Probl Cryobiol Cryomed 2019; 29(2):159
https://doi.org/10.15407/cryo29.02.159

Чи можливо використання нанокристалічних сполук у середовищах для гіпотермічного зберігання дріжджів штаму *Saccharomyces cerevisiae var. boulardii*?

О.В. Поліванова, В.В. Чижевський, І.П. Висеканцев, І.А. Буряк, О.В. Фалько
Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

Is it possible to use nanocrystalline compounds in media for hypothermic storage of yeast *Saccharomyces cerevisiae var. boulardii strains*?

O.V. Polivanova, V.V. Chizhevsky, I.P. Vysekantsev, I.A. Buriak, O.V. Falko
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

У попередніх дослідженнях [M. Grechyshnikova *et al.*, 2018] нами було визначено захисну дію розчинів нанокристалічного діоксиду церія (НДЦ) та гідратованого фулерену C_{60} (C_{60} FWS) за умов гіпотермічного зберігання прокаріотичної мікроводорості *Spirulina platensis*. Виникає питання про можливість використання вказаних сполук для довгострокового зберігання за помірно низьких температур інших видів мікроорганізмів більш високого еволюційного розвитку, а саме – дріжджів, які є нижчими еукаріотами. Відомо, що C_{60} FWS (2×10^{-5} М) [О.В. Павлович, 2014] та НДЦ (10^{-4} М) [А.Л. Попов и др., 2016] не чинять цитотоксичної дії на клітини ссавців.

Мета нашого дослідження – визначення можливого негативного впливу розчинів нанорозмірних сполук на мікроорганізми.

У якості тест-об'єкта було обрано культуру клітин дріжджів *Saccharomyces cerevisiae var. boulardii* у період розмноження. У роботі досліджували кінетику росту цієї культури.

Дріжджі *S. cerevisiae var. boulardii* висівали в конічні колби із середовищем YPD. До частини колб додавали НДЦ із кінцевою концентрацією 0,02 г/л, а у другу частину колб – C_{60} FWS із кінцевою концентрацією 0,0144 г/л. Контролем були культури у середовищі YPD без домішок. Початкова концентрація клітин у всіх колбах складала 1×10^5 кл/мл. Дріжджі вирощували на термостатованій качалці «УВМТ-12-250» (НВО «Еліон», Росія) при температурі 30°С. Періодично стерильно відбирали проби суспензій для підрахунку кількості дріжджових клітин у камері Горяєва.

Встановлено, що lag-фаза росту клітин у всіх зразках тривала 1,5 години. Після цього спостерігали логарифмічну фазу росту клітин. Кількість клітин у контрольних пробах протягом цієї фази не перевищувала таку у середовищах із нанорозмірними сполуками. Концентрації клітин дріжджів у колбах із C_{60} FWS та НДЦ також значуще не відрізнялися ($p < 0,05$). Криві росту свідчили про початок через 15 годин стаціонарної фази у всіх досліджуваних культурах. Кількість клітин дріжджів у всіх зразках становила $1,75–1,77 \times 10^8$ кл/мл.

Таким чином, результати дослідження кінетики росту дріжджів *S. cerevisiae var. boulardii* у ростовому середовищі з додаванням НДЦ та C_{60} FWS показали, що вказані нанорозмірні розчини не впливали на характер росту культур дріжджів та не мали токсичної дії на клітини *S. cerevisiae var. boulardii*, що дозволяє їх використовувати для створення технологій зберігання за різних низьких температур.

Previous studies [M. Grechyshnikova *et al.*, 2018] demonstrated the protective effect of nanocrystalline cerium dioxide (CeNPS) and hydrated fullerene C_{60} (C_{60} FWS) solutions under prokaryotic microalgae *Spirulina platensis* hypothermic storage conditions. The question arises about the possibility of using these compounds for a long-term storage of higher evolutionarily developed microorganisms, namely yeasts that are lower eukaryotes, at moderately low temperatures. It is known that C_{60} FWS (2×10^{-5} M) [O.V. Pavlovych, 2014] and CeNPS (10^{-4} M) [A.L. Popov *et al.*, 2016] have no cytotoxic effects on mammalian cells.

The purpose of our study was to determine the possible negative effects of solutions of nano-sized compounds on microorganisms.

A yeast cell culture of *Saccharomyces cerevisiae var. boulardii* during reproduction period was selected as a test object. The growth kinetics of this culture was studied.

Yeast *S. cerevisiae var. boulardii* were plated in a conical flask with YPD medium. To the first part of the flasks there was added CeNPS at a final concentration of 0.02 g/l, and to the second part of the flasks there was added C60 FWS at a final concentration of 0.0144 g/l. The controls were the cultures plated in a YPD medium without any additives. The initial concentration of cells in all flasks was 1×10^5 cells/ml. Yeasts were grown in the 'UVMT-12-250' thermostat (SPU 'Elion', Russia) at a temperature of 30°C. Samples of suspensions were periodically sterilized for counting the number of yeast cells in the Goryaev's chamber.

It was found that the lag phase of cell growth in all the samples lasted 1.5 hours. Then the logarithmic phase of cell growth was observed. The cells number in the control samples during the logarithmic phase did not exceed the one in the media with nano-sized compounds. Yeast cells concentrations in flasks with C_{60} FWS and CeNPS also did not differ significantly ($p < 0,05$). Growth curves showed the stationary phase beginning after 15 hours in all studied cultures. The number of yeast cells in all the samples was $1.75–1.77 \times 10^8$ cells/ml.

Thus, the results of the study of growth kinetics of *S. cerevisiae var. boulardii* yeast in the growth medium with the addition of CeNPS and C_{60} FWS showed that the nanosized solutions did not affect the character of yeast cultures growth and had no toxic effects on *S. cerevisiae var. boulardii* cells, that allowed them to be used during creation of storage technologies at various low temperatures.