем высокие дозы озона губительно действуют на многие микроорганизмы. Озон в водном растворе способен убивать все известные виды грам-положительных и грам-отрицательных

Stimulating effect of ozone low doses on biological objects has been actively studied by the researchers since the 70s. This interest of researchers is related to the usage of ozone as therapeutic means [11-14]. It has been shown that at an organism level of homoiothermal animals ozone under low doses contributes to the activation of metabolism, manifests immune modulating properties [9, 10], under its effect anti-hypoxic and detoxicating effects are revealed [6]. Recently it has been found that the glucose consumption by tissues and organs is strengthened in ozone presence, the content of incompletely oxidized metabolites in plasm reduces[13]. It has been noted that under ozone effect the activity of glutathione system, forming intracellular antioxidant protection of an organism against free-radical reactions is increased [8, 12].

In addition high doses of ozone ruinously affect many microorganisms. Ozone in aqueous solution is capable to kill all known types of gram-positive and gram-negative bacteria, including blue puss bacillus and legionella, all lipo- and hydrophilic viruses, including those of hepatites A, B, C, spores and vegetative forms of all known pathogenic microorganisms, fungi and

**Адрес для корреспонденции:** Белых И.А. Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.:+38 (057) 772-61-41, факс: +38 (057) 772-00-84, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

**Address for correspondence:** Belykh I.A. Institute for Problems of Cryobiology&Cryomedicine of the Natl. Acad. Sci. of Ukraine, 23, Pereyaslavskaya str.,Kharkov, Ukraine 61015; tel.:+380 57 772 6141, fax: +380 57 7720084, e-mail:cryo@online.kharkov.ua

бактерий, включая синегнойную палочку и легионеллу, все липо- и гидрофильные вирусы, в том числе вирусы гепатитов А, В, С, споры и вегетативные формы всех известных патогенных микроорганизмов, грибов и простейших. Озон в концентрации от 1 до 5 мг/л в водном растворе приводит к гибели 99,9% *E. Coli*, *Streptococcus faecalis*, *Micobacterium tuberculosis*, *Cryptosporidium parvum*, *Varavium* и других микроорганизмов в течение 4-20 мин [1, 4, 5, 7]. Механизмы действия больших доз озона на микроорганизмы связывают в первую очередь с его деструктивным влиянием на мембраны.

В отличие от деструктивного действия больших доз озона механизмы стимулирующего действия малых доз на биологические системы изучены мало. Эффекты действия как больших, так и малых доз озона на биологические системы могут представлять практический интерес для криобиологии, особенно использование стимулирующего эффекта малых доз озона на биологические объекты на разных стадиях криоконсервирования.

Цель настоящей работы – исследование действия малых доз озона на кинетику роста некоторых микроорганизмов в нормальных физиологических условиях и после замораживания-оттаивания. Выбор микроорганизмов как объекта исследования был обусловлен, прежде всего, простотой численных оценок биологического действия озона. Степень влияния озона на микроорганизмы легко оценить по характеристикам показателей роста.

### Материалы и методы

Озон для исследований получали из чистого кислорода при помощи разработанного нами генератора с разрядной трубкой барьерного типа. Производительность генератора до 5 л озонкислородной смеси в минуту, концентрация озона до 30 мг/л в газовой смеси на выходе генератора. Концентрацию озона в газовой фазе в озонкислородной смеси и в водных растворах определяли спектрофотометрическим методом, измеряя спектрофотометром Specord UV VIS поглощение света на полосе Хиггинса-Хартли (254,7 нм). При расчетах использовали значения сечения поглощения озона, приведенные в [3]. Объектом исследования служили бактерии *Esherichia coli* (штамм получен из Российской коллекции промышленных микроорганизмов ГНИИ генетики, Москва) и дрожжеподобные грибы *Candida albicans* ATCC 835-653, полученные из коллекции АОЗТ “Здоровье” (г. Харьков). Исследование влияния озона на рост микроорганизмов проводили методом посева микроорганизмов на питательную

protozoa. Ozone under concentration from 1 to 5 mg/l in aqueous solution results in the 99.9% death of *Esherichia coli*, *Streptococcus faecalis*, *Micobacterium tuberculosis*, *Cryptosporidium parvum*, *Varavium* and other microorganisms during 4-20 min [1, 4, 5, 7]. Action mechanisms of ozone high doses on microorganisms are referred firstly to its destructive effect on membranes.

In contrast to destructive effect of high doses of ozone, the mechanisms of stimulating effect of low doses on biological systems has been investigated poorly. The effects of both high and low doses of ozone on biological systems may be of practical interest for cryobiology, of special one is the usage of stimulating effect of ozone low doses on biological objects at different cryopreservation stages.

The aim of this research was studying the effect of ozone low doses on the kinetics of the growth of some microorganisms under normal physiological conditions and after freeze-thawing. The choice of microorganisms as the research object was stipulated first of all by the simplicity of numeric assessments of ozone biological effect. The degree of ozone effect on microorganisms is easy to estimate on the characteristics of growth indices.

### Materials and methods

Ozone for the study has been obtained from pure oxygen by means of specially developed by us generator with discharge tube of barrier type. Generator yield is up to 5 l of ozone-oxygen mixture per minute, ozone concentration is up to 30 mg/l in gas mixture at generator output. Ozone concentration in gas phase in ozone-oxygen mixture and in aqueous solutions was spectrophotometrically examined by measuring light absorption with “Specord UV VIS” spectrophotometer on the Higgins-Hartley band (254.7 nm). For calculations there were used the values of ozone absorption section, reported elsewhere [3]. *Esherichia coli* bacteria (strain was obtained from Russian collection of industrial microorganisms of the State R&D Institute of Genetics, Moscow) and *Candida albicans* yeast-like fungi ATCC 835-653, obtained from the collection of JSC “Zdorovje” (Kharkov) served as the research objects. The investigation of ozone effect on growth of microorganisms was performed by the inoculation of microorganisms on nutritive medium and calculation of number of colonies according to the methods described in the paper [2]. *Esherichia coli* bacteria were grown on meat peptone agar slope at 37°C for 20-22 hrs. *Candida albicans* fungi were grown on Sabouraud’s agar slope for 30 hrs at 30°C. Kinetics of microorganism growth was studied by measuring with photocolimeter of optic

среду и подсчета числа колоний по методике, описанной в [2]. Бактерии *Esherichia coli* выращивали на скошенном мясо-пептонном агаре при 37°C в течение 20-22 ч. Грибы *Candida albicans* выращивали на скошенном агаре Сабуро в течение 30 ч при 30°C. Кинетику роста микроорганизмов исследовали измерением при помощи фотоколориметра оптической плотности ростовой среды во время их роста. Грибы *Candida albicans* замораживали в ростовой среде без криопротекторов и отогревали на водяной бане. Использовали два режима замораживания: первый – одноступенчатый прямым погружением контейнера с образцом в жидкий азот (режим быстрого замораживания), при котором скорость охлаждения составляла около 400°C/мин, второй – двухступенчатый с охлаждением образца от 20 до –45°C со скоростью 2°C/мин и далее погружением контейнера в жидкий азот. Указанные режимы замораживания были выбраны нами из тех соображений, что они обеспечивают разную степень сохранности микроорганизмов при замораживании клеток без озона. В данной работе для нас представляло интерес сопоставить величину эффекта воздействия озона на клетки, испытывавшие повреждение различной степени в результате замораживания-оттаивания. Для введения в ростовую среду контролируемого количества озона использовали физиологический раствор, который барботировали озono-кислородной смесью до достижения концентрации растворенного озона 2-4 мг/л. Затем требуемый объем физиологического раствора, насыщенного озоном, вводили в ростовую среду для микроорганизмов.

### Результаты и обсуждение

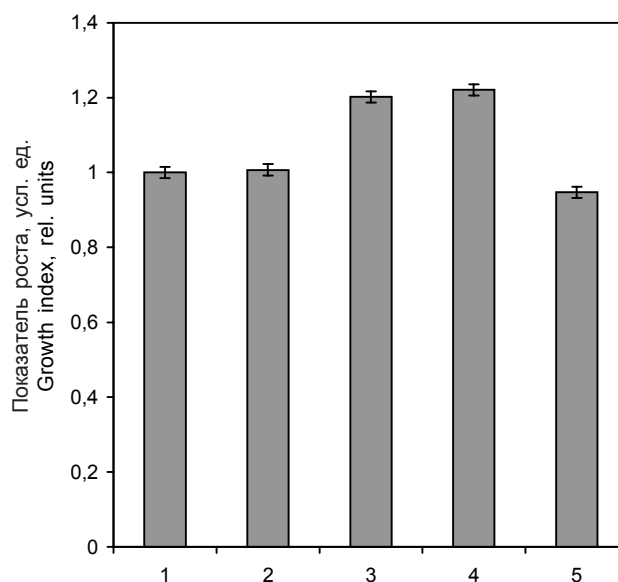
На рисунке представлена полученная нами зависимость величины стимулирующего действия озона на рост бактерий *Esherichia coli* при разных дозах его в ростовой среде. Концентрации озона указаны в расчете на единицу объема ростовой среды. Видно, что при концентрации озона в ростовой среде 0,12 и 0,35 мг/л наблюдается увеличение количества бактерий в среде на линейной фазе роста, при дозе 0,67 мг/л – эффект угнетения роста клеток озоном.

Выявленный эффект стимулирующего действия озона на микроорганизмы интересно исследовать с точки зрения возможности использования его в криобиологии для стимуляции процессов жизнедеятельности в клетках после криоконсервирования. Такие исследования мы проводили на дрожжеподобных грибах *Candida albicans*. Дозированные количества озона добавляли в суспензию

density of growth medium during the growth in it of microorganisms. *Candida albicans* fungi were frozen in growth medium without cryoprotectants and thawed on water bath. There were used two freezing regimens: the first one is one-step, container with the sample was submerged into liquid nitrogen, at which cooling rate made about 400°C/min and another is a two-step regimen with the sample cooling 2°C/min from 20°C down to 45°C and further with immersion into liquid nitrogen. The mentioned freezing regimens were chosen by us because they provide different degree of micro-organisms' integrity during freezing of cells without ozone. In this research for us there was of interest to compare the ozone effect value on cells subjected to various degree of damage as a result of freeze-thawing. To introduce into growth medium the ozone amount being controlled we used physiological solution which was bubbled with ozone-oxygen mixture up to the achieving the concentration of dissolved ozone 2-4 mg/l. Then the requested volume of physiological solution was introduced into growth medium for microorganisms.

### Results and discussion

The figure shows the obtained by us dependency of the value of ozone stimulating effect on the growth of *Esherichia coli* bacteria under its different doses



Показатели роста бактерий *Esherichia coli* в ростовой среде без добавления озона (1 – контроль) и в присутствии различных доз озона (мг/л): 2 – 0,0013; 0,013 и 0,062; 3 – 0,12; 4 – 0,35; 5 – 0,57.

Indices of bacteria growth for *Esherichia coli* in growth medium without adding ozone (1 – control) and in the presence of ozone different doses (mg/l): 2 – 0.0013; 0.013 and 0.062; 3 – 0.12; 4 – 0.35; 5 – 0.67.

клеток непосредственно перед замораживанием. Результаты этих исследований представлены в таблице.

Как видно из таблицы, эффект стимулирующего действия озона не одинаков для разных скоростей замораживания. При замораживании грибов в присутствии озона в к о н ц е н т р а ц и и 0,16-0,64 мг/л наблюдается более высокая

их выживаемость после быстрого замораживания. При повышении концентрации озона до 0,8 мг/л жизнеспособность достоверно не отличается от показаний в контроле. В образцах, замороженных двухступенчато, более высокую жизнеспособность наблюдали при концентрации озона 0,16-0,32 мг/л. При повышении концентрации озона до 0,64-0,8 мг/л жизнеспособность грибов была достоверно ниже, чем в контрольных образцах. Этот результат согласуется с теми представлениями, что озон в высоких дозах вызывает угнетение роста микроорганизмов, причем наблюдается синергизм двух факторов повреждающего действия на микроорганизмы: фактора высоких доз озона и фактора замораживания-оттаивания. Эффект стимуляции роста грибов *Candida albicans* отмечается именно при малых дозах озона.

Объяснить механизм стимулирующего действия малых доз озона на биологические системы разного уровня организации в настоящее время можно только на уровне гипотез, поскольку мы не располагаем достаточно детальной информацией о молекулярных механизмах влияния озона на компоненты живых систем. Например, важную роль здесь может играть активация ферментативных систем малыми дозами озона [8, 12, 13].

### Выводы

Выявлен эффект стимулирующего действия малых доз озона на бактерии *Esherichia coli* и грибы *Candida albicans* в нормальных физиологических условиях и после замораживания-оттаивания. Выявленный эффект может быть практически применен в криобиологии при разработке протоколов криоконсервирования биологических объектов.

### Жизнеспособность дрожжеподобных грибов *Candida albicans* после замораживания в растворах, содержащих озон Viability of *Candida albicans* yeast-like fungi after freezing in ozone-containing solutions

Режим замораживания Freezing regimen	Процент жизнеспособных клеток после замораживания в средах с добавками различных доз озона, мг/л Percentage of viable cells after freezing in media with adding different ozone doses,mg/l					
	Контроль, среда без озона Control, ozone-free medium	0,16	0,32	0,48	0,64	0,8
Одноступенчатый One-step	47,8±2,9	61,7±2,9	66,9±4,2	65,5± 4,7	61,2±3,1	42,5±5,7
Двухступенчатый Two-step	35,3±3,1	56,7±3,4	50,2±5,0	33,9±3,5	15,1±7,2	3,4±1,8

of ozone in growth medium. Ozone concentrations are shown in respect of the growth medium volume unit. Under ozone concentration of 0.12 and 0.35 mg/l in growth medium there is observed an increase of the bacteria number in the medium on linear growth phase, at the dose of 0.67 mg/l the effect of suppression of cells by ozone is noted.

The revealed effect of ozone stimulating action on microorganisms is interesting to be studied from the point of view of the possibility to use its in cryobiology to stimulate the processes of vital activity in cells after cryopreservation. These studies were performed in *Candida albicans* yeast-like fungi.

Dosed ozone amounts were added to the suspension of cells directly before freezing. The results of these studies were shown in the Table.

As the Table shows ozone stimulating effect is not the same for various rates of freezing. When freezing fungi in ozone presence under concentration of 0.16-0.64 mg/l there is observed their higher viability after rapid freezing. With the increase in ozone concentration up to 0.8 mg/l the viability statistically and significantly does not differ from the indices in the control. When rising ozone concentration up to 0.64-0.8 mg/l the fungi viability was statistically and significantly lower than in control samples. This result agrees with those notions that ozone in high doses causes the suppression of microorganism growth, moreover there is observed synergism of two factors of damaging effect on microorganisms: factors of ozone high doses and that of freeze-thawing. The stimulation effect of *Candida albicans* fungi growth is noted namely under ozone low doses.

Now it is possible to explain the mechanisms of stimulating effect of ozone low doses on biological systems of different level of organization only at the level

## Литература

1. Алферина Ф.Н., Амплеева Н.П., Мамыкина В.М. и др. Сравнительная оценка эффективности озонотерапии при стрептококковых инфекциях в зависимости от способа применения // Тез. докл. Всерос. конф. "Озон и методы эфферентной терапии в медицине". – Н.-Новгород, 2000. – С. 111-112.
2. Лабинская А.С. Микробиология с техникой микробиологических исследований. – М.: Медицина, 1972. – 480 с.
3. Лунин В.В., Попович М.П., Ткаченко С.Н. Физическая химия озона. – М.: Изд-во МГУ, 1998. – 480 с.
4. Суколин Г.И., Яковлев А.Б., Степанова Ж.В. Озонотерапия грибковых поражений кожи и ногтей // Тез. докл. 1-й Всесоюз. науч.-практич. конф. "Озон в биологии и медицине". – Н.-Новгород, 1992. – С. 57.
5. Яковлев А.Ю., Бричкин Ю.Д., Фуфаев А.Н. и др. Эффективность методов озонотерапии в лечении острого вирусного гепатита // Тез. докл. Всерос. конф. "Озон и методы эфферентной терапии в медицине". – Н.-Новгород. – 2000. – С. 81
6. Bocci V. Ozone as bioregulator. Pharmacology and toxicology of ozonotherapy today // Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents. – 1997. – Vol. 10. – N 2/3. – P. 31- 53.
7. Burlison G.R., Murray T.M., Pollard M. Inactivation of viruses and bacteria by ozone, with and without sonification // Appl. Microbiol. – 1975. – Vol. 29. – P. 340-344.
8. Chow C.K., Ploppe C., Chia M. Dietary vitamin E and pulmonary and morphological alteration of rats exposed to 0.1 ppm ozone // Environmental Res. 1981. – Vol. 24. – P. 315 – 324.
9. Fahmy Z. Immunological effect of ozone in rheumatic diseases // Ozone in Medicine. Proceedings of Eleventh Ozone World Congress. – San Francisco, 1993. – P. 3-22.
10. Fahmy Z. Ozon-Sauerstoff-Therapie in der Rheumatologie // OzoNachrichten. – 1982. – Heft 1. – P. 56.
11. Rokitansky O. Die Ozon-Therapie bei peripheren arteiellen Durchblutungsstörungen // Dr. Med. – 1977. – N4. – P. 12.
12. Rokitansky O. Klinik und Biochemie der Ozonotherapie // Hospitalis. – 1982. – Vol. 52. – P. 711.
13. Viebahn-Haensler R. The use of ozone in medicine. – Heidelberg: K.F. Haug Publishers. 1999. – P. 17-20.
14. Wolf H. H. Das medizinische Ozon. – Heidelberg: VFM Publication. 1979. – 211 p.

Поступила 30.09.2004

of hypotheses, since we do not have quite detailed information about molecular mechanisms of ozone effect on the components of living systems. For instance, the activation of enzyme systems with zone low doses may play an important role thereat [8, 12, 13].

## Conclusions

Stimulating effect of low ozone doses on *Escherichia coli* and *Candida albicans* fungi was revealed under normal physiological conditions and after freeze-thawing. The found effect can have practical application in cryobiology when developing the cryopreservation protocols for biological objects.

## References

1. Alferina F.N., Ampleyeva N.P., Mamykina V.M. et al. Comparative evaluation of ozonotherapy efficiency at streptococcus infections depending on application way // Proc. of Reports of All-Russian Conference "Ozone and methods of efferent therapy in medicine". – N.-Novgorod, 2000. – P. 111-112.
2. Labinskaya A.S. Microbiology with technique of microbiological studies. – Moscow: Meditsina, 1972. – 480 p.
3. Lunin V.V., Popovich M.P., Tkachenko S.N. Physical chemistry of ozone. – Moscow: Publishing House of Moscow State University, 1998. – 480 p.
4. Sukolin G.I., Yakovlev A.B., Stepanova Zh.V. Ozonotherapy of fungal damages of skin and nails // Proc. of Reports of the 1<sup>st</sup> All-Union Scientific and Practical Conference "Ozone in biology and medicine". – N.-Novgorod, 1992. – P. 57.
5. Yakovlev A.Yu., Brichkin Yu.D., Fufaev A.N. et al. Efficiency of ozonotherapy methods in treatment of acute virus hepatitis // Proc. of Reports of All-Russian Conference "Ozone and methods of efferent therapy in medicine". – N.-Novgorod, 2000. – P. 81.
6. Bocci V. Ozone as bioregulator. Pharmacology and toxicology of ozonotherapy today // Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents. – 1997. – Vol. 10, N2/3. – P. 31- 53.
7. Burlison G.R., Murray T.M., Pollard M. Inactivation of viruses and bacteria by ozone, with and without sonification // Appl. Microbiol. – 1975. – Vol. 29. – P. 340-344.
8. Chow C.K., Ploppe C., Chia M. Dietary vitamin E and pulmonary and morphological alteration of rats exposed to 0.1 ppm ozone // Environmental Res. 1981. – Vol. 24. – P. 315 – 324.
9. Fahmy Z. Immunological effect of ozone in rheumatic diseases // Ozone in Medicine. Proceedings of Eleventh Ozone World Congress. – San Francisco, 1993. – P. 3-22.
10. Fahmy Z. Ozon-Sauerstoff-Therapie in der Rheumatologie // OzoNachrichten. – 1982. – Vol.1. – P. 56.
11. Rokitansky O. Die Ozon-Therapie bei peripheren arteiellen Durchblutungsstörungen // Dr. Med. – 1977. – N4. – P. 12.
12. Rokitansky O. Klinik und Biochemie der Ozonotherapie // Hospitalis. – 1982. – Vol. 52. – P. 711.
13. Viebahn-Haensler R. The use of ozone in medicine. – Heidelberg: K.F. Haug Publishers, 1999. – P. 17-20.
14. Wolf H. H. Das medizinische Ozon. – Heidelberg: VFM Publication. 1979. – 211 p.

Accepted in 30.09.2004