

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК  
Институт морских биологических исследований  
им. А. О. Ковалевского

Геворгиз Р. Г., Мальцева О. А., Романова Д. Ю.

**Выделение *Spirulina (Arthrospira) platensis* North. Geitl.  
в альгологически чистую культуру**

Учебно-методическое пособие

Севастополь, 2017

УДК 582.232:58.082

ББК 28.591.2

Г–27

**Р е ц е н з е н т :** заведующий отделом экологической физиологии водорослей ФГБУН ИМБИ, доктор биологических наук, профессор  
**З. З. Финенко**

Геворгиз Р. Г., Мальцева О. А., Романова Д. Ю.

Выделение *Spirulina (Arthrospira) platensis* North. Geitl. в альгологически чистую культуру : учебно-методическое пособие / РАН, Ин-т морских биологических исследований им. А. О. Ковалевского. — Севастополь, 2017. — 12 с. — (Препринт / РАН, ИМБИ).

В настоящем учебно-методическом пособии представлена подробная инструкция по выделению *Spirulina (Arthrospira) platensis* в альгологически чистую культуру. Даны практические рекомендации по выделению спирулины в альгологически чистую культуру в неспециализированных лабораториях.

Пособие адресовано биологам, альгологам, технологам, а также аспирантам и студентам всех специальностей.

Утверждено к публикации Учёным советом  
ФГБУН «Институт морских биологических исследований им. А. О. Ковалевского»  
(протокол №12 от 18.12.2017 г.)

© Р. Г. Геворгиз, О. А. Мальцева, Д. Ю. Романова, 2017

© ФГБУН ИМБИ, 2017

### Область применения

Неотъемлемой частью создания и поддержания любой коллекции живых культур микроводорослей являются работы по выделению микроводорослей из природных популяций в альгологически чистые культуры. Для этих целей альгологами разработаны специальные приёмы, преимущественно основанные на стандартных микробиологических методах, например на изъятии с помощью капилляра клеток определённого вида из смешанной культуры и пересеве их в стерильные питательные среды [1–5]. Такие методы, как правило, достаточно трудоёмки, требуют высокой квалификации, навыка и значительных затрат времени.

В данном методическом пособии описан простой метод выделения *Spirulina (Arthrospira) platensis* в альгологически чистую культуру (очистки культуры от сопутствующей альгофлоры). Приведённая методика применима для выделения в альгологически чистую культуру спирулины из проб, полученных как из естественных, так и из искусственных водоёмов, например из промышленных культиваторов открытого типа. Методика проста в освоении, не требует высокой альгологической квалификации и специального оборудования. Доступна к использованию в неспециализированных лабораториях.

### Термины и определения

*Альгологически чистая культура* микроводорослей или цианобактерий (син. монокультура) — популяция клеток одного вида низших фотоавтотрофов, которые вегетируют на минеральной питательной среде преимущественно за счёт процессов фотобиосинтеза. Обычно под термином *альгологически чистая культура* низших фотоавтотрофов подразумевают некий альгобактериальный ценоз, поскольку в нестерильных условиях клеткам фотоавтотрофов сопутствуют клетки хемогетеротрофов (например, клетки бактерий или грибов). Если в альгологически чистой культуре микроводорослей исключена возможность развития хемогетеротрофных организмов (бактерий и грибов), то такая культура микроводорослей называется *аксеничной*.

*Штамм культуры* — альгологически чистая культура клональных клеток одного вида микроводорослей, т. е. культура микроводорослей, полученная из одной клетки.

*Пересев культуры* — перенос небольшого количества клеток микропипеткой или микробиологической петлёй на свежую питательную среду в стерильных условиях.

### Сущность метода

Метод основан на видоспецифической особенности *S. (A.) platensis*. Её трихомы способны из жидкой питательной среды перемещаться по твёрдой, гладкой поверхности (например, по стенкам стеклянных сосудов), образуя характерные длинные тяжи (см. рисунок 1). При этом сопутствующие микроводоросли остаются в питательной среде. Верхнюю часть длинных спирулиновых тяжей отбирают для пересева. Таким образом происходит выделение *S. (A.) platensis* в альгологически чистую культуру.

### Сущность методики

Спирулину, которая находится на стенках стеклянного сосуда (с противоположной освещению стороны), стерильной микробиологической петлёй переносят в стерильную питательную среду Заррук (пересевают культуру). После пересева культуру помещают в благоприятные для роста условия (20–25 °С, диапазон рН 8,4–9,5, постоянное освещение 500–1000 лк) и культивируют без перемешивания. При этом по мере накопления биомассы на стенках стеклянного сосуда образуются спирулиновые тяжи, которые используют для очередного пересева. Процедуру повторяют до полной очистки культуры спирулины от клеток сопутствующих фотоавтотрофов. Очищенную культуру кодируют — клоновой линии присваивают кодовое имя.

### Приборы

1. Оптический микроскоп Carl Zeiss AxioStar Plus с бинокулярной насадкой  $\times 10$ , объективами  $\times 20$ ,  $\times 63$  (кратность увеличения равна 200 и 630) и набором предметных и покровных стёкол.
2. Сушильный шкаф. Диапазон температурного режима 40–200 °С. Погрешность стабилизации температуры в рабочей камере в установленном режиме составляет  $\pm 3$  °С.
3. Стандартная микробиологическая петля.
4. Спиртовая горелка для прокаливания микробиологической петли.

*Примечание.* Модели приборов, используемых в работе, могут отличаться от приведенных выше.



**Рис. 1.** Фото культуры *Spirulina (Arthrospira) platensis* North. Geitl. с характерными длинными тяжами на стенках стеклянного сосуда.

**Посуда**

1. Колбы конические, плоскодонные объёмом 250 мл, 5 шт.
2. Колбы плоскодонные объёмом 500–1000 мл, 2 шт., для приготовления питательной среды Заррук.
3. Стеклянная палочка.
4. Крышки, фольга или плёнка Parafilm для закрытия колб во время культивирования и стерилизации питательной среды Заррук.

**Материалы**

1. Крафт-пакеты для стерилизации заклеивающиеся или со скрепами.
2. Фильтровальная бумага любой плотности.

**Реактивы**

В нижеследующих таблицах приведён перечень реактивов, необходимых для приготовления стандартной питательной среды Заррук [6]. Питательную среду Заррук готовят на дистиллированной воде.

Раствор А. Перечень макроэлементов.

№	Компонент	Навеска, г/л	Класс чистоты
1	NaHCO <sub>3</sub>	16,8	ч
2	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5	ч
3	NaNO <sub>3</sub>	2,5	ч
4	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,0	ч
5	NaCl	1,0	ч
6	Na <sub>2</sub> EDTA	0,08	ч
7	FeSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0,01	ч
8	CaCl <sub>2</sub>	0,04	ч
9	MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0,2	ч
10	Раствор микроэлементов	1 мл/л	–

## Раствор В. Перечень микроэлементов.

№	Компонент	Навеска, г/л	Класс чистоты
0	Na <sub>2</sub> EDTA	0,5	ч
1	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2,86	ч
2	MnCl <sub>2</sub> · 4 H <sub>2</sub> O	1,81	ч
3	ZnSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0,222	ч
4	CuSO <sub>4</sub> · 5 H <sub>2</sub> O	0,079	ч
5	MoO <sub>3</sub>	0,015	ч
6	NH <sub>4</sub> VO <sub>3</sub>	0,02296	ч
7	Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	0,04398	ч
8	K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>4</sub> · 24 H <sub>2</sub> O	0,0960	ч
9	NiSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0,04785	ч
10	Na <sub>2</sub> WO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	0,01794	ч
11	Ti <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>	0,040	ч

**Ход работы**

1. Вымытые колбы ополаскивают разбавленным раствором соляной кислоты (1:1), затем обильно промывают водопроводной водой (5–7 объёмов) и ополаскивают дистиллированной. Проводят сухую стерилизацию посуды в сушильном шкафу. Для этого колбы помещают в крафт-пакеты (чтобы исключить попадание пыли, спор и т. д. внутрь колбы) и выдерживают при температуре 120 °С в течение 2–3 часов.

После стерилизации закрытые колбы хранят в специально предназначенном для этих целей стеклянном шкафу.

2. Непосредственно перед началом процедур, связанных с выделением спирулины в альгологически чистую культуру, готовят стерильную питательную среду Заррук<sup>1</sup>.
3. Перед очисткой культуры спирулины необходимо убедиться в том, что клетки спирулины адаптированы к среде Заррук и активно вегетируют. Для этого смешанную культуру помещают в благоприятные для роста условия (20–25 °С, диапазон рН 8,4–9,5, постоянное освещение

<sup>1</sup> Допускается стерилизация готовой питательной среды в автоклаве в течение 15–20 минут при давлении 1–1,5 атм и температуре 120 °С.

500–1000 лк) и культивируют в накопительном или квазинепрерывном режиме. Посредством микроскопирования периодически (каждые 1–2 дня) необходимо проверять, удлиняются ли нити спирулины.

4. После накопления биомассы смешанную культуру спирулины разливают в несколько стерильных колб. Высота слоя культуры 2–3 см. Колбы помещают в условия недостаточной освещённости (500–1000 лк). Суспензию в колбах не перемешивают. Через 2–3 дня на стенках колб появляются характерные спирулиновые тяжи (см. рис. 1), обусловленные подвижностью и реакцией на свет нитей спирулины.
5. Прокаливают микробиологическую петлю на спиртовой горелке, аккуратно, не перемешивая культуру, отбирают петлёй нити с верхней части спирулиновых тяжей (см. рисунок 2) и переносят их в колбу со свежей питательной средой Заррук. Пересев делают параллельно в 3–4 колбы.
6. Колбы с пересеянной культурой помещают в благоприятные для роста условия.
7. По мере нарастания биомассы спирулины посредством микроскопирования проверяют наличие сопутствующих клеток других видов фототрофов.
8. По истечении некоторого времени (2–3 недели) колбы, в которых не обнаружены клетки сопутствующих фототрофов пересевают повторно. Альгологическую культуру спирулины помещают в коллекцию и присваивают ей новое кодовое имя.

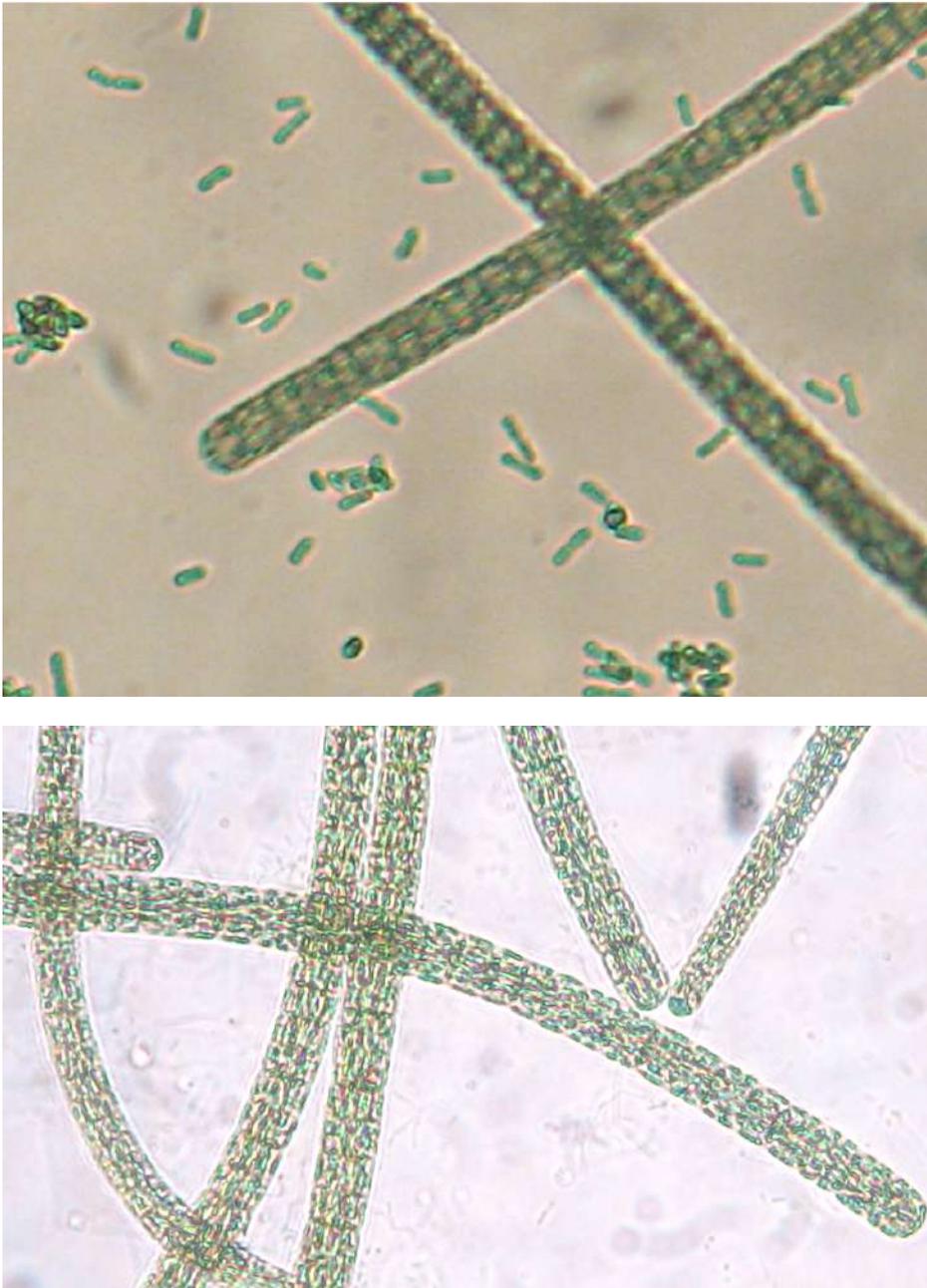
На рисунке 3 представлены фотографии культуры спирулины до и после процедуры очистки.

### **Рекомендации по предотвращению заражения культуры**

1. Проверку на чистоту клональной культуры необходимо делать через 20–30 дней после последнего контрольного забора биоматериала, поскольку за данный период времени можно выявить наличие различных контаминантов в среде обитания клоновой культуры.
2. В журнал пересева культуры необходимо вносить подробные данные по датам пересева культуры, а также по возможным заражениям культуры или их отсутствию.



**Рис. 2.** Пересев культуры *S. (A.) platensis*. Отбор клеток осуществляют с верхней части спирулиновых тяжей (указано стрелкой).



**Рис. 3.** Культура *S. (A.) platensis* до очистки (вверху). В культуре присутствуют клетки *Synechococcus* sp. Культура *S. (A.) platensis* после процедуры очистки (внизу).

3. Для исключения заражения культуры в условиях неспециализированных лабораторий (например, на предприятии) не рекомендуется проводить работы в помещениях, где выращивают культуру микроводорослей в интенсивном режиме, а также в помещениях с высшими растениями (рассадой, комнатными растениями и т. п.).
4. Во время работы по очистке культуры необходимо окна и двери держать закрытыми, поскольку воздушные потоки способны переносить споры микроводорослей.
5. В тех случаях, когда дистиллятор снабжён прозрачными шлангами и установлен в хорошо освещаемом помещении, источником заражения культуры в коллекции микроводорослей может служить дистиллированная вода. Споры микроводорослей попадают в неё из водопроводной воды и прорастают спустя 2–3 месяца.

### Список литературы

1. Владимирова М. Г., Семененко В. Е. Интенсивная культура одноклеточных водорослей (инструкция по первичным испытаниям, выделяемых из природы и селекционируемых форм фотоавтотрофных одноклеточных водорослей) / Ред. Ничипорович А. А. — М.: АН СССР, 1962. — 60 с.
2. Гайсина Л. А., Фазлутдинова А. И., Кабиров Р. Р. Современные методы выделения и культивирования водорослей : учебное пособие. — Уфа: Изд-во БГПУ, 2008. — 152 с.
3. Методы физиолого-биохимического исследования водорослей в гидро-биологической практике. — Киев: Наук. думка, 1975. — 247 с.
4. Орлова Т. Ю., Айздайчер Н. А., Стоник И. В. Лабораторное культивирование морских микроводорослей, включая продуцентов фитотоксинов : научно-методическое пособие. — Владивосток: Дальнаука, 2011. — 88 с.
5. Темралеева А. Д., Минчева Е. В., Букин Ю. С., Андреева А. М. Современные методы выделения, культивирования и идентификации зелёных водорослей (*Chlorophyta*). — Кострома: Костромской печатный дом, 2014. — 215 с.

6. Zarrouk C. Contribution à l'étude d'une cyanophycée. Influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthèse de *Spirulina maxima* (Setch et Gardner) Geitler: Ph. D thèse. — Paris, 1966. — 114 p. — (A la faculté des sciences de l'université de Paris)

Геворгиз Руслан Георгиевич  
e-mail: r.gevorgiz@yandex.ru

Мальцева Ольга Александровна  
e-mail: solnce\_olia@inbox.ru

Романова Дарья Юрьевна  
e-mail: driaromanova@yandex.ru

R. G. Gevorgiz, O. A. Maltseva, D. Yu. Romanova

Isolation of *Spirulina (Arthrospira) platensis* North. Geitl. in an algologically pure culture : educational and methodological manual / RAS, Kovalevsky Institute of Marine Biological Research. — Sevastopol, 2017 — 12 p. — (Working paper / RAS, IMBR)

This training aid provides detailed instructions on the isolation of *Spirulina (Arthrospira) platensis* in an algologically pure culture. In this work have been given practical recommendations for isolation of spirulina's cells into algologically pure culture in non-specialized laboratories.

The training aid is addressed to biologists, algologists, technologists, as well as students and postgraduates of all specialties.