



СОЮЗ СОВЕТСКИХ
СОЦИАЛИСТИЧЕСКИХ
РЕСПУБЛИК

(19) **SU** (11) **1451162 A1**

(5D) 4 C 12 N 1/12, A 01 G 33/00

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ
ПО ИЗОБРЕТЕНИЯМ И ОТКРЫТИЯМ
ПРИ ГИИТ СССР

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К АВТОРСКОМУ СВИДЕТЕЛЬСТВУ

(21) 4231060/30-13

(22) 17.04.87

(46) 15.01.89. Бюл. № 2

(71) Институт физиологии растений
им. К.А.Тимирязева

(72) К.С.Спекторов и А.А.Захарин

(53) 636.085:639.64 (088.8)

(56) Microbiol., J.Gen. Vol. 74,
№ 81, 1973, 77-91.

Physiologia Plantarum, Vol. 22,
F 1, 1969, 126-139.

Microbiology. J. Gen. Vol. 102,
№ 1, 1977, 199-202.

(54) СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОПТИМАЛЬНОГО
СОСТАВА СРЕДЫ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ
ПОДВИЖНЫХ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ

(57) Изобретение относится к микро-
биологической промышленности и может
быть использовано при выборе сред
для культивирования подвижных микро-
водорослей и бактерий. Целью изоб-
ретения является повышение точности,
упрощение и снижение трудоемкости
оценки степени оптимальности сред
по токсической реакции микроорганиз-
мов. Способ заключается в создании
контакта между исходной суспензией
клеток и испытываемыми средами на
микроповерхности в системе из сое-
диненных между собой в нижней части
стеклянных сосудов и учете количест-
ва переместившихся в разные среды
клеток после нескольких часов экспо-
зиции. 3 табл.

(19) **SU** (11) **1451162 A1**

Изобретение относится к микробиологической промышленности и может быть использовано при выборе сред для культивирования подвижных микроводорослей.

Цель изобретения - повышение точности и упрощение способа оценки степени оптимальности состава сред по токсической реакции подвижных микроводорослей.

Способ позволяет осуществлять прямой подсчет числа клеток и определить вес их сухой биомассы в единице объема исследуемой среды и контролировать физико-химический состав этой среды не только по окончании опыта, но и в динамике, т.е. неоднократно по ходу эксперимента. Способ возможно осуществить двумя вариантами.

При первом варианте осуществления способа подвижные микроводоросли выращивают до достаточной плотности ($10-20 \cdot 10^6$ кл/мл) на исходной среде в культуральной камере емкостью 500 мл, продуваемой снизу смесью воздуха с CO_2 . После этого в суспензию водорослей через отверстие в крышке камеры вставляются стеклянные трубки типа пипеток с оттянутым кончиком (площадь отверстия кончика $0,15-0,90$ мм², емкость трубки 2-3 мл), целиком заполненные исследуемой средой и загерметизированные сверху короткой стеклянной палочкой, вставленной в отрезок резиновой трубки, надетой сверху на пипетку. Среды в трубках и в культуральной камере при этом практически не смешиваются, если только удельный вес сред в трубках не превышает значительно удельного веса среды в культуральной камере. Подвижные микроводоросли из камеры переходят в трубки с исследуемыми средами в количествах, пропорциональных степени оптимальности данной среды для их жизнедеятельности. Через 1-2 сут стеклянные трубки вынимают из камеры с культурой и содержимое их анализируют обычными методами (плотность суспензии по числу клеток определяют подсчетом в камере Горяева, общая концентрация солей в среде высушиванием 1 мл и взвешиванием сухого остатка, содержание отдельных элементов в среде методом плазменной фотометрии и т.п.).

При втором варианте осуществления способа подвижные микроводоросли вы-

ращивают в любом культуральном сосуде до той же примерно плотности, что и при первом варианте осуществления способа.

После этого 50 мл суспензии микроводорослей заливают в одно из колен закрепленной на штативе U-образной системы, состоящее из двух загнутых снизу под прямым углом трубок диаметром 20 мм, соединенных в нижней своей суженной части прозрачной эластичной трубкой пережатой посередине зажимом. Во второе колено системы заливают исследуемую среду любого состава и любого удельного веса. Остатки воздуха из горизонтального участка системы удаляют пальпированием эластичной трубки. После этого зажим в горизонтальной части системы осторожно удаляют и обе среды соединяются одна с другой таким образом, что между ними образуется поверхность раздела фаз достаточно большой площади ($10-12$ мм²). Систему можно усложнить, составив ее из трех (Ш-образная система) и более сообщающихся сосудов (через стеклянные тройники в нижней части). Через поверхность раздела фаз микроводоросли из исходной среды свободно переходят в колена с исследуемыми средами в соответствии со степенью оптимальности каждой исследуемой среды для их жизнедеятельности. В вертикальные части трубок системы можно вставлять сверху тонкие стеклянные капилляры или пластиковые трубочки, через которые культура продувается смесью воздуха с CO_2 . Через определенные промежутки времени (обычно раз в сутки) из трубок отбирают пробы для определения плотности культуры по числу клеток и по весу сухой биомассы клеток в единице объема суспензии и для одновременного контроля за тем, насколько сохраняется постоянство каждой из сред в трубках по ее физико-химическим показателям.

Пример 1. Штамм подвижных микроводорослей *Dunaliella primolecta* Butch. № 63, полученный из коллекции Института Ботаники АН УССР, выращивают в культуральной камере емкостью 500 мл, продуваемой снизу смесью воздуха с $0,5\%$ CO_2 до плотности $20 \cdot 10^6$ кл/мл на среде следующего состава, г/л: NaCl 29,0; KNO_3 5,0; KH_2PO_4 0,5; $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 0,75; $MgCl_2 \cdot 6H_2O$

0,38; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,24; раствор микроэлементов A_4 1 мл, раствор $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ в смеси с ЭДТА ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 3 мг/л и ЭДТА 37 мг/л) 1 мл. Содержание Na^+ в этой среде равно 11,41 г/л, $\text{K}^+ > 2,33$ г/л, так как значение pH среды до 7,0 доводили при помощи КОН.

После этого в суспензию водорослей через отверстия в крышке камеры вставляют стеклянные трубки типа пипеток с оттянутым кончиком, заполненные исследуемыми средствами и загерметизированные сверху короткой стеклянной палочкой, вставленной в надетый на пипетку отрезок резиновой трубки.

В табл.1 показан характер исследуемых сред и содержание в них основных ионов.

Т а б л и ц а 1

Характер исследуемой среды	Содержание ионов, г/л	
	Na^+	K^+
Основная среда без NaCl , разбавленная в 4 раза	0,047	0,822
Основная среда без NaCl , разбавленная в 1,5 раза	0,062	1,701

Продолжение табл.1

Характер исследуемой среды	Содержание ионов, г/л	
	Na^+	K^+
Основная среда, разбавленная в 8 раз	1,398	0,698

В табл.2 приведено среднее число клеток, обнаруженных через 2 сут. в трубках-пипетках с исследуемыми средами.

Т а б л и ц а 2

Вариант среды	Число клеток, 10^6 кл/мл
Основная среда без NaCl , разбавленная в 4 раза	0,030
Основная среда без NaCl , разбавленная в 1,5 раза	0,175
Основная среда, разбавленная в 8 раз	1,156

Т а б л и ц а 3

Вариант среды	Содержание ионов, г/л		Осмотическое давление, атм	Значение pH
	Na^+	K^+		
Основная среда без NaCl , разбавленная в 4 раза	0,048	0,827	2,08	7,72
Основная среда без NaCl , разбавленная в 1,5 раза	0,048	1,665	3,26	7,75
Основная среда, разбавленная в 8 раз	1,366	0,694	3,88	7,75

При этом исходные параметры исследуемых сред в трубках, как это

видно из табл.3, сохраняются практически без изменений.

Таким образом, отсутствие NaCl в среде является фактором, неблагоприятным для жизнедеятельности *Dunaliella primolecta*. В случае отсутствия NaCl в среде водоросли отдают предпочтение менее разбавленной по сравнению с исходной среде, т.е. предпочитают среду с более высоким осмотическим давлением.

Пример 2. Штамм водорослей *Dunaliella salina* Teod. № 10, полученный из коллекции культур института Ботаники АН УССР, выращивают на среде того же состава, что и *Dunaliella primolecta* Butch. штамм 63, но содержащей NaCl в количестве не 29,0, а 87,0 г/л. В остальном водоросли выращивают в тех же условиях, что и *Dunaliella primolecta* до плотности $10 \cdot 10^6$ кл/мл.

Монтируют на штативе Ш-образную систему, состоящую из трех вертикально расположенных трубок, соединенных снизу через стеклянный тройник прозрачным шлангом из силиконовой резины, пережатый между трубками при помощи съемных зажимов, затем в среднюю трубку заливают 50 мл полученной суспензии водорослей, в левую трубку такое же количество чистой исходной среды разбавленной в 2 раза, а в правую — ту же среду, но разбавленную в 4 раза (также 50 мл). После этого, не снимая зажимов пальпированием шлангов, удаляют оставшиеся в системе пузырьки воздуха, а затем осторожно снимают зажимы. Между исходной суспензией водорослей и исследуемыми средами в результате этого образуются поверхности непосредственного соприкосновения (раздела фаз), обеспечивающие микроводорослям воз-

можности свободно перемещаться из средней трубки в боковые.

Установлено, что через 48 ч культивирования микроводоросли из средней трубки переместились в левую трубку, тогда как среда в правой трубке осталась совершенно прозрачной.

Таким образом, исходная культуральная среда, разбавленная в 4 раза, становится неблагоприятной для жизнедеятельности *Dunaliella salina* и они из плотной исходной суспензии в поисках более благоприятных по освещенности условий перемещаются только в среду, содержащуюся в левой трубке, т.е. их осмотаксис положителен только по отношению к исходной среде, разбавленной не более чем в 2 раза.

Ф о р м у л а и з о б р е т е н и я

Способ определения оптимального состава среды для культивирования подвижных микроводорослей, включающий выращивание микроводорослей в сосуде с контрольной средой с последующим контактированием полученной культуры водорослей с исследуемой средой и определением токсической реакции микроводорослей по отношению к исследуемой среде, отличающийся тем, что, с целью повышения точности и упрощения способа, контактирование культуры водорослей с исследуемой средой осуществляют путем создания поверхности раздела фаз с исследуемой средой, находящейся по крайней мере в одном сообщающемся сосуде с сосудом с контрольной средой, с последующей инкубацией культуры водорослей.

Редактор М. Недолуженко

Составитель Е. Золотухина

Техред А. Кравчук

Корректор И. Эрдейи

Заказ 7036/20

Тираж 500

Подписное

ВНИИПИ Государственного комитета по изобретениям и открытиям при ГКНТ СССР
113035, Москва, Ж-35, Раушская наб., д. 4/5

Производственно-полиграфическое предприятие, г. Ужгород, ул. Проектная, 4