

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 201792053 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2018.01.31

(51) Int. Cl. C12M 1/42 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
2016.03.18

(54) СПОСОБ И БИОРЕАКТОР ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ КУЛЬТУРЫ МИКРООРГАНИЗМОВ

(31) PG2015A000016

(32) 2015.03.19

(33) IT

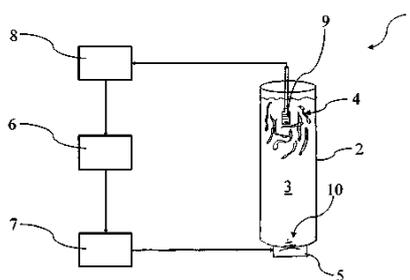
(86) PCT/IB2016/051542

(87) WO 2016/147156 2016.09.22

(71)(72) Заявитель и изобретатель:  
ЛАБРУЦЦО ПЬЕТРО (IT)

(74) Представитель:  
Угрюмов В.М. (RU)

(57) Предложен биореактор (1) для получения культуры микроорганизмов (4), содержащий по меньшей мере одну цилиндрическую емкость (2) и средства (11) встряхивания и перемешивания, предназначенные для встряхивания и перемешивания указанной культуры микроорганизмов (4), размещенной в указанной емкости (2), причем указанный биореактор (1) дополнительно содержит источник звуковых волн (5) для воздействия на указанную культуру микроорганизмов (4) звуковой волной (10). Также предложен способ получения культуры микроорганизмов (4) при помощи биореактора (1), предусматривающий стадии: а) встряхивание и перемешивание указанных микроорганизмов (4) с помощью указанных средств (11) встряхивания и перемешивания и б) воздействие на указанную культуру микроорганизмов (4) звуковой волной (10). Предлагаемые биореактор и способ характеризуются тем, что частота (f) звуковой волны (10) изменяется со временем по принципу пилообразной функции в диапазоне от 50 Гц до 8 кГц, предпочтительно от 100 Гц до 6 кГц.



A1

201792053

201792053

A1

# **СПОСОБ И БИОРЕАКТОР ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ КУЛЬТУРЫ МИКРООРГАНИЗМОВ**

## **ОПИСАНИЕ**

### **Область техники, к которой относится настоящее изобретение**

Настоящее изобретение относится к способу и биореактору для получения культуры микроорганизмов, таких как, например, микроводоросли, цианобактерии, диатомовые водоросли, дрожжи и т.п.

### **Предшествующий уровень техники настоящего изобретения**

Биореакторы – это устройства, обеспечивающие возможность самостоятельного (без постоянного вмешательства оператора) роста клеток или тканей в заданной среде культивирования (обычно жидкой).

Известно, что звуки, обусловленные природными явлениями, взаимодействием животных, климатическими явлениями и иными формами акустического загрязнения, распространяются в воздухе и воспринимаются растительным миром, преобразуясь в механические сигналы.

Из уровня техники известны биореакторы, в которых помещенную в них культуру микроорганизмов подвергают воздействию звуковых волн, которые вырабатывает источник, работающий в слышимом человеком звуковом диапазоне (100 Гц - 20 кГц). При этом для таких биореакторов необходимы звуковые волны высокой интенсивности, которые в любом случае не могут усилить рост микроорганизмов в достаточной степени, чтобы удовлетворить требования рынка по меньшей мере с экономической точки зрения.

### **Краткое раскрытие настоящего изобретения**

Целью настоящего изобретения является предоставление способа получения культуры микроорганизмов, способного ускорить рост культуры, тем самым обеспечивая более высокую скорость роста по сравнению с известными способами.

Дополнительной целью настоящего изобретения является создание биореактора

для получения культуры микроорганизмов, который прост в изготовлении и который позволяет повысить кинетику роста микроорганизмов, чтобы получать культуру микроорганизмов быстрее известных биореакторов.

Согласно настоящему изобретению эти и дополнительные цели достигаются посредством способа получения культуры микроорганизмов, раскрытого в независимом пункте 1 формулы изобретения и соответствующих зависимых пунктах формулы изобретения, а также посредством биореактора, раскрытого в пункте 8 формулы изобретения и соответствующих зависимых пунктах формулы изобретения.

В частности, способ получения культуры микроорганизмов осуществляют посредством биореактора, содержащего по меньшей мере одну цилиндрическую емкость и средства встряхивания и перемешивания, предназначенные для встряхивания и перемешивания указанной культуры микроорганизмов, содержащейся в указанной емкости.

Способ предусматривает стадию а) встряхивания и перемешивания указанных микроорганизмов с помощью средств встряхивания и перемешивания и стадию б) воздействия на культуру микроорганизмов звуковой волной.

Согласно одному из аспектов настоящего изобретения во время стадии б) на культуру воздействуют звуковой волной, частота которой изменяется со временем по принципу пилообразной функции. Частота звуковой волны изменяется в диапазоне от 50 Гц до 8 кГц, предпочтительно от 100 Гц до 6 кГц.

Полученная вследствие этого звуковая волна (именуемая «свипом») обладает частотой, изменяющейся линейно во времени между двумя величинами, взятыми в диапазоне от 50 Гц до 8 кГц, предпочтительно от 100 Гц до 6 кГц. Для того чтобы получить пилообразную функцию, возьмем в качестве точки отсчета начальный момент времени  $t_0$ , в котором частота звуковой волны равна, например, 100 Гц, при этом по истечении заданного периода времени  $T$  частота, линейно изменяясь, достигает значения 6 кГц для того, чтобы затем вернуться (за период времени значительно меньший  $T$ , а в идеале равный нулю) к 100 Гц; повторяя эти действия, получают звуковую волну, частота которой представляет собой функцию (пилообразную) с периодом  $T$ .

Согласно особенному аспекту настоящего изобретения период  $T$  пилообразной функции составляет от 5 до 20 секунд, предпочтительно 10 секунд.

Автор настоящего изобретения обнаружил, что стимуляция культуры микроорганизмов (например, микроскопических водорослей) посредством звуковой волны с изменяющейся во времени частотой (как изложено выше) вызывает усиление

роста по сравнению с показателями роста, полученными на фоне применения звуковых волн с постоянной частотой.

Такой результат можно обосновать тем, что модулированное прерывистое давление, вероятно, переносится лучше, чем непрерывное и постоянное во времени воздействие. Биохимический отклик на сжатие и разрежение с частотой звуковой волны позволяет клеткам некоторым образом воспользоваться благотворным расслабляющим эффектом, который более эффективен для поддержания физиологического баланса микроорганизмов (например, микроводорослей).

Согласно дополнительному аспекту настоящего изобретения интенсивность звуковой волны изменяется со временем от 0 дБ до 70 дБ по принципу пилообразной функции, имеющей тот же период  $T$ . Предпочтительно, интенсивность и частота звуковой волны могут изменяться со временем по принципу пилообразных функций, синхронизированных друг с другом и имеющих один и тот же период  $T$  (составляющий от 5 до 20 секунд, предпочтительно 10 секунд). Таким образом, повышение частоты соответствует повышению интенсивности звуковой волны.

Согласно дополнительному аспекту настоящего изобретения способ предусматривает стадию с) регистрации посредством гидрофона, размещенного по меньшей мере частично внутри культуры микроорганизмов, сигнала, создаваемого указанной звуковой волной внутри указанной культуры микроорганизмов, и стадию d) определения концентрации жидкой культуры на основе сигнала, зарегистрированного гидрофоном.

В частности, стадия d) включает в себя стадию d1) расчета преобразования Фурье звуковой волны, зарегистрированной на стадии с), и стадию d2) расчета акустического давления звуковой волны, зарегистрированной на стадии с).

Таким образом, анализируя частотный диапазон звуковой волны, зарегистрированной гидрофоном, автор настоящего изобретения обнаружил, что звуковая волна, проходящая сквозь культуру, содержит информацию о количестве клеток микроорганизмов в культуре. В частности, акустическое давление, измеренное гидрофоном, пропорционально концентрации микроорганизмов в культуре, изменяющейся со временем. Благодаря настоящему изобретению результаты измерений количества клеток на один миллилитр и скорости роста микроорганизмов в биореакторе можно получать непрерывно и автоматически с течением времени.

Согласно преимущественному аспекту настоящего изобретения стадия а) включает в себя стадию a1) приведения культуры микроорганизмов в движение с

помощью средств встряхивания и перемешивания, причем движение носит возвратно-поступательный характер и совершается по существу в вертикальном направлении.

Предпочтительно, стадия а1) продолжается приблизительно 60 секунд, при этом ее повторяют каждые 10 минут.

Согласно настоящему изобретению также предложен биореактор для получения культуры микроорганизмов, содержащий по меньшей мере одну цилиндрическую емкость (предпочтительно имеющую эллиптическое сечение) и средства встряхивания и перемешивания, предназначенные для встряхивания и перемешивания культуры микроорганизмов, содержащейся в емкости.

Согласно одному аспекту настоящего изобретения биореактор дополнительно содержит источник звуковых волн, предназначенный для воздействия звуковой волной на культуру микроорганизмов. В частности, источник выполнен с возможностью испускания звуковой волны, частота которой изменяется со временем по принципу пилообразной функции в диапазоне от 50 Гц до 8 кГц, предпочтительно от 100 Гц до 6 кГц.

Согласно дополнительному аспекту настоящего изобретения период  $T$  пилообразной функции составляет от 5 до 20 секунд, предпочтительно 10 секунд. Предпочтительно, интенсивность звуковой волны изменяется от 0 дБ до 70 дБ по меньшей мере на протяжении указанного периода  $T$ .

Согласно дополнительному аспекту настоящего изобретения биореактор содержит по меньшей мере один гидрофон, размещенный по меньшей мере частично внутри культуры микроорганизмов, для регистрации сигнала, испускаемого источником звуковой волны внутри культуры микроорганизмов. Как пояснено выше, сигнал, зарегистрированный гидрофоном, используют для определения концентрации микроорганизмов в культуре.

Преимущественно, средства встряхивания и перемешивания биореактора согласно настоящему изобретению содержат по меньшей мере один встряхивающий элемент, оснащенный стержнем с по существу вертикальной продольной осью и по меньшей мере одним первым диском, размещенным под углом к продольной оси стержня.

Предпочтительно, средства встряхивания и перемешивания содержат по меньшей мере один второй диск, размещенный под углом к продольной оси стержня. Предпочтительно, указанный по меньшей мере один первый диск и указанный по меньшей мере один второй диск расположены под противоположными углами.

Преимущественно, средства встряхивания и перемешивания дополнительно содержат электромотор, предназначенный для обеспечения возвратно-поступательного движения встряхивающего элемента в направлении продольной оси стержня. Благодаря этому можно постоянно и равномерно распределять микроорганизмы по биореактору, предотвращая таким образом формирование биопленок микроорганизмов на стенках реактора и не препятствуя звуковым волнам.

### **Краткое описание фигур**

Дополнительные аспекты и преимущества настоящего изобретения станут более очевидными при ознакомлении с нижеследующим описанием, которое представлено лишь в целях иллюстрации и выполнено со ссылками на прилагаемые фигуры, где:

на фиг. 1 показана функциональная схема варианта осуществления биореактора согласно настоящему изобретению;

на фиг. 2А и 2В показаны соответственно графики зависимости частоты и интенсивности испускаемой звуковой волны от времени согласно одному варианту осуществления настоящего изобретения;

на фиг. 3 показана функциональная схема средств встряхивания и перемешивания согласно настоящему изобретению;

на фиг. 4 показана представленная в логарифмическом масштабе спектрограмма за период  $T$  звукового сигнала, используемого для генерирования звуковой волны согласно одному варианту осуществления настоящего изобретения.

### **Варианты осуществления настоящего изобретения**

На фиг. 1 показана функциональная схема биореактора для получения культуры микроорганизмов согласно настоящему изобретению. Согласно конкретному варианту осуществления, показанному на фигурах, биореактор 1 использовали для получения культуры микроводорослей (например, *Scenedesmus obliquus*). К числу штаммов микроводорослей, пригодных к применению в рамках настоящего изобретения, можно, кроме прочего, отнести следующие штаммы: *Scenedesmus obliquus*, *Scenedesmus quadricaula*, *Scenedesmus sp.*, *Chlorella emersonii*, *Chlorella vulgaris*, *Chlorella pyrenoidosa*, *Chlorella sorokiniana*, *Chlorella ellipsoidea*, *Chlorella salina*, *Chlorella minutissima*, *Chlorella protothecoides*, *Phaeodactylum tricorutum*, *Phaeodactylum tricorutum*,

*Porphyridium cruentum*, *Spirulina platensis*, *Dunaliella salina*, *Dunaliella tertiolecta*, *Nannochloropsis salina*, *Nannochloropsis oculata*, *Nannochloropsis* sp., *Tetraselmis suecica*, *Tetraselmis chuii*, *Nannochloropsis Gaditana*, *Gymnodinium nelsoni*, *Isochrysis galbana*, *Euglena gracilis*, *Botryococcus braunii*, *Neochloris oleoabundans*, *Chroomonas salina*, *Cyclotella cryptica*, *Nitzschia laevis*, *Onoraphidium* sp., *Haematococcus pluvialis*, *Monoraphidium minutum*, *Monoraphidium* sp., *Cyclotella* sp., *Ettlia texensis*, *Pavlova lutheri*, *Thalassiosira* sp., *Bacillaris stichococcus*, микроводоросли, культивируемые в монокультуре или на фоне конкуренции различных видов. Также можно использовать культуры различных видов цианобактерий: *Anabaena* sp., *Anabaena variabilis*, *Arthrospira platensis*, *Arthrospira* sp., *Acaryochloris* sp., *Cyanothece* sp., *Microcystis aeruginosa*, *Microcystis* sp., *Rhodopseudomonas* sp., *Rhodopseudomonas palustris*, *Prochlorococcus marinus*, *Synechococcus* sp., *Synechococcus allunga*, *Nostoc* sp., *Nostoc punctiforme*, *Thermosynechococcus allunga*, *Trichodesmium erythraeum*, *Chlorobium tepidum*, *Chlorobaculum* sp., *Prochlorococcus* sp., *Acaryochloris marina*, *Gloeobacter* sp., *Gloeobacter violaceus*, *Synechocystis* sp., *Cylindrospermopsis raciborskii*, *Synechocystis* sp. Также можно применять культуры различных видов диатомовых водорослей: *Haslea ostrearia*, *Navicula ostrearia*, *Navicula* sp. в качестве биологических индикаторов воды, *Licmophora ehrenbergii*, *Navicula tripunctata*, *Didimosphenia geminata*, *Cymbella* sp., а также рассматриваемые в качестве примера дрожжи: *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces kudriavzevii*, *Saccharomyces cariocanus*, *Saccharomyces paradoxus*, *Saccharomyces pastorianus*, *Saccharomyces bayanus*, *Saccharomyces monacensis*, *Saccharomyces uvarum*, *Saccharomyces carlsbergensis*.

Биореактор 1 содержит цилиндрическую емкость 2, выполненную с возможностью размещения культуры микроорганизмов. В случае микроводорослей биореактор дополнительно содержит один или несколько источников светового излучения (не показаны), например, неоновые лампы или потолочную лампу, расположенную на заданном расстоянии от емкости, предпочтительно 25 см. Емкость 2 предпочтительно изготовлена из боросиликатного стекла толщиной 5 мм.

Предпочтительно, емкость в поперечном сечении имеет форму эллипса, малая ось которого равна радиусу эквивалентной трубки. Такая характеристика позволяет распределить объем микроводорослей вдоль всей оси источника света, а тот факт, что воздействию светового излучения подвергается поверхность меньшей кривизны, позволяет исключить явления отражения, ограничив эффект дисперсии лишь областью вблизи боковых сторон (более искривленных).

Емкость 2, показанная на фиг. 1, обычно заполнена бидистиллированной водой 3, в которую погружена культура микроорганизмов 4 (в этом случае микроводорослей). Вблизи от основания емкости имеется источник 5 звука (звуковой актуатор), предназначенный для облучения и стимуляции культуры микроорганизмов 4 звуковой волной 10. Предпочтительно, наружная сторона источника 5 звука взаимодействует с нижней стенкой емкости 2.

Кроме того, автор настоящего изобретения отметил, что по результатам анализа лазерной интерферометрии, проведенной с помощью LVD (лазерного доплеровского виброметра), вблизи от соответствующих внешних профилей эллиптического сечения емкости 2 обеспечивает биореактору большую жесткость на стадиях передачи звуковых волн, а также усиливает колебания самой боковой поверхности емкости 2 более значительно, чем сходных цилиндрических структур, в которых из-за возникновения помех в виде радиальных движений эффект передачи звуковых вибраций исчезает.

Согласно другим вариантам осуществления настоящего изобретения источник звука может располагаться внутри емкости 2, будучи погруженным в бидистиллированную воду, что также находится в пределах объема настоящего изобретения.

Источник 5 звука может представлять собой звуковой актуатор (например, актуатор Ottone™) с применением магнитострикционного привода, максимальной мощностью 20 Вт и импедансом 4 Ом.

Предпочтительно, источник 5 звука соединен с усилителем 7, который в свою очередь подключен к генератору 6 сигнала. Генератор 6 сигнала предпочтительно подключен к электронному процессору 8, с помощью которого можно задать конкретный вид электрического сигнала, который должен вырабатывать генератор 6, при этом генератор и электронный процессор можно рассматривать как единый рабочий блок (например, ПК со звуковой картой). Таким образом, с помощью электронного процессора и/или генератора можно вырабатывать заданный электрический сигнал, который после надлежащего усиления усилителем 7 может быть преобразован при помощи звукового актуатора 5 в звуковую волну 10.

Согласно предпочтительному варианту осуществления биореактор дополнительно содержит гидрофон 9, по меньшей мере частично погруженный внутрь культуры 4 (предпочтительно на глубину приблизительно 5-10 см от открытой водной поверхности). Звуковая волна, вырабатываемая актуатором 5, проходит сквозь культуру 4 и затем регистрируется гидрофоном 9. Гидрофон 9 подключен к электронному

процессору 8 (например, через плату сбора данных, подключенную к ПК). После прохождения сквозь культуру 4 звуковая волна 10 несет некоторую полезную информацию, которую можно извлечь с помощью частотного анализа сигнала, зарегистрированного гидрофоном 9. Электронный процессор 8 рассчитывает преобразование Фурье (например, по алгоритму быстрого преобразования Фурье) сигнала, зарегистрированного гидрофоном 9, и акустическое давление зарегистрированной звуковой волны. На основании этих данных процессор 8 определяет концентрацию микроорганизмов, содержащихся внутри культуры 4.

При измерениях интенсивности звуковой волны в воде единицей измерения, полученной после ряда преобразований, обусловленных температурой и характеристиками среды, является дБ относительно 1 мПа.

В частности, с помощью экспериментальных испытаний можно создать базу данных, в которой каждой концентрации микроорганизмов (измеренной известными методиками) соответствуют данные, связанные с рядом образцов звуков (с установленной интенсивностью и частотой). Измерения концентрации (количество клеток на 1 миллилитр) проводили с применением методики лазерного определения размера частиц с помощью анализатора размера частиц Accusizer 780/AD с авторазбавителем после определения диаметра эквивалентной сферы, спроецированной в оптический путь прибора во время пересечения его клетками (которые в случае *Scenedesmus obliquus* представляют собой вытянутые сфероиды), и автоматического портативного счетчика клеток с одноразовыми наконечниками Scepter™ 2.0 Handheld Automated Cell Counter.

Путем сравнения данных, связанных с зарегистрированной звуковой волной, с данными, содержащимися в базе данных, процессор может точно определять концентрацию микроорганизмов в емкости. Поэтому такие измерения можно проводить в режиме реального времени, чтобы вести мониторинг культуры микроорганизмов 4 на протяжении цикла культивирования.

Предпочтительно, мониторинг роста размеров проводят по классам 1-3 мкм, 3-7 мкм, 7-10 мкм, 10-13 мкм, вместо подсчета клеток в камере Бюркера без учета отношения их площади к объему.

Предпочтительно, генерируемая звуковая волна 10 (например, синусоидальная) обладает частотой, изменяющейся со временем по принципу пилообразной функции. На фиг. 2А показана зависимость частоты звуковой волны 10 от времени. Частота звуковой волны изменяется в диапазоне от 50 Гц до 8 кГц, предпочтительно от 100 Гц до 6 кГц.

Пилообразная функция имеет период  $T$ , составляющий предпочтительно от 5 до 20 секунд, предпочтительно 10 секунд.

Предпочтительно, интенсивность звуковой волны изменяется со временем по принципу пилообразной функции в диапазоне от 0 дБ до 70 дБ. На фиг. 2В показана зависимость интенсивности звука (выраженной в децибелах) звуковой волны 10, генерируемой актуатором 5, от времени. Согласно представленному варианту осуществления интенсивность ( $I$ ) и частота ( $f$ ) изменяются в зависимости от времени синхронно в соответствии с пилообразной функцией с одним и тем же периодом  $T$ . Однако согласно другим вариантам осуществления может обеспечиваться сохранение постоянной интенсивности звуковой волны (например, величиной приблизительно 62 дБ) с изменением только частоты, что также находится в пределах объема настоящего изобретения.

На фиг. 4 более подробно показана представленная в логарифмическом масштабе спектрограмма за равный десяти секундам период  $T$  звукового сигнала, используемого для генерирования звуковой волны согласно предпочтительному варианту осуществления настоящего изобретения.

В том случае, если для роста микроорганизмов требуется искусственное освещение (например, в случае микроводорослей), предпочтительно циклическое освещение культуры в течение 14 часов с периодом 24 часа, из которых 10 часов освещение отсутствует. Акустическую стимуляцию предпочтительно проводить только в течение четырнадцати часов освещения. Еще более предпочтительно проводить акустическую стимуляцию сессиями по 40 минут, которые перемежаются периодами ожидания (покоя) по 140 минут. Иными словами, попеременно проводят сессии акустической стимуляции, продолжающиеся 40 минут, и сессии «тишины», продолжающиеся 140 минут.

Биореактор 1 дополнительно содержит средства 11 для встряхивания и перемешивания культуры 4 микроорганизмов, содержащейся в емкости 2. Из соображений ясности средства 11 не показаны на фиг. 1. На фиг. 3 показан вариант осуществления средств 11 встряхивания и перемешивания культуры 4 микроорганизмов согласно настоящему изобретению.

Средства 11 встряхивания и перемешивания содержат по меньшей мере один встряхивающий элемент 11а (расположенный внутри емкости 2), оснащенный стержнем 12 с по существу вертикальной продольной осью и по меньшей мере одним первым диском 13а, размещенным под углом к продольной оси стержня 12. Согласно

показанному варианту осуществления встряхивающий элемент 11а оснащен двумя дисками 13а, 13b, прикрепленными к стержню 12 и предпочтительно расположенными наклонно относительно продольной оси стержня 12, более предпочтительно расположенными под противоположными углами. Угол расположения дисков относительно дна емкости 2 предпочтительно составляет приблизительно  $20^\circ$ .

Согласно другим вариантам осуществления может присутствовать стержень 12, оснащенный большим количеством дисков (например, тремя или более дисками), из которых по меньшей мере один ориентирован под углом, противоположным остальным дискам, что также находится в пределах объема настоящего изобретения.

Стержень 12 предпочтительно изготовлен из стали. Диски 13а и 13b предпочтительно изготовлены из тефлона (предпочтительно толщиной приблизительно 4 мм), чтобы обеспечить возможность скольжения и минимизировать возможное трение о внутренние стенки емкости 2.

Следовательно, встряхивающий элемент 11а совершает возвратно-поступательные движения по существу в вертикальном направлении, как показано стрелками 14 на фиг. 3. Возвратно-поступательное движение встряхивающего элемента 11а в направлении вверх-вниз внутри емкости 2 создает завихрения (т.е. микроскопические вихри без турбулентности), посредством которых обеспечивают однородное распределение микроорганизмов в пределах культуры 4 и улучшают ресуспендирование микроорганизмов вдоль водяного столба 3.

Продольное возвратно-поступательное движение может быть обеспечено, например, путем разматывания и наматывания нейлоновой нити 15 (прикрепленной к концу стержня 12) на алюминиевый пруток 16, расположенный горизонтально над емкостью 2 и вращающийся по часовой стрелке и против нее (как показано стрелками 17) под воздействием электромотора М. Электромотор М приводится в движение чередующимися импульсами (положительными и отрицательными) продолжительностью по шесть секунд каждый. Таким образом, встряхивающий элемент 11а движется таким образом, что полный цикл «подъем-спуск» завершается за 12 секунд (шесть секунд на подъем и шесть секунд на спуск). Такую операцию повторяют в течение минуты (пять полных циклов «подъем-спуск») каждые десять минут, то есть на одну минуту встряхивания приходится девять минут покоя.

В случае культур 4 микроводорослей предпочтительно, чтобы стадии, состоящие из одной минуты встряхивания и девяти минут покоя, непрерывно повторялись как в период освещения, так и в период темноты и – сходным образом – в

период акустической стимуляции и в период тишины.

Вариант осуществления, показанный на фиг. 3, позволяет сделать средства 11 менее громоздкими, однако другие варианты осуществления могут обеспечивать продольное возвратно-поступательное движение встряхивающего элемента 11а иными способами, например, стержень 12 может перемещаться под воздействием жесткого элемента, например, зубчатой рейки (вместо нити), входящей в зацепление с шестерней, вращаемой электромотором М.

Согласно альтернативному варианту осуществления предложен биореактор 1, содержащий множество емкостей 2, каждая из которых оборудована источником 5 звуковых волн 10. Согласно этому варианту осуществления каждая емкость 2 оснащена встряхивающим элементом 11а. Каждый встряхивающий элемент 11а перемещается посредством разматывания и наматывания соответствующей нейлоновой нити 15 на прутки 16, вращаемый мотором М. Это позволяет с помощью одного электромотора М синхронно и поступательно перемещать разные встряхивающие элементы 11а, получая простую и недорогую в реализации конструкцию. В общем, способ получения культуры микроорганизмов согласно настоящему изобретению предусматривает стадии:

а) встряхивание и перемешивание указанных микроорганизмов 4 с помощью указанных средств 11 встряхивания и перемешивания,

б) воздействие на указанную культуру микроорганизмов 4 звуковой волной 10, частота ( $f$ ) которой изменяется со временем по принципу пилообразной функции в диапазоне от 50 Гц до 8 кГц, предпочтительно от 100 Гц до 6 кГц.

Предпочтительно, период  $T$  пилообразной функции составляет от 5 до 20 секунд, предпочтительно 10 секунд.

Предпочтительно, указанный способ предусматривает стадии:

с) регистрация посредством гидрофона 9, размещенного по меньшей мере частично внутри указанной культуры микроорганизмов 4, указанной звуковой волны 10, проходящей сквозь указанную культуру микроорганизмов 4,

д) определение концентрации указанной культуры 4 на основе сигнала, поступающего от указанного гидрофона 9.

Предпочтительно, в течение стадии б) интенсивность ( $I$ ) указанной звуковой волны 10 изменяется со временем по принципу пилообразной функции в диапазоне от 0 дБ до 70 дБ.

Стадия а) включает в себя стадию а1) приведения указанной культуры микроорганизмов 4 в движение посредством указанных средств 11 встряхивания и

перемешивания, причем движение носит возвратно-поступательный характер и совершается по существу в вертикальном направлении 14. Предпочтительно, стадия a1) продолжается приблизительно 60 секунд, при этом ее повторяют каждые 10 минут.

Предпочтительно, стадия d) включает в себя стадию d1) расчета преобразования Фурье звуковой волны 10, зарегистрированной на стадии с), и стадию d2) расчета акустического давления звуковой волны 10, зарегистрированной на стадии с).

**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Способ получения культуры микроорганизмов (4) с помощью биореактора (1), содержащего меньшей мере одну цилиндрическую емкость (2) и средства (11) встряхивания и перемешивания для встряхивания и перемешивания указанной культуры микроорганизмов (4), размещенной в указанной емкости (2), причем способ предусматривает стадию а) встряхивания и перемешивания указанных микроорганизмов (4) с помощью указанных средств (11) встряхивания и перемешивания и стадию б) воздействия на указанную культуру микроорганизмов (4) звуковой волной (10), отличающийся тем, что указанная стадия б) включает в себя стадию воздействия на указанную культуру (4) звуковой волной (10), частота (f) которой изменяется со временем по принципу пилообразной функции в диапазоне от 50 Гц до 8 кГц, предпочтительно от 100 Гц до 6 кГц.

2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что интенсивность (I) указанной звуковой волны (10) изменяется со временем по принципу пилообразной функции в диапазоне от 0 дБ до 70 дБ.

3. Способ по п. 1 или п. 2, отличающийся тем, что период (T) указанной пилообразной функции составляет от 5 до 20 секунд, предпочтительно 10 секунд.

4. Способ по одному или нескольким из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что дополнительно предусматривает стадию с) регистрации посредством гидрофона (9), размещенного по меньшей мере частично внутри указанной культуры микроорганизмов (4), указанной звуковой волны (10), проходящей сквозь указанную культуру микроорганизмов (4), и стадию d) определения концентрации указанной культуры (4) на основе сигнала, поступающего от указанного гидрофона (9).

5. Способ по п. 4, отличающийся тем, что указанная стадия d) включает в себя стадию d1) расчета преобразования Фурье сигнала звуковой волны (10), зарегистрированной на стадии с), и стадию d2) расчета акустического давления звуковой волны (10), зарегистрированной на стадии с).

6. Способ по одному или нескольким из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что указанная стадия а) включает в себя стадию a1) приведения указанной культуры микроорганизмов (4) в движение посредством указанных средств (11) встряхивания, причем движение носит возвратно-поступательный характер и совершается по существу в вертикальном направлении (14).

7. Способ по п. 6, отличающийся тем, что указанная стадия a1) длится

приблизительно 60 секунд, при этом ее повторяют каждые 10 минут.

8. Биореактор (1) для получения культуры микроорганизмов (4), содержащий по меньшей мере одну цилиндрическую емкость (2) и средства (11) встряхивания и перемешивания, предназначенные для встряхивания и перемешивания указанной культуры микроорганизмов (4), размещенной в указанной емкости (2), причем указанный биореактор (1) дополнительно содержит источник звуковых волн (5) для воздействия на указанную культуру микроорганизмов (4) звуковой волной (10), отличающийся тем, что указанный источник (5) выполнен с возможностью испускания звуковой волны (10), частота ( $f$ ) которой изменяется со временем по принципу пилообразной функции в диапазоне от 50 Гц до 8 кГц, предпочтительно от 100 Гц до 6 кГц.

9. Биореактор (1) по п. 8, отличающийся тем, что период ( $T$ ) указанной пилообразной функции составляет от 5 до 20 секунд, предпочтительно 10 секунд, при этом интенсивность указанной звуковой волны (10) изменяется со временем от 0 дБ до 70 дБ по меньшей мере на протяжении указанного периода ( $T$ ).

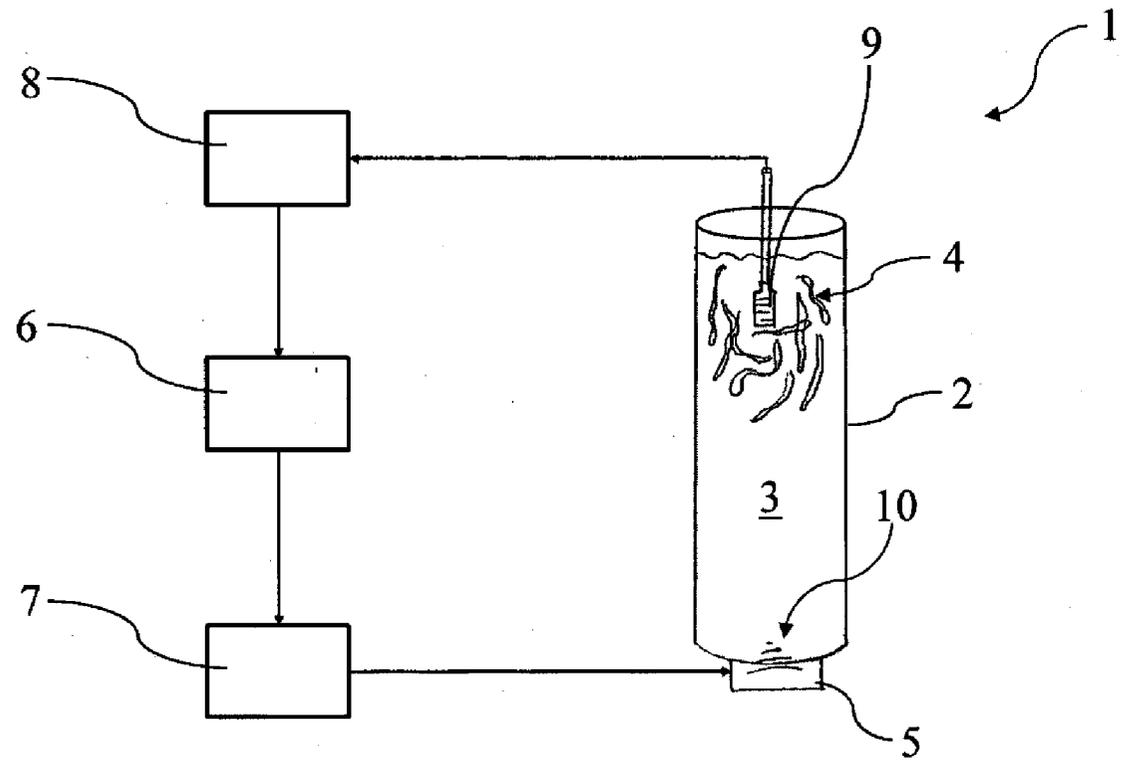
10. Биореактор (1) по п. 8 или п. 9, отличающийся тем, что содержит по меньшей мере один гидрофон (9), размещенный по меньшей мере частично внутри указанной культуры микроорганизмов (4), для регистрации звуковой волны, испускаемой из указанного источника (5) и проходящей сквозь указанную культуру микроорганизмов (4), причем указанную звуковую волну, регистрируемую указанным гидрофоном (9), используют для определения концентрации указанной жидкой культуры (4).

11. Биореактор (1) по одному или нескольким из пп. 8-10, отличающийся тем, что указанные средства (11) встряхивания и перемешивания содержат по меньшей мере один встряхивающий элемент (11a), оснащенный стержнем (12) с по существу вертикальной продольной осью и по меньшей мере одним первым диском (13a), размещенным под углом к продольной оси стержня (12).

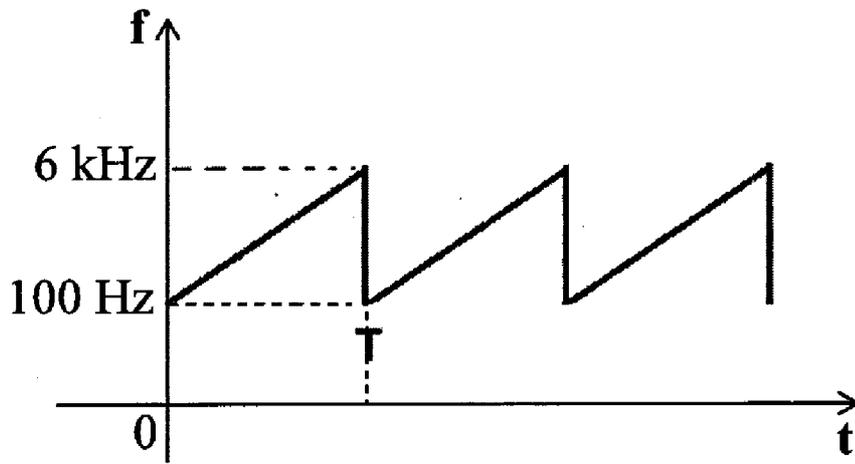
12. Биореактор (1) по п. 11, отличающийся тем, что указанные средства (11) встряхивания и перемешивания содержат по меньшей мере один второй диск (13b), расположенный под углом относительно указанной продольной оси указанного стержня (12), причем указанный по меньшей мере один первый диск (13a) и указанный по меньшей мере один второй диск (13b) расположены под противоположными углами.

13. Биореактор (1) по п. 11 или п. 12, отличающийся тем, что указанные средства (11) встряхивания и перемешивания дополнительно содержат электромотор ( $M$ ), предназначенный для обеспечения возвратно-поступательного движения

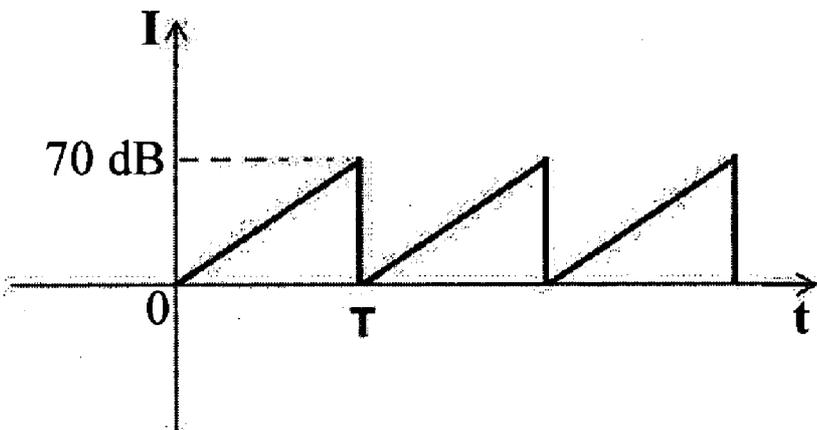
встрягивающего элемента (11a) в направлении (14) продольной оси указанного стержня (12).



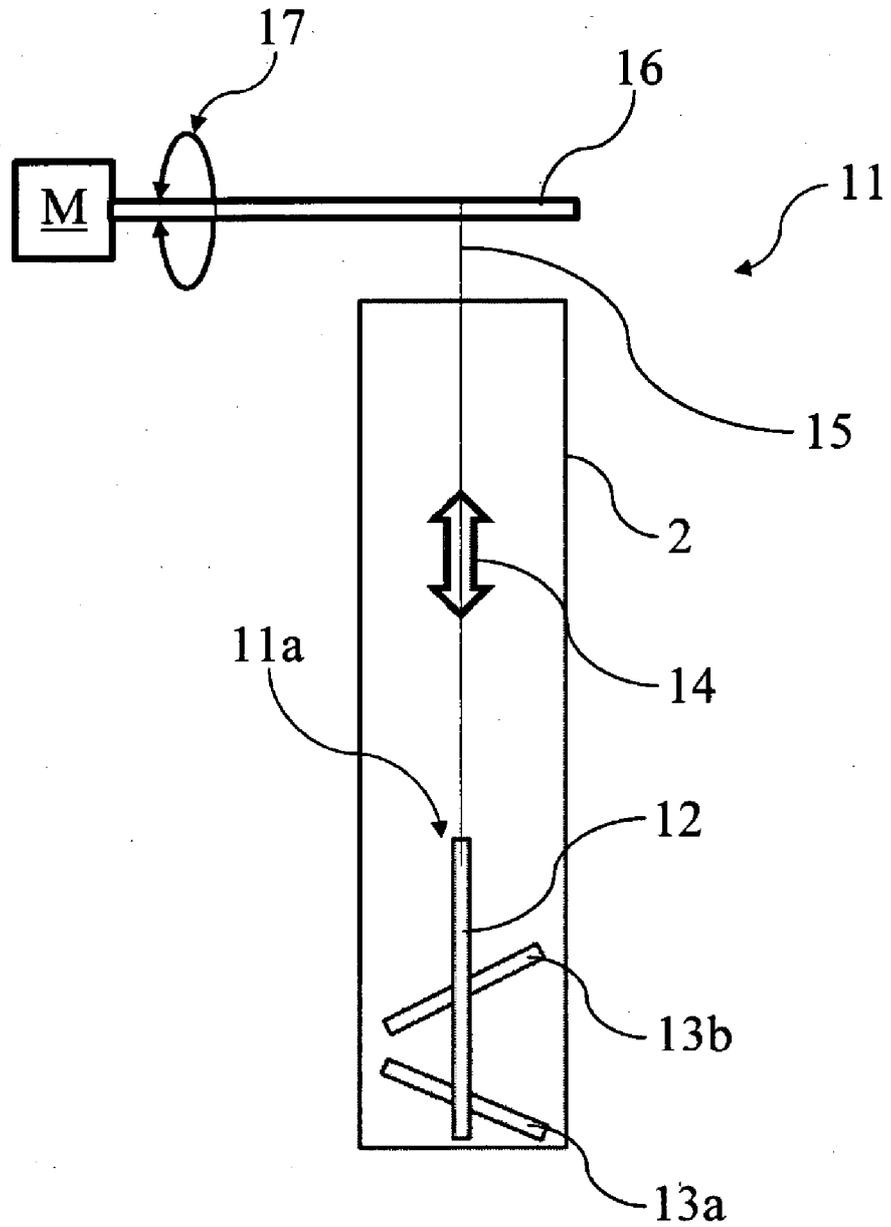
Фиг. 1



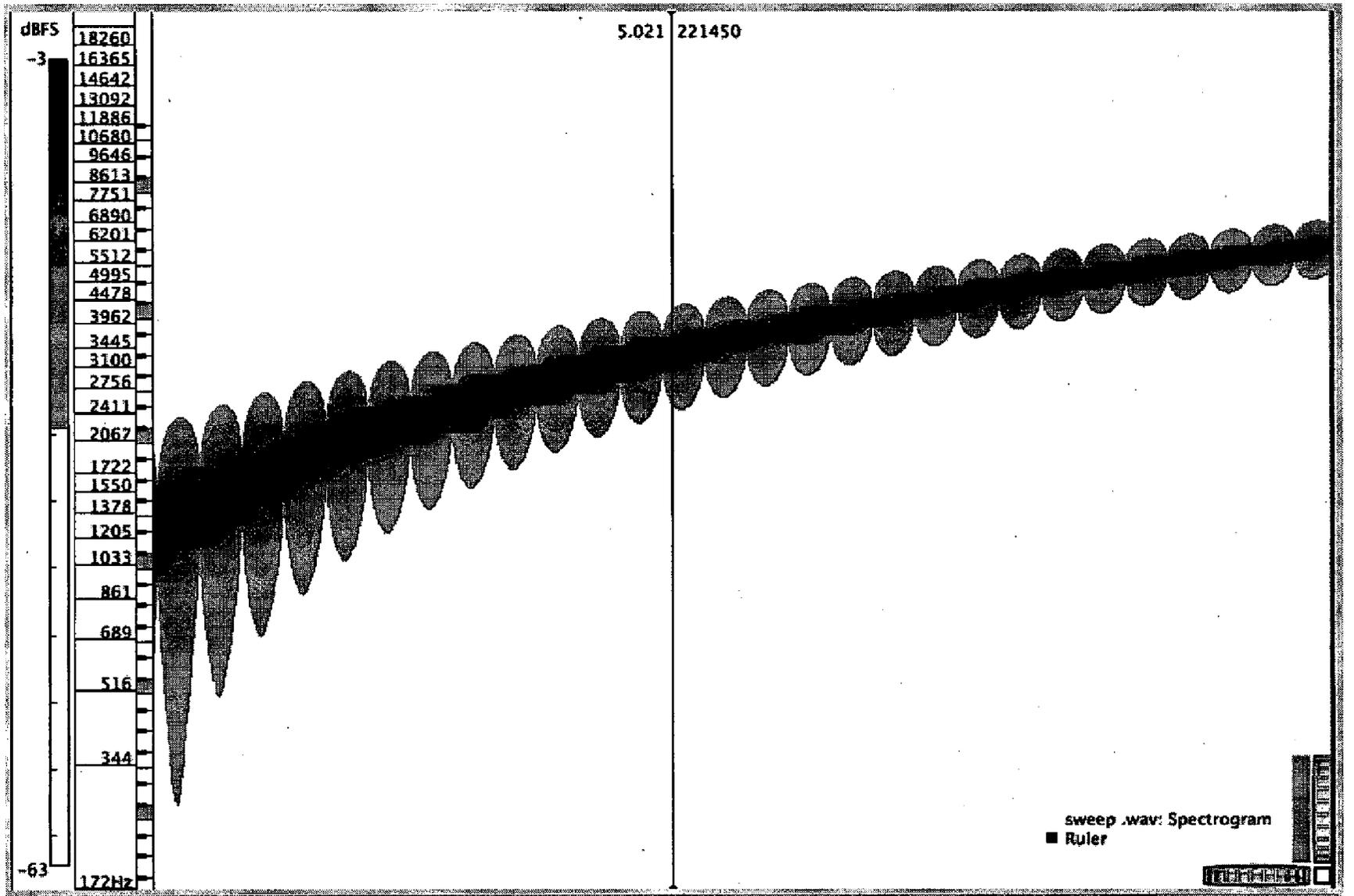
Фиг. 2А



Фиг. 2В



Фиг. 3



Фиг. 4