

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ  
ІНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРІОБІОЛОГІЇ І КРІОМЕДИЦИНИ

Марущенко Володимир Васильович

УДК 57.043:54.001.573:582.282.23

АНАЛІЗ ПРОЦЕСІВ ЗАМОРОЖУВАННЯ ДРІЖДЖОПОДІБНИХ ГРИБІВ *SACCHAROMYCES*  
*CEREVISIAE* З УРАХУВАННЯМ РОЗКИДУ УМОВ ОХОЛОДЖЕННЯ В ЗРАЗКУ

03.00.19 - кріобіологія

Автореферат  
дисертації на здобуття наукового ступеня  
кандидата біологічних наук

Харків - 2009

Дисертацією є рукопис

Робота виконана у відділі низькотемпературної консервації Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України

**Науковий керівник:**

доктор біологічних наук, професор **Гордієнко Євген Олександрович**, Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, завідувач відділу низькотемпературної консервації

**Офіційні опоненти:**

доктор біологічних наук, професор **Зінченко Василь Демидович**, Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, головний науковий співробітник відділу кріобіофізики

кандидат біологічних наук, доцент **Гаташ Сергій Васильович**, Харківський національний університет ім. В.Н. Каразіна, завідувач кафедри біологічної і медичної фізики

Захист дисертації відбудеться “ 20 ” жовтня 2009р. о 13<sup>30</sup> годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 64.242.01 при Інституті проблем кріобіології і кріомедицини НАН України за адресою 61015, м. Харків, вул. Переяславська, 23

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України за адресою 61015, м. Харків, вул. Переяславська, 23

Автореферат розісланий “ 15 ” вересня 2009р.

Вчений секретар

спеціалізованої вченої ради

академік НАН України

А.М. Гольцев

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність теми.** Наразі для кріоконсервування клітинних суспензій використовуються як повільні, так і швидкі й надшвидкі лінійні або кусочно-лінійні режими охолодження, а також швидке двохступінчасте заморожування, при якому швидкість охолодження не є сталою величиною. Теоретично й експериментально встановлені фізико-хімічні фактори, від яких залежить кріопшкодження кожної окремої клітини в зразку [Miller R.H., Mazur P., 1976; Грищенко В.И., Калугин Ю.В., Лучко Н.А., 1993; Abbeel E., Camus M., Waesberghe L. et al., 1997]. Вважається, що до таких факторів належать швидкість охолодження й відігрівання, ступінь і кінетика зневоднювання клітин, кількість кріопротектора в поза- і внутрішньоклітинному середовищі, розмір кристалів льоду, величина переохолодження кріозахисного розчину й цитоплазми. Всі зазначені фактори кріопшкодження є неоднаковими в різних точках біологічного об'єкта, що заморожується, внаслідок чого різні клітини можуть неоднаково пошкоджуватися залежно від їхнього положення в контейнері, у якому міститься клітинна суспензія. Вплив цього чинника на ефективність кріоконсервування біологічних об'єктів відзначається тільки в окремих роботах [Hayes L.J., Diller K.R., Chang H.J., Lee H.S., 1988, Грищенко В.И., Дунаевская А.В., 2002, Бабенко В.И., Грищенко В.И., Дунаевская А.В., 2005], а цілеспрямоване дослідження цієї проблеми в аспекті кріобіологічних задач майже повністю відсутнє. У переважній більшості робіт з кріоконсервування біоб'єктів взагалі не реєструються і не надаються у повному обсязі дані про умови проведення експериментів і реалізації кріобіологічних технологій, які дозволили б їх точно відтворити, оскільки не враховується розкид режимних параметрів кріоконсервування уздовж зразка, що заморожується. Таким чином виникає необхідність уточнення таких фундаментальних кріобіологічних понять, як оптимальний режим охолодження й оптимальні умови кріоконсервування. Для розробки нових, удосконалення й практичного використання існуючих способів кріоконсервування біологічних об'єктів необхідно провести аналіз впливу неоднакових умов заморожування клітин у різних точках зразка на результат кріоконсервування.

Без теоретичного аналізу впливу зазначеного ефекту на результат низькотемпературного консервування прикладні завдання часто вирішуються недостатньо ефективно. Наприклад, виникає питання, чи можна по збереженості клітин у невеликих контейнерах – сателітах робити висновки про рівень їхньої збереженості в основному контейнері, де, як правило, міститься значно більший об'єм біологічного матеріалу. Таким чином більш детальне, ніж існуюче, вивчення впливу розкиду режимних параметрів кріоконсервування в контейнері із клітинною суспензією на ефективність цієї процедури є актуальною задачею кріобіології, розв'язання якої сприятиме підвищенню ефективності низькотемпературної консервації біологічних об'єктів.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертаційна робота виконана в межах відомчих науково-дослідних тем Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України «Вивчення впливу умов кріоконсервування й збереження дріжджоподібних грибів, постнатальних фібробластів і клітинних культур» (номер державної реєстрації 0104U03919) і «Теоретичний аналіз і експериментальне дослідження специфічних механізмів кріопошкодження й кріозахисту клітин, обумовлених особливостями їхнього функціонування» (номер державної реєстрації 0106U002164).

**Мета і завдання дослідження:** Метою роботи було визначення оптимальної з точки зору двохфакторної теорії кріопошкодження швидкості охолодження при заморожуванні суспензії дріжджоподібних грибів *Saccharomyces cerevisiae* в фізіологічному розчині і впливу розкиду цього режимного параметра в зразках циліндричної форми на їх колонієутворюючу здатність після циклу «заморожування-відтаювання».

Для досягнення поставленої мети вирішені наступні завдання:

1) теоретично оцінити значення оптимальної швидкості охолодження суспензії дріжджоподібних грибів *Saccharomyces cerevisiae* у фізіологічному розчині на етапі кристалізації, спираючись на літературні та власні дані щодо геометричних і транспортних характеристик цих клітин;

2) на основі узагальнення отриманих при вирішенні попередньої задачі результатів сформулювати алгоритм кількісної оцінки оптимальної (з точки зору двохфакторної теорії кріопошкодження) швидкості охолодження при заморожуванні суспензії мікроорганізмів у бінарному водному розчині за даними про їх геометричні й транспортні характеристики в області позитивних температур;

3) методами термографії і програмного заморожування експериментально визначити розподіл швидкості охолодження при заморожуванні суспензії дріжджоподібних грибів *Saccharomyces cerevisiae* у фізіологічному розчині в залежності від розміру і режиму охолодження контейнера з цим біооб'єктом;

4) методом математичного моделювання апроксимувати універсальною аналітичною залежністю експериментально отримані термограми охолодження суспензії дріжджоподібних грибів *Saccharomyces cerevisiae* у діапазоні температур від початку кристалізації суспензії до евтектичної температури позаклітинного розчину;

5) встановити зв'язок між розподілом швидкості охолодження в контейнері при заморожуванні дріжджоподібних грибів *Saccharomyces cerevisiae* і їх колонієутворюючою здатністю після заморожування-відтаювання.

**Об'єкт дослідження.** Процес заморожування дріжджоподібних грибів *Saccharomyces cerevisiae* та його вплив на збереженість розморожених мікроорганізмів.

*Предмет дослідження.* Процес заморожування суспензії дріжджоподібних грибів *Saccharomyces cerevisiae* у фізіологічному розчині в контейнерах різного розміру за різних режимів охолодження і його вплив на колонієутворюючу здатність цих клітин після циклу «заморожування - відтаювання».

*Методи дослідження:* вольюмометричний метод визначення коефіцієнтів проникності клітинних мембран для молекул води; програмне заморожування для реалізації різних умов заморожування мікроорганізмів; термографія для експериментального визначення температури та швидкості її зміни у різних точках зразка, що заморожується; світлова мікроскопія для визначення геометричних характеристик дріжджоподібних грибів *Saccharomyces cerevisiae*; визначення збереженості дріжджоподібних грибів чашковим методом Коха за кількістю макроколоній, що утворилися на твердому живильному середовищі, для визначення ефективності різних режимів охолодження; чисельне рішення на ЕОМ рівнянь трансмембранного переносу води для теоретичного аналізу кінетики пересичення клітин при заморожуванні мікроорганізмів.

**Наукова новизна отриманих результатів.** Вперше експериментально визначений розподіл швидкості охолодження в контейнерах циліндричної форми різного розміру при заморожуванні суспензії дріжджоподібних грибів *Saccharomyces cerevisiae*.

Встановлено, як розкид швидкості охолодження в об'ємі контейнера впливає на колонієутворюючу здатність цих мікроорганізмів після циклу «заморожування-відтаювання».

Сформульовано модель внутрішньоклітинного кристалоутворення, на основі якої розроблено оригінальний алгоритм теоретичної оцінки оптимальної швидкості охолодження мікроорганізмів на етапі кристалізації суспензії в бінарному водному розчині.

Отримано експериментальні дані, які є підставою до перегляду існуючих поглядів на оптимальний режим охолодження клітинних суспензій, оскільки збереженість однієї й тієї ж клітинної суспензії залежить від розміру контейнера, в якому вона заморожується, і швидкості зниження температури середовища, яке оточує контейнер з біооб'єктом. Для зразків порівняно великого розміру у зв'язку з існуванням значного розкиду швидкостей охолодження уздовж зразка виникає необхідність уточнення самого поняття «швидкість охолодження» і необхідність розробки нових, більш точних, ніж існуючі, вимог до визначення й опису оптимальних умов низькотемпературного консервування біологічних об'єктів.

**Практичне значення отриманих результатів.** Отримані в роботі результати можуть бути використані при розробці способів кріоконсервування мікроорганізмів у великих (промислових) об'ємах, для стандартизації вимог до наукового й техніко-економічного обґрунтування технологій кріоконсервування, а також при створенні апаратури для їх реалізації. Можливість здійснення за допомогою запропонованого в роботі алгоритму попередньої (до проведення експериментів по заморожуванню) оцінки оптимальної швидкості охолодження мікроорганізмів на основі невеликої

кількості даних про їх геометричні й транспортні характеристики в області позитивних температур сприятиме скороченню обсягу експериментальних робіт при розробці способів криоконсервування цих біологічних об'єктів.

**Особистий внесок здобувача.** Автором роботи самостійно проведено аналіз літератури за темою дисертації, створено теоретичну модель, яка дозволяє оцінити значення оптимальної швидкості охолодження суспензії клітин у бінарному водному розчині, особисто отримані експериментальні результати, які представлені в розділах 3 і 4 дисертації. Автором самостійно здійснені статистичний аналіз й інтерпретація отриманих експериментальних даних. В опублікованих спільно зі співавторами наукових працях особистий внесок здобувача полягає в наступному:

- у роботі [1] – у виконанні розрахунків і проведенні порівняльного аналізу створеної моделі з існуючими моделями;

- у роботі [2] – у плануванні та проведенні експериментів і в аналізі їх результатів;

- у роботі [3] – у виведенні теоретичної залежності середнього часу льодоутворення всередині клітин *Saccharomyces cerevisiae* від ступеня пересичення внутрішньоклітинного розчину;

- у роботі [4] – в експериментальному дослідженні впливу режимів охолодження на колонієутворюючу здатність декріоконсервованих мікроорганізмів;

- у роботі [5] – у виконанні чисельних розрахунків на ЕОМ при апроксимації експериментальних даних теоретичними залежностями та у проведенні експериментів;

- у роботі [6] – в участі в експериментах по визначенню температурного поля в зразках, що заморожуються, та колонієутворюючої здатності мікроорганізмів *Saccharomyces cerevisiae* після циклу заморожування-відтаювання;

- у роботах [7, 8] – в участі в проведенні експериментів для визначення геометричних характеристик *Saccharomyces cerevisiae* та обговоренні результатів дослідження;

- у роботі [9] – у теоретичній оцінці оптимальної швидкості охолодження суспензії мікроорганізмів;

- у роботі [10] – у здійсненні програмного заморожування зразків і визначенні розподілу швидкості охолодження при кристалізації суспензії мікроорганізмів в контейнерах циліндричної форми.

**Апробація результатів дисертації.** Результати проведених досліджень були представлені і обговорювались на XXIII науковій конференції країн СНД «Дисперсні системи» (м. Одеса, 2008), на міжнародній конференції «Нові технології для рішення фундаментальних та прикладних задач медицини» (м. Харків, 2008), на 2-й Всеукраїнській науковій конференції молодих вчених «Фізика низьких температур»

(м. Харків, 2009), на конференції молодих вчених «Холод в біології і медицині» (м. Харків, 2009).

**Публікації.** За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 5 статей у наукових фахових виданнях і 5 тез доповідей на наукових конференціях.

**Структура та обсяг дисертації.** Дисертаційна робота складається зі вступу, огляду літератури, розділу «Матеріали і методи дослідження», двох розділів з результатами власного дослідження, підсумку, висновків і списку використаної літератури, який містить 120 першоджерел на 12 сторінках. Робота проілюстрована 33 рисунками і 10 таблицями. Повний обсяг дисертації складає 120 сторінок.

## ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

**У вступі** обґрунтовано актуальність теми, зв'язок дисертації з науковими програмами і темами, сформульовано мету і завдання дослідження, показано новизну і практичну цінність отриманих результатів, вказано особистий внесок здобувача в опубліковані із співавторами роботи.

**У першому розділі** «Сучасні уявлення щодо оптимального режиму охолодження суспензії клітин при їх криоконсервуванні» представлено огляд літератури за темою дисертації, проведено аналіз впливу швидкості охолодження на пошкодження клітин різними фізико-хімічними чинниками при глибокому заморожуванні клітинної суспензії і, спираючись на літературні дані, доведена провідна роль цього режимного параметру у досягненні позитивного результату низькотемпературного консервування біологічних об'єктів.

**У другому розділі** «Матеріали і методи дослідження» наведено методи дослідження, описані умови та порядок проведення експерименту. Як біологічний об'єкт дослідження використовували хлібопекарські дріжджоподібні гриби *Saccharomyces cerevisiae* (паса 608, СП ВО РНДІХП, Санкт-Петербург). Вибір об'єкта дослідження обумовлений тим, що транспортні та геометричні характеристики цих клітин, дані про які необхідні для кількісного аналізу процесу заморожування суспензії, наразі визначені з достатньо великою точністю. Дріжджоподібні гриби *Saccharomyces cerevisiae* на відміну від клітин ссавців не втрачають життєздатності у дистильованій воді і переносять заморожування в бінарному водному розчині. Остання обставина суттєво полегшує моделювання процесів, що протікають при заморожуванні клітинної суспензії, оскільки діаграми плавлення бінарних водних розчинів відомі та є простими у порівнянні з діаграмами плавлення багатоконпонентних розчинів. В роботі для заморожування клітин *Saccharomyces cerevisiae* використовували контейнери циліндричної форми, оскільки при такій формі контейнера теплове поле і процес кристалізації залежать практично від одної (радіальної)

координати, що значно спрощує проведення експериментів та теоретичний аналіз отриманих результатів.

Дріжджоподібні гриби вирощували на скошеному суслі-агарі при температурі 30 °С впродовж 48 годин. Надалі клітини двічі змивали фізіологічним розчином, осаджали центрифугуванням (300 об/хв упродовж 15 хвилин). Осад ресуспендували в 0,15 М водному розчині хлориду натрію. Здійснюючи серію розведень, доводили щільність клітин в суспензії до значень, оптимальних для визначення їх колонієутворюючої здатності. Контроль висівали на тверде живильне сусло-агарове середовище (по 6 чашок Петрі на кожне розведення). Чашки Петрі з контрольними зразками термостатували при 30 °С впродовж 48 годин, після чого визначали життєздатність клітин у контрольних зразках «чашковим методом» Коха за кількістю макроколоній, що утворились. Паралельно суспензію *Saccharomyces cerevisiae* з розведення, аналогічного контролю, заморожували в кріокамері програмного охолоджуючого пристрою УОП–06, розробленого та виготовленого в СКТБіДВ ІПКіК НАН України.

Відтаювання заморожених зразків здійснювали через три доби у водній ванні при 30 °С. Вміст контейнерів висівали на чашки Петрі з твердим живильним сусло-агаровим середовищем після чого, як і в контролі, визначали життєздатність клітин у розморожених зразках чашковим методом.

Суспензія дріжджоподібних клітин заморожувалася в контейнерах циліндричної форми, виготовлених з термостійкого пластику, з діаметрами 10 мм, 20 мм або 30 мм. Датчиками, що вимірюють температуру усередині зразка, який заморожується, слугували попередньо відкалібровані мідь-константанові термопари, які розташовувалися у зразку, що заморожувався, так, як показано на рис.1.

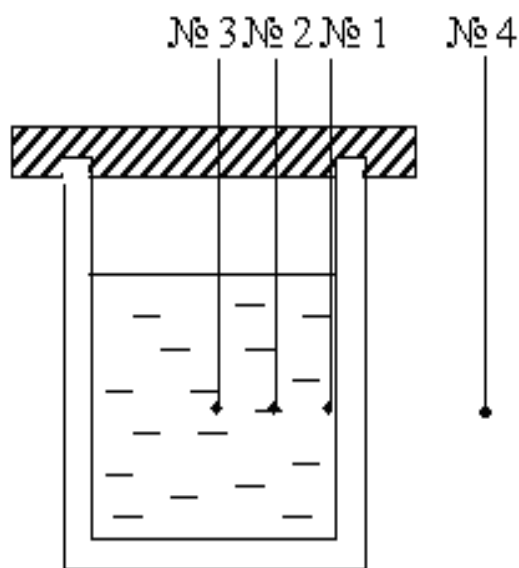


Рис. 1. Схема розміщення термопар у циліндричному контейнері.



Управління режимом заморожування і контроль температури в камері заморожувача УОП–06 здійснювалися за допомогою термометра опору (рис.1, № 4). Інформацію про температурне поле в зразку, що заморожувався, одержували, реєструючи термограми в одному (контрольному) із чотирьох контейнерів самописним потенціометром КСП–4.

Для заморожування мікроорганізмів у контейнерах кожного розміру використовувались три програми заморожування, за яких температура в кріокамері, яка реєструвалася термометром опору, зменшувалася з постійною швидкістю 1 °С/хв, 5 °С/хв або 10 °С/хв.

Транспортні характеристики клітинних мембран визначалися волюмометричним методом з використанням апроксимації експериментальних залежностей рішенням модифікованих нами рівнянь трансмембранного масопереносу. Геометричні параметри клітин визначали візуально під мікроскопом LSM 510 META. Для теоретичної оцінки оптимальної швидкості охолодження на етапі кристалізації суспензії дріжджоподібних грибів *Saccharomyces cerevisiae* використовували чисельне комп'ютерне моделювання.

Кінетику зневоднення клітин на етапі кристалізації клітинної суспензії визначали розрахунковим шляхом на основі рівнянь трансмембранного масопереносу, які є одним з окремих випадків феноменологічних рівнянь лінійної термодинаміки незворотних процесів. Чисельне вирішення рівнянь, що описують зміну пересичення внутрішньоклітинного розчину з часом при заморожуванні *Saccharomyces cerevisiae*, проводили на ЕОМ стандартним методом Рунге-Кутта четвертого порядку.

Для апроксимації експериментальних даних про швидкість охолодження клітин в різних точках заморожуваного зразка параболічною залежністю використовувався стандартний метод найменших квадратів. Статистичну обробку експериментальних результатів здійснювали стандартним методом з використанням t-критерію Стьюдента.

Матеріали і методи розглянуто і схвалено комісією з біоетики ІПКіК НАН України.

**У третьому розділі** «Кількісна оцінка оптимальної швидкості охолодження суспензії *Saccharomyces cerevisiae* у фізіологічному розчині на етапі кристалізації» розроблений алгоритм розрахунку оптимальної швидкості охолодження суспензії мікроорганізмів на етапі кристалізації у бінарному водному розчині за наявності невеликої кількості даних про геометричні і транспортні параметри клітин, які кріоконсервуються.

На основі термодинамічної теорії утворення кристалів в розчинах Я. І. Френкеля та загальної теорії процесів активаційного типу отримана залежність між пересиченням внутрішньоклітинного розчину  $\bar{a}_e - c_e$  і середнім часом  $\langle t \rangle_i$ , після спливання якого при цьому пересиченні в дріжджоподібних грибах *Saccharomyces cerevisiae* починається внутрішньоклітинна кристалізація:

$$\langle t \rangle_i = \frac{A}{\left( \frac{\tilde{c}_e}{c_0} - \frac{c_e}{c_0} \right)^2} \exp \left[ \frac{16\pi}{3kT} \frac{v_i^2 \sigma^3}{RT - v_w^2 c_0^2 \left( \frac{\tilde{c}_e}{c_0} - \frac{c_e}{c_0} \right)^2} \right], \quad (1)$$

де  $A$  – передекспоненційний множник;

$T$  – абсолютна температура;

$c_e$  – концентрація внутрішньоклітинного розчину при температурі  $T$  ;

$\tilde{c}_e$  – концентрація хлориду натрію, що відповідає точці плавлення на кривій рівноваги розчину  $NaCl$  – вода при температурі  $T$  ;

$c_0$  – початкова (до заморожування) концентрація позаклітинного розчину;

$k$  – постійна Больцмана;

$\sigma$  – коефіцієнт поверхневого натягу границі поділу твердої і рідкої фаз;

$v_i, v_w$  – об'єм молекули води в кристалічній і рідкій фазі відповідно;

$R$  – універсальна газова стала.

За відомими значеннями констант, що фігурують у цьому виразі, обчислені коефіцієнти

$$B = \frac{16\pi v_i^2 \sigma^3}{3kT_{K_0} (RT_{K_0})^2 v_w^2 c_0^2} = 169,45, \quad A = 300с, \quad \text{де } T_{K_0} - \text{температура плавлення розчину з початковою}$$

концентрацією  $c_0$ .

Отримана у такий спосіб залежність часу, при якому починається внутрішньоклітинне льодоутворення в дріжджоподібних грибах *Saccharomyces cerevisiae*, від величини пересичення їхнього внутрішньоклітинного розчину  $x = \frac{\tilde{c}_e}{c_0} - \frac{c_e}{c_0}$  графічно представлена пунктирною лінією на рис. 2.

Як видно, велике, але нетривале пересичення внутрішньоклітинного розчину не призводить до льодоутворення в клітинах, тоді як невелике, але довготривале пересичення, навпаки, може призвести до утворення кристалів льоду всередині клітин і, отже, до їх кріопшкодження. Залежність пересичення внутрішньоклітинного розчину в дріжджоподібних грибах *Saccharomyces cerevisiae* від часу при кристалізації суспензії цих клітин у фізіологічному розчині визначалась шляхом чисельного вирішення рівнянь Кедем-Качальського в створеній нами модифікації з використанням відомих для цих мікроорганізмів та визначених нами геометричних і транспортних характеристик. Результати розрахунків представлені на рис. 3 суцільними лініями. Для того, щоб визначити, за яких швидкостей охолодження відбувається внутрішньоклітинна кристалізація, необхідно порівняти залежність часу, протягом якого одноклітинний дріжджоподіб

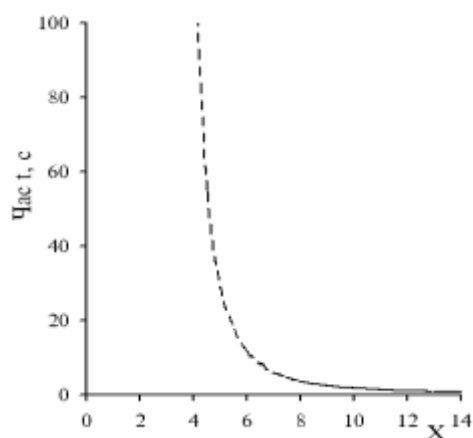


Рис. 2. Залежність часу, необхідного для початку льодоутворення в дріжджоподіб-них грибах *Saccharomyces cerevisiae*, від пересичення внутрішньоклітинного розчину.

ний гриб *Saccharomyces cerevisiae* у процесі заморожування перебуває за різних пересичень (суцільні криві на рис. 3) із поданою на рис. 2 залежністю середнього часу утворення кристала льоду в клітині від величини пересичення її внутрішньоклітинного розчину.

За швидкостей охолодження  $10\text{ }^{\circ}\text{C/хв}$  і  $20\text{ }^{\circ}\text{C/хв}$  пересичення внутрішньоклітинного розчину є достатнім для утворення внутрішньоклітинних кристалів льоду, про що свідчить перетинання відповідних суцільних та пунктирної кривих на рис.3. За цих швидкостей охолодження внутрішньо

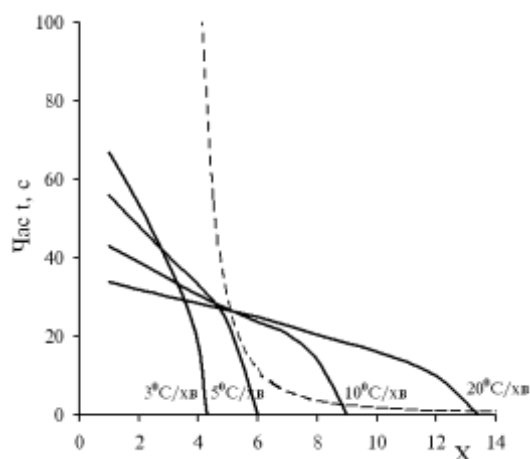


Рис. 3. Тривалість часу, впродовж якого дріжджоподібні гриби *Saccharomyces cerevisiae* перебувають при пересиченні  $x$ , від величини пересичення  $x$  за різних швидкостей охолодження.

клітинні кристали льоду обов'язково утворюються. За швидкості охолодження  $5\text{ }^{\circ}\text{C/хв}$  пунктирна крива, що описує залежність імовірності внутрішньоклітинного кристалоутворення від пересичення внутрішньоклітинного розчину, і залежність «пересичення внутрішньоклітинного розчину мікроорганізмів – час» не перетинаються, хоча ці криві проходять близько одна від одної. Таким чином, за швидкості охолодження  $5\text{ }^{\circ}\text{C/хв}$  пересичення внутрішньоклітинного розчину

виявляється недостатнім для утворення льоду усередині клітин. За більш повільних, ніж  $5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{хв}$  швидкостей охолодження, внутрішньоклітинний лід також не утворюється, але ці швидкості менш ефективні, ніж  $5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{хв}$ , тому, що при цьому клітини більш тривалий проміжок часу перебувають в умовах, що сильно відрізняються від нормальних. Таким чином, швидкість охолодження  $5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{хв}$  є оптимальною для досліджуваних клітин з погляду двохфакторної теорії кріопшкодження.

Задовільна узгодженість між отриманою кількісною оцінкою оптимальної швидкості охолодження з існуючими в літературі експериментальними даними свідчить як про справедливість двохфакторної теорії кріопшкодження клітин, так і на користь адекватності сформульованої в роботі моделі внутрішньоклітинного кристалоутворення.

У четвертому розділі «Вплив швидкості охолодження і розмірів зразка на колонієутворюючу здатність дріжджоподібних грибів *Saccharomyces cerevisiae* після заморожування-відтаювання» визначено розподіл швидкостей охолодження в суспензії мікроорганізмів *Saccharomyces cerevisiae* у фізіологічному розчині під час заморожування їх в контейнерах циліндричної форми різного (10, 20 і 30 мм) діаметра зі швидкостями 1, 5 і  $10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{хв}$  (за датчиком на зовнішній поверхні контейнера), а також вплив розподілу швидкостей охолодження та розмірів контейнера на колонієутворюючу здатність цих мікроорганізмів після «заморожування-відтаювання».

На рис. 4 показана типова термограма охолодження мікроорганізмів *Saccharomyces cerevisiae* в  $0,15\text{ M}$  водному розчині хлориду натрію.

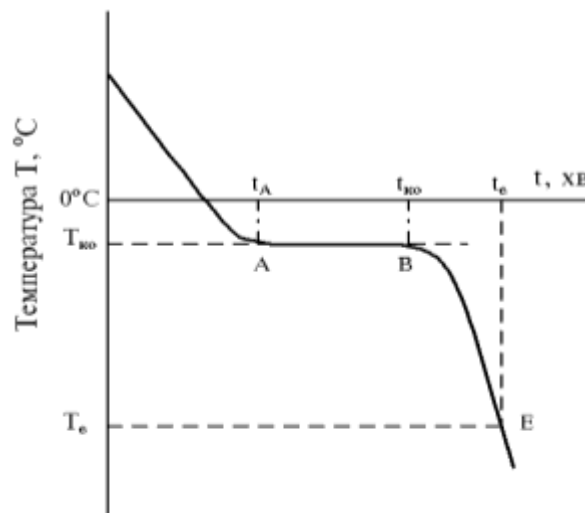


Рис. 4. Типова термограма охолодження суспензії *Saccharomyces cerevisiae* у фізіологічному розчині в циліндричному контейнері:  $t_A$  – момент початку кристалізації в певній точці зразка;  $T_{K0}$  – температура початку кристалізації;  $T_e$  – температура евтектики позаклітинного розчину;  $t_e$  – момент досягнення евтектичної температури в певній точці зразка;  $t_{K0}$  – момент часу, що відповідає проходженню умовного фронту кристалізації через точку, в якій перебуває термopара.

В таблиці 1 і на рис. 5, як приклад, подані отримані дані багатоточкової термографії розподіли швидкості охолодження під час заморожування суспензії дріжджоподібних грибів *Saccharomyces cerevisiae* в 0,15М водному розчині хлориду натрію. Як видно, швидкість охолодження клітин на етапі кристалізації суспензії змінюється в залежності від їх розміщення в зразку, а саме, швидкість охолодження поблизу осі контейнера перевищує швидкість охолодження біля стінки контейнера в кілька разів.

Таблиця 1

**Тривалість етапу кристалізації  $t_e - t_{K0}$  та середня швидкість охолодження на етапі кристалізації  $\bar{\beta} = \frac{T_e - T_{K0}}{t_e - t_{K0}}$  при заморожуванні суспензії *Saccharomyces cerevisiae* в фізіологічному розчині в циліндричному контейнері діаметром 30 мм в залежності від швидкості охолодження зовнішньої поверхні контейнера та розміщення термопар у зразку.**

Номер термопар	Швидкість зміння температури в кріостаті, °C/хв	$t_e - t_{K0}$ , хв	$\frac{T_e - T_{K0}}{t_e - t_{K0}}$ , °C/хв
1	-1	24,9 ± 2,6	1,0 ± 0,1
	-5	9,3 ± 1,3	2,3 ± 0,3
	-10	5,5 ± 0,9	4,0 ± 0,7
2	-1	11,9 ± 2,0	1,8 ± 0,4
	-5	5,1 ± 0,5	4,2 ± 0,5
	-10	2,5 ± 0,5	8,1 ± 1,1
3	-1	3,5 ± 0,6	6,1 ± 1,8
	-5	1,5 ± 0,3	14,2 ± 1,2
	-10	1,0 ± 0,2	21,3 ± 2,1

Очевидно, життєздатність замороженої-відігрітої суспензії мікроорганізмів у цілому залежить від розкиду швидкості охолодження в контейнері. З урахуванням отриманого експериментально розподілу швидкості охолодження можна визначити, як життєздатність всієї кріоконсервованої суспензії мікроорганізмів у цілому залежить від розкиду швидкостей охолодження в біоб'єкті, що заморожується.

Припустимо, що внаслідок розкиду клітинних параметрів у популяції мікроорганізмів

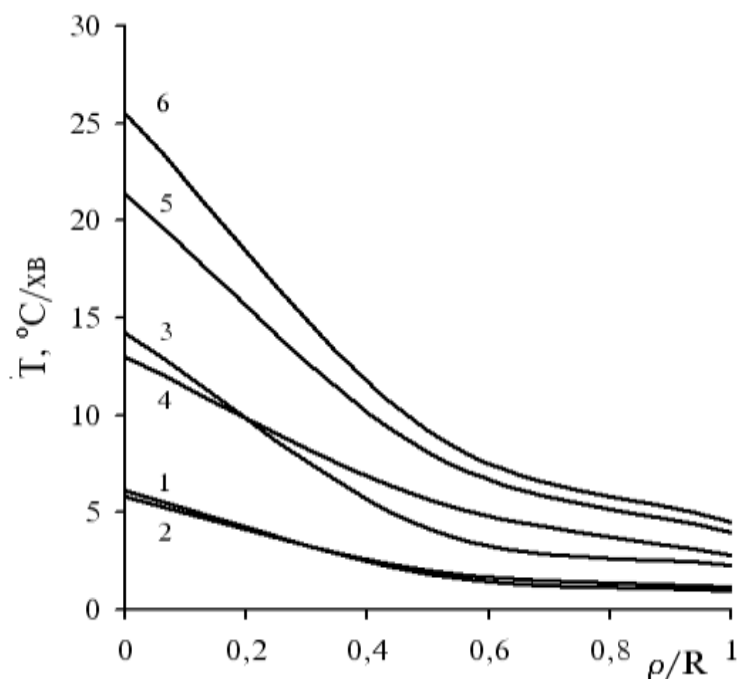


Рис. 5. Залежність локальної швидкості охолодження на етапі кристалізації від приведеної відстані  $\rho/R$  клітини до осі контейнера, що заморожується, за різних значень швидкості зміни температури холодоагента в криокамері заморозувача  $\beta$  і радіусу контейнера  $R$ : 1)  $R=15$  мм,  $\beta = 1$   $^{\circ}\text{C}/\text{хв}$ ; 2)  $R = 10$ мм,  $\beta = 1$   $^{\circ}\text{C}/\text{хв}$ ; 3)  $R = 15$  мм,  $\beta = 5$   $^{\circ}\text{C}/\text{хв}$ ; 4)  $R=10$ мм,  $\beta = 5$   $^{\circ}\text{C}/\text{хв}$ ; 5)  $R=15$  мм,  $\beta = 10$   $^{\circ}\text{C}/\text{хв}$ ; 6)  $R=10$  мм,  $\beta = 10$   $^{\circ}\text{C}/\text{хв}$ .

життєздатність клітини  $s$  залежить від усередненої в діапазоні температур  $T_{k0} \dots T_e$  швидкості охолодження  $\bar{\beta}$  в місці їх розташування таким чином:

$$s = \text{const} \bar{\beta}^p \exp\left(-\frac{\bar{\beta}}{m}\right) \quad (2)$$

Графік цієї залежності при  $n=4$ ,  $m=1$  приведений на рис.6.

Якщо клітини в суспензії розподілені однорідно з щільністю  $n$ , то загальна кількість клітин в суспензії, очевидно, дорівнює  $n\pi R^2 L$ , де  $R$  – радіус циліндричного контейнера і  $L$  – висота контейнера. Доля клітин, які на етапі кристалізації зразка охолоджуються з швидкостями охолодження в діапазоні  $\bar{\beta} \dots \bar{\beta} + d\bar{\beta}$ , дорівнює  $2 \frac{\rho}{R} d \frac{\rho}{R}$ , де  $\frac{\rho}{R}$  як функція швидкості охолодження  $\bar{\beta}$  визначається за експериментальними даними, аналогічними тим, що представлені на рис. 5.

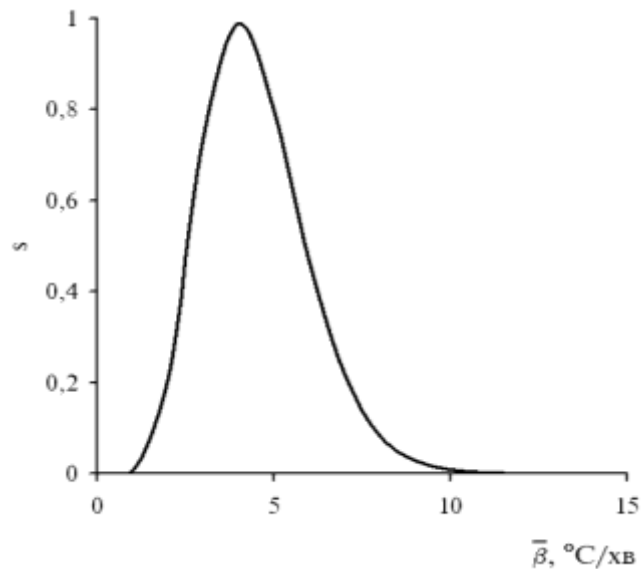


Рис. 6. Залежність життєздатності окремих клітин від локальної швидкості охолодження  $\bar{\beta}$  в місці їхнього розташування.

Життєздатність зразка в цілому  $\bar{S}$  з урахуванням розкиду швидкостей охолодження у контейнері, в якому міститься клітинна суспензія, визначається рівністю

$$\bar{S} = -2 \int_{\dot{T}_{\min}}^{\dot{T}_{\max}} s \frac{B + \sqrt{B^2 - 4C(\rho - \bar{\beta})}}{C\sqrt{B^2 - 4C(\rho - \bar{\beta})}} d\bar{\beta}, \quad (3)$$

де  $s$  визначається виразом (2), а сталі  $A$ ,  $B$  і  $C$  визначаються шляхом апроксимації (методом найменших квадратів) експериментально визначених представлених на рис. 5 залежностей квадратичними функціями  $\bar{\beta} = A + B\frac{\rho}{R} + C\left(\frac{\rho}{R}\right)^2$ . Для досліджуваних нами дріжджоподібних грибів залежність колонієутворюючої здатності деконсервованого мікроорганізму від швидкості охолодження на етапі кристалізації можна розрахувати за рівністю (2) при  $const = 0,2$ ,  $p = 4$ ,  $m = 1$ . Значення цих констант визначені методом підбору з умови найкращої згоди між розрахунковими значеннями життєздатності біооб'єкту після заморожування-відтаювання з приведеними нижче в таблиці 3 експериментальними даними. За допомогою (3) можна обчислити показник життєздатності для всього зразка в цілому за різних умов охолодження. Значення колонієутворюючої здатності суспензії *Saccharomyces cerevisiae*, розраховані таким чином, і експериментально визначена колонієутворююча здатність цих мікроорганізмів після заморожування-відтаювання представлені в таблицях 2 і 3.

Таблиця 2

**Теоретично розраховані (у відсотках порівняно з контролем) значення колонієутворюючої здатності мікроорганізмів *Saccharomyces cerevisiae* в залежності від швидкості охолодження зовнішньої стінки і розміру контейнера**

Швидкість охолодження, °C/хв	Діаметр циліндричного контейнера, мм		
	30	20	10
1	24,4	26,0	35,7
5	48,3	42,0	74,6
10	33,8	31,6	36,5

Таблиця 3

**Експериментально визначені значення колонієутворюючої здатності мікроорганізмів *Saccharomyces cerevisiae* (у відсотках порівняно з контролем) після їхнього заморожування-відтаювання в залежності від швидкості охолодження зовнішньої стінки і розміру контейнера**

Швидкість охолодження, °C/хв	Діаметр циліндричного контейнера, мм		
	30	20	10
1	25,3±4,7	29,8±5,4	39,0±6,1
5	49,7±6,9	34,5±7,5	72,7±6,5
10	34,3±5,2	29,7±4,2	36,7±5,7

Як видно із поданих у цих таблицях даних, розрахункові й експериментально визначені значення колонієутворюючої здатності мікроорганізмів *Saccharomyces cerevisiae* цілком задовільно узгоджуються між собою. Це свідчить про те, що вирішальний внесок у збереженість кріоконсервованих клітин має режим охолодження на етапі кристалізації клітинної суспензії. Як витікає з отриманих результатів, розмір контейнера позначається на збереженості кріоконсервованих клітин. Хоча в досліджених умовах значення оптимальної швидкості охолодження для всього зразка в цілому не залежить від розміру контейнера і дорівнює 5 °C/хв, при цьому значенні швидкості охолодження результат кріоконсервування залежить від розміру зразка, що заморожується.



Оскільки на виживаність клітини у зразку, що заморожується, впливає локальна швидкість охолодження в тій точці зразка, де розташована клітина, збереженість кожної окремої клітини залежить від її місцезнаходження в зразку. Як наслідок цього, збереження кріоконсервованого зразка в цілому залежить як від розміру зразка, так і від швидкості охолодження зовнішньої стінки контейнера, в якому здійснюється заморожування біоб'єкту. Оскільки розкид швидкості охолодження в зразку при його заморожуванні збільшується із збільшенням його розміру і з підвищенням швидкості охолодження, можна стверджувати, що перехід від кріоконсервування біоб'єкту меншого розміру до кріоконсервування крупнішого біоб'єкту буде, як правило, знижувати його збереження. Цей ефект слід враховувати, наприклад, при оцінці життєздатності біоб'єктів, які заморожуються і зберігаються при низькій температурі в контейнерах порівняно великого розміру, по життєздатності клітин у так званих сателітах, які заморожуються і зберігаються разом з ними, але мають значно менші розміри. Крім того, щоб забезпечити високе збереження біоб'єкту після кріоконсервування в контейнерах великого об'єму, необхідно добитися максимального розширення залежності «збереження біоб'єкту - швидкість охолодження». Лише при чималій ширині цієї залежності збереження декріоконсервованого біоб'єкту буде високим, не дивлячись на значний розкид швидкості охолодження в контейнері з біоб'єктом, що заморожується. Іншими словами, розробляючи режим охолодження для кріоконсервації біоб'єкту шляхом його заморожування в контейнерах великого розміру, необхідно добитися не лише високого збереження при якій-небудь певній швидкості охолодження, а забезпечити досить високе збереження клітин в якомога ширшому діапазоні швидкостей. При цьому швидкість охолодження зовнішньої стінки контейнера із біоб'єктом, який заморожується не обов'язково повинна збігатися з оптимальним з точки зору двохфакторної теорії кріопошкодження значенням, а може мати і нижче значення.

Отримані в роботі результати слід мати на увазі при розробці нових автоматичних пристроїв для заморожування біоб'єктів з метою їх низькотемпературної консервації. Вочевидь, як об'єкт регулювання в цих пристроях недоцільно використовувати різницю електричного сигналу між пристроєм, який задає програму охолодження, і датчиком температури, розташованим або усередині біоб'єкту або усередині розчину, що імітує цей біологічний об'єкт, оскільки такий спосіб автоматичного регулювання не дозволяє здійснити його охолодження за задалегідь заданою програмою.

Можливо, при конструюванні автоматичних пристроїв для заморожування необхідно разом з реєстрацією термограми передбачити можливість реєстрації та фіксації певного значення теплового потоку з біологічного об'єкта, який заморожується.

## ВИСНОВКИ

1. У дисертації теоретично обґрунтований і експериментально підтверджений новий підхід до розв'язання проблеми оптимізації умов заморожування біологічних об'єктів порівняно великих розмірів, яка виникає тому, що при кріоконсервуванні біологічних зразків порівняно великого розміру неможливо реалізувати оптимальні умови охолодження для всіх клітин одночасно внаслідок розкиду режимних параметрів охолодження в зразках, які заморожуються. Здійснення за допомогою запропонованого в роботі алгоритму оцінки оптимальної швидкості охолодження мікроорганізмів сприяє підвищенню ефективності способів кріоконсервування цих біоб'єктів і скороченню обсягу експериментальних робіт при їх розробці.

2. Побудовано алгоритм, що дозволяє оцінити значення оптимальної з погляду двохфакторної теорії кріопошкодження швидкості охолодження суспензії одноклітинних мікроорганізмів у бінарному водному розчині на етапі її кристалізації, виходячи з невеликої кількості даних щодо геометричних і транспортних характеристик клітин, які підлягають кріоконсервуванню.

3. Цілком задовільна узгодженість між отриманою в роботі кількісною оцінкою оптимальної швидкості охолодження суспензії дріжджоподібних грибів *Saccharomyces cerevisiae* у фізіологічному розчині на етапі кристалізації з відомими в літературі й власними експериментальними даними свідчить як про справедливість двохфакторної теорії кріопошкодження клітин, так і на користь адекватності сформульованої в роботі моделі внутрішньоклітинного кристалоутворення.

4. Методом багатоточкової термографії визначені поле температур і розподіл швидкості охолодження при заморожуванні суспензії дріжджоподібних грибів *Saccharomyces cerevisiae* у фізіологічному розчині в контейнерах циліндричної форми різного (10, 20 і 30 мм) діаметру зі швидкостями 1, 5 і 10 °C/хв (за датчиком на зовнішній поверхні контейнера).

5. Отримано аналітичний вираз, що апроксимує поле температури в суспензії дріжджоподібних грибів *Saccharomyces cerevisiae* у фізіологічному розчині на етапі її кристалізації в циліндричному контейнері залежно від його діаметра й швидкості охолодження зовнішньої поверхні контейнера.

6. Експериментально встановлено, що клітини, розташовані в центрі зразка, що заморожується, на етапі кристалізації суспензії охолоджуються зі швидкістю, яка в 2-6 разів перевищує швидкість охолодження клітин, розташованих біля стінки циліндричного контейнера.

7. Неоднорідність температурного поля і розкид швидкостей охолодження в зразку збільшуються зі збільшенням розміру зразка й швидкості охолодження контактуючого з ним холодоагенту.

8. Чашковим методом Коха визначена колонієутворююча здатність мікроорганізмів *Saccharomyces cerevisiae* після їхнього заморожування-відтаювання в залежності від швидкості охолодження клітинної суспензії на етапі кристалізації й установлений зв'язок цього показника з розподілом швидкості охолодження в зразку, що заморожується.

### СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ ПРАЦЬ

1. Гордієнко Є.О. Удосконалена модель пасивного масопереносу крізь плазматичну мембрану клітини / Є.О. Гордієнко, О.І. Гордієнко, В.В. Марущенко [та ін.] // Біофізичний вісник. – 2008. – Вип. 21, № 2. – С. 75 – 80.

2. Марущенко В.В. Розподіл швидкості охолодження у циліндричних контейнерах різного розміру на етапі кристалізації суспензії *Saccharomyces cerevisiae* / В.В. Марущенко, І.П. Висеканцев // Проблемы криобиологии. – 2008. – Т. 18, № 4. – С. 15 – 19.

3. Марущенко В.В. Зависимость вероятности внутриклеточного льдообразования от уровня пересыщения в дрожжеподобных грибах *Saccharomyces cerevisiae* / В.В. Марущенко, Е.А. Гордиенко // Біофізичний вісник. – 2009. – Вип. 22, № 1. – С. 65 – 70.

4. Сакун О.В. Вплив температури на коефіцієнти проникності мембран дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* для води і криопротекторів / О.В. Сакун, В.В. Марущенко, І.Ф. Коваленко [та ін.] // Проблемы криобиологии. – 2009. – Т. 19, № 1. – С. 41 – 48.

5. Марущенко В.В. Влияние разброса скоростей охлаждения в замораживаемом образце на колониеобразующую способность *Saccharomyces cerevisiae* / В.В. Марущенко, Е.А. Гордиенко // Вісник ХНАУ. – 2009. – Вип 17, № 2. – С. 96 – 101.

6. Марущенко В.В. Розподіл швидкості охолодження у циліндричних контейнерах різного розміру на етапі кристалізації суспензії *Saccharomyces cerevisiae* / В.В. Марущенко, І.П. Висеканцев, Є.О. Гордієнко // Проблемы криобиологии. – 2008. – Т. 18, № 2. – С. 222.

7. Гордиенко О.И. Коэффициенты проницаемости мембран *Saccharomyces cerevisiae* для криопротекторов / О.И. Гордиенко, И.Ф. Коваленко, А.В. Сакун [и др.] // Дисперсные системы: научная конференция стран СНГ, 22-26 сент. 2008 г. : тезисы докл. - Одесса, – 2008. – С. 96 – 97.

8. Гордиенко Е.А. Количественная модель массообмена между клетками и окружающим их многокомпонентным раствором / Е.А. Гордиенко, А.В. Сакун, В.В. Марущенко [и др.] // Дисперсные системы: научная конференция стран СНГ, 22-26 сент. 2008 г.: тезисы докл. - Одесса, 2008. – С. 98 – 99.

9. Марущенко В.В. Количественная оценка оптимальной скорости охлаждения суспензии микроорганизмов *Saccharomyces cerevisiae* / В.В. Марущенко, А.Ю. Сиренко // Фізика низьких

температур: 2-а Всеукраїнська наук. конф. молодих вчених, 1–5 червня 2009 р.: тези допов. – Х., – 2009. – С. 97.

10. Сиренко А.Ю. Влияние скорости охлаждения и размера образца на колониеобразующую способность дрожжеподобных грибов *Saccharomyces cerevisiae* после замораживания – оттаивания /А.Ю. Сиренко, В.В. Марущенко // Проблемы криобиологии. – 2009. – Т. 19, № 2. – С. 225.

## АНОТАЦІЯ

**Марущенко В.В. Аналіз процесів заморожування дріжджоподібних грибів *Sacharomyces cerevisiae* з урахуванням розкиду умов охолодження в зразку – Рукопис.**

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.19 – криобіологія. – Інститут проблем криобіології і криомедицини НАН України, м. Харків, 2009.

Дисертаційна робота присвячена визначенню оптимальної з точки зору двохфакторної теорії кріопошкодження швидкості охолодження при заморожуванні дріжджоподібних грибів *Saccharomyces cerevisiae*, розкиду швидкості охолодження в суспензії цих мікроорганізмів при заморожуванні в контейнерах циліндричної форми різного розміру і дослідженню впливу неоднорідності поля швидкості охолодження на їх колонієутворюючу здатність.

Досліджено збереженість клітин дріжджоподібних грибів *Saccharomyces cerevisiae* при їх заморожуванні в контейнерах циліндричної форми різного розміру при сталих швидкостях зміни температури холодоагенту, який оточує контейнер з клітинною суспензією. Побудовано алгоритм, що дозволяє оцінити значення оптимальної з погляду двохфакторної теорії кріопошкодження швидкості охолодження суспензії одноклітинних мікроорганізмів у бінарному водному розчині на етапі її кристалізації, виходячи з невеликої кількості даних щодо геометричних і транспортних характеристик клітин, які підлягають кріоконсервуванню. Експериментально встановлено, що клітини, розташовані в центрі зразка, що заморожується, на етапі кристалізації суспензії охолоджуються зі швидкістю, яка в 2-6 разів перевищує швидкість охолодження клітин, розташованих біля стінки циліндричного контейнера.

Чашковим методом Коха визначена колонієутворююча здатність мікроорганізмів *Saccharomyces cerevisiae* після їхнього заморожування-відтаювання й установлений зв'язок цього показника з розподілом швидкості охолодження в зразку, що заморожується.

*Ключові слова:* розкид швидкостей охолодження, бінарний розчин, оптимальна швидкість, *Saccharomyces cerevisiae*, колонієутворююча здатність, геометричні та транспортні характеристики клітин.

## АНОТАЦИЯ

**Марущенко В.В. Анализ процессов замораживания дрожжеподобных грибов *Sacharomyces cerevisiae* с учетом разброса условий охлаждения в образце – Рукопись.**

Диссертация на соискание научной степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.19 – криобиология. – Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков, 2009.

Диссертационная работа посвящена определению оптимальной с точки зрения двухфакторной теории криповреждения скорости охлаждения при замораживании дрожжеподобных грибов *Saccharomyces cerevisiae*, разброса скорости охлаждения в суспензии этих микроорганизмов при замораживании в контейнерах цилиндрической формы разного размера и исследованию влияния неоднородности поля скорости охлаждения на их колониеобразующую способность.

Исследована сохранность клеток дрожжеподобных грибов *Saccharomyces cerevisiae* при их замораживании в контейнерах цилиндрической формы разного размера при постоянных скоростях изменения температуры окружающего контейнер хладагента. Установлено, что диаметр контейнера и разброс скоростей охлаждения в контейнере с клеточной суспензией существенно влияют на колониеобразующую способность микроорганизмов после замораживания-оттаивания. На основе термодинамической теории кристаллизации растворов получена зависимость между пересыщением внутриклеточного раствора и средним временем, по истечении которого при этом пересыщении в дрожжеподобных грибах *Saccharomyces cerevisiae* начинается внутриклеточная кристаллизация; путем численного решения уравнений Кедем-Качальского, описывающих кинетику обезвоживания клеток, определена зависимость пересыщения внутриклеточного раствора по отношению ко внеклеточному раствору от времени при кристаллизации суспензии дрожжеподобных грибов *Saccharomyces cerevisiae* в физиологическом растворе.

Построен алгоритм, который позволяет оценить значение оптимальной с точки зрения двухфакторной теории криповреждения скорости охлаждения суспензии одноклеточных микроорганизмов в бинарном водном растворе на этапе ее кристаллизации, исходя из небольшого количества данных о геометрических и транспортных характеристиках, подлежащего криоконсервированию биообъекта. Поскольку построение этого алгоритма опирается только на общие термодинамические соображения, то полученный результат является универсальным и может быть применен к анализу процесса зародышеобразования в любом бинарном водном растворе. Специфические свойства замораживаемых клеток и водного внеклеточного раствора при этом могут быть учтены путем задания равновесной кривой плавления конкретного внеклеточного

раствора и подбора (с помощью небольшого количества вспомогательных экспериментов) одной константы.

Получено аналитическое выражение, которое аппроксимирует поле температуры в суспензии дрожжеподобных грибов *Saccharomyces cerevisiae* в физиологическом растворе на этапе кристаллизации в цилиндрическом контейнере в зависимости от его диаметра и скорости охлаждения внешней поверхности контейнера. Показано, что неоднородность температурного поля и разброс скоростей охлаждения в замораживаемом образце увеличиваются с увеличением размера образца и скорости охлаждения контактирующего с ним хладагента.

Экспериментально установлено, что клетки, расположенные в центре замораживаемого образца на этапе кристаллизации суспензии охлаждаются со скоростью, которая в 2-6 раз превышает скорость охлаждения клеток, расположенных около стенки цилиндрического контейнера.

Чашечным методом Коха определена колониобразующая способность микроорганизмов *Saccharomyces cerevisiae* после их замораживания-оттаивания и установлена связь этого показателя с распределением скорости охлаждения в замораживаемом образце, на этапе его кристаллизации

*Ключевые слова:* разброс скоростей охлаждения, бинарный раствор, оптимальная скорость, *Saccharomyces cerevisiae*, колониобразующая способность, геометрические и транспортные характеристики клеток.

## SUMMARY

**Maruschenko V.V. Analysis of freezing processes of yeast-like fungi *Sacharomyces cerevisiae* with taking into consideration the dispersion of cooling conditions in sample - Manuscript.**

Dissertation for the candidate of biological science degree in speciality 03.00.19 – cryobiology. – Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, 2009.

This dissertation covers the examining of the optimal from the point of view of two-factor theory of cryodamage cooling rate during freezing of yeast-like fungi *Sacharomyces cerevisiae*, dispersion of cooling rate in suspensions of these microorganisms during freezing in containers of cylinder shape of different dimensions and studying the effect of inhomogeneity of cooling rate field on their colony-forming ability.

Cell survival for yeast-like fungi *Sacharomyces cerevisiae* has been investigated during their freezing in the containers of cylinder shape of different dimensions at stable rates of temperature change in the coolant, surrounding the container with cell suspension. There has been built the algorithm allowing the estimation of the optimal from the point of view of two-factor theory of cryodamage cooling

rate of the suspension of one-cell microorganisms in binary aqueous solution at the stage of its crystallization, proceeding from small amount of data as for geometrical and transport parameters of the cells to be cryopreserved. It has been experimentally established, that the cells located in the centre of sample under freezing, at the suspension crystallization stage are cooled with the rate which in 2-6 times exceeds the one for the cells located near the wall of cylinder container.

With Koch's plate method there was found the colony-forming ability of *Sacharomyces cerevisiae* microorganisms after their freeze-thawing and there has been established the relationship of this index with the scattering of the cooling rate in the sample being frozen.

*Key words:* dispersion of cooling rates, binary solution, optimal rate, *Sacharomyces cerevisiae*, colony-forming ability, geometrical and transport parameters of cells.

Відповідальний за випуск доктор біологічних наук професор Бабійчук Г.О.

Підписано до друку \_\_\_\_ . \_\_\_\_ 2009р. Формат 60x90x16  
Обсяг 0,8 ум.-друк. арк. Папір офсетний. Друк різнограф.  
Наклад 100 прим. Зам. №

---

Надруковано RISO друкарня ФВП НТУ «ХП»  
Харків, 61034, вул. Полтавський шлях, 192.