әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті.
Биология және биотехнология факультеті
Биотехнология кафедрасы

Фототрофты микроорганизмдер биотехнологиясы
пәні

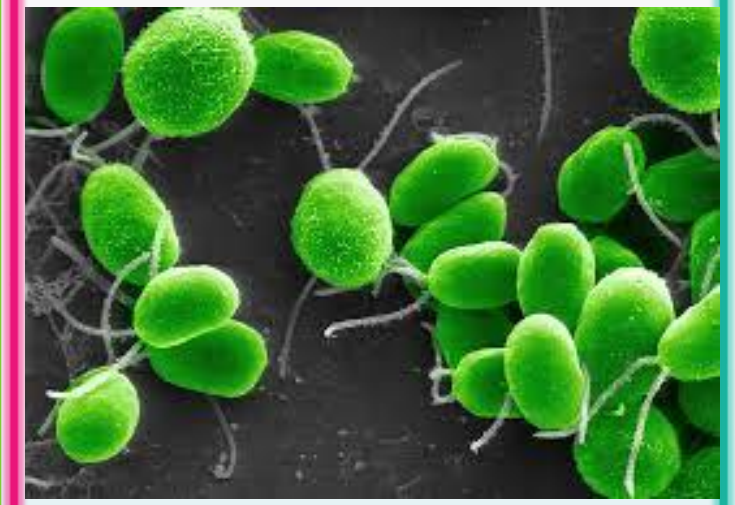
БИОРЕМЕДИАЦИЯ ОБЪЕКТІЛЕРІ. СУ ОРТАСЫН ТАЗАРТУ ПРОЦЕСТЕРІНДЕГІ МИКРОБАЛДЫРЛАР

Дәріскер: Какимова Ардак Болатовна

Алматы 2026

Су ортасын биоанализдеу кезінде мутанттарды қолданудың артықшылығы - ластанған судың уыттылығын ғана емес, оның мутагенділік потенциалын анықтау мүмкіндігі.

Жасыл бір клеткалы балдыр *Chlamydomonas (Chlamydomonas reinhardtii*) генетикалық объект болып табылады және мутагенді заттардың оның бастапқы және мутантты штамдарына әсер ету салдарын зерттеу жүйелік экожүйені ластайтын факторлардың биологиялық әрекеті туралы біліміміздi кеңейту тұрғысынан ғана емес, қызығушылық тудырады. қоршаған орта объектілерінің генетикалық мониторингі.



Сонымен, сары түспен сипатталатын пигментті мутанттарды қолдана отырып, зерттелетін суды биотестілеу кезінде және штамға тән жасыл ревертанттардың пайда болуын тіркеу кезінде мутагендердің болуына су экожүйелерінің күйін бағалауға болады.

Сынақ объектісі ретінде *Chlamydomonas reinhardtii* бірқатар ерекше мутанттары ұсынылған.

Фотосинтезі бұзылған, қоректік ортада болатын көміртегі көзі - натрий ацетаты есебінен колониялар түзетін автотрофты өсуге қабілетсіз мутанттар.

Жабайы типке (реверванттарға) кері мутацияны дамытатын жасушалар қоршаған ортада жарықта ацетатсыз тіршілік етеді.

Мұндай мутациялардың жиілігі ацетатсыз селективті ортада өсірілген реверванттық колониялар санымен бағаланады және гендік мутациялардың пайда болу индикаторы ретінде қызмет етеді.аций.

Хлорофилл биосинтезі бұзылған, жарықта өсе алмайтын пигментті мутант

Мутагендік әсер осы мутанттардың жарыққа төзімді жасыл ревертанттарының пайда болуына тексеріледі.

Бұл жағдайда селекция факторы – жарық.

Аргининсіз ортада өсе алмайтын ауксотропты микробалдыр мутанттарын қолданған жағдайда мутагендік әсер аргининсіз селективті ортада өсуге қабілетті ревертанттардың пайда болуына тексеріледі.

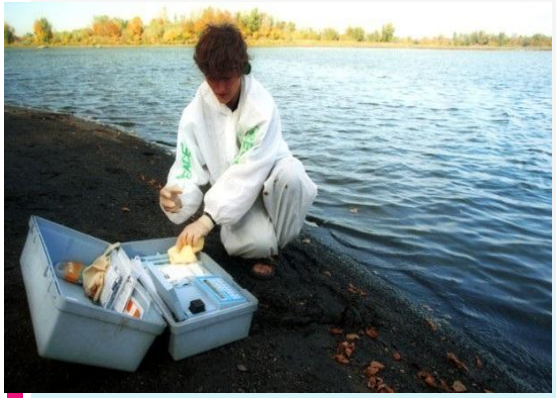
Хламидомонаның ауксотропты, фотосинтездейтін және жарыққа сезімтал мутанттарын қолдану балдыр жасушаларының өміршеңдігін бағалаумен бірге су ортасының генотоксикалығын толық және барабар бағалауға мүмкіндік береді.

Биотестілеу процедурасының өзі қоршаған ортаның улылығын анықтауға арналған бірнеше кезеңнен тұрады.

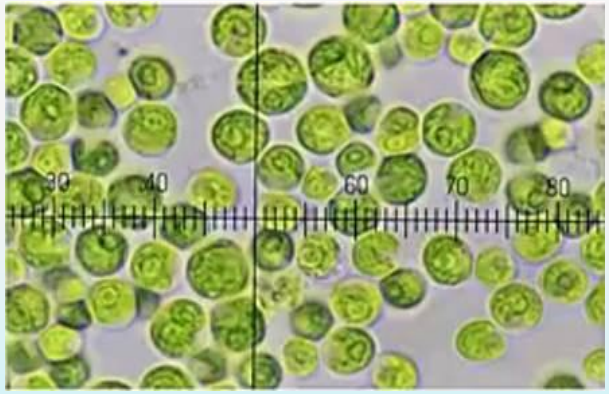
Су үлгісін алу

Культивирленетін балдырлардың егуін бақылауға және тексерілген ортаға енгізу

балдырлар жасушаларының саны

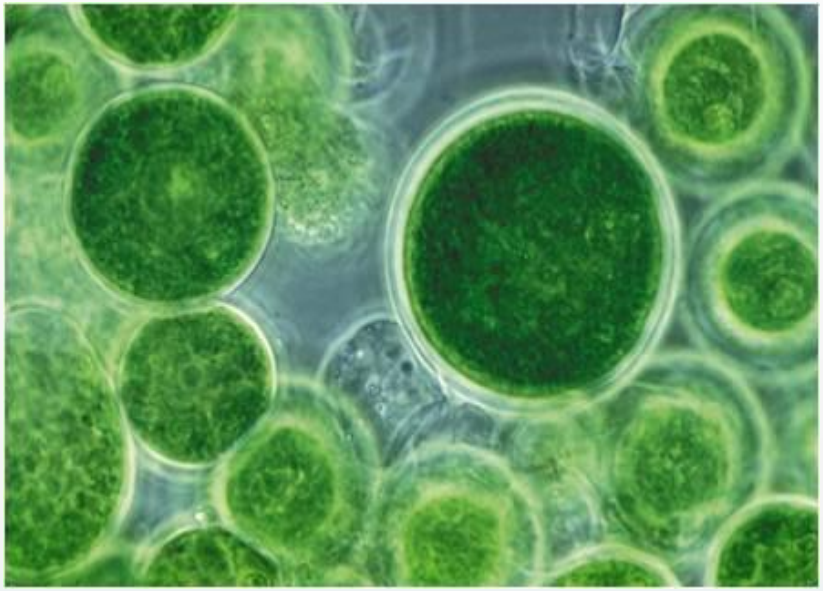




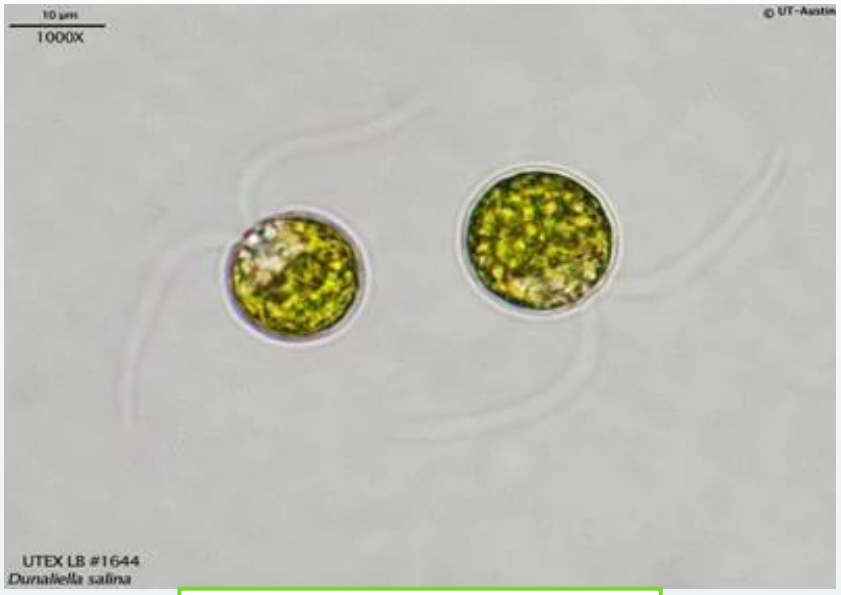


Зерттелетін объектілер ретінде токсиканттарға жоғары сезімталдықпен сипатталатын микробалдырлардың әртүрлі штамдары қолданылады.

Теңіз суын сынау кезінде ұзақ мерзімді (15 күндік) тәжірибе жүргізілетін *Platymonas viridis Rouch* және *Dunaliella salina Teod* сияқты бір жасушалы теңіз микробалдырларының дақылдарын қолдану қажет.



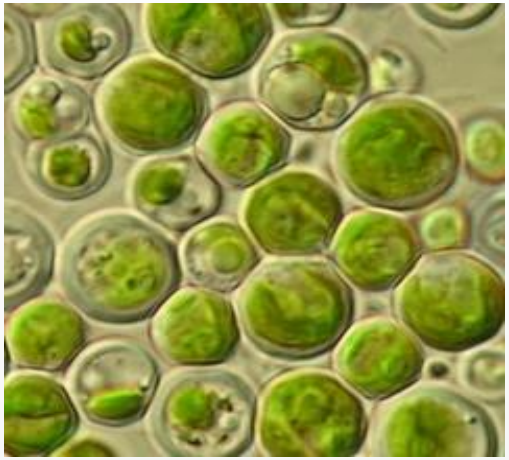
Platymonas viridis Rouch



Dunaliella salina Teod

Микробалдырлар *Platymonas viridis Rouch* ағынды сулардың уыттылығының теңіз ортасына әсерін бағалау үшін қолданылады.

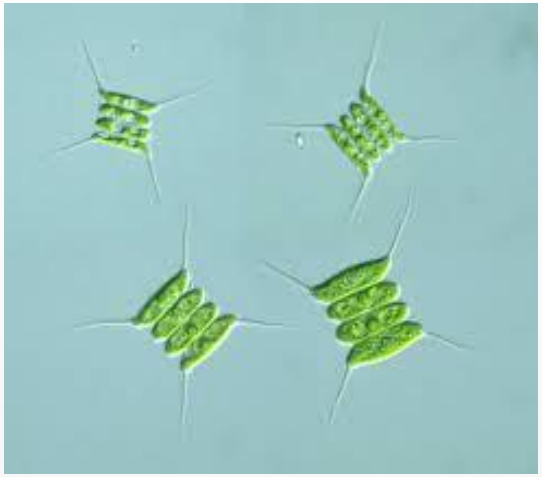
Тұзданбаған үлгілерді биотестілеу үшін келесі типтер жиі қолданылады:



Chlorella vulgaris



Selenastrum



Scenedesmus quadricauda



Pseudokirchneriella subcapitata



Selenastrum capricornutum

- Биотестілеу үшін кем дегенде 90% тірі жасушалардан тұратын және логарифмдік өсу фазасында «күн» және «түн» ауыспалы синхрондалған балдырлардың (~ 30-50 мың л / мл) қалыпты дамып келе жатқан мәдениеті қолданылады.

- Осы мақсатта балдырлар жаңа қоректік ортаға алдын-ала беріледі (тәжірибеден 3-5 күн бұрын).

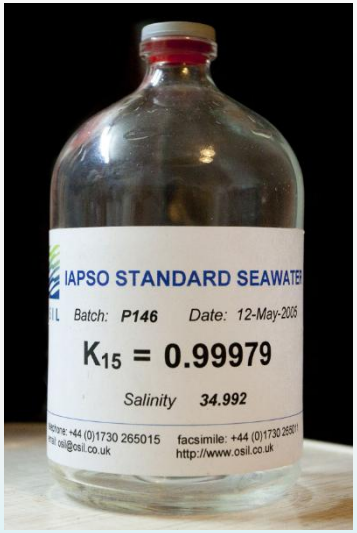
- Балдырлар қоректік орталарда әртүрлі жүйелі топтар үшін арнайы таңдалған минералды құрамы бар, олардан төмен емес деп белгіленген реактивтерді қолданып өсіріледі.

- Тұщы су түрлерін өсіруге арналған орта автоклавта немесе 20-30 минут қайнатумен зарарсыздандырылады.

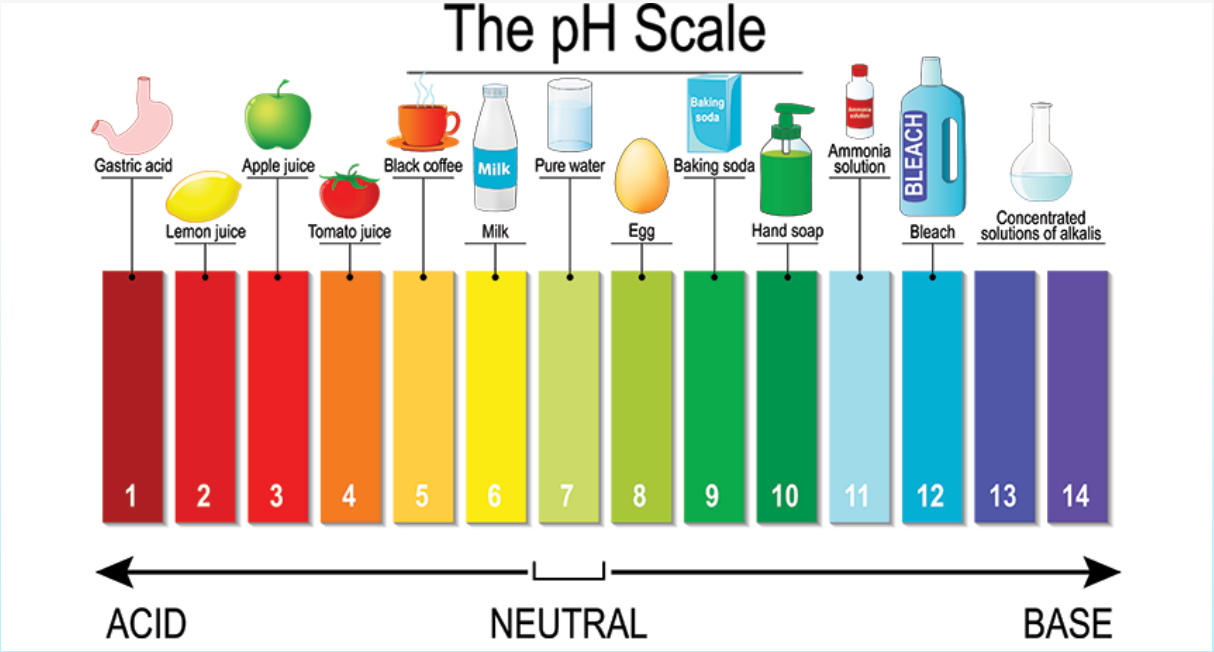
Теңіз балдырларын қолдана отырып биотестілеу ортасы табиғи немесе жасанды теңіз суында қажетті тұздылықта дайындалады (әдетте 20%, бұл сөре аймағындағы теңіз суының орташа тұздылығына сәйкес келеді)

70°C температурада су моншасында үш жақты пастерлеу арқылы зарарсыздандырылған

pH стерилизациядан кейін 7,0-7,3 болуы керек







Су өсімдіктері организмдерінің арасында токсиканттарға (пестицидтер мен ауыр металдар) бейімделу кең таралған.

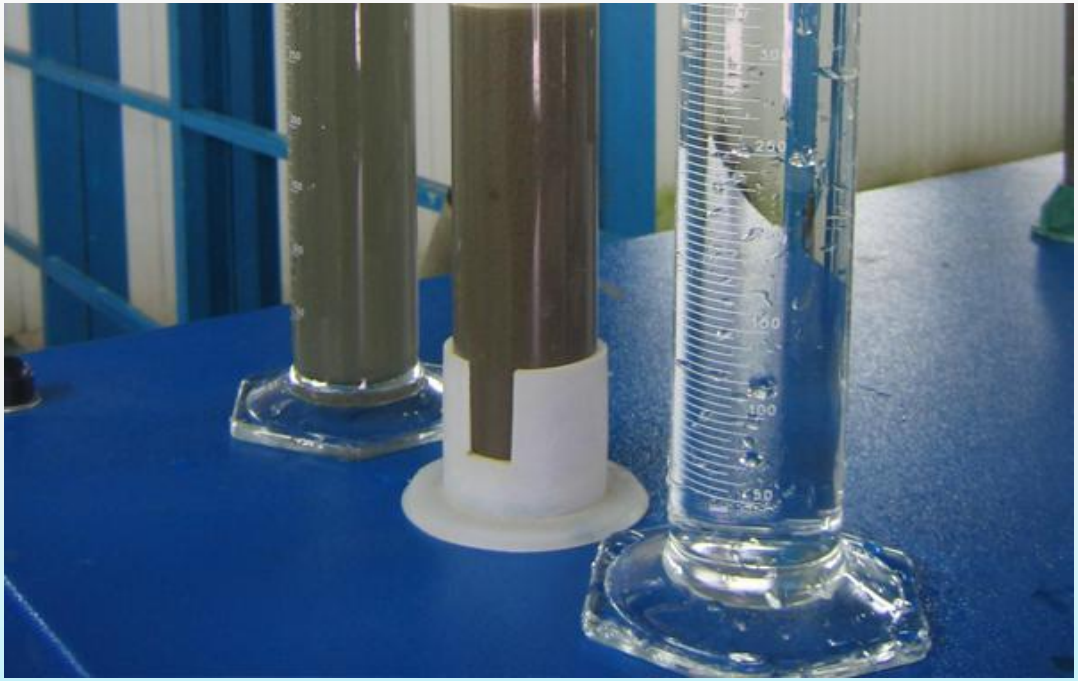


Сондықтан, сол немесе басқа заттардың балдырларға уыттылығын бағалау кезінде өте мұқият болу керек, әсіресе тез көбейетін планктондық организмдерде пайда болатын функционалдық өзгерістер бірнеше ұрпаққа оңай сіңіп, осылайша жиналмайтын популяцияның пайда болуына ықпал етеді.

Көбінесе, қалдықтар мен табиғи суларды биотестілеу кезінде ынталандыру әсері байқалады; Бақылауға қарағанда эксперименттегі балдыр жасушаларының санының көбеюі.

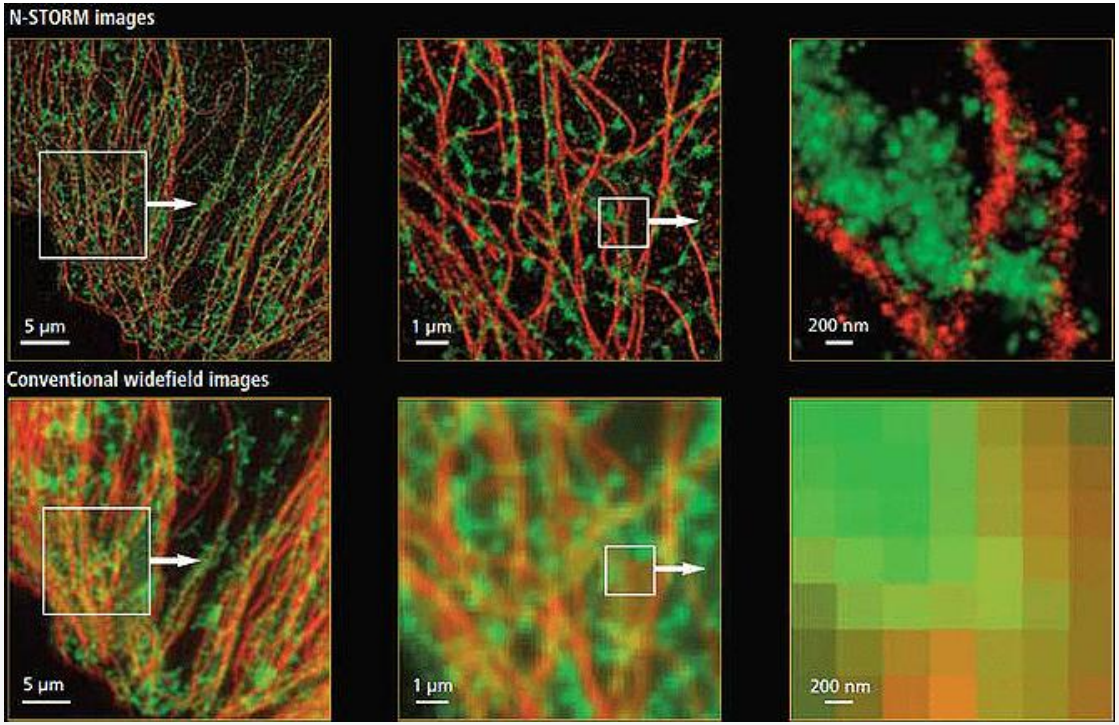
Мұндай деректерді түсіндіру кейбір қиындықтарды тудырады, өйткені байқалатын әсер судағы қоректік заттардың болуымен де, токсикант әсерінің кейбір ерекшеліктерімен де байланысты болуы мүмкін.





Ұқсас нәтижелерді талдау биотестілеу әдісіне байланысты жүзеге асырылады.

Сонымен, қысқа мерзімді биотестілеу және ағынды сулардың немесе топырақ сығындыларының қауіптілік класын анықтау үшін бақылаудың 30% дейін санын ынталандыру рұқсат етілген болып саналады.



Уытты заттардың белсенді емес концентрациясын анықтау мақсатында ұзақ мерзімді созылмалы экспериментте талданған сынамадағы балдыр жасушаларының саны бақылаудағыдан статистикалық тұрғыдан айтарлықтай өзгеше болмаған жағдайда ғана стимуляцияның әсері ескерілмейді.

Биотестілеу кезінде микробалдырларды зерттеуде люминесценттік микроскопия әдісін қолдану

Флуоресценттік микроскопия әдісінің артықшылығы - балдыр жасушаларының тіршілік күйін оларға зиян келтірмей бағалаудың жылдамдығы.

Олар уақыт жағынан үнемді және дәл, аз уақыт ішінде сіз кішкене материалға көптеген үлгілерді зерттей аласыз (мысалы, балдырлардың 0,5-1,0 мл суспензиясы жеткілікті).

Әдіс әсіресе әртүрлі заттардың немесе ағынды сулардың уыттылығын экспресс-талдауға, сондай-ақ әр түрлі су объектілерінің ластану дәрежесін анықтауға ыңғайлы.

Әдіс биологиялық индикаторлармен жақсы үйлеседі: балдыр жасушалары санының өзгеруі, түрлердің алуан түрлілігі, бүкіл биоценоздағы фитоматериалдың күйіне тез және нақты баға береді, бұл биоценоздың жекелеген компоненттеріне биоиндикациялық бағалау жүргізуге мүмкіндік береді (фитопланктон, фитобентос, фито-өсу).

Люминесценция микроскопиясын және хлорофилл флуоресценциясын өлшеуді бір мезгілде қолдану микробалдырлақұбылыстыңрға алғашқы зақымдануды, сонымен қатар осы ұзақтығы мен тереңдігін және улы заттардың төмен концентрациясында ілеспе бейімделу процестерін орнатуға мүмкіндік береді.

Фотосинтетический аппарат растительных организмов весьма чувствителен к действию различных загрязняющих веществ и одним из первых реагирует на их воздействие.

Методом люмЛюминесценция микроскопиясын және хлорофилл флуоресценциясын өлшеуді бір мезгілде қолдану микробалдырларға алғашқы зақымдануды, сонымен қатар осы құбылыстың ұзақтығы мен тереңдігін және улы заттардың төмен концентрациясында ілеспе бейімделу процестерін орнатуға мүмкіндік береді.

Техника использования люминесцентной микроскопии для диагностики физиологического состояния водорослей была разработана С.В. Горюновой.

Бұл әдіс балдырларды ультрафиолет сәулелерінде микроскопиялық түрде анықтағанда, олардың физиологиялық күйімен ерекшеленетін жасушалар люминесценцияның түрлі-түсті және жарықтық реңктерін беретіндігіне негізделген.

Диатомдар, кейбір жасыл және басқа балдырлардың түрлері май жинауға қабілетті (кейде 60% дейін).

Мұндай формаларда ыдырау процестері сыртқа қарай тез жүреді, яғни жасушалар майлы тамшылардың пайда болуымен тән контурларын жоғалтады, белгілі бір уақыт ашық қызыл люминесценция кезінде жарқырайды

Балдырлар, жасушаның негізгі құраушысы - ерекше көмірсулар, кейде олар органикалық заттардың жалпы санының 70% дейін құрайды, мысалы көк-жасыл балдырлар (*Oscillatoria, Microcystis* т.б.) Сияқты, ұзақ мерзімге дейін ыдырайды, ал визуалды өзгерістер көрінбейді балдырлар.

Мұндай анықтамалар флуоресцентті микроскопия кезінде мүмкін болады

Тірі жасушаларда қанық қызыл сәуле пайда болады

Әр түрлі қурап кету кезеңіндегі балдыр жасушалары жарықтың әр түрлі өту кезеңіне ие

Негізінен балдыр жасушаларының люминесценция спектрінің өзгеруі келесі кезеңдерде жүреді:

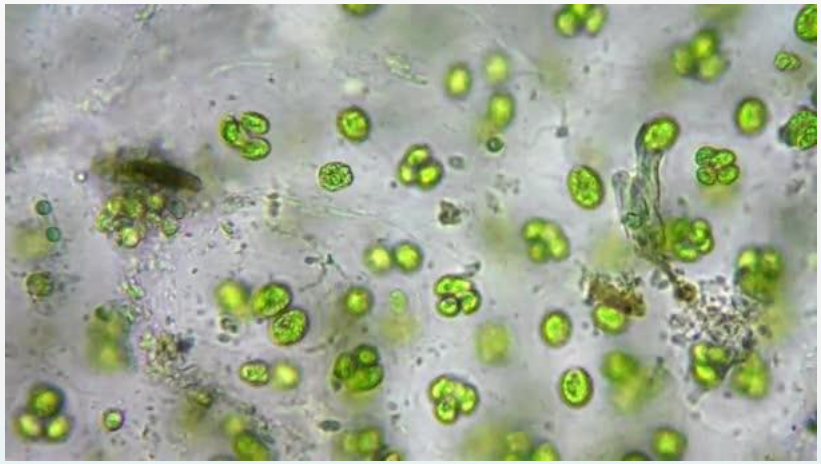
1) жарқын күлгін-қызыл жарқыл өміршеңдігі жоғары хлорофиллі бар жасушаларға тән - жасушалар белсенді күйде болады, қарқынды бөлінеді немесе бөлінуге дайындалады (өсу кезеңі логарифмдік).

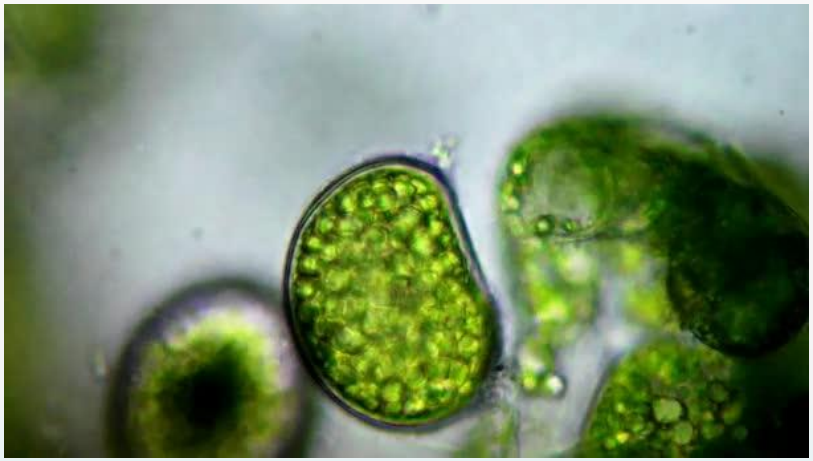
1) жарқын күлгін-қызыл жарқыл өміршеңдігі жоғары хлорофиллі бар жасушаларға тән - жасушалар белсенді күйде болады, қарқынды бөлінеді немесе бөлінуге дайындалады (өсу кезеңі логарифмдік).

Қандай да бір фактордың әсерінен депрессияға ұшыраған жасушалар сарғыш-қызыл жарқыл береді, ал тіршілік әрекеті өте төмен, бірақ әлі тірі жасушаларда бозғылт қызғылт сары жылтыр болады.

Люминесценцияның реңктері алғашқы және мәдени материалды қарау кезінде айқын ажыратылады және оларды спектрлерді салыстыру арқылы анықтауға болады.

Культураның интенсивті өсу сатысында өлі жасушалар болмауы мүмкін, бұл олардың тез лизисімен байланысты.





Балдырлардың культуралардағы тірі және өлі жасушаларын санау және люминесценттік микроскопия көмегімен олардың автолизі арқылы балдырлардың әр түрлі типтерінің даму және ыдырау процестерінің ерекшелігі анықталады.

Даму және ыдырау жылдамдығына сәйкес балдырлардың келесі топтарын ажыратуға болады:

1) тез өсетін және тез автолиздейтін тез өсетін және тез автолиздейтін

2) тез өсетін және баяу автолизденетін

3) баяу өсу және тез автолиздеу

4) баяу өсу және баяу автолиздеу

Балдырлардың белгілі бір түрлерінде токсиканттардың әсерінен өсу және ыдырау жылдамдығы айтарлықтай өзгеруі мүмкін

Сондықтан диатомдарда (токсиканттарды енгізбестен), клеткалардың көбеюінің ең жоғарғы нүктесіне жеткенде, олардың тез ыдырауы (2-3 тәулікте) клапандар ерігенге дейін жүреді.

Сондықтан токсиканттың жасушаға әсері қиын болады, оның қалың көмірсу қабығының болуына байланысты жарқырауы бозарады

Флуоресцентті микроскоптарды қолдану балдыр жасушаларының өміршеңдік дәрежесін жеткілікті тез және дәл бағалауға мүмкіндік береді.



Люминесценцияны талдау және хлорофиллді флуоресценцияны өлшеу әдістері балдырлар, макрофиттер, фитопроба үшін зертханалық, далалық және экспедициялық жағдайларда, модельдік экожүйелердегі улылық дәрежесін бағалау үшін, сондай-ақ су мен ағынды сулардың уыттылығын бағалау үшін қолданылды.

Бұл әдіс әрбір жеке жасушаның терең сүйіспеншілігін көрсетеді, балдырлардың әртүрлі типтерінің даму және ыдырау процестерінің ерекшелігін бағалауға мүмкіндік береді.

Пигментті аппараттың ерте өзгеруін хлорофилл флуоресценциясының өзгеруін немесе ұзақ уақыттан кейінгі жарқырауды (кешіктірілген флуоресценцияны) байқау арқылы орнатуға болады.

Бұл әдісті қолдана отырып, сіз балдыр дақылдарына әртүрлі заттарды тексере аласыз: пропанид, сатурн мен пропанид қоспасы, метафос, фенол мен формальдегид қоспасы.

Хлорофиллді флуоресценцияны өлшеу балдырлардың әр түрлі типтегі жасушаларының фотосинтездеу аппараттарының заттардың енуіне жылдам реакциясын көрсетеді (ең улы пропанид, метафос, пропанид пен сатурн қоспасы).

Хлорофиллді флуоресценцияны өлшеу балдырлардың әр түрлі типтегі жасушаларының фотосинтездеу аппараттарының заттардың енуіне жылдам реакциясын көрсетеді (ең улы пропанид, метафос, пропанид пен сатурн қоспасы).

Теңіз сары-жасыл балдыры *Phaeodactilum trucornutum* бұл заттарға сезімтал, пропанид қатысында өлі жасушалардың лизисі және метафос дақылына енгеннен кейін жасушалар санының едәуір (7 есе) азаюы байқалады.

- Осы бағытта жүргізілген тәжірибелер егер төмен концентрациядағы ластаушы заттар үнемі су объектілеріне түсетін болса, онда қолайлы температура жағдайында және қоректік заттардың жеткілікті мөлшері кезінде көк-жасыл балдырлар дамуы мүмкін деп болжауға мүмкіндік береді.

- Бұл балдырлардың жасушаларында шырыштың қорғаныс қабаты болады, ол арқылы улы затты қабылдауға кедергі келтіріледі, ал жемдік құнды балдырлар өндірісі тоқтатылады.

- Болашақта мұндай өзгерістер биоценоздың қайта құрылуына әкелуі мүмкін: бағалы балық аулау қоймасынан су құрамы өзгерген төмен құндыға айналуы мүмкін.

Балдырларды биотестілеуде қолданудың артықшылықтары

Фототрофты микроорганизмдерді қолданудың басты артықшылықтарының бірі - олардың көбеюінің жоғары жылдамдығы, бұл көптеген ұрпақ бойына зертханалық жағдайда жасуша популяциясын бақылауға мүмкіндік береді. Сонымен қатар, микробалдырлардың фотосинтетикалық аппараты әртүрлі ластаушы заттардың әсеріне өте сезімтал және олардың әсеріне алғашқылардың бірі болып жауап береді. Фототрофты микроорганизмдер жасушаларының пигменттік аппараттарының фотосинтездеу белсенділігінің өзгеруі фототрофты микроорганизмдердің жалпы физиологиялық күйінің, демек, олардың тіршілік ету ортасының күйінің индикаторы бола алады.

Балдырлар санын және фотосинтездеу процестерінің қарқындылығын есептеу арқылы ластаушы заттар мен ағынды сулардың уыттылығын анықтайтын ең сәтті сынақ объектілері - дақылдары зертханалық жағдайда арнайы ортада өсірілген жасыл және көк-жасыл (цианобактериялар) балдырлар бөлімдерінің өкілдері.

Биотестинг жүргізу технологиясы

Сынамаларды алу



Сайран көлі



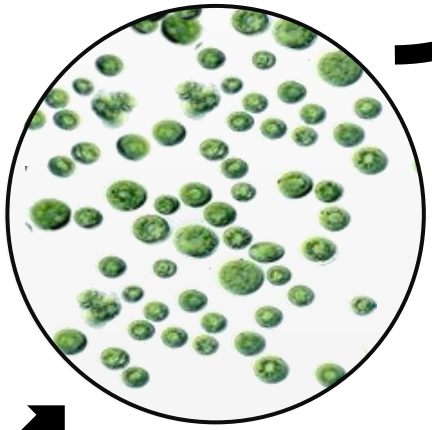
Большая Алматинка өз.

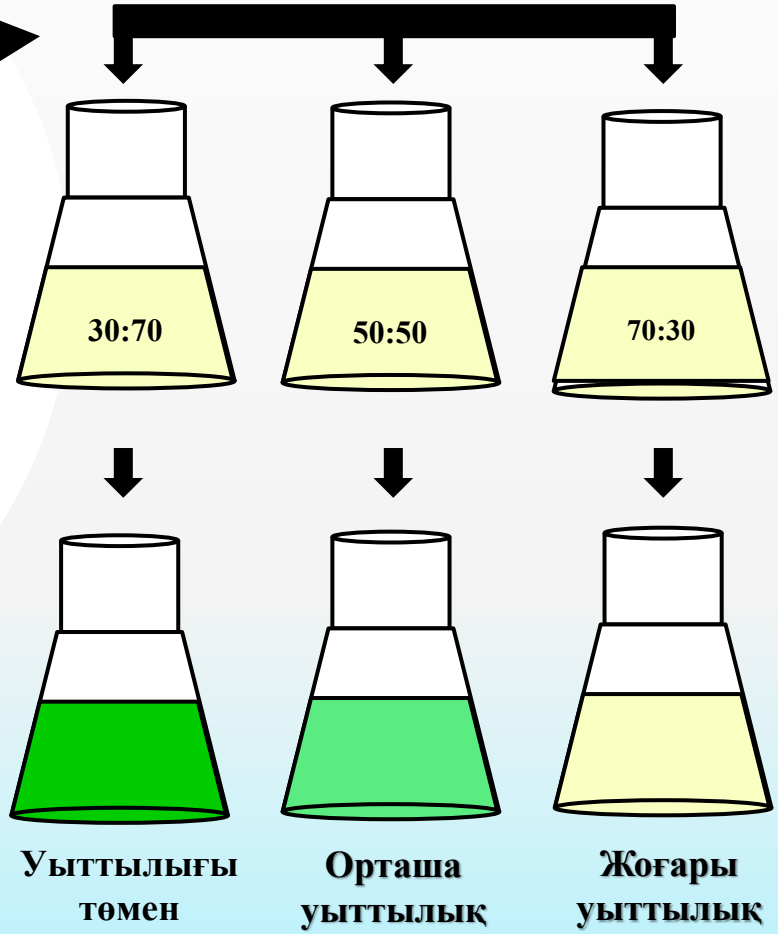


2. Уыттылық дәрежесін бағалау



Chlamydomonas reinhardtii

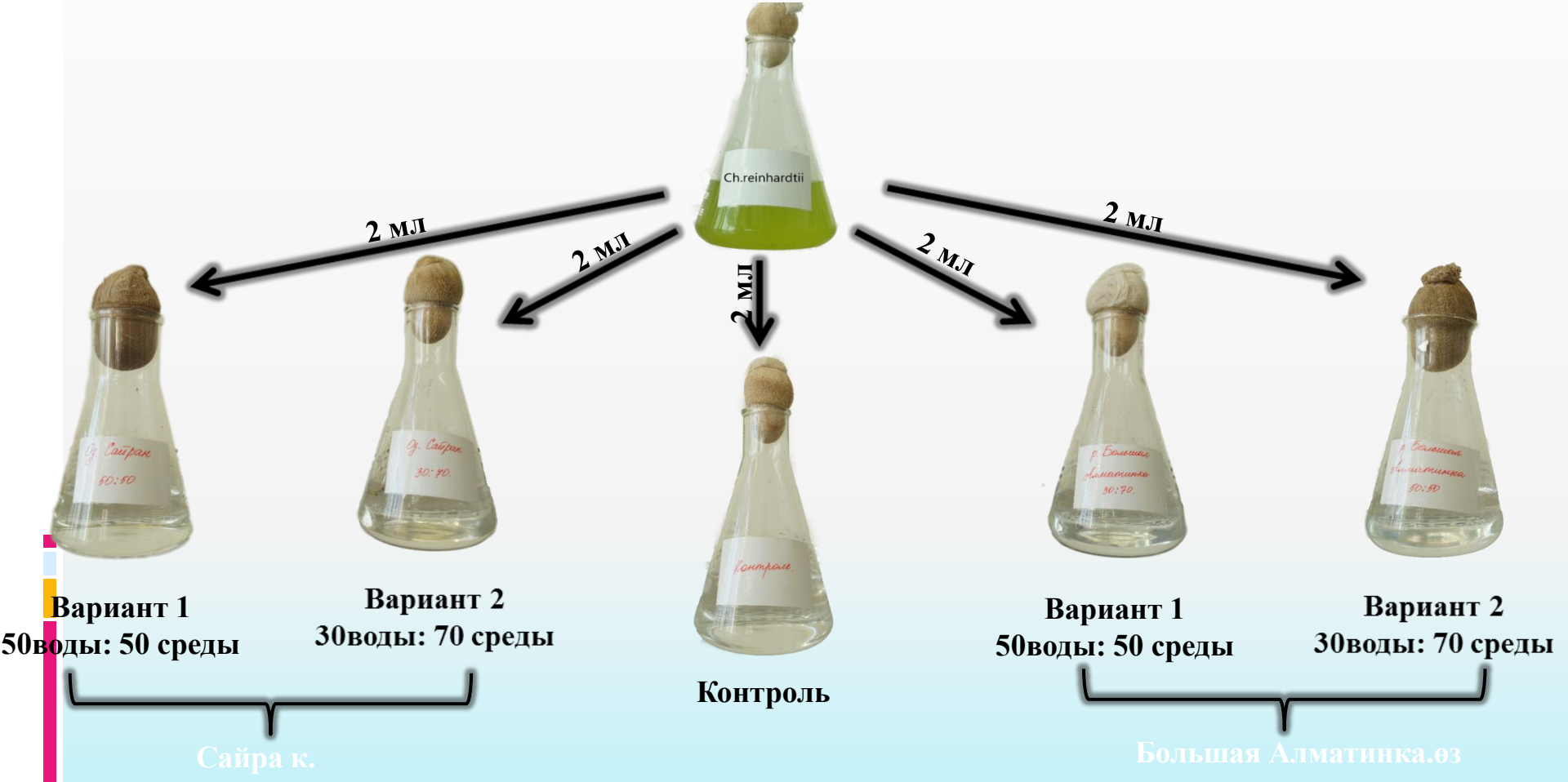


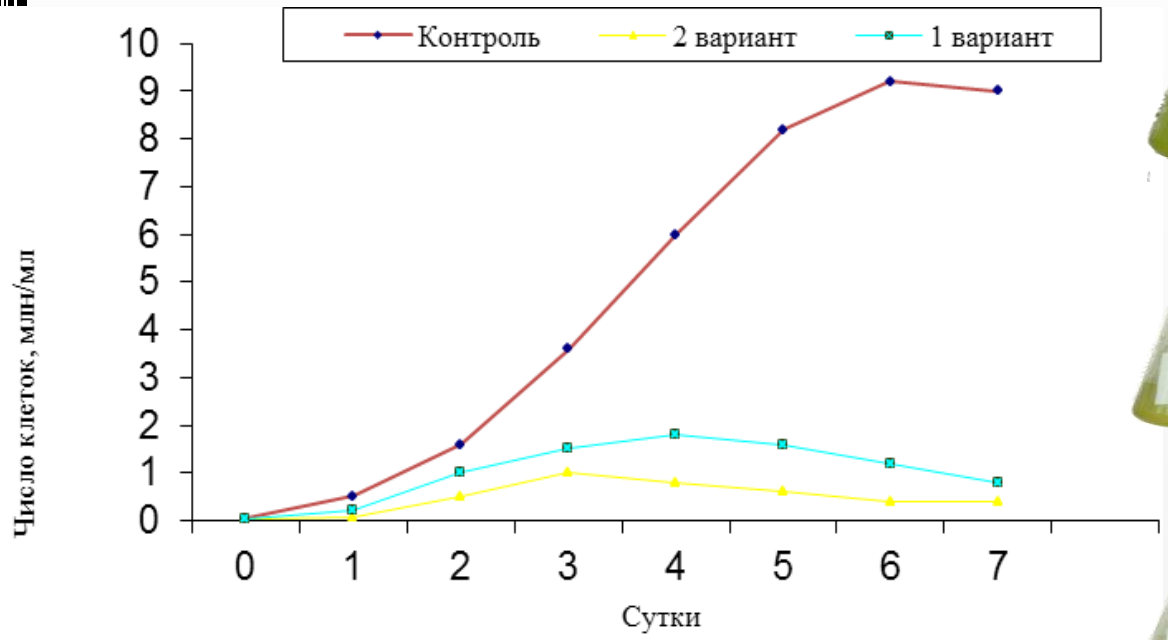


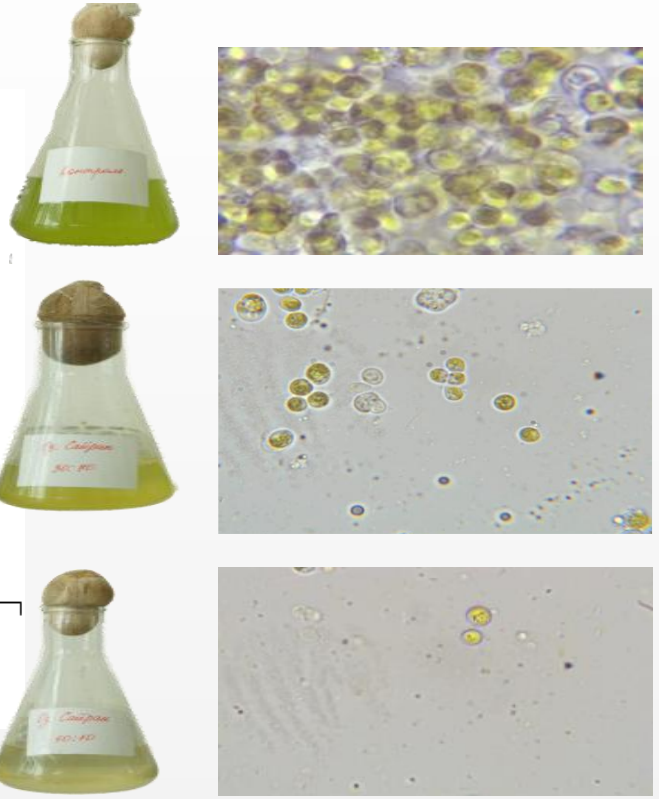
Материалдар және зерттеу әдістері

- Биотестингке келесі операциялар кіреді: бақылау және тәжірибелік орталарды дайындау, зерттелетін организм жасушаларын енгізу (*Chlamydomonas reinhardtii CC-1354* штаммының жасушалары), жасушалардың 7 күн бойғы өсу динамикасын зерттеу және алынған мәліметтерді салыстырмалы талдау.
- **Қоректік ортаны дайындау үшін жасушалардың қоректенуіне қажетті минералды тұздар сұйық ортаға және зерттелетін объектіден суға стандартты L2-мин ортаға сәйкес мөлшерде қосылды. Микробалдыр клеткалары олардың өсу динамикасын зерттеу үшін 7 күн бойы осы ортада өсірілді. Зерттеу үшін ластанған судың 2 нұсқасы алынды.** 1 нұсқада су 50:50, ал екінші нұсқада - 30:70 қатынасында алынды.
- *Chlamydomonas reinhardtii* CC-1354 мутантты штамының енгізілген жасушаларының саны барлық нұсқаларында бірдей болды және мл-ге 100000 құрады. Бақылау ретінде біз алынған сынамалардан су қоспастан стандартты қоректік ортаны қолдандық. Бақылау мен тәжірибедегі микробалдыр жасушаларының сандық есебі 7 күн ішінде әр 24 сағат сайын тіркелді. Горяев камерасы арқылы жасушалардың саны есептелді.

Зерттелетін затты сыналған суға себу және бақылау

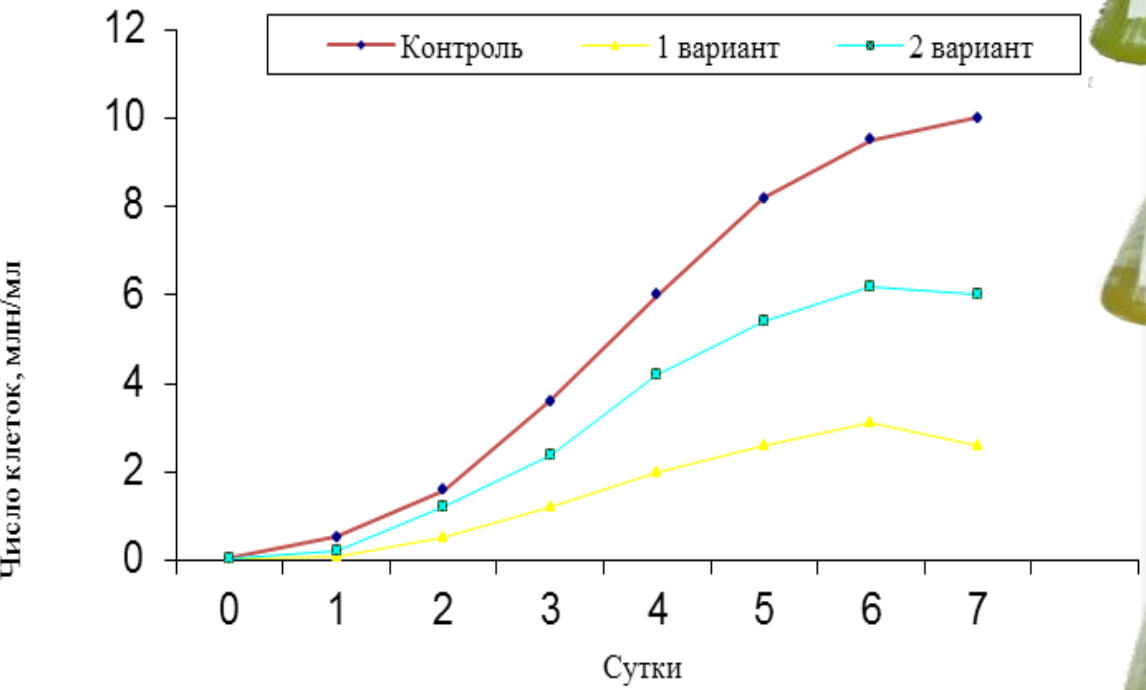




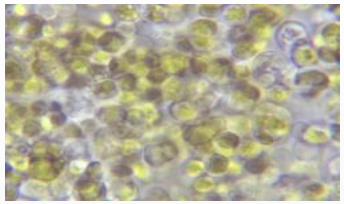


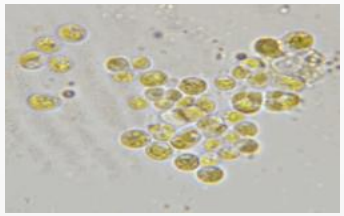
1 сурет - жасыл микробалдырлар жасушаларының тірі қалуы
Сайран көліндегі суды биотестілеу кезінде хламидомоналар *reinhardtii* *CC-1354*

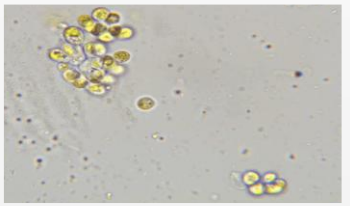
Көл суын сынау Сайран сұйық ортада Chlamydomonas reinhardtii CC-1354 штаммының жасушалық өсуінің тежелуін көрсетті.











Сурет 2 - r суын биотестілеу кезінде жасыл микробалдырлар *Chlamydomonas reinhardtii CC-1354* жасушаларының тірі қалуы. Үлкен Алматы

Үлкен Алматы өзенінен алынған эксперименттің 1 нұсқасында алынған су сынамаларында өсірудің 6 күнінде Chlamydomonas reinhardtii SS-1354 штамы жасушаларының санынан көбейгені байқалды, алайда клеткалардың өсу қарқыны бақылауға қарағанда төмен болды.

Ағынды сулардың және табиғи таза және теңіз суларының, түбіндегі шөгінділердің, ластайтын заттардың бұрғылау қалдықтарының уыттылығын анықтау үшін биотестілеу әдісі қолданылады: физикалық-химиялық әдістермен қатар судың сапасына қойылатын нормативтік талаптарды белгілеу кезінде, химиялық заттарды су объектілеріне жіберудің нормативтерін сақтау бойынша экологиялық бақылау жүргізу. және су объектілеріне шаруашылық және өзге де қызметтің жол берілетін әсерінің нормативтері; бірінші кезекте антропогендік әсер ету көздері орналасқан аудандардағы су объектілерінің мемлекеттік экологиялық мониторингін жүзеге асыру үшін; су экожүйелерінің күйін бағалау.

Микробалдырлардың сезімтал штамдарына негізделген биотестілеуді қолдану физико-химиялық анализге қарағанда бірқатар артықшылықтарға ие, олардың құралдары көбінесе тұрақсыз қосылыстарды анықтай алмайды немесе экотоксиканттардың ультра төмен концентрациясын сандық түрде анықтайды.

Довольно часты случаи, когда выполненный современными средствами химический анализ не показывает наличия токсикантов, тогда как использование биологических тест-объектов, в частности микроводорослей, свидетельствует об их присутствии в исследуемой среде. Биотестирование дает возможность быстрого получения интегральной оценки токсичности, что делает весьма привлекательным его применение при скрининговых исследованиях.



Сонымен, фактордың сандық және сапалық сипаттамаларын беретін, бірақ оның биологиялық әрекетін жанама түрде бағалауға мүмкіндік беретін физикалық немесе химиялық әдістерден айырмашылығы, биомониторинг әдістері ең алдымен биологиялық жүйелердің реакциясы туралы ақпарат береді, яғни. фактордың әсер етуінің биологиялық салдары туралы, бірақ оның ерекшеліктері туралы емес.

Назарларыңызға рахмет