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

Фототрофты микроорганизмдер биотехнологиясы пәні

МИКРОБТЫҚ ДАҚЫЛДАРДЫ ҰЗАҚ САҚТАУДЫҢ ӘДІСТЕРІ

Дәріскер: Какимова Ардак Болатовна

Алматы 2026

Фототрофты микроорганизмдердің жасушаларын сақтаудың тиімді әдістерін қолдануға байланысты сұрақтар

мамандандырылған коллекциялар

өндірістік және ғылыми зертханалар

өйткені олар коммерциялық қызығушылық тудырады

Фототрофты микроорганизмдер жасушаларын сақтаудың белгілі бір әдісін қолданудың негізгі критерийлерінің бірі ұзақ мерзімді сақтауды қамтамасыз ететін сақтау шарттарын дәл таңдау болып табылады

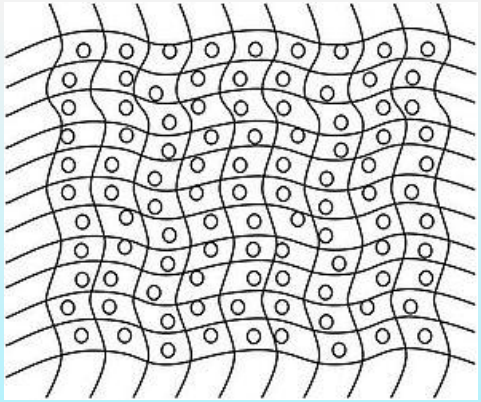
олардың популяция сипаттамаларының қасиеттерін сақтау

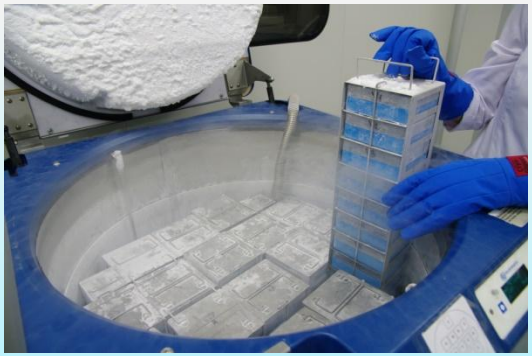
өміршеңдіктің ең жоғары деңгейі

Жасушаларды өміршең және репродуктивті күйде ұстаудың бірнеше белгілі тәсілдері бар:

- сұйық және агар орталарында жасушаларды сақтау
- Иммобилиздеген түрінде сақтау
- қорғаныш орталары мен криопротекторларды қолданып лиофилизация және криоконсервация







Музейдегі тірі дақылдарды сақтау:

қатты агардан жасалған қосяктар

сұйық суспензиялы қоректік орталарда

үш данадан кем емес

Балдырлар баяу өседі, сондықтан мұражайларда балдырларды сақтау үшін қатты орталар жиі қолданылады.

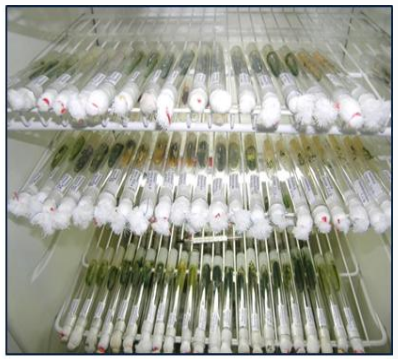
Сұйық ортаға себілмей өсіру ұзақтығы: балдырлардың өсу жылдамдығына, ортада қоректік заттардың берілуіне және т.б.





Сұйық және агар орталарында жасушаларды ұстау







Микробалдырлар мен цианобактериялардың жинағын сақтауға арналған тоңазытқыш

Дақылдарды сақтау үшін 300-500 лк әлсіз жарық көзімен (люминесцентті лампа немесе қыздыру лампасы 15-25 Вт) жарықтандырылған t ° = 6-16 ° C температурада тоңазытқыш қолданылады.

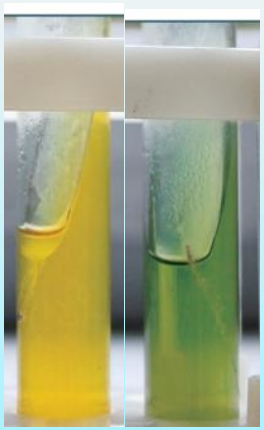
Мұндай жағдайларда дақылдар ұзақ уақыт сақталуы мүмкін, егер олар мезгіл-мезгіл (объектінің ерекшеліктеріне байланысты 1-3 айдан кейін) жаңа ортаға қайта отырғызады.

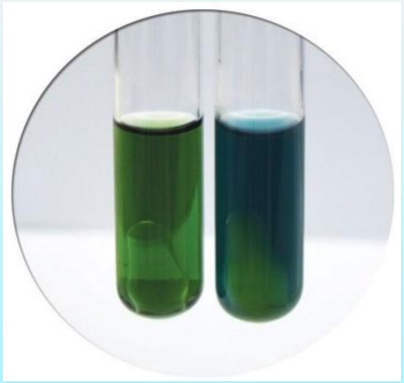
Көк-жасыл балдырларды ұзақ уақыт (1-1,5 жыл), жасыл балдырларды - 1-2 ай ғана, диатомдарды - бір айға дейін сақталынады.

Балдырларға ұзақ уақыт бойынада коректік ортада тұру ұсынылмайды, өйткені бай коректік ортада да балдырлар олардың тіршілік әрекеті өнімдерімен өзін-өзі уландыру (аутоингибирлеу) нәтижесінде өсуін тоқтатуы мүмкін.

Балдырлар тіршілігінің тежелуінің және өсудің тоқтауының белгілері болуы мүмкін

- Дақылдың сарғаюы
- Ортада ақшыл түстің пайда болуы
- Ортаның лайлануы





Балдырлардың әр штаммы коллекцияда белгілі бір нөмірдің астында сақталады және арнайы паспорты болады.

- Иддентификацияланған атауы
- бөліп алған зерттеушінің тегі
- коллекциядағы нөмірі
- штамның шығу тегі
- бөлініп алынған күні
- дақылды одан әрі өсіру, сақтау және сақтау шарттары
- штамның сипаттамасы

Балдырларды қысқа мерзімді сақтау үшін әр түрлі фиксаторлар мен консерванттар қолданылады. Балдырларды сақтау үшін 3 айдан аз уақытта консерванттарды пайдалануға болады

натрий ацетаты қосылған концентрацияланған Люголь ерітіндісі

спирт-глицерин қоспасы I (180 мл 96% спирт, 80 мл глицерин, 700 мл дистилденген су)

Концентрацияланған Люголь ерітіндісін дайындау:

10 г KI 20 мл дистиллденген суда ериді

содан кейін 5 г йод қосады

5 мл натрий ацетаты ерітілген 50 мл су қосады

жалпы көлемін 100 мл-ге дейін жеткізеді

Консерванттардың бірімен алгологиялық үлгі пластикалық ыдыста жақсы сақталуы мүмкін.

Лактофенол (кулактол) және Кинг ерітіндісі аз уақытта әсер ететін консерванттар болып табылады.



Таза бейтарап лактофенолдың құрамы келесідей: кристалды фенол - 20 г, сүт қышқылы - 20 г, глицерин - 40 г, тазартылған су - 200 мл

Лактофенол көк-жасыл балдырлардан басқа барлық тұщы су балдырларын (жасыл, эвглена) сақтауға жарамды.

Бұл консервант жасушаның пішінін, хлоропластардың жасыл түске боялуын және крахмалдың түс беру қабілетін сақтайды.

Балдырларды сақтамас бұрын дистилденген немесе қайнатылған сумен шайып, содан кейін лактофенолды қосу керек.

Балдырлардың барлық топтарын сақтауға ыңғайлы - **Пфайфер** ерітіндісі:

формалин + метил спирті + Сірке қышқылы

Бұл бекіткіштерде жақсы сақталады:

- балдырлардың пішіні
- органеллалар, хлоропласттар
- сыртқы шырышты қабық

ерітінді үлгіге (3-4) қатынасында қосылады: 1

→ 5-20 сағ.бекіту

↓

балдырларды сірке қышқылының иісі жоғалғанға дейін жуу

← материал тұрақты консервантқа орналастырылады (спирт-глицерин қоспасы II)

★ 600 мл 96% спирт, 80 мл глицерин, 280 мл тазартылған су

Алгологиялық үлгілерді өзгеріссіз күйде ұзақ уақыт сақтаудың негізгі шарттары

- Дұрыс бекіту
- шаю
- тиісті консервантты таңдау

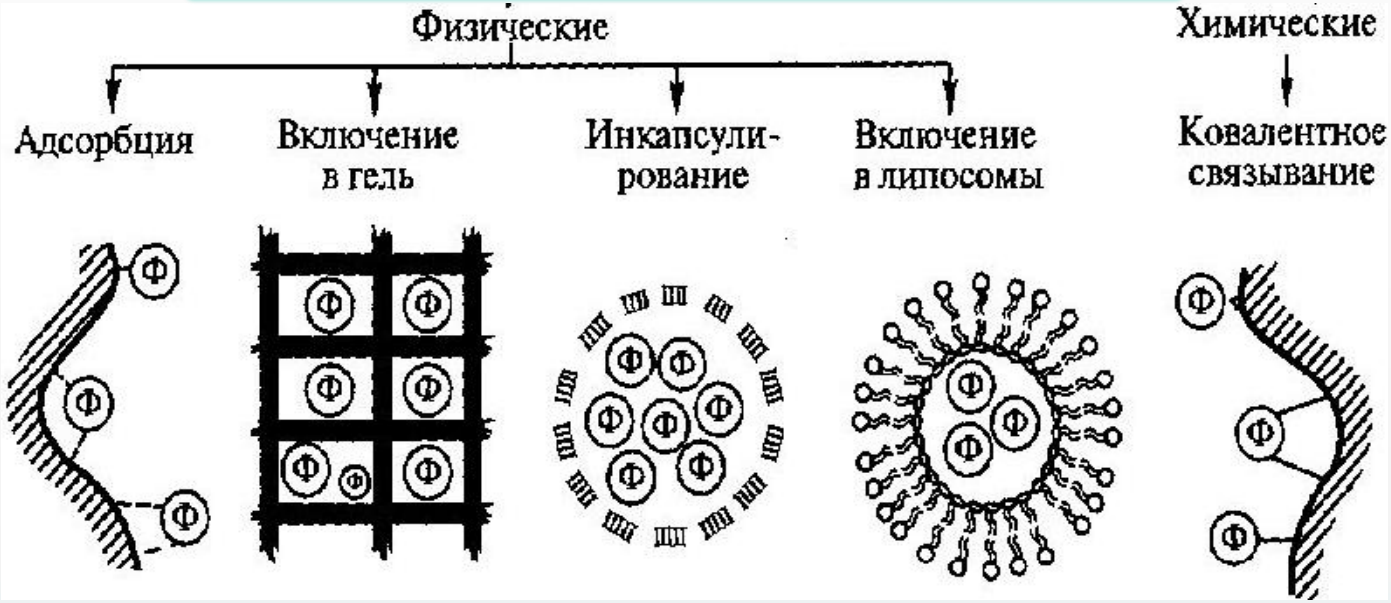
Балдырлардың бекітілген үлгілерінің коллекциясы арнайы гербарийде - алготекте сақталады.

Балдырлардың сулы формалары тығыздалған бұрандалы металл қақпағы бар 100 мл қара шыны бөтелкелерде сақталады, олар үстіңгі жағынан полиэтиленмен жабылған, резеңке сақинамен бөтелкенің мойнына оралады.

Балдырлардың сулы емес түрлері (ауа, су-ауа, жердегі, су-жердегі) 4% формалин ерітіндісімен алдын ала құйылған қара шыны колбаларда немесе картон қораптарға оралған қағаз пакеттерде сақталады.

Жасушалардың ***иммобилизациясы*** - бұл катализатор (жасуша) мен еріткіштің физикалық бөлінуі, онда субстрат пен өнім молекулалары фазалар арасында оңай алмасады.

Иммобилизация әдістері



Жасушалар өтетін химиялық модификация (адсорбция немесе ковалентті иммобилизация) олардың қасиеттерін өзгерте алады.

Препараттарды жасушалар ерітіндінің қалған бөлігінен тірекке қосу немесе инкапсуляциялау арқылы бөлінетін гельге қоскан жөн.

Кальций альгинат гелындегі Chlorella жасушаларын иммобилизациялау



шоғырландыру

Паста алу

натрий альгинат ерітіндісінің жасушалық пастасын араластыру (10:1)

алынған қоспаны шприцке салады

диаметрі 1-2 мм түйіршіктер пайда болатындай етіп 0,2М CaCl2 салқындатылған ерітіндісі бар ыдысқа тамызады

қатаю үшін 20 мин инкубирлейді

дистилденген сумен (10 минут ұстай отырып 3 рет)

препараттарды сумен ыдыстарға орналастырылады

тоңазытқышта сақтау

Chlorella жасушаларын агар-агар гелiне қосу арқылы иммобилизациялау

4% агар-агар ерітіндісін дайындау

жасушалардың қалың суспензиясын дайындау

су стаканға құйылады (t = 45°C) және ыдыстар температураны теңестіру үшін 10 минутқа қойылады

суспензияны агар-агар ерітіндісімен араластыру

алынған қоспаны шприцке салады

салқындатылған капиллярдан өтіп, онда жасушалары бар жұқа гель цилиндрі пайда болады

Дистилденген сумен шаю (10 минут ұстай отырып 3 рет)

препараттарды сумен ыдыстарға орналастырылады

Тоңазытқышта сақтау

Лиофилді кептіру

Әдістің мәні

Лиофилді күйден (мұздан) ылғал сұйық фазаны айналып өтіп, газ тәрізді күйге өтеді.

Басқа әдістерге қарағанда артықшылығы

Ылғалдылықты өте төмен деңгейге жеткізуге болады (1-3%)

Жойылған ылғалдың массасы салмақ жоғалту арқылы оңай анықталады

Лиофилизденген жасушалар ылғалданған кезде бастапқы қасиеттерін қалпына келтіреді

Мұздатылған ерітіндінің температурасы -21,2°С-қа жеткенде, барлық сұйықтық қатты фазаға (мұзға) өтеді.

Бұл трансформация жүретін температура эвтектикалық деп аталады, әр түрлі жасушалар үшін әр түрлі болады.



Микробалдырларды сублимациялық әдіс бойынша сақтау
(барлық сұйықтық қатты фазаға өткен)

Леофилді кептіру процесі 4 кезеңде жүзеге асырылады:

- алдын-ала мұздату;
- алғашқы кептіру (вакуумды сублимация);
- қайталама кептіру (қосымша кептіру) немесе вакуумдық десорбция;
- кептіру процесін аяқтау және кептірілген материалды қалпына келтіру.

Лиофилизацияның жетістігі байланысты:

- қолданылатын жасушалардың сапасы
- жасушалардың өміршеңдігіне
- олар өскен жағдайлар

Суспензияда кем дегенде 108 жасуша /мл болатындай етіп жеткілікті мөлшерде жасушалар өсіріледі.

Жасушалар экспоненциалды немесе ерте стационарлық өсу фазаларында жиналады.



Жасушаларды лиофилизацияға дайындау үшін оларды криопротекторлары бар ортада суспензиялайды.



Қорғаныс орталарын жасау тәжірибесі көрсеткендей, физикалық қасиеттері бойынша жасушалар мен өнім қалдықтарының өлімін азайту үшін ксеропротектор құрамы микробалдырлардың әр түрі үшін сапалық және сандық теңдестірілген компоненттер жиынтығын қамтуы керек.

Маңыздылығы:

- Жасуша саны
- мұздату кезіндегі температура әсерінің сипаты
- сусыздандыру кезіндегі температура әсерінің сипаты

Жабдықтармен қамтылуы

Лиофилді кептіру үшін екі қондырғы белгілі бір режимде болатын арнайы қондырғылар қолданылады

- Температура
- Қысым (вакуум)



Жұмыс істеу принципі бойынша сублимациялық қондырғылар:

Мерзімді орнату құрылғысы

- бір камералы
- көп камералы

Үздіксіз қондырғылар

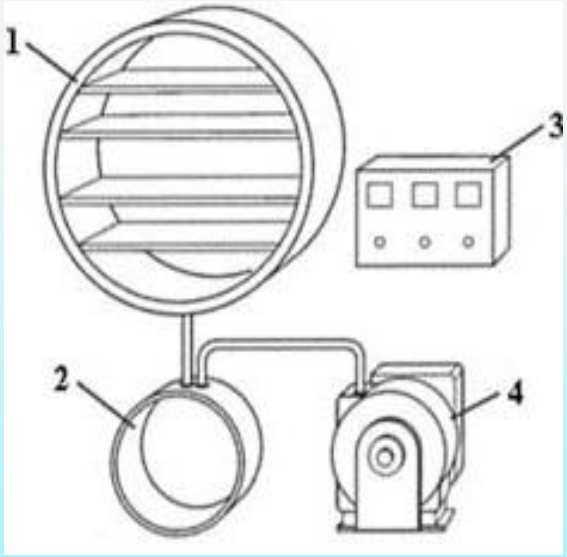
- үздіксіз-циклдік
- үздіксіз-сатылы
- үздіксіз-ағынды
- үздіксіз

Лиофилді кептіру құрылғысы

Бірінші кезеңде бастапқы материал төмен температураға дейін мұздатылады және конденсаторға қосылған жұмыс камерасындағы ашық ыдысқа салынады. Конденсатордағы температура мәні лиофилизация камерасына қарағанда әрдайым төмен болады.

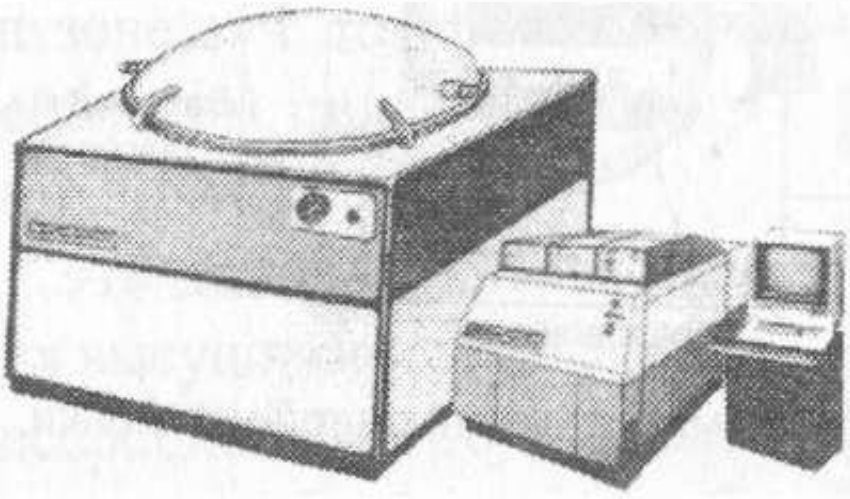
Екінші кезеңде мұздатылған ерітіндіден жоғары вакуум жағдайында мұз немесе еріткіш кристалдары тікелей жойылады.

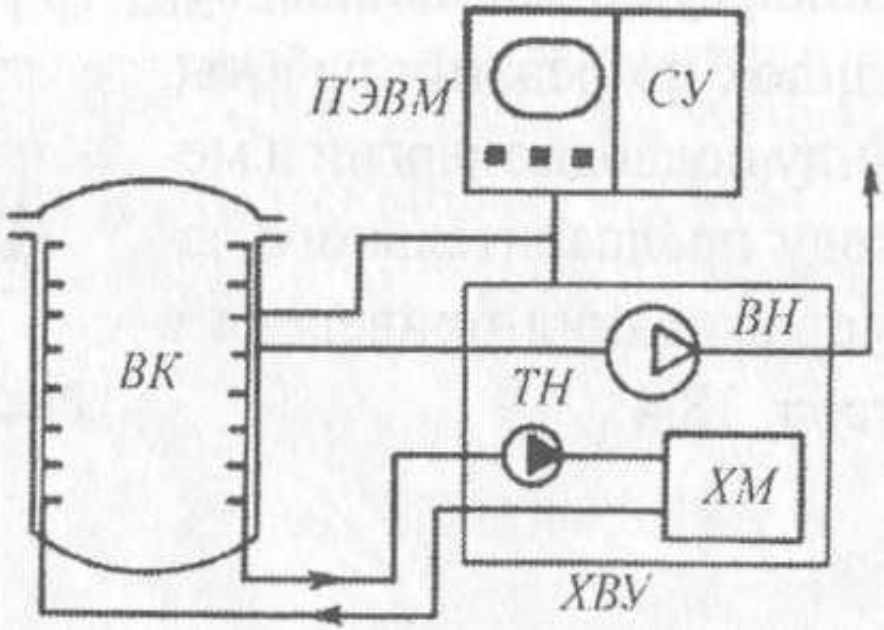




1. Камера;
2. Конденсор төмен температуралы;
3. Басқару панелі;
4. Вакуумды сорғы;

Мерзімді әрекет ететін сублимация қондырғысының жалпы көрінісі мен схемасы:





ВК - вакуумды камера;

ЖБ – жүйелі басқару;

ТН - турбонасос;

ПЭВМ - персоналді ЭВМ;

ВН - вакуумды насос;

ТМ - тоңазытқыш машина;

ТВО - тоңазытқыш-вакуумды орналастыру

Қазіргі уақытта **криоконсервация** әртүрлі фототрофты микроорганизмдерді ұзақ уақыт сақтаудың ең тиімді әдісі болып саналады.



Әдіс биологиялық объектілерді суық күйге анабиоз жағдайына (мұздату) ауыстырудан тұрады

физиологиялық оптималды өсіру жағдайында метаболикалық белсенділікке (ерітуге) кейіннен қайта оралуынан тұрады

Жасушаны мұздату-еріту режимдерін әр түрлі ету

мұздату және еру температурасы

бірінші және екінші процестің жылдамдығы

фототрофты микроорганизмдер жасушаларының криоконсервациясы нәтижелерінің тиімділігін арттыра алады

Мұздату температурасына қатысты фототрофты жасушаларды криоконсервілеу әдістері 2 түрге бөлінеді:

- сұйық азот температурасында жасушаларды сақтауды қамтамасыз ететін фототрофты микроорганизмдер жасушаларын криоконсервілеу әдістері
- сұйық азоттың температурасынан жоғары температурада жасушаларды сақтау әдістері

Сұйық азот температурасына дейін жасушаларды мұздату

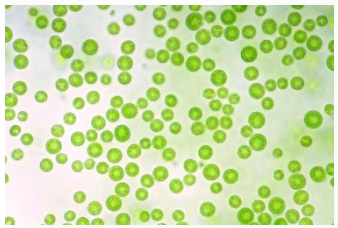
- температураның күрт төмендеуіне әкелетін t° жылдам салқындаумен бірге жүреді
- Электролиттер концентрациясының жасушадан тыс әсерін азайтады
- жасуша ішіндегі мұздың пайда болуына әкеледі

Баяу салқындату (-30-80°С)

- жасушадан судың көп жоғалуына әкеледі
- жасушаішілік мұздың аз жиналуына әкеледі
- электролиттердің жасушадан тыс әсері едәуір күшейеді

Криопротекторлар СРМ серпімділігіне әсер ететін, жасушаішілік суды байланыстыратын және жасушалардың сусыздануын алдын алатын, электролит тұздарының уытты әсерін төмендететін және ірі мұз кристалдарының пайда болуына жол бермейтін заттар қолданылады.

Екі сатылы мұздату режимін қолдана отырып, Chlamydomonas reinhardtii фототрофты жасушаларын криоконсервациялау әдістері

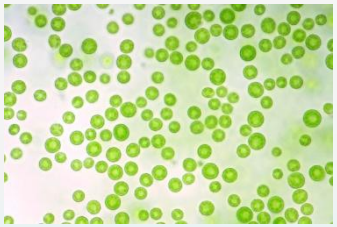


Жасуша суспензиясы (2,2÷3,3)х106 кл/мл

-55°С дейін мұздатады, метанол қатысында (2-10%)

мұздатылған материалды t = -170 ° С сұйық азот буына салады

Жасушалардың өміршеңдігі 40-52,5% құрайды.



Жасуша суспензиясы (2,2÷3,3)х106 кл/мл

-80°С дейін мұздатады, в ДМСО (10%)

жасушалар осы температурада 1,5 сағат ұсталады

мұздатылған материалды t = -170 ° С сұйық азот буына салады

C. vulgaris жасушаларын -196°С температурасында 10-30 күн сақтауға болады.

Фототрофты микроорганизмдер жасушаларын криоконсервациялау әдісі

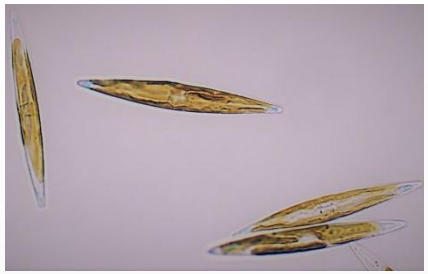
Жасушалар мұздату -20°С -60°С немесе -80°С жүреді; криопротектордың қатысуымен (20% метанол немесе 5-10% ДМСО)

сақтау осы температурада жүзеге асады

Бұл әдістің артықшылығы - сұйық азоттың температурасынан едәуір жоғары температураны пайдалану, қарапайым және арзан жабдықты пайдалануға мүмкіндік беру.

Бұл *әдістің кемшілігі* - ерігеннен кейін жасушалардың өміршеңдігінің ішінара сақталуын қамтамасыз ететін токсинді криопротекторларды қолдану.

Жасушаларды иммобилизациялаумен криоконсервация тәсілі



диатомовые микроводоросли
Haslea ostrearia

Са-алгинат гельіндегі жасушалардың иммобилизациясы

түйіршіктерді 0,7М сахарозаның ерітіндісімен сіңдіру (криопротектор)

зарарсыздандырылған ауа ағынында кептіру

кептірілген түйіршіктердің сынамаларын -80 ° С-та мұздату

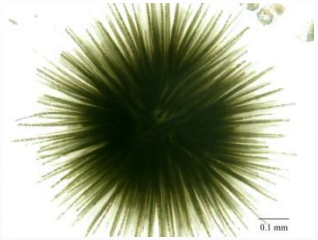
оларды сұйық азотты ортаға беру және сақтау

77% жасушалардың тіршілік етуін қамтамасыз етеді

Кемшіліктері:

- осылайша алынған жасуша үлгілерін өсіру оларда сахарозаның болуына байланысты тез инфекция жұғу жүреді
- көп сатылы, процестің ұзақтығы және құны

Жасушаларды иммобилизациялаумен криоконсервация тәсілі



Gloeotrichia echinulata

және *Rivularia aquatica*

дақылдау

центрифугалау

натрий альгинатының стерильді 6% ерітіндісінде қайта суспензияланады

алынған суспензия 100 мм CaCl2 ерітіндісіне тамшылатып қосылып, диаметрі 4 мм сфералық түйіршіктер түзеді

кальций хлориді ерітіндісінен түйіршіктер бөлінеді

стерильді дистилденген суда жуылады.

стерильді ауа ағынында 30 минут кептірілді

-20±2°C температурада жабық ыдыста сақталады

Сақтауға дейін және кейін микробалдырлардың қасиеттерінің сақталу дәрежесін бағалау үшін мыналарды қолданады:

- Дақылдық әдістер
- Морфологиялық әдістер
- Биохимиялық әдістер
- Өнімділік белсенділігін анықтайды

Сақтаудан кейін алынған нәтижелерді бұрын жазылған нәтижелермен салыстыру.

Тіршілікке қабілетті жасушалардың саны сериялық сұйылту әдісімен анықталады, содан кейін агар орталарына егіп, өскен колонияларды санау.



Терең мұздату мұз кристалдарының пайда болуынан және олардың сусыздануымен бірге жүретін зақымдану салдарынан клеткалардың ауыр және қайтымсыз зақымдалуына әкелуі мүмкін.

Мұздату кезінде электролиттер концентрациясының жоғарылауы әкеледі

сутегі иондарының концентрациясының өзгеруі	қышқыл-сілтілік тепе-теңдіктің бұзылуы

Сусыздануның салдарынан жасушадағы тұздардың локалды мөлшері белоктардың құрылымына кері әсер етіп, критикалық концентрацияға жетеді.

Фототрофты микроорганизмдерді сақтаудың қазіргі заманғы әдістеріне қарамастан, олардың штамдарын белсенді өсіп келе жатқан жағдайда оңтайлы сақтау жүзеге асырылады.

колбалардағы сұйық орталарда немесе

агар ортасы бар пробиркаларда

дақылдау бөлмесінде LB-40 люминесцентті лампалармен жабдықталған тоңазытқыш қондырғысында әр 2-3 айда 5-15 ° С температурада қайта егілі отырады

Назарларыңызға рахмет