

emperor moths *Nudaurelia cytherea capensis* was attempted. Electron microscopic studies on material taken from the 3 zones observed revealed that there were 3 infective agents present. The largest of particle size 39 nm sedimented out furthest to be followed by a virus type of particle size 37.5 nm. This type represented approximately 80% of the total virus present. This fraction was then followed by a type of particle size 27 nm which represented approximately 5% of the total virus concentration. The entity of particle size 37.5 nm was approximate 100% pure, but the remaining 2 were contaminated with the 37.5 nm variety. The presence of these viruses in the pine emperor moths had been reported on by JUCKES<sup>3</sup>.

In conclusion it may be stated that the method could be complementary to such techniques as are commonly used in virus research such as ion exchanging, gel exclusion chromatography and zone electrophoresis.

**Zusammenfassung.** Der verbesserte, neu konzipierte Reograd-Rotor eignet sich für die präparative Zentrifugierung von Makromolekülen und Viren.

A. POLSON and K. J. KAUFMANN

M.R.C. Virus Research Unit,  
University of Cape Town (South Africa), 2 March 1970.

<sup>3</sup> I. JUCKES, to be published in the Bull. S.A. Soc. Plant Path. Microbiol. (1970).

<sup>4</sup> Acknowledgements. The authors wish to acknowledge the donation of the insect virus concentrate by Mr. I. JUCKES and to Prof. A. KIRPS for the haemocyanin and for his interest in this work. We are grateful to the Department of Agriculture Technical Services for financial assistance towards this investigation.

## Automatische Apparatur zur kontinuierlichen Herstellung synchroner Algenkulturen

Zur Durchführung gewisser biochemischer Untersuchungen benötigen wir grössere Mengen synchroner *Chlamydomonas*-Zellen. Um die zeitraubende und umständliche chargenweise Kultivierung zu umgehen, haben wir eine Anlage gebaut, welche möglichst weitgehend automatisiert ist und sich dennoch für verschiedene Zwecke einsetzen lässt. Kontinuierlich arbeitende Apparaturen sind schon verschiedentlich entwickelt worden<sup>1,2</sup> und auch schon im Handel erhältlich (zum Beispiel Chemap AG., Männedorf/Zürich, oder New Brunswick Scientific Company, New Jersey). Anlagen zur kontinuierlichen Synchronkultur dagegen sind noch selten beschrieben worden<sup>3-5</sup>. Unter kontinuierlich verstehen wir hier eine sich über längere Zeit synchron entwickelnde Kultur, welche periodisch verdünnt wird. Wir haben uns zu einer eigenen Konstruktion entschlossen, weil uns die Fragen der Beleuchtung, der Sterilisierbarkeit und der Verfolgung und Steuerung des Wachstums für unsere Zwecke noch nicht befriedigend gelöst erschienen.

**Apparatur.** Es wurden zwei identische Apparaturen aufgebaut, welche einerseits aus dem eigentlichen Kulturgefäß und andererseits aus den Steuerorganen bestehen.

**Kulturgefäß.** Das Kulturgefäß, dessen Konzeption auf einer Idee von K. ERISMANN (Pflanzenphysiologisches Institut Bern) beruht, wird durch drei koaxiale Glaszyliner von je 1 m Länge und von 160, 88 beziehungsweise 56 mm Aussendurchmesser gebildet (Figur 1), welche in den Rillen zweier Flansche aus rostfreiem Stahl laufen. Gummiringe und Zugstäbe, welche die Flansche gegeneinanderziehen, sorgen für die Dichtigkeit der abgetrennten Räume. Beide Flansche sind in der Mitte durchbohrt, so dass eine 100 W Hochleistungs-Leuchstoffröhre das Gefäß von innen her beleuchten kann. Der Raum a) dient, mit Zu- und Abflüssen in beiden Flanschen versehen, der Thermostatisierung durch einen Wasserkreislauf. Der Raum b) nimmt etwa 10 l Nährlösung (NL) auf; eine Teflon-Siebplatte c) im untern Flansch erlaubt Begasung und gleichzeitig Durchmischung der Suspension; das Gasgemisch verlässt das Kulturgefäß zwangsläufig durch ein im obern Flansch verschiebbar befestigtes Glasrohr d), welches in eine Kugel mit zwei Austrittsöffnungen mündet. In dieser Kugel findet beim Nachströmen frischer NL Separation statt: das Gas gelangt durch die obere Öffnung durch ein Sterilfilter ins Freie und die Flüssigkeit strömt durch die untere in ein

Auffanggefäß. Ein Widerstandselement in einem Tauchrohr e) misst die Temperatur der Kulturflüssigkeit. Die Suspension wird außerdem am untern Flansch dauernd entnommen und durch einen externen Kreislauf durch den oben Flansch wiederum in den Kulturrbaum zurückgeleitet. Dieser Kreislauf wird durch eine eigens für diesen Zweck konstruierte, autoklavierbare Zentrifugalpumpe aufrechterhalten; die Pumpe besteht aus Teflon und kann,

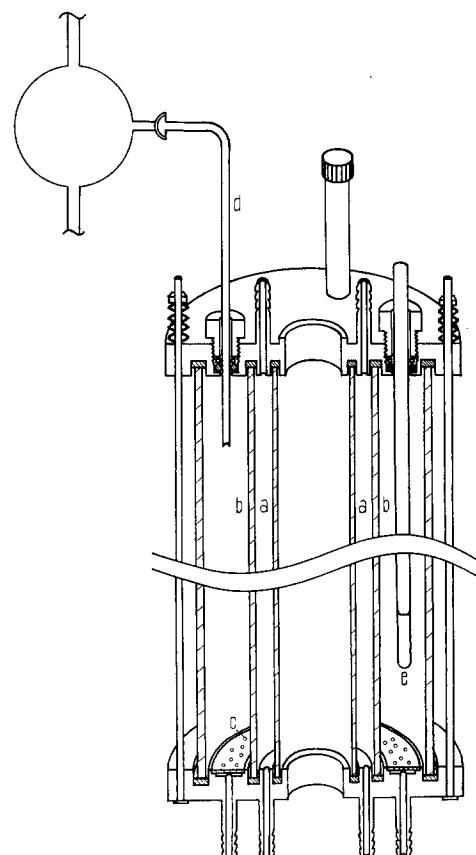


Fig. 1. Kulturgefäß.

da sie durch eine axiale Magnetkupplung angetrieben wird, leicht vom Motor gelöst werden. Nach der Pumpe passiert die Flüssigkeit eine Messzelle für die pH-Messung und eine für die Messung der optischen Dichte (O.D.) und ein Zulaufstück, wo die benötigten Korrekturflüssigkeiten beigemischt werden können.

**Steuerinrichtungen.** Das Blockschema (Figur 2) zeigt die wesentlichen Steuerfunktionen.

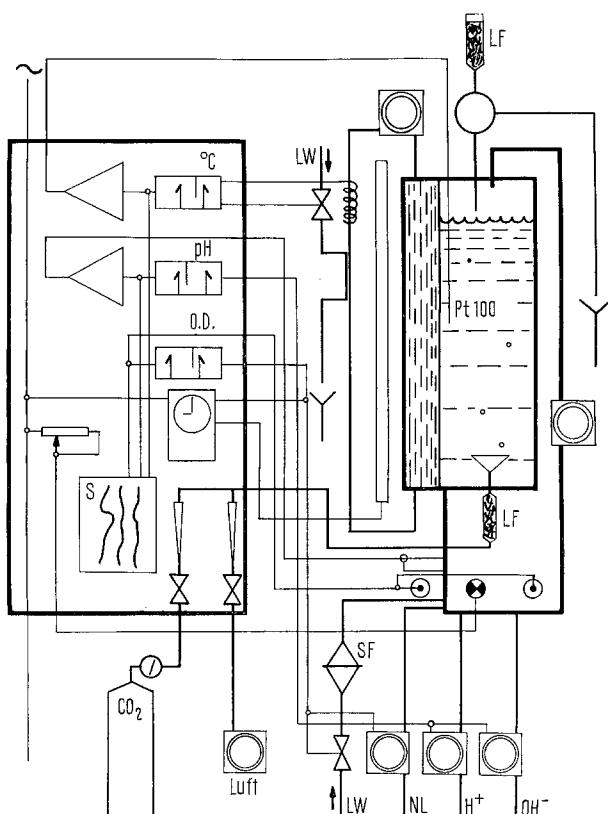


Fig. 2. Blockschema.

**Thermostatisierung.** Das im Raum a) des Kulturgefässes zirkulierende Wasser strömt durch ein Becken, wo es mit einem Tauchsieder erwärmt beziehungsweise mit einer Kühlslange abgekühlt werden kann; die Regelung erfolgt über einen anzeigenenden Zweipunktregler mit Rückführung, der an den erwähnten Temperaturfühler angeschlossen wird. Bei richtiger Einstellung des Gerätes und bei Abwesenheit erheblicher Störfaktoren (Zumischen kalter NL oder – in geringerem Masse – Ein- und Ausschalten des Lichts) ist keine Abweichung vom eingestellten Sollwert festzustellen, das heißt die Temperaturkonstanz ist besser als  $\pm 0,2^\circ\text{C}$ .

**pH-Regulierung.** Der pH-Wert wird durch einen elektronischen Regler überwacht, welcher bei Über- oder Unterschreitung des Sollwertes über Motorkolbenbüretten 2n Säure oder Lauge beimischt; auch diese Regelung lässt sich in weiten Grenzen an die Trägheit der Regelstrecke anpassen. Die Konstanz ist besser als  $\pm 0,2$  pH-Einheiten.

**Messung der OD** Sie erfolgt in einer Messzelle mit kreisrundem Querschnitt mit Hilfe zweier Photowiderstände in Brückenschaltung und eines kleinen Scheinwerfers. Der Messwert hat keine absolute Bedeutung, sondern muss erst geeicht werden, zum Beispiel durch Auszählen der Zellen im Mikroskop.

**Registrierung.** Die drei erwähnten Größen werden durch einen Punktschreiber laufend registriert.

**Belüftung.** Die von einem Kompressor gelieferte Luft und Kohlendioxid aus einer Stahlflasche werden einzeln mit Hilfe von Strömungsmessern gemessen, gemischt und nach Sterilfiltration ins Kulturgefäß eingeblasen.

<sup>1</sup> H. SENGER und H.-J. WOLF, Arch. Mikrobiol. 48, 81 (1964).

<sup>2</sup> I. MÁLEK and Z. FENCL; *Theoretical and Methodological Basis of Continuous Culture of Microorganisms* (Academic Press, New York 1966).

<sup>3</sup> F. FETTER, T. GUMPELMAYER, N. WEIDINGER, F. BUSCHBÖCK, E. PFISTERER, K. KAINDL, A. v. SZILVINYI und H. ALTMANN, Bodenkultur 18, 293 (1967).

<sup>4</sup> T. A. HARE und R. R. SCHMIDT, Appl. Microbiol. 16, 496 (1968).

<sup>5</sup> J. DALMON und R. GILET, Folia microbiol. 14, 97 (1969).

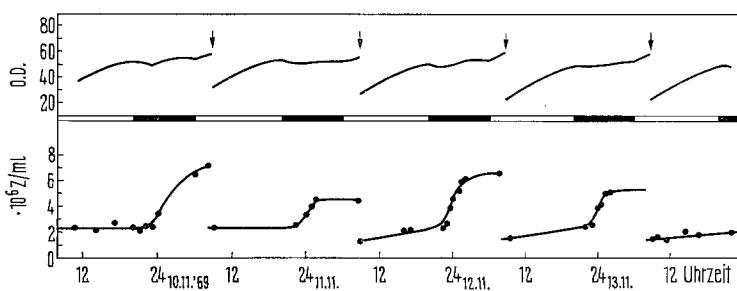


Fig. 3. *Chlorella pyrenoidosa*, 14:10 h. Oben: nach Registrierstreifen umgezeichnete OD Mitte: Licht-Dunkel. Unten: mikroskopisch bestimmte Zellzahl. Die Pfeile deuten die Verdünnung an.

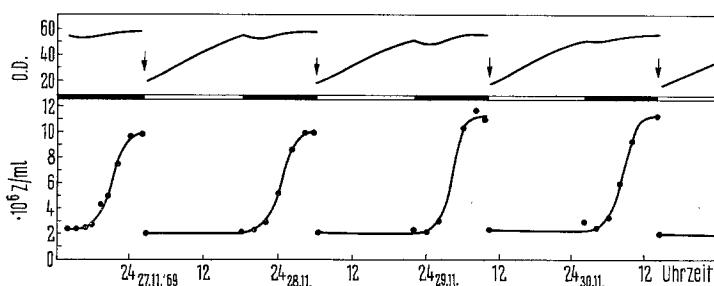


Fig. 4. *Chlorella pyrenoidosa*, 16:12 h.

**Nährlösung.** Eine Schlauchquetschpumpe fördert steriles NL-Konzentrat ins Zulaufstück, während gleichzeitig steril filtriertes Leitungswasser im richtigen Verhältnis beigemischt wird. Die Zufuhr von NL kann manuell oder automatisch ausgelöst werden. Bei automatischem Betrieb wird entweder täglich eine bestimmte Menge NL nachgefüllt oder bei Erreichen einer bestimmten OD solange verdünnt, bis die OD auf einen andern, einstellbaren Wert gesunken ist (setzt man beide Grenzen nahe zusammen, erreicht man einen quasi-kontinuier-

#### Anwendungsbeispiel. Kulturbedingungen

	<i>Chlorella</i> <sup>a</sup>	<i>Chlamydomonas</i> <sup>b</sup>
Nährlösung	H <sub>8</sub> <sup>6</sup>	Medium I <sup>7</sup> + 0,1 g/l Arginin/HCl
Temperatur	30 °C	20 °C
pH	6,4	7,0
Beleuchtung	14:10 bzw. 16:12 h Licht:Dunkel 2000–10000 Lux in der Kultur, je nach Entfernung von der Lichtquelle	12:12 h Licht:Dunkel
Belüftung	10 l/min mit ca. 2,5% CO <sub>2</sub>	

<sup>a</sup> *Chlorella pyrenoidosa*, Nr. 211-8c der Algensammlung des pflanzenphysiologischen Instituts der Universität Göttingen. <sup>b</sup> *Chlamydomonas reinhardtii* Arg.-mt<sup>t</sup>, Nr. 11/32f der Culture Collection of Algae and Protozoa, the Botany School, Cambridge.

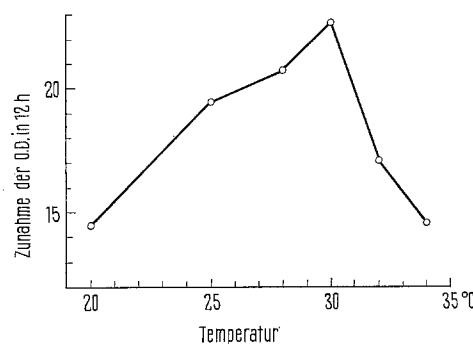


Fig. 5. *Chlorella pyrenoidosa*; Temperaturoptimum des Wachstums.

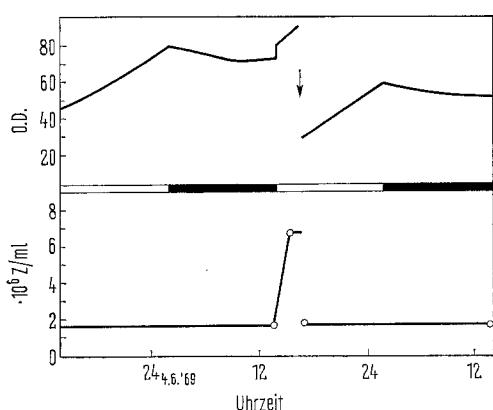


Fig. 6. *Chlamydomonas reinhardtii*, 12:12 h.

lichen Betrieb), oder täglich zu einer festgesetzten Zeit verdünnt, bis eine bestimmte OD erreicht ist.

Die ersten Versuche wurden mit *Chlorella* ausgeführt; sie sollten lediglich dazu dienen, Verhalten und Möglichkeiten der Apparatur zu testen. Wir haben *Chlorella* gewählt, weil dieser Organismus erfahrungsgemäß viel einfacher zu handhaben ist als *Chlamydomonas* und besonders an die Sterilität nur geringe Anforderungen stellt. *Chlorella*-Kulturen blieben auch nach monatelangem Betrieb ohne weiteres sauber, ja sie reinigten sich sogar von selbst, wie schon verschiedentlich festgestellt worden ist<sup>8, 9</sup>.

**Ergebnisse.** Synchronre Kultivierung von *Chlorella* bei 14:10 h Licht:Dunkel-Rhythmus (Figur 3) liefert keine guten Resultate: die Teilung findet zu einem geringen Massen auch noch während der Lichtperiode statt. Wesentlich bessere Synchronität<sup>9–11</sup> erhält man mit 16:12 h (Figur 4). Die eigentliche Teilung der Zellen beziehungsweise Autosporenbildung lässt sich auch anhand der OD verfolgen: während der Lichtperioden steigt die OD jeweils an, entsprechend der Zunahme des Zellvolumens; in den Dunkelperioden sinkt sie aus bisher noch nicht erklären Gründen zunächst etwas, um dann während der Teilung wieder anzusteigen. Die Registrierung der OD erlaubt somit eine einfache, qualitative Beurteilung der Synchronität.

Figur 5 zeigt, wie durch Auswertung der OD-Messungen ohne Auszählung oder Trockengewichtsbestimmung das Temperaturoptimum des Wachstums bestimmt werden kann.

Im synchronen Betrieb konnte alle 28 Stunden etwa 1 g Trockengewicht an *Chlorella* geerntet werden, im quasi-kontinuierlichen bei Dauerlicht täglich etwa 4 g.

Die Teilung der Autosporen-Mutterzellen von *Chlamydomonas* findet beim Einschalten des Lichts statt (Figur 6). Wegen der gegenüber *Chlorella* erhöhten Synchronisationschärfe lässt sich die Teilung als sprunghafter Anstieg der OD besser verfolgen<sup>12, 13</sup>.

**Summary.** An apparatus for continuous and synchronous cultivation of microorganisms is described; operation and applicability of the apparatus have been demonstrated by cultivation of *Chlorella pyrenoidosa* and *Chlamydomonas reinhardtii*.

E. C. GROB, A. BOSCHETTI  
und J.-J. MORGENTHALER

Institut für organische Chemie der Universität,  
Länggass-Strasse 7, CH-3011 Bern (Schweiz),  
25. März 1970.

<sup>6</sup> K. H. ERISMANN und A. FINGER, Ber. Schweiz. bot. Ges. 78, 5 (1968).

<sup>7</sup> R. SAGER und S. GRANIK, J. gen. Physiol. 37, 729 (1954).

<sup>8</sup> R. PRATT, T. C. DANIELS, J. J. EILER, J. B. GUNNISON, W. D. KUMLER, J. F. ONETO, L. A. STRAIT, H. A. SPOEHR, G. J. HARDIN, H. W. MILNER, J. H. C. SMITH and H. H. STRAIN, Science 99, 351 (1944).

<sup>9</sup> A. PIRSON und H. SENGER, Naturwissenschaften 48, 81 (1961).

<sup>10</sup> H. SENGER, Arch. Mikrobiol. 40, 47 (1961).

<sup>11</sup> H. TAMIYA, in *Synchrony in Cell Division and Growth* (Ed. E. ZEUTHEN; Interscience Publisher, New York 1964), p. 247.

<sup>12</sup> Diese Arbeit ist mit Unterstützung des Schweiz. Nationalfonds durchgeführt worden, dem wir dafür unseren besten Dank aussprechen.

<sup>13</sup> Den Werkstätten des Theodor-Kocher-Institutes und des anorganisch-chemischen Institutes danken wir für die Anfertigung der mechanischen Teile.