

## **О ПРИМЕНЕНИИ ОЗОНА В ТЕХНОЛОГИЧЕСКОМ ЦИКЛЕ КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ**

Зинченко В.Д., Грищенко В.И., Высеканцев И.П., Белых И.А.

*Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков*

В работе показано, что в присутствии малых доз озона (0,1 – 0,6 мг/л) ускоряется рост микроорганизмов *Escherichia coli* в нормальных физиологических условиях и дрожжеподобных грибов *Candida albicans* после замораживания до  $-196^{\circ}\text{C}$  –и последующего оттаивания. Показано, что микроорганизмы *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, нанесенные на поверхность миллиметровых фильтров полностью инактивируются при обработке в камере газообразной озон-воздушной смесью с концентрацией озона 6 мг/л. Полученные результаты показывают, что озонные технологии могут представлять интерес для криобиологии в двух направлениях: использование малых доз озона для интенсификации репарационных процессов в биологических объектах после действия холода и использование высоких концентраций и больших доз озона для стерилизации криобиологического оборудования.

Низкотемпературное консервирование биологических объектов разного уровня организации в настоящее время приобретает все большее практическое значение в связи с применением криоконсервированных биологических материалов в медицине и особенно в связи с постоянно возрастающим интересом исследователей во всем мире к стволовым клеткам. Применение стволовых клеток в медицине в большинстве случаев требует их хранения в жизнеспособном состоянии в течение некоторого времени. Методы консервирования биологических объектов при температуре жидкого азота позволяют сохранять биологические объекты в жизнеспособном состоянии в течение весьма длительного времени. Известны эксперименты, в которых эритроциты и некоторые другие биологические объекты успешно хранились при температуре  $-196^{\circ}\text{C}$  в течение десяти лет и более [1]. В процессе замораживания, хранения и оттаивания биологических объектов

возникают повреждения, которые могут носить не летальный характер. Если после оттаивания биологический объект находится в нормальных физиологических условиях, то его функциональные свойства могут постепенно приходить к норме. В таких случаях говорят о репарации биологических объектов после действия холода [4].

В связи появляющимися в последнее время многочисленными данными о том, что озон в малых (терапевтических) дозах способствует стимуляции различных биологических процессов в живых системах возникает интерес к использованию указанного свойства озона в технологическом цикле криоконсервирования биологических объектов для более эффективной репарации криоконсервированного объекта после действия холода.

Другой аспект применения озона в криобиологии связан с его способностью при достаточно высоких концентрациях уничтожать различные микроорганизмы. Криобиологические технологии включают в себя собой, как правило, несколько этапов при подготовке материала в процессе криоконсервирования и при его деконсервации и поэтому предполагают многочисленные лабораторные манипуляции с образцом. На каждом этапе существует вероятность контаминации образца микроорганизмами, в связи с чем к условиям стерильности помещений, боксов, инструментов, низкотемпературных хранилищ в криобиологии предъявляются особые требования.

Целью данной работы явилось исследование действия малых доз озона на некоторые микроорганизмы в условиях криоконсервирования и исследование обеззараживающего действия больших доз газообразного озона на различные микроорганизмы.

### **Материалы и методы**

Озон для исследований в данной работе получали из кислорода производства Харьковского кислородного завода (ГОСТ 5583-78) при помощи разработанного нами генератора с разрядной трубкой барьерного типа. Производительность генератора до 5 литров озono-кислородной смеси в минуту, концентрация озона до 30 мг/л в газовой смеси на выходе генератора. Концентрацию озона в озono-кислородной смеси и в водных растворах определяли спектрофотометрическим методом, измеряя поглощение света на полосе Хартли при помощи спектрофотометра Specord UV VIS [3].

Объектом исследований служили бактерии *Esherichia coli* (штамм получен из Российской коллекции промышленных микроорганизмов ГНИИ генетики, Москва) и дрожжеподобные грибы *Candida albicans* АТТС 835-653, полученные из коллекции АОЗТ «Здоровье» (г. Харьков). Исследование влияния озона на рост микроорганизмов проводили методом посева на питательную среду и подсчета числа колоний по методике,

описанной в книге Лабинской А.А. [2]. Бактерии *Esherichia coli* выращивали при 37°C на агаризованной среде, смывали и переносили в стандартную солевую среду *M9* с добавлением глюкозы. Состав среды *M9* (на 1 л дистиллированной воды):  $Na_2HPO_4$  – 6 г,  $K_2HPO_4$  – 3 г,  $NaCl$  – 0,5 г,  $NH_4Cl$  - 1 г, после автоклавирования добавляли 10 мл 0,01 *M* раствора  $CaCl_2$ , 1мл раствора  $MgSO_4$ , 5 мл 40% раствора глюкозы. Кинетику роста микроорганизмов исследовали, измеряя при помощи фотоколориметра ФЭК – 56 оптическую плотность ростовой среды во время роста в ней микроорганизмов.

Грибы *Candida albicans* выращивали на скошенном агаре Сабуро в течение 30 часов при 30°C. Замораживание грибов *Candida albicans* проводили в полимерных контейнерах, устойчивых против растрескивания при температуре жидкого азота. Объем образца для замораживания составлял 2 мл. Использовали два способа замораживания образцов с различными температурными режимами охлаждения: с режимом быстрого одноступенчатого охлаждения и с режимом двухступенчатого охлаждения. При использовании первого режима контейнер с образцом погружали непосредственно в жидкий азот. Средняя скорость охлаждения при этом составляла около 400 °C/мин. Режим двухступенчатого охлаждения состоял в том, что контейнер с образцом охлаждали от +20 до - 20°C со скоростью 2°C/мин, после чего погружали в жидкий азот. Два указанных режима были выбраны нами из тех соображений, что они обеспечивают разную степень сохранности микроорганизмов при замораживании. В данной работе для нас представляло интерес сопоставить величину эффекта действия озона на клетки, испытывавшие повреждения различной степени в результате замораживания-оттаивания.

Оттаивание образцов проводили на водяной бане при 37°C. Степень сохранности грибов *Candida albicans* после замораживания-оттаивания определяли чашечным методом Коха на основании подсчета числа колониеобразующих единиц (КОЕ) на агаризованной среде.

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, содержащего растворенный озон в известной концентрации, вводили в ростовую среду для микроорганизмов.

## Результаты и обсуждение

На рис. 1 представлены полученные нами кинетические кривые роста бактерий *Esherichia coli* при 37<sup>0</sup>С в виде зависимостей оптической плотности ростовой среды от времени при разных дозах озона в ростовой среде.

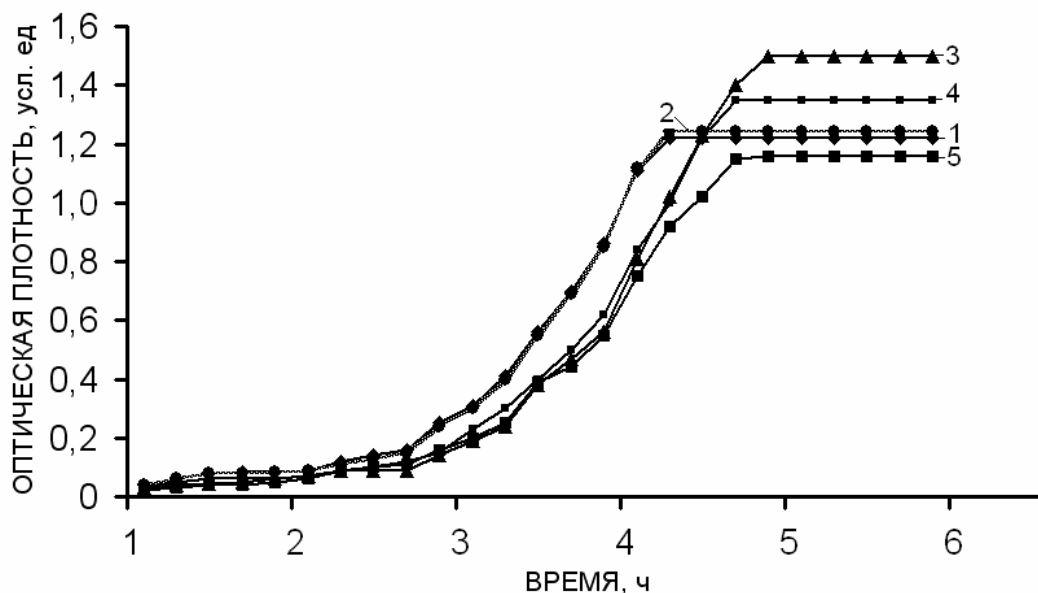


Рис. 1 Кинетические кривые роста бактерий *Esherichia coli* в ростовой среде М9 при 37<sup>0</sup>С в присутствии различных доз озона. 1 – контроль (без озона); 2 – 0,0013 мг/л; 0,013 мг/л; 0,062 мг/л; 3 – 0,35 мг/л; 4 – 0,12 мг/л; 5 – 0,57 мг/л.

Концентрации озона рис. 1 указаны в расчете на единицу объема ростовой среды. Видно, что при концентрации 0,12 и 0,35 мг/л озона в ростовой среде наблюдается увеличение количества бактерий в среде на линейной фазе роста. При дозе 0,67 мг/л наблюдается эффект угнетения роста клеток озоном.

Действие малых доз озона на микроорганизмы в условиях замораживания-оттаивания проводили на дрожжеподобных грибах *Candida albicans*.

Клетки замораживали в ростовой среде без криопротекторов со скоростями 2<sup>0</sup>С/мин и 400<sup>0</sup>С/мин. до -196<sup>0</sup>С и отогревали в водяной бане. Дозированные количества озона добавляли в суспензию клеток непосредственно перед замораживанием. Результаты этих исследований представлены в таблице 1.

Таблица 1

Жизнеспособность дрожжеподобных грибов *Candida albicans* после замораживания в растворах, содержащих озон (озон добавляли перед замораживанием)

Режим замораживания	% жизнеспособных клеток после замораживания - оттаивания					
	Контроль, среда без озона	Доза озона, мг/л				
		0,16	0,32	0,48	0,64	0,8
Одноступенчатое замораживание	47,8 ± 2,9	61,7 ± 2,9	66,9 ± 4,2	65,5 ± 4,7	61,2 ± 3,1	42,5 ± 5,7
Двухступенчатое замораживание	35,3 ± 3,1	56,7 ± 3,4	50,2 ± 5,0	33,9 ± 3,5	15,1 ± 7,2	3,4 ± 1,8

Как видно из таблицы, эффект стимулирующего действия озона не одинаков для разных скоростей замораживания. При замораживании грибов в присутствии озона в концентрации 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 медленно, более высокую жизнеспособность наблюдали при концентрации озона 0,16 – 0,48 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. При этом наблюдается синергизм в повреждающем действии озона и замораживания-оттаивания на сохранность микроорганизмов. Эффект стимуляции роста грибов *Candida albicans* наблюдается именно при малых дозах озона.

Стерилизующее действие газообразного озона изучали на бактериях *Escherichia coli*, *Staphilococcus aureus* и *Candida albicans*. Микроорганизмы наносили на миллипоровые мембранные фильтры (Millipore USA GSW POM 250), задерживающие клетки бактерий и грибов. Миллипоровые фильтры размещали на фильтровальной бумаге. На каждый фильтр наносили по 0,2 мл. микробных суспензий с исходной концентрацией  $10^8$  КОЕ/мл. Фильтры выдерживали на фильтровальной бумаге до удаления физиологического раствора с поверхности фильтров. Фильтры помещали в открытые чашки Петри, которые устанавливали в камеру для озонирования. Образцы выдерживали в атмосфере озона 3 и 6 часов при комнатной температуре и

затем помещали в герметичную камеру и обрабатывали газовой озono-воздушной смесью с концентрацией озона 6 мг/л. После инкубирования в озоне контрольные и опытные образцы фильтров помещали в 10 мл стерильного физиологического раствора и встряхивали на мешалке 10 - 15 минут для смывания клеток микроорганизмов. Жизнеспособность микроорганизмов определяли путем подсчета числа КОЕ в 1 мл смыва. В этих экспериментах было установлено, что озон оказывает достаточно выраженное повреждающее действие на микроорганизмы, находившиеся на миллиметровых фильтрах. (табл. 2)

Таблица 2

Жизнеспособность микроорганизмов, нанесенных на миллиметровые фильтры после инкубирования в озоне в течение 1, 3 и 6 часов.

Микроорганизмы	Время инкубирования микроорганизмов в озоне, час		Число КОЕ/мл, $x \pm Sx$
Escherichia coli	1	контроль	$(4,5 \pm 0,3) 10^8$
		опыт	$(1,2 \pm 0,3) 10^8$
	3	контроль	$(1,2 \pm 0,2) 10^8$
		опыт	$(7,6 \pm 0,3) 10^4$
	6	контроль	$(4,2 \pm 0,4) 10^7$
		опыт	0
Staphilococcus aureus	1	контроль	$(2,3 \pm 0,3) 10^8$
		опыт	$(0,9 \pm 0,5) 10^8$
	3	контроль	$(2,1 \pm 0,4) 10^7$
		опыт	$(4,6 \pm 0,3) 10^4$
	6	контроль	$(6,7 \pm 0,3) 10^4$
		опыт	0
Candida albicans	1	контроль	$(3,4 \pm 0,3) 10^8$
		опыт	$(6,8 \pm 0,3) 10^7$
	3	контроль	$(5,1 \pm 0,4) 10^7$
		опыт	$(2,9 \pm 0,2) 10^7$
	6	контроль	$(1,0 \pm 0,3) 10^7$
		опыт	0

Примечание:  $x$  – среднее арифметическое;  $Sx$  – среднее квадратичное отклонение.

Видно, что за время обработки газообразным озоном около 6 ч в тех условиях, в которых проводился эксперимент, наступает полная инактивация микроорганизмов. Это указывает на возможность использования газообразного озона для стерилизации оборудования и помещений, что может найти практическое применение в технологии криоконсервирования биологических объектов.

#### **Выводы.**

1. Экспериментально на бактериях *Escherichia coli* показано, что определенные малые дозы озона, введенные в среду инкубирования, стимулируют рост микроорганизмов в нормальных физиологических условиях.
2. На примере грибов *Candida albicans* показано, что при введении в ростовую среду озона в определенных малых дозах наблюдается интенсификация процесса репарации в клетках после замораживания-оттаивания.
3. При высоких дозах озона, введенного в ростовую среду, наблюдается угнетение роста микроорганизмов и проявляется синергизм факторов повреждающего действия озона и повреждающего действия замораживания-оттаивания на клетки в ходе их криоконсервирования.
4. Показано, что озон в газообразном состоянии может быть использован для стерилизации криобиологического оборудования, которое не может подвергаться стерилизации путем нагрева.

#### **Литература.**

1. Виноград-Финкель Ф.Р., Федорова Л.И., Семенова Н.В. и др. //Пробл. гематол. и перелив. крови., 1980, № 1, с. 8 – 11.
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. Кримоиммунология// Цуцаева А.А., Гольцев А.Н., Попов Н.Н. и др. Ин-т проблем криобиологии и криомедицины. – Киев: Наук. думка, 1988. – с.25 – 28.