

Predavanje GIO 7

Čuvanje i održavanje stanica

Dr. sc. Višnja Bačun-Družina, izv. prof.

ČUVANJE I ODRŽAVANJE SOJEVA I STANIČNIH LINIJA

- **Kratko vrijeme čuvanja** (do mj.): na krutoj podlozi (parafilm); +4 °C
- **Srednje vrijeme čuvanja** (do 2 god.): duboki ubod u agar (parafilm, parafin); +4 °C
- **Dugotrajno čuvanje** (10-15 god.)

- Dozvoljeni rast – sve teh. koje dozvoljavaju m.o. da tijekom čuvanja rastu; prenošenje na svježere podloge.

- Dehidracija uključuje: sušenje zrakom, isušavanje u ili na sredstvu za isušivanje, sušenje vakuumom iz tekuće ili smrznute faze.

- Smrzavanje – na temp. koja će smanjiti ili potpuno spriječiti metabolizam i fizikalne promijene stanica.

Čuvanje uz dozvoljeni rast

- **Postupak 1.** Čuvanje ispod sloja parafinskog ulja (pogodno za bakterije i gljive; spriječen pristup kisiku i smanjeno isušivanje)

Nacjeppljivanje i spremanje:

- nacjepeliti kulturu na KP u bočicama na zavrtanj

- inkubirati na optimalnoj temp. do formiranih kolonija

- dodati parafinsko ulje (čistoća, ster. 121 °C, 20 min 2x) da prekriva 1 cm

- čuvanje na 15-20 °C

Oživljavanje stanica:

- uzimanje stanica (otresti ulje)

- inokulirati u KP pri optimalnim uvjetima

- # plijesni viabilne 44 god u Int. Mycological Inst. (IMI)

Obnavljanje kulture: plijesni nakon 2-10 god.; bakterije 2-4 god.

- **Postupak 2.** Čuvanje u vodi

(pogodno za bakterije, plijesni; uz dijelove agara-dozvoljen određen rast, resuspendirane spore plijesni-nema rasta)

- Spremanje:

- izrezati blokove agara (6x6x6 mm) obrasle m.o.

- prenjeti 20-30 blokova u 10 ml ster. vode

- čuvanje na 20-25 °C

Tehnike dehidracije

- **Postupak 3.** Sušenje u silikagelu

(smanjuje se mogućnost biokem. reakcija – varijabilnost;

nosači: zemlja, pjesak, silikagel, porculanske kuglice i papir; sredstvo za suspenziju: 5-10 %-tno obrano mlijeko, 3 %-tni inozitol ili 5 %-tni med)

- rashlađena (5 °C) suspenzija spora m.o. u 5 %-tnom obranom mlijeku

- na silikagel (ster. 180 °C 2-3 h; smrznuti -20 °C preko noći) dodati 1 ml suspenzije spora

- inkubirati na 25 °C 1-2 tjedan, kristali silikagela

- čuvati na 4 °C

- Oživljavanje kulture: nekoliko kristala silikagela s mikroorganizmom nacijepiti na KP, optimalni uvjeti rasta.
- # spore plijesni 20 god u IMI; 50 % sojeva preživi uz ovu metodu u National Collection of Yeast Cultures (ACYC)
- Obnavljanje kulture: prije 8. god.

- **Postupak 4.** L-sušenje (Dando i Bousfield, 1991.)

- (sušenje pod vakuumom bez smrzavanja – pogodno za bakterije)

- gusta suspenzija stanica u KP (serum, hranivi bujon, glukoza)

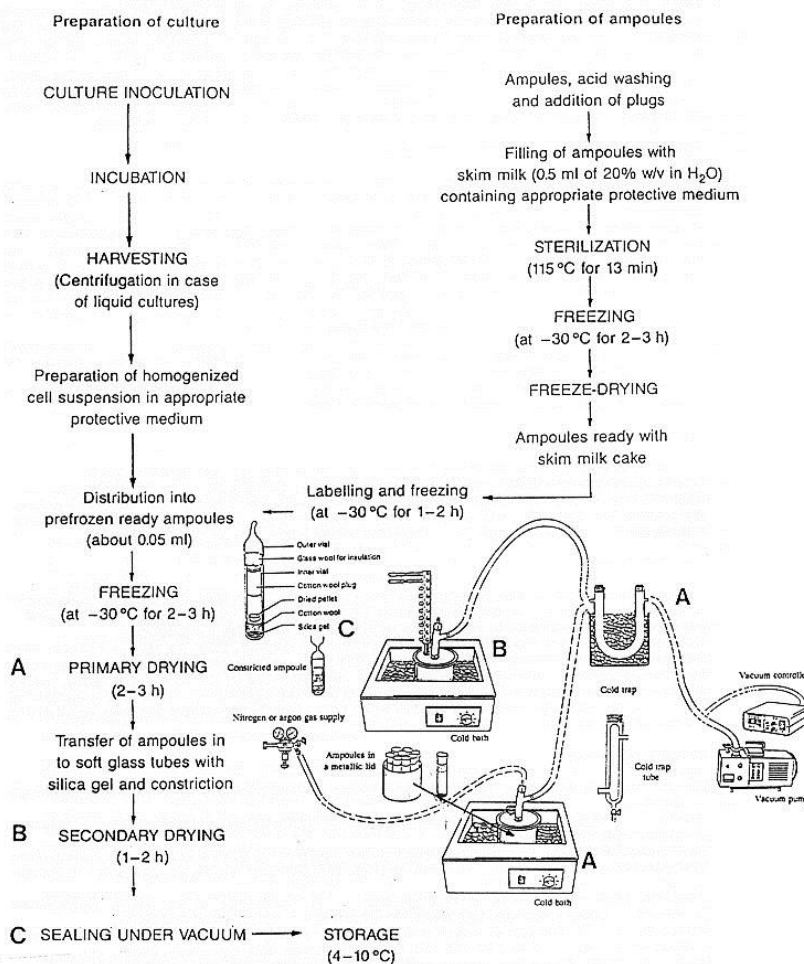
- u ampule po 0,1 ml suspenzije stanica

- sušiti pod vakuumom temp. 20 °C, zataliti ampule

- Oživljavanje stanica: dodati 0,1 ml des. vode, KP, optimalni uvjeti rasta.

- # National Collection of Ind. And Marine Bacteria (NCIMB Ltd) – modrozeleno alge do 15 god.

Fig.1 Flow - diagram of a freeze - drying process using a simple apparatus

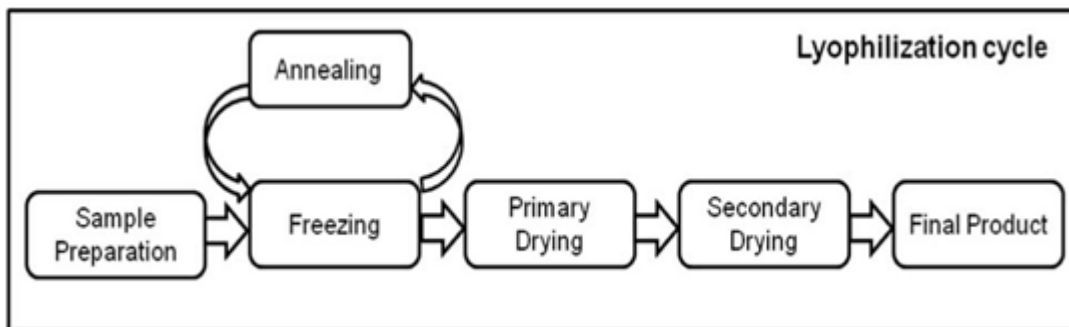


Slika 1. Shematski prikaz liofilizacije

- **Postupak 5.** Sušenje smrzavanjem uz vrtnju
- (sušenje sublimacijom leda pri sniženom pritisku)
- suspenzija spora u ranivoj otop. (10 %-tno obrano mlijeko, 5 %-tni inositol)
- u ampule po 0,2 ml suspenzije spora
- ampule u aparat za sušenje (freeze-drier with spin-freeze), zataliti ampule
- Oživljavanje stanica: dodati 0,3 ml dest. vode, KP, optimalni uvjeti rasta
- # vijabilnost funga ovisi da li je suspenzija smrznuta u trenutku sušenja (sadržaj vode 5%); optimalno 2 % vode, 10 % kraće čuvanje!
- Temp. čuvanja 15-20 °C, bolje 4 °C!



Slika 2. Ampula s liofiliziranim stanicama



Slika 3. Shematski prikaz principa liofilizacije

Postupak 6. Sušenje smrzavanjem

(pogodno za bakterije, kvasce i plijesni)

- pothladiti aparat na $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$

- suspenzija stanica i spora u hranjivoj otop. (10 %-tno obrano mlijeko, 5 %-tni inositol)

u pothlađene posude 0,5 ml suspenzije stanica (pretinci)

- sušenje uz vakum pri $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$ kroz 3h, dizati temp $0,08\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ do $10\text{ }^{\circ}\text{C}$

- zataliti posude, čuvati na $18\text{ }^{\circ}\text{C}$

- Oživljavanje stanica: dodati 0,5 ml dest.vode, KP, optimalni uvjeti rasta
- Temp. čuvanja od $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ do s.t., bolja niža temp.

Čuvanje smrzavanjem

(uspostava ravnoteže bakterije st.-krioprotektori 1-2 h; 15 %; kvasci 50 %)

- suspenzija spora ili stanica u 10 %-tnom glicerolu

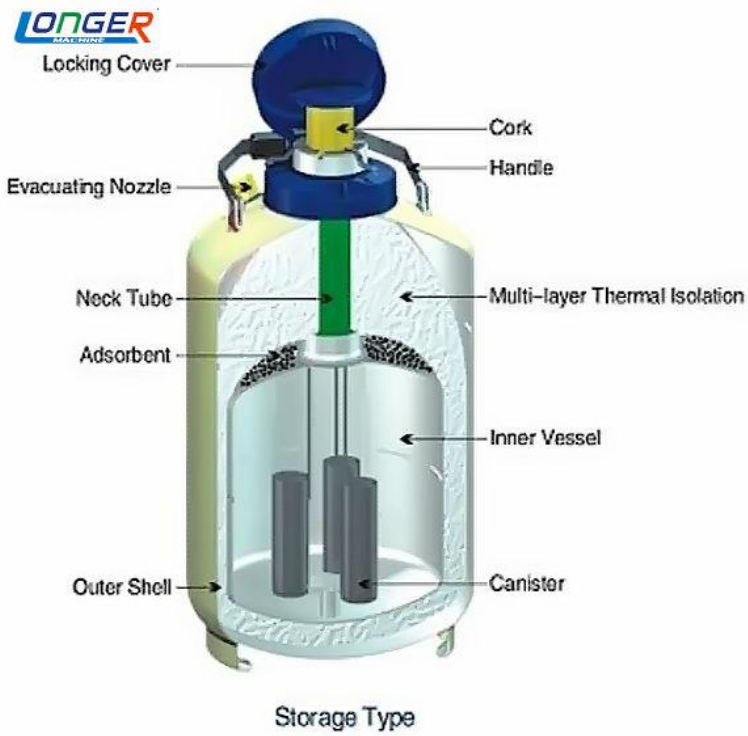
- 0,5 ml u krioposude (staklene kuglice)

- pothladiti na -50 °C (optimalno -10 °C/min)

- spremiti u tekući dušik (-196 °C)

- Oživljavanje stanica: brzo otapanje u vodenoj kupelji, uzimanje kuglica ili suspenzije.
-
- Temp. čuvanja od -10 do -196 °C; pri -25 do -30 °C citoplazma nekih plijesni nije smrznuta; metabolizam nekih st. je moguć i pri -70 °C; pri -196 °C metaboličke aktivnosti st. u mirovanju; st. kulture na -150 °C ili tekući dušik. (m.o.: ostrugati smrznutu suspenziju, dozvoljeno do 30 ciklusa odmrzavanja i smrzavanja)







Slika 4. Kontejneri s tekućim dušikom

- Krioprotektori za osmoregulaciju stanica (5-10 %) – prožimajući: dimetilsulfoksid (DMSO ili Me₂SO), glicerol, metanol; neprožimajući: polivinilpirolidon, dekstran, hidroksietilni alkohol.
- Biljni materijali:
 - sporo smrzavanje (konst. temp. intervali 0,5-2 °C/min do konačne -40 °C)
 - brzo smrzavanje (neposredno uranjanje u tekući dušik, letalni led)
 - postupno smrzavanje (u kapljicama 3 μL, 0,5 °C/min do -40 °C, tekući dušik)

- taljenje 1-2 min u vodu 34-44 °C.



Slika 6. Ulošci za kotejnere s tekućim dušikom

Hladnjaci na -80 C



Slika 7. Hladnjak za čuvanje mikrobnih stanica na -80 C