

Региональная открытая конференция
по научно-техническому творчеству школьников «Лабиринты науки»

Секция «Биотехнология»

Тема работы
«Водоросли в альгинатном геле»

Автор:

Азиз Мария Ноомановна,
ученица 11 «Б» класса
МОУ СОШ «Образовательный комплекс № 33»
«Центр образования - школа №18»

Научный руководитель:

Зубишина Алла Александровна,
к.б.н., доцент кафедры биологии и зоологии
ФГБОУ ВО «ЯрГУ им. П.Г. Демидова»

г. Ярославль,

2025 год

Оглавление

Введение.	3
Актуальность проекта.	4
Проблема, решаемая в рамках проекта.	4
Цель, задачи, новизна проекта.	5
Теоретическая часть.	6
Практическая часть.	7
Заключение.	10
Список литературы.	12
Приложение 1. Фотофиксация этапов проведения эксперимента.	13
Приложение 2. Обработка результатов эксперимента.	17

Введение.

Микроводоросли, такие как *Chlorella*, представляют огромный интерес для различных отраслей науки и промышленности: от биотехнологии и до косметологии, фармацевтики и создания систем жизнеобеспечения. Они являются ценным источником белка, витаминов, антиоксидантов и других биологически активных веществ.

Одной из ключевых задач при работе с культурами микроводорослей является их долгосрочное хранение и транспортировка. Эффективным и распространенным методом является криоконсервация – замораживание при сверхнизких температурах. Однако главная проблема этого метода заключается в том, что при замерзании внутри и вокруг клеток образуются кристаллы льда, которые механически повреждают клеточные мембраны и структуры, приводя к гибели значительной части культуры. Для защиты клеток от повреждающего действия замораживания используются криопротекторы – вещества, которые снижают точку замерзания воды и минимизируют образование льда.

Вместе с тем, многие традиционные криопротекторы, такие как глицерин или ДМСО, в высоких концентрациях могут быть токсичны для клеток. Альгинатные гели, получаемые из бурых водорослей, представляют собой альтернативу или дополнение к обычным методам криоконсервации. Эти гели способны формировать пористую трехмерную структуру, которая может иммобилизовать клетки, физически защищая их от механических повреждений кристаллами льда, а также создавая микросреду, стабилизирующую клеточные мембраны.

Гипотеза исследования: предполагается, что иммобилизация клеток *Chlorella* в альгинатных гелях повышает их выживаемость после криоконсервации, причем эффективность защиты напрямую зависит от концентрации альгината: более концентрированные гели (3%) обеспечивают лучшую защиту по сравнению с менее концентрированными (1 и 2 %).

Актуальность проекта.

Актуальность данного исследования обусловлена следующими факторами:

1. Потребность в эффективных методах хранения биокультур: биотехнологические производства, научные лаборатории и коллекции культур микроводорослей нуждаются в надежных, долгосрочных и экономичных методах хранения своих штаммов без потери их жизнеспособности и ценных свойств.
2. Проблема транспортировки: пересылка живых культур микроводорослей на большие расстояния сопряжена с рисками их гибели из-за перепадов температуры, механических воздействий и других стрессовых факторов. Разработка методов, позволяющих безопасно замораживать и перевозить культуры, критически важна для научного и коммерческого сотрудничества.
3. Ограничения традиционных методов: использование жидких криопротекторов не всегда эффективно для всех видов водорослей и может требовать сложных процедур по их удалению после разморозки. Кроме того, их токсичность является существенным недостатком.
4. Перспективность иммобилизации клеток: технология иммобилизации в гелях является экологически чистой, биосовместимой и позволяет не только защищать клетки при замораживании, но и потенциально использовать готовые гелевые шарики в биореакторах или для применения в готовых продуктах (например, в косметике или кормах).
5. Фундаментальная научная значимость: изучение взаимодействия клеток с полимерными матрицами в условиях криогенного стресса вносит вклад в понимание механизмов криоповреждений и способов их предотвращения.

Проблема, решаемая в рамках проекта.

Основная проблема, на решение которой направлен данный проект, заключается в низкой выживаемости клеток микроводорослей при криоконсервации и транспортировке в замороженном состоянии.

Цель, задачи, новизна проекта.

Цель: оценить влияние концентрации альгинатного геля на выживаемость клеток микроводоросли *Chlorella* после криоконсервации при температуре -18°C .

Для достижения поставленной цели необходимо решить следующие задачи:

1. Приготовить растворы альгината натрия трех различных концентраций: 1%, 2% и 3%. Получить суспензию клеток *Chlorella*, смешать ее с приготовленными растворами альгината. Методом экструзии (с помощью шприца) и ионной сшивки в растворе хлорида кальция получить сферические гелевые шарики с иммобилизованными клетками водорослей для каждой концентрации альгината.
2. Провести криоконсервацию полученных шариков (по 100 шт. для каждой концентрации) и контрольного образца (суспензия водорослей с глицерином) в морозильной камере при температуре -18°C на срок 2 недели.
3. Провести микроскопический анализ выживаемости клеток из отобранных гелевых шариков (по 3 шарика на каждую концентрацию) с использованием светового и флуоресцентного микроскопов, а также подсчет доли живых и мертвых клеток в общей выборке (не менее 300 клеток на образец), провести статистическую обработку полученных данных.
4. Проанализировать полученные результаты, сделать выводы о подтверждении или опровержении гипотезы исследования.

Новизна работы заключается в том, что впервые проведено комплексное исследование влияния концентрации альгинатного геля (от 1 до 3%) на выживаемость микроводорослей *Chlorella* после криоконсервации, что вносит вклад в развитие методов биопротекции водорослей и расширяет представление о возможностях использования альгината в биотехнологических приложениях.

Теоретическая часть.

Микроводоросль *Chlorella*: общая характеристика и значение *Chlorella*— это одноклеточная зелёная водоросль сферической формы, широко распространённая в пресных водоёмах. Её ключевые особенности:

- Высокая скорость фотосинтеза и роста: способна быстро наращивать биомассу.
- Пищевая ценность: богата белками (до 50% сухой массы), витаминами (А, С, группы В), минералами и незаменимыми аминокислотами.
- Биотехнологический потенциал: используется в качестве пищевой добавки, корма, в биоочистке сточных вод, производстве биотоплива и в косметологии. [1]

Из-за своих малых размеров и нежной клеточной стенки хлорелла сильно уязвима к физико-химическим стрессам, таким как замораживание.

Для долгосрочного и эффективного хранения хлореллы проводят криоконсервацию. [2-3]

Криоконсервация — это процесс сохранения жизнеспособных клеток и тканей при ультранизких температурах (обычно от -80°C до -196°C).

Основные причины гибели клеток при замораживании:

1. Внутриклеточное образование льда: кристаллы льда, формирующиеся внутри клетки, механически разрушают мембраны и органеллы, что является фатальным для клетки.
2. Осмотический стресс: при медленном замораживании вода сначала замерзает вне клетки. Это приводит к повышению концентрации растворённых веществ во внеклеточной среде. Вода из клетки выходит наружу по осмотическому градиенту, вызывая сильное обезвоживание (дегидратацию) и сморщивание клетки.

Для эффективной криоконсервации клетки замораживаемых объектов насыщают криопротекторами — веществами, уменьшающими криповреждения. А для повышения стабильности, активности,

селективности и возможности многократного использования биообъектов применяют иммобилизацию. [4-7]

Таким образом, для минимизации повреждений клеток используются две основные стратегии:

Криопротекторы - вещества, которые снижают точку замерзания воды и препятствуют образованию крупных кристаллов льда, и включают.

- Проникающие (интрацеллюлярные): глицерин, диметилсульфоксид (ДМСО). Проникают внутрь клетки. Однако в высоких концентрациях могут быть токсичны.
- Непроникающие (экстрацеллюлярные): сахароза, полиэтиленгликоль, альгинат. Действуют вне клетки, стабилизируя мембраны и создавая аморфную стекловидную структуру вместо кристаллического льда.

Иммобилизация в гели: заключение клеток в пористую матрицу геля. · Альгинат натрия — природный полисахарид, получаемый из бурых водорослей. Его водный раствор при контакте с ионами кальция (Ca^{2+}) образует прочный гель (альгинат кальция) по механизму ионной сшивки. ·

Защитный механизм геля:

- Физический барьер: гелевая матрица ограничивает рост кристаллов льда, дробит их на мелкие и менее опасные, замедляет процессы обезвоживания и повторной гидратации клеток.
- Стабилизация мембран: плотная полимерная сеть механически стабилизирует клетку, предотвращая разрывы мембран.
- Гипотеза зависимости от концентрации: чем выше концентрация альгината, тем плотнее и мельче становится сетка геля. Предполагается, что плотный гель (3%) обеспечивает лучшую механическую поддержку и более эффективно контролирует образование льда, чем рыхлый гель (1%).

Практическая часть.

При проведении практической части исследования использованы следующие материалы и оборудование:

- Биологический материал: чистая культура микроводоросли *Chlorella*.
- Реактивы: порошок альгината натрия, хлорид кальция (CaCl_2), глицерин, дистиллированная вода.
- Лабораторная посуда и оборудование: мерные стаканы (3 шт. по 50 мл), стеклянные палочки, шприц на 5 мл, чашки Петри, мерный цилиндр, весы аналитические, морозильная камера (-18°C), световой микроскоп, флуоресцентный микроскоп.

Методика проведения эксперимента:

1. Приготовление растворов альгината.

В каждый из трех стаканов объемом 50 мл. было налито по 25 мл. дистиллированной воды. В первый стакан добавлено 0,5 г. альгината натрия (получен 1% раствор). Во второй стакан добавлен 1 г. альгината (получен 2% раствор). В третий стакан добавлено 1,5 г. альгината (получен 3% раствор). Растворы в каждом стакане перемешивались до полного растворения порошка.

2. Приготовление иммобилизованных образцов.

В каждый из трёх приготовленных растворов альгината была добавлена готовая суспензия водорослей *Chlorella* и тщательно перемешана. С помощью шприца полученная смесь медленно капельно добавлялась в 2% раствор хлорида кальция. В результате ионного гелеобразования в чашке Петри с CaCl_2 формировались твёрдые сферические шарики. Для каждой концентрации альгината было получено по 100 шариков.

3. Приготовление контрольного образца.

Аликвота суспензии *Chlorella* была смешана с глицерином (сильным криопротектором) для сравнения эффективности традиционного метода с предлагаемым.

4. Криоконсервация:

Все образцы (шарики трёх типов и контрольная суспензия) были помещены в морозильную камеру и заморожены при температуре -18°C на срок 2 недели.

5. Анализ выживаемости после разморозки:

Образцы были извлечены из морозильной камеры и разморожены при комнатной температуре. От каждой концентрации геля было случайным образом отобрано по 3 шарика. Шарика были растворены в цитрате натрия для высвобождения клеток. Полученная суспензия анализировалась под микроскопом. Сначала под световым микроскопом оценивалась общая морфология клеток. Затем с помощью флуоресцентного микроскопа проводился подсчёт живых и мёртвых клеток. Для каждого образца было подсчитано 300 клеток, результаты зафиксированы (Приложение 1).

Методы анализа данных.

Для оценки выживаемости рассчитывался процент жизнеспособных клеток по формуле: $\text{выживаемость (\%)} = (\text{число живых клеток} / \text{общее число подсчитанных клеток}) * 100\%$. Полученные данные были занесены в таблицу и проанализированы для выявления зависимости выживаемости от концентрации альгинатного геля.

Методы исследования и результаты проекта.

Лабораторные методы: приготовление растворов альгината, иммобилизация клеток, формирование гелевых шариков, криоконсервация, микроскопия (световая и флуоресцентная), витальное окрашивание.

Результаты подсчета выживаемости представлены на рисунках 1 и 2 (Приложение 2).

Из рисунков 1 и 2 видно, что наибольшая выживаемость клеток *Chlorella* после криоконсервации наблюдается в образце с 3% альгинатным гелем, что демонстрирует прямую зависимость между концентрацией гелевого носителя и эффективностью криозащиты. Таким образом, поставленная гипотеза подтвердилась.

Заключение.

На основании проведённого экспериментального исследования по криоконсервации микроводоросли *Chlorella* в альгинатных гелях различной концентрации получены следующие выводы:

1. В рамках исследования успешно подготовлены растворы альгината натрия с различной концентрацией и произведена имплантация клеток хлореллы в сферические гелевые шарики с помощью метода экструзии и ионной сшивки. Проведена криоконсервация полученных гелевых шариков и контрольных образцов с глицерином. Микроскопические исследования показали, что после двухнедельного хранения в морозильной камере при -18°C доля живых клеток в шариках с альгинатом существенно превышает показатели контрольных образцов.

2. Подтверждена основная гипотеза исследования. Концентрация альгинатного геля статистически значимо влияет на выживаемость клеток *Chlorella* после криоконсервации. Наибольшая доля живых клеток (91.1%) была зафиксирована в образце с 3% гелем, что подтверждает предположение о том, что более плотная гелевая матрица обеспечивает лучшую защиту.

3. Установлена четкая положительная корреляция между концентрацией геля и выживаемостью. Полученные данные демонстрируют прямую зависимость увеличения выживаемости клеток *Chlorella* при увеличении концентрации альгинатного геля в системе.

4. Эффективность иммобилизации в альгинате в качестве метода криозащиты доказана. Даже в наименее концентрированном геле (1%) выжила четверть популяции, в то время как в контрольном образце без геля выживаемость близка к нулю. Это подтверждает, что сама по себе гелевая матрица является эффективным барьером, ограничивающим повреждение клеток кристаллами льда.

5. Механизм защиты подтверждается практическими результатами. Высокая выживаемость в 3% геле объясняется его плотной структурой,

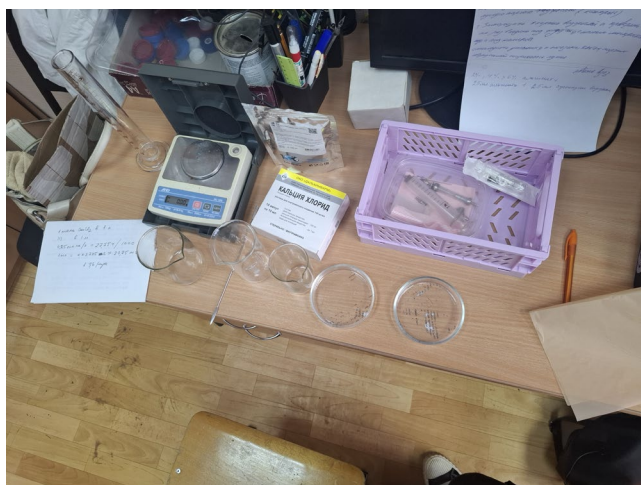
которая создаёт оптимальный физический барьер, эффективно дробит формирующиеся кристаллы льда и стабилизирует клеточные мембраны, минимизируя осмотический стресс и механические повреждения.

6. Метод является перспективной альтернативой или дополнением к традиционной криоконсервации. Использование 3% альгинатного геля в качестве криопротектора показало исключительно высокий результат, что позволяет рекомендовать данный метод для практического применения в биотехнологии для долгосрочного хранения и транспортировки ценных культур микроводорослей.

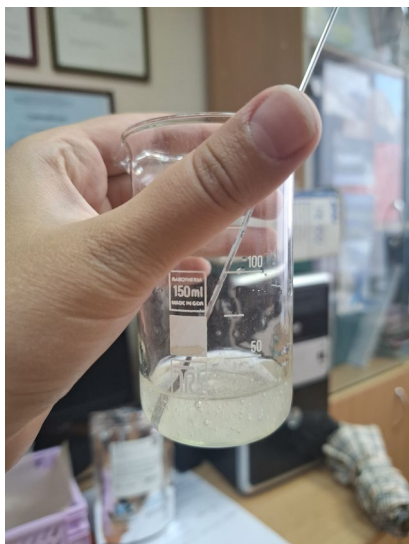
Список литературы.

1. Николаева, Ю. В. Микроскопическая водоросль хлорелла / Ю.В. Николаева, М.В. Ефимова. – Текст: непосредственный // Молодой ученый. – 2022. - № 24 (419). – С.111-113.
2. В. Д. Похиленко, А. М. Баранов., К. В. Детушев, «Методы длительного хранения коллекционных культур микроорганизмов и тенденции развития» /Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Медицинские науки. 2009, N 4(12), с.99-121.
3. Харчук И.А., «Сохранение жизнеспособности клеток микроводорослей при замораживании» /Морские исследования и образование (MARESEDU-2016): труды V Междунар. науч.-практ. конф. - М. : Феория, 2016. - 549 с., с.416-419.
4. Петрухина Д. И. Низкотемпературная консервация видов Cyanophyta (Spirulina, Arthrospira) // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология. 2019. Т. 19, вып. 1. С. 58-63.
5. Susana Romo, Carmen Pérez-Martínez, “THE USE OF IMMOBILIZATION IN ALGINATE BEADS FOR LONG-TERM STORAGE OF PSEUDANABAENA GALEATA (CYANOBACTERIA) IN THE LABORATORY” /June 2008, Journal of Phycology 33(6):1073 – 1076
6. Иванов И.И. Иммобилизация: определение и применение в биотехнологии [Электронный ресурс] // Научный журнал "Биотехнология": сведения, относящиеся к заглавию / Иванов И.И. URL: <https://www.biotechjournal.ru/article/immobilization> (дата обращения: 25.10.2025).
7. Olga Murujew, Rachel Whitton, Matthew Kube, Linhua Fan, Felicity Roddick Bruce Jefferson, Marc Pidou, «Recovery and reuse of alginate in an immobilised algae reactor» / Environmental Technology, Volume 42, Issue 10, 2021, pp. 1521-1530.

Приложение 1. Фотофиксация этапов проведения эксперимента.



Подготовка материалов и оборудования для проведения эксперимента



Замешивание геля для растворов



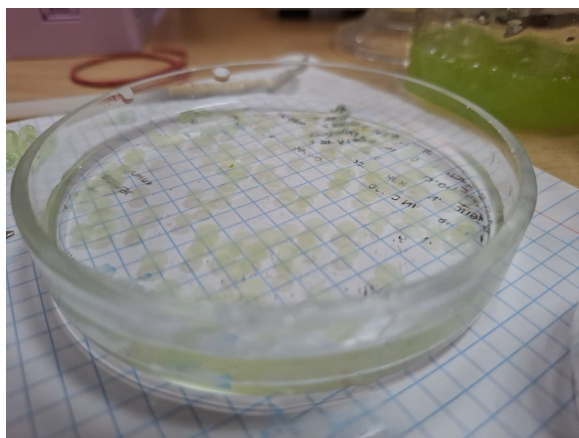
Получение 1%, 2%, 3% растворов.



Добавление суспензии водорослей в растворы



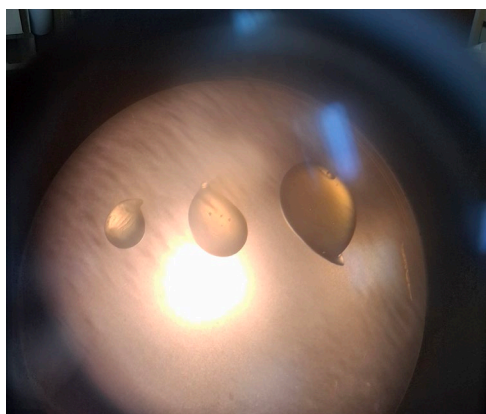
Смешивание суспензии водорослей с 1%, 2%, 3% растворами альгината натрия.



Формирование твёрдых сферических шариков в растворе CaCl_2



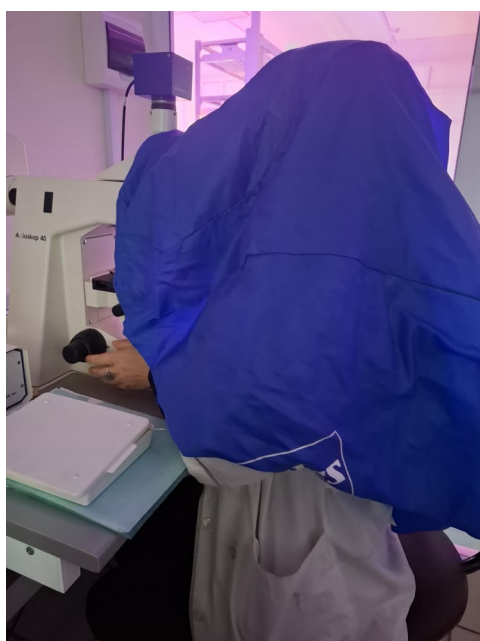
Отделение шариков от раствора CaCl_2 и промывание их в дистиллированной воде



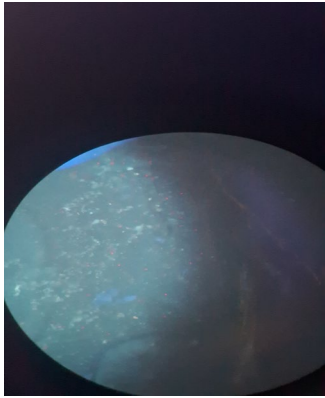
**Твердые шарики геля
разной концентрации под
световым микроскопом до
заморозки**



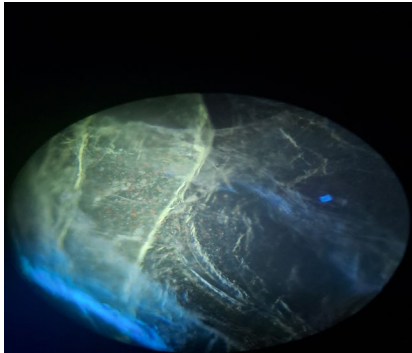
**Твердые шарики геля
разной концентрации под
световым микроскопом
после заморозки**



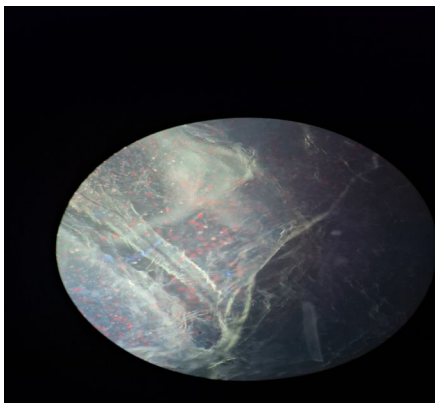
**Процесс просмотра
шариков под
флюоресцентным
микроскопом**



**Суспензия водорослей под
флюоресцентным
микроскопом**



**Водоросли, которые были в
шариках 1% раствора
альгината натрия**



**Водоросли, которые были в
шариках 2% раствора
альгината натрия**



**Водоросли, которые были в
шариках 3% раствора
альгината натрия**

Приложение 2. Обработка результатов эксперимента.

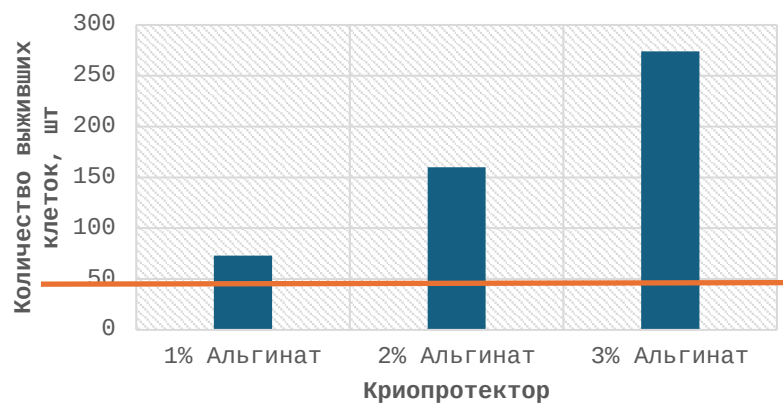


Рисунок 1. Количество выживших клеток *Chlorella* (шт) от концентрации альгинатного геля (%).

На рисунке 1 красная линия — это контрольный образец с использованием традиционного криопротектора - глицерина.

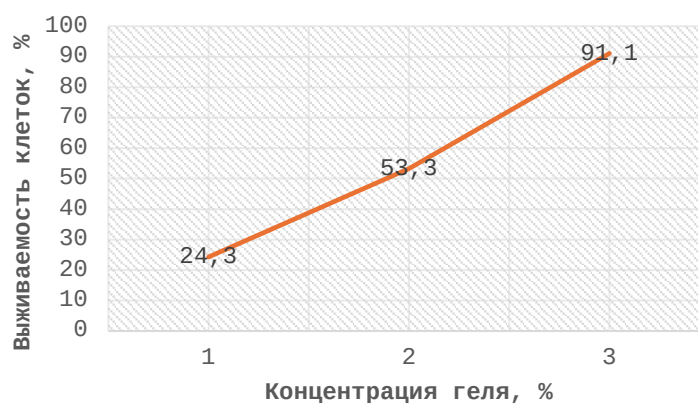


Рисунок 2. Зависимость выживаемости клеток *Chlorella* (%) от концентрации альгинатного геля (%).