

TERESA JAROSZYŃSKA

ZASTOSOWANIE HODOWLI SYNCHRONICZNEJ DO BADAŃ METABOLIZMU *CHLORELLA* BEYER W JEJ CYKLU ŻYCIOWYM

W poszukiwaniu nowych źródeł wyżywienia dla coraz liczniejszej ludności kuli ziemskiej poważną rolę odgrywać zaczyna hodowla glonów, zwanych często «pokarmem przyszłości». Najczęściej hodowanym organizmem jest *Chlorella* — jednokomórkowa roślina z grupy zielenic. Rozmnaża się ona dość szybko, dając w niedługim czasie jednolitą, intensywnie zieloną zawiesinę. Cecha ta spowodowała, że *Chlorella* od dawna i powszechnie używana jest do doświadczeń z zakresu fizjologii roślin, a zwłaszcza do badań dotyczących procesu fotosyntezy i oddychania.

Podczas tego typu badań uczeni japońscy pod kierunkiem H. Tamiya zauważyli w kulturach *Chlorella ellipsoidea* Gerneck formy komórek różniące się pod względem wielkości, intensywności zabarwienia i aktywności fotosyntetycznej. Komórki mniejsze ($2,0\mu$ — $4,5\mu$), charakteryzujące się dużą procentową zawartością chlorofilu i większą aktywnością fotosyntetyczną, nazwano komórkami ciemnymi i oznaczono symbolem D od «Dark cells». Komórki większe ($4,5\mu$ — $6,0\mu$), jaśniejszej barwy i o mniejszej aktywności fotosyntetycznej, nazwano komórkami jasnymi i oznaczono symbolem L od «Light cells». Komórki jasne wytwarzają drogą podziału pewną liczbę (n) komórek ciemnych. Proces ten można wyrazić wzorem:



Japońscy uczeni odkryli również pewną cykliczność rozwoju komórek *Chlorella*, zwaną obecnie «cyklem Tamiya» (Zurzycki 1958). W oparciu o tę cykliczność wprowadzili metodę hodowli synchronicznej. Istotną jej cechą jest możliwość uzyskania populacji, w której 90—99% komórek znajduje się w tym samym stadium rozwojowym. Umożliwia to przeprowadzenie analiz dających pewne wyobrażenie o funkcjach pojedynczej komórki w zależności od jej stadium rozwojowego. Poznanie przemiany materii oraz fizjologii wzrostu i rozwoju glonów staje się problemem ważnym nie tylko z teoretycznego, ale i praktycznego punktu widzenia.

Metoda hodowli synchronicznej, opracowana w 1953 r. przez Tamiya, stosowana jest w pracach szkoły japońskiej dotyczących fizjologii komórki. Najczęściej używanym gatunkiem jest *Chlorella ellipsoidea*.

Podobne prace prowadzone są w Niemczech przez Lorenzena i współpracowników w oparciu o hodowlę *Chlorella pyrenoidosa* Chick.

W pracowniach japońskich hodowlę prowadzi się w płaskich butlach z żywicy akrylowej, o świetle 2,8 cm i pojemności 600 ml. Napełnia się je 500 ml pożywki o pH 5,2, zawierającej zarówno pierwiastki podstawowe (K, N, P, S, Mg), jak i śladowe. Naczynie z chlorellą umieszcza się w termostacie wodnym z jedną ścianą szklaną i oświetla z zewnątrz. Światło pada prostopadle do płaskiej powierzchni butli. Oświetlenie, zależnie od potrzeb, wynosi 800—15000 lx, a temperatura 16—25°C. Do kultury doprowadzane jest stale powietrze wzbogacone dwutlenkiem węgla do 5%. Szybkość przepływu wynosi 200—300 ml/min, przez co uzyskuje się nie tylko przewietrzanie hodowli, ale również ciągłe mieszanie zawiesiny komórkowej. Gęstość populacji utrzymywana jest poniżej 0,1 ml zwartej objętości komórek na litr hodowli, a pożywka jest codziennie odświeżana.

Lorenzen i współpracownicy używają do hodowli rur ze szkła jenajskiego o pojemności 300 ml, ustawionych na obwodzie koła, którego środek stanowią lampy jarzeniowe. Oświetlenie wynosi 9000 lx, a temperatura 22 lub 30°C. Powietrze przepływające przez kultury wzbogacone jest CO₂ do 1,5%. Zawiesinę glonów rozcieńcza się pożywką na początku każdego okresu świetlnego do stężenia $1,56 \times 10^6$ komórek w ml.

Wzrost kultury charakteryzowany jest przez następujące pomiary:

1. Liczba komórek w litrze — liczona w komorze Thoma.
2. Objętość zwartych komórek.
3. Średnia objętość komórki — iloraz objętości zwartych komórek przez liczbę komórek.
4. Procent komórek ciemnych i jasnych.
5. Względna szybkość wzrostu — liczona według wzoru:

$$K_g = \frac{1}{t_2 - t_1} \lg \frac{V_2}{V_1}$$

gdzie V = objętość zwartych komórek; t = czas w dniach.

6. n = liczba komórek ciemnych wytworzonych w formie autospor przez jedną komórkę jasną. Wylicza się ją ze stosunku przyrostu liczby komórek ciemnych do zmniejszenia się liczby komórek jasnych $\left(n = \frac{dD}{dL} \right)$.

W hodowlach prowadzonych przy stałym i umiarkowanym oświetleniu znajduje się 40—80% komórek ciemnych (więcej przy słabym oświetleniu). Pozostały procent stanowią komórki jasne. Stosując frakcjonowane wirowanie można uzyskać materiał złożony prawie całkowicie z jednego tylko rodzaju komórek.

Badania mikroskopowe wykazały, że wśród komórek jasnych można wyróżnić dwie grupy:

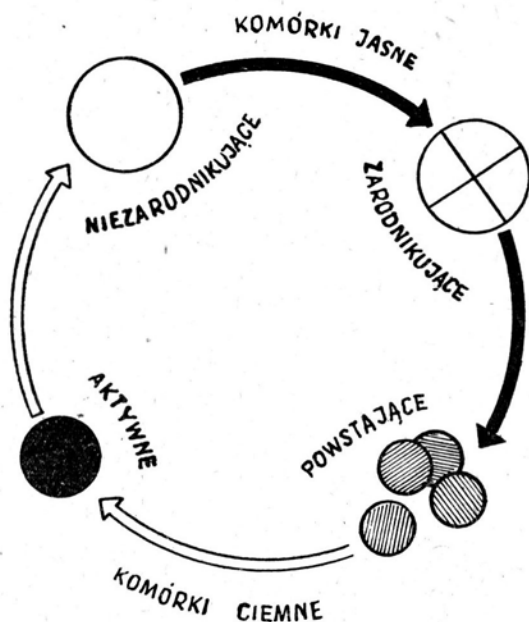
1. «niezarodnikujące», o jednolitej budowie wewnętrznej;
2. «zarodnikujące», które wykazują przy barwieniu zwiększoną zawartość substancji jądrowej.

Grupy te nie dają się rozdzielić wirowaniem.

Podobnie wśród komórek ciemnych wyróżniono:

1. «powstające» komórki ciemne — Dn;
2. «aktywne» komórki ciemne — Da, o wyższej od poprzednich aktywności fotosyntetycznej.

Wobec tego schemat cyklu życiowego *Chlorella* przyjął nową postać (Rys. 1).



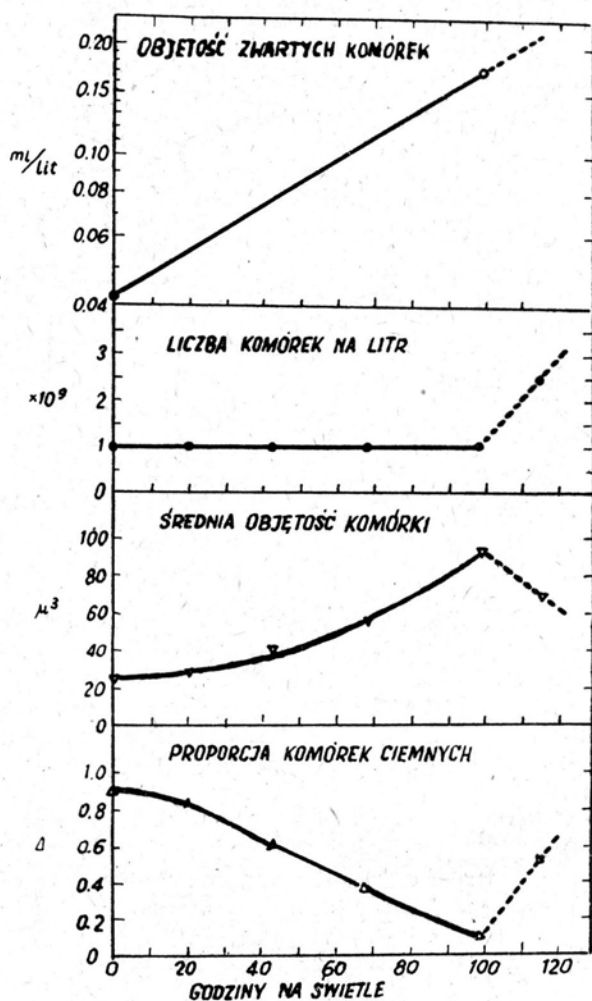
Rys. 1. Schemat cyklu rozwojowego komórek *Chlorella*. Białe strzałki wskazują procesy zachodzące na świetle, czarne — niezależne od światła. Średnica kółek odpowiada wielkości komórek, a stopień zaczerwienienia — ich aktywności fotosyntetycznej (Tamiya i wsp. 1953)

Uzyskiwanie komórek ciemnych. Komórki Dn uzyskuje się prowadząc hodowlę przez kilka dni w świetle silnym, a następnie w słabym. Iwamura (1955) stosując oświetlenie 10000 lx przez kilka dni i 800 lx przez 10 dni otrzymał populację złożoną w 90% z komórek ciemnych. Podobne wyniki można uzyskać przenosząc hodowlę zawierającą zarodnikujące komórki jasne do ciemności. Po upływie 10—20 godz. niemal wszystkie komórki jasne dzielą się na komórki Dn. Przy inkubacji na świetle stadium Dn trwa bardzo krótko; komórki te mogą wzrastać nawet w macierzystych komórkach jasnych i uwalniać się z nich jako Da — aktywne komórki ciemne.

Komórki Da można uzyskać z komórek Dn po kilkugodzinnym oświetleniu 150 lx, przy temperaturze 25°C.

Przekształcanie komórek ciemnych w jasne. Proces ten zachodzi tylko na świetle; jego prędkość zależy tak od siły światła, jak i od temperatury. Przy oświetleniu 20000 lx w temperaturze 10°C czas dzielący stadium powstających

komórek ciemnych od stadium dzielących się komórek jasnych wynosi 100 godz. (Tamiya, 1953). Przy oświetleniu 15000 lx i temperaturze 16°C — 25—45 godz. (Iwamura, 1955; Nihei, 1954). Przy oświetleniu 9000 lx i temperaturze 22°C — 20 godz. (Lorenzen, 1957). Podczas procesu przekształcania się komórek ciemnych

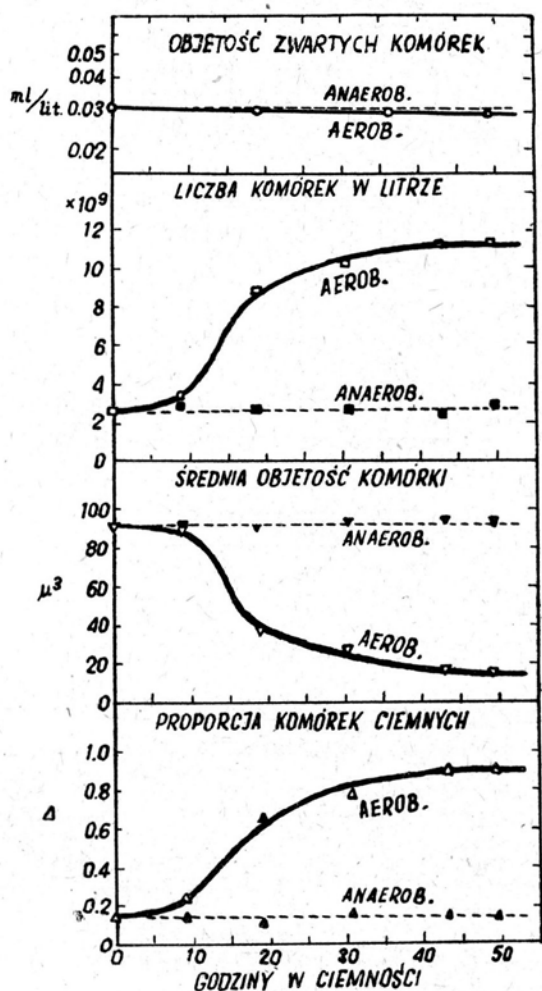


Rys. 2. Zmiany zwartej objętości komórek, liczby komórek i średniej objętości komórki w czasie przekształcania komórek ciemnych w jasne (Tamiya i wsp. 1953)

w jasne liczba ich nie ulega zmianie. Znacznie wzrasta natomiast średnia objętość komórki i objętość zwartych komórek (Rys. 2).

Przekształcanie komórek jasnych w ciemne. Komórki jasne ulegają podziałowi niezależnie od światła. Po 50 godz. inkubacji w temperaturze 10°C w ciemności komórki ciemne stanowią 90% ogólnej liczby komórek. W tym czasie

wzrasta liczba komórek i procent komórek ciemnych, a objętość zwartych komórek jest stała lub nieznacznie malejąca skutkiem procesu oddychania. Równocześnie zmniejsza się średnia objętość komórki. Po przeniesieniu hodowli do warunków anaerobowych powyższe procesy ustają (Rys. 3).



Rys. 3. Zmiany zwartej objętości komórek, średniej objętości komórki oraz procentu komórek ciemnych w czasie przekształcania komórek jasnych w ciemne w warunkach aerobowych i anaerobowych (Tamiya i wsp. 1953).

Lorenzen (1960) uzyskał synchroniczne hodowle *Chlorella pyrenoidosa* przez zastosowanie rytmicznych zmian światła i ciemności. Po przebadaniu licznych kombinacji czasów naświetlenia i zaciemnienia stwierdził, że najbardziej jednolitą synchronizację uzyskuje się rytmem 16 godz. światła i 12 godz. ciemności, przy oświetleniu 9000 lx i temperaturze 30°C. Dane te potwierdzili Pirson i Senger

(1961), dodając, że przy obniżeniu temperatury do 20°C lub oświetlenia do 5000 lx w populacji pozostaje grupa komórek nie dzielących się. Ich cykl rozwojowy jest opóźniony o jeden okres. Podobne zaburzenie synchronizacji następuje przy skróconym czasie naświetlania. Również w hodowlach stale zagęszczających się (skutkiem przyrostu komórek) synchronizacja ulega stopniowemu rozchwianiu. Rozcieńczanie hodowli pożywką zapobiega temu nie zmieniając rytmiki podziałów (Lorenzen, 1957).

Iwamura (1955) zbadal zdolność komórek jasnych do podziału w ciemności zależnie od czasu poprzedniego naświetlania. Według jego obserwacji komórki D i D—L nie są zdolne do podziału, natomiast komórki L dzielą się w różnym stopniu. Przy dłuższym wstępnym naświetlaniu wzrasta procent komórek zdolnych do podziału w ciemności oraz średnia liczba autospor powstających z jednej komórki macierzystej. Dane liczbowe zawarte są w tabeli I.

TABELA I

Zdolność komórek jasnych do podziału w ciemności (wg Iwamura 1955)

Wiek komórek jasnych wzrastających na świetle	Procent komórek jasnych zdolnych do podziału w ciemności	Wartość $n = \frac{dD}{dL}$
34 godz.	32%	1,30
39 godz.	74%	4,66
42—45 godz.	82%	5,07

Na podstawie powyższych danych wyróżniono w rozwoju komórek jasnych trzy stadia, oznaczając je odpowiednio symbolami: L₁, L₂, L₃.

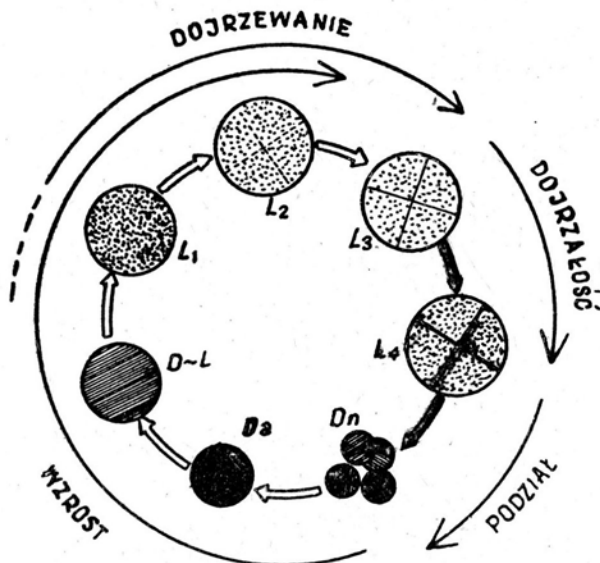
Hase i Morimura (1957) wyodrębnili czwarte stadium, nazywając je L₄. Są to komórki zbudowane z pewnej liczby komórek ciemnych, objętych jeszcze wspólną błoną komórki macierzystej.

W rezultacie szkoła japońska ustaliła siedem stadiów cyklu rozwojowego komórek *Chlorella* (Rys. 4):

1. powstające komórki ciemne (Dn) — komórki młode, świeżo wytworzone z macierzystych komórek jasnych,
2. aktywne komórki ciemne (Da) — bogatsze w chlorofil i aktywniejsze fotosyntetycznie,
3. komórki w stadium przejściowym (D—L) między komórkami ciemnymi a jasnymi,
4. niedojrzałe komórki jasne (L₁), które mają większą od poprzednich objętość, lecz nie są jeszcze zdolne do podziału w ciemności,
5. pół-dojrzałe komórki jasne (L₂) — w ciemności dzielą się tylko częściowo,
6. dojrzałe komórki jasne (L₃) — zdolne do całkowitego podziału w ciemności,
7. komórki w stadium bezpośrednio poprzedzającym podział (L₄).

Wyróżniono też fazy cyklu:

- I. faza wzrostu, charakteryzująca się przyrostem masy komórkowej,
- II. faza dojrzewania, w której zachodzą reakcje syntezy przygotowujące komórki do podziału,
- III. faza dojrzałości, prowadząca do całkowitej dojrzałości komórek,
- IV. faza podziału.

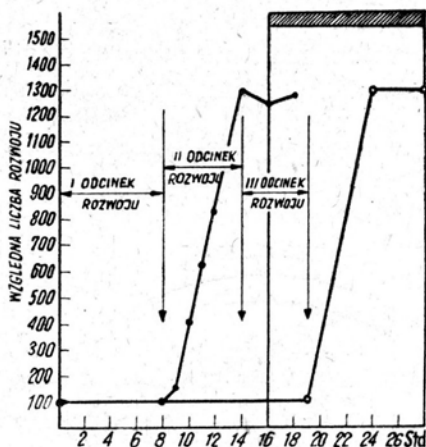


Rys. 4. Schemat cyklu rozwojowego *Chlorella*. Objasnienia w tekście (Morimura 1959)

Również Lorenzen (1960) badał zdolność komórek jasnych do podziału w ciemności. Stwierdził, że 8 godz. wstępnego naświetlania nie wywołuje podziału w ciemności. Okres ten nazywa «pierwszym odcinkiem rozwojowym». Po 9–14 godz. naświetlania liczba wytwarzanych autospor wzrasta liniowo zależnie od długości okresu światła («drugi odcinek rozwojowy»). Do spowodowania podziału w ciemności wszystkich komórek hodowli wystarcza 12 godz. naświetlania. «Trzeci odcinek rozwojowy» zaczyna się od 14 godz. naświetlania. W tym odcinku liczba autospor nie zmienia się pomimo dalszego przedłużania inkubacji na świetle (Rys. 5).

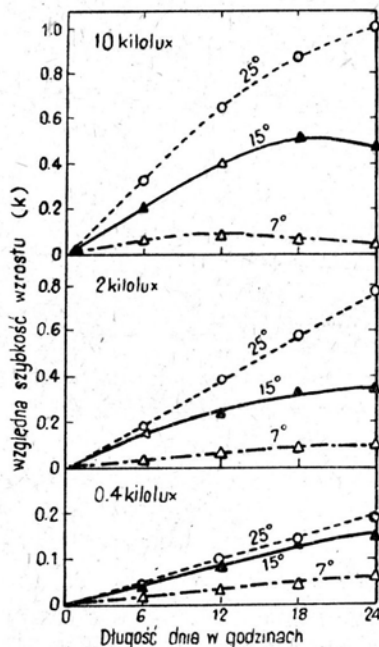
Zależność szybkości wzrostu od temperatury, oświetlenia i czasu naświetlania. Badania przeprowadził Tamiya w latach 1953 i 1955. Obserwował szybkość wzrostu przy stałym i zmiennym czasie naświetlania, wynoszącym 6, 12 i 18 godz. na dobę. Zastosował oświetlenie 50000, 10000, 2000 i 400 lx oraz temperaturę 7°C, 15°C i 25°C. W każdym układzie warunków hodowla prowadzona była 10–14 dni. Pomiary względnej szybkości wzrostu rozpoczynano po 7 dniach, gdy populacja osiągnęła stan równowagi (tzn. stałą szybkość wzrostu i stały stosunek komórek ciemnych do jasnych). W wyniku obserwacji stwierdzono:

1. światło może być czynnikiem ograniczającym wzrost masy komórkowej



Rys. 5. Wpływ czasu naświetlania na zdolność komórek *Chlorella pyrenoidosa* do podziału w ciemności. Kółka wskazują przebieg zmiany liczby komórek w normalnej hodowli, punkty — ostateczne liczby komórek w próbkach pobranych w danym czasie, liczone po 24 godz. zaciemnienia (Lorenzen i Ruppel 1960)

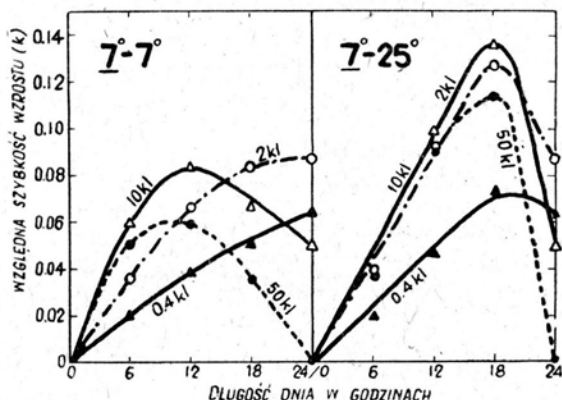
i fotosyntezę, zależących od niego liniowo, jeżeli oświetlenie jest słabe, czas naświetlania krótki, a temperatura wysoka (Rys. 6). Szybkości wzrostu i fotosyntezy są wtedy zgodne;



Rys. 6. Zależność szybkości wzrostu od długości dnia i temperatury przy różnych oświetleniach (Tamiya i wsp. 1955)

2. w warunkach nasycenia światłem szybkość fotosyntezy i wzrostu zależy od temperatury, przy czym wzrost jest wolniejszy niż fotosynteza i mniej zależy od temperatury;

3. przy silnym oświetleniu, długim dniu i niskich temperaturach występuje wzrost «przesycony przez dzień». Szybkość wzrostu maleje, komórki bledną całkowicie (nawet giną), a komórki jasne nie ulegają podziałom. Objawy te ustępują, jeżeli podwyższona zostanie temperatura nocy (Rys. 7).



Rys. 7. Zależność szybkości wzrostu od długości dnia i intensywności oświetlenia w różnych temperaturach nocy przy tej samej temperaturze dnia (Tamiya i wsp. 1955)

W wysokich temperaturach szybciej przebiega faza niezależna od światła (podziału), w niskich — fazy zależne (wzrostu i dojrzewania). Dlatego komórki jasne gromadzą się w hodowli w tym większym procencie, im silniejsze jest oświetlenie i niższa temperatura.

Jak wynika z powyższych badań, stosując różne metody (frakcjonowane wirowanie, zmiany rytmu naświetlania itp.) można uzyskać populacje, w których komórki jednocześnie przechodzą przez omówione stadia rozwojowe (tzw. hodowle synchroniczne). Pozwala to uzyskać odpowiednią ilość materiału doświadczalnego do badań metabolizmu komórki w poszczególnych stadiach cyklu rozwojowego.

Zależność zawartości witamin w komórkach *Chlorella* od ich stadium rozwojowego

W związku z projektami zużytkowania glonów jako pożywienia lub paszy zbadano (Morimura 1959) zawartość różnych witamin w suchej masie komórek w kolejnych stadiach rozwojowych. Stosując chemiczne i mikrobiologiczne metody analizy stwierdzono, że (Rys. 8):

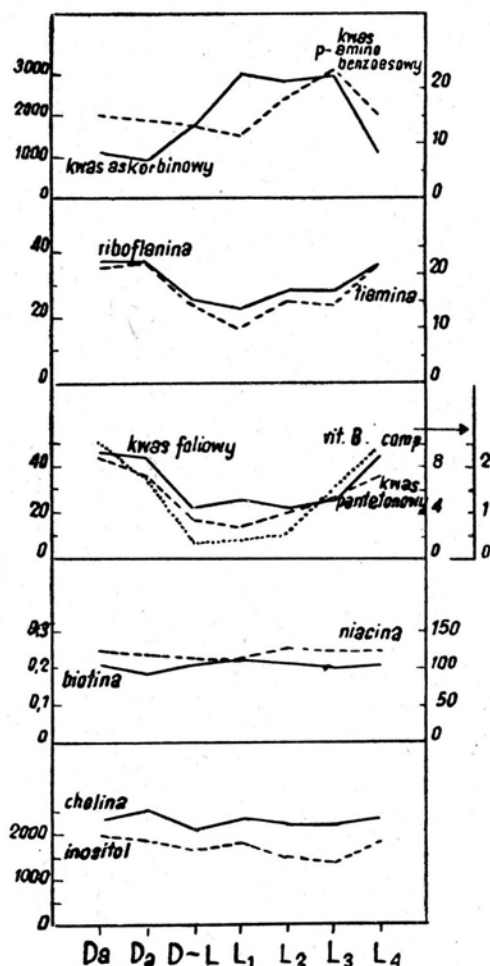
1. ilość niacyny, biotyny, inozytolu i choliny nie zmienia się w czasie cyklu — są one wytwarzane równolegle z przyrostem masy komórkowej;

2. kompleks witamin B₆, kwas pantotenowy, kwas foliowy, tiamina i ryboflawina występują w mniejszych ilościach w komórkach Da i w początkowych

stadiach komórek L — wytwarzanie ich związane jest z procesem dojrzewania;

3. kwas p-aminobenzoowy powstaje w większych ilościach w stadiach L_1 do L_3 ;

4. zawartość kwasu askorbinowego zwiększa się w komórkach od stadium Da i osiąga maksimum w stadiach L_1 do L_3 . W okresie dojrzewania i podziału (stadia L_4 i Dn) ilość jego znacznie maleje.



Rys. 8. Zmiany zawartości różnych witamin w cyklu rozwojowym komórek *Chlorella*

Ciekawe jest, że kwas p-aminobenzoowy i kwas foliowy, biorące udział w syntezie puryn i pirymidyn, tworzą się głównie w procesie dojrzewania. Podobnie kompleks witamin B₆ działający w metabolizmie aminokwasów.

Dane liczbowe (w mikrogramach na gram suchej masy) dotyczące ogólnej zawartości witamin w komórkach *Chlorella* podane są w tabeli II.

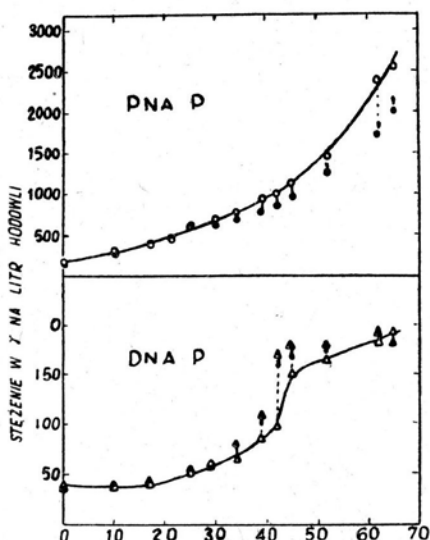
TABELA II

Zawartość witamin w komórkach *Chlorella ellipsoidea* (wg Morimura 1959)

Witamina	$\mu\text{g/g}$	Witamina	$\mu\text{g/g}$
Biotyna	0,19— 0,23	Niacyna	122— 125
Kw. pantotenowy	3,50— 8,60	Kw. askorbinowy	1000—3200
Tiamina	10,0 —23,0	Inozytol	1600—2100
Kw. p-aminobenzoesowy	12,0 —24,0	Cholina	2200—2500
Ryboflawina	23,0 —27,0		
Związki kwasu foliowego	22,0 —47,0		

Zmiany zawartości kwasu rybonukleinowego i dezoksyrybonukleinowego*

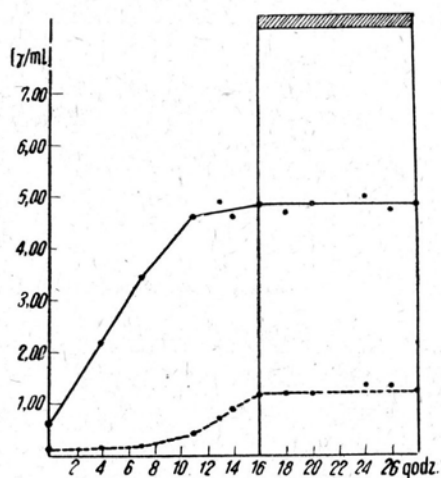
Zagadnieniem tym zajmowali się Iwamura i Lorenzen. Pierwszy z nich (1955) podaje, że stężenie kwasu rybonukleinowego w litrze hodowli wzrasta równoległe z przyrostem zwartej masy komórkowej. Na tej podstawie można twierdzić, że RNA wytwarzany jest, podobnie jak białko, prawie natychmiast po fotosyntezie (Rys. 9). Wyniki badań Lorenzena (1960) różnią się nieco od wyników Iwamura. Stwierdza on stały wzrost zawartości RNA tylko w czasie 10—12-tu początkowych



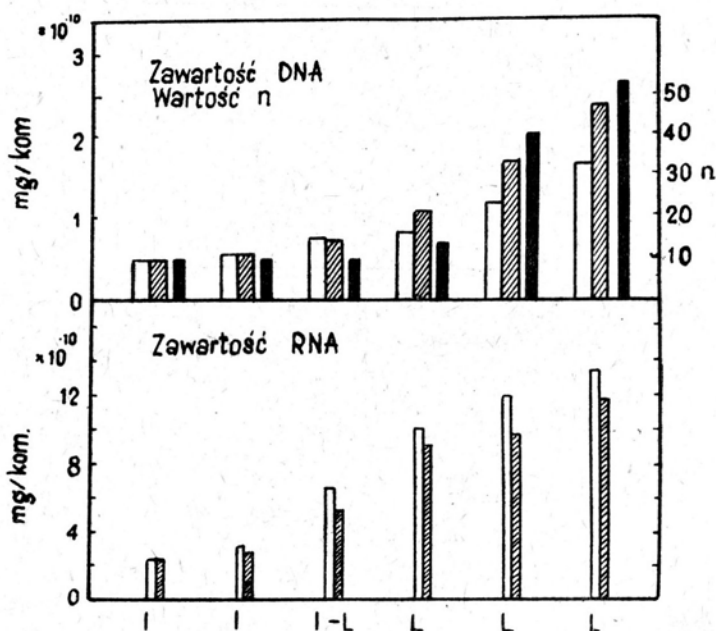
Rys. 9. Zmiany ilości RNA i DNA w cyklu *Chlorella ellipsoidea*. Otwarte koła i trójkąty przedstawiają wartości uzyskane z hodowli na świetle, pełne — po przeniesieniu kultury w odpowiednim stadium do ciemności (Iwamura 1955)

* Badania szkoły japońskiej dotyczące fotosyntezy, asymilacji azotu i zawartości kwasów nukleinowych w cyklu życiowym *Chlorella* omówione zostały dokładniej w «Cykl Tamiya» J. Zurzyckiego (1958).

godzin naświetlania (odpowiada to w przybliżeniu stadiom Da do L₂—L₃). Przy dalszym naświetlaniu zawartość tego związku utrzymuje się na stałym poziomie (Rys. 10). Wyniki obu autorów są jednak mało porównywalne, z uwagi na użycie przez nich różnych gatunków *Chlorella* i stosowanie odmiennych metod synchronizacji.



Rys. 10. RNA (—) i DNA (---) w γ /ml zawiesiny komórkowej w całkowicie synchronicznej hodowli *Chlorella pyrenoidosa* (Lorenzen i Ruppel 1960)

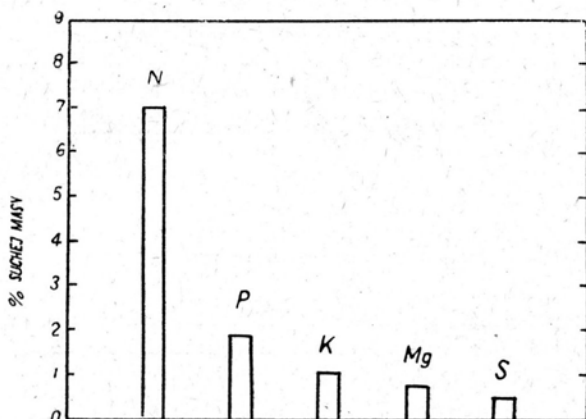


Rys. 11. Ilość DNA zawartego w komórce oraz średnia liczba autospor — n (paski czarne) wytworzonych w ciemności w różnych stadiach rozwoju komórek. Paski białe i kreskowane przedstawiają odpowiednie wartości uzyskane przed i po inkubacji w ciemności. n = 1 oznacza, że komórki nie dzielą się (Iwamura i wsp. 1955)

Dane dotyczące zmian zawartości kwasu dezoksyrybonukleinowego są u obu autorów zgodne. Stężenie DNA w jednostce objętości zawiesiny komórkowej wykazuje niewielki wzrost w fazie początkowej (Da do L₂—L₃) i znaczny, szybki przyrost w okresie wytwarzania autospor (Rys. 9 i 10). Obaj autorzy stwierdzili również, że zawartość DNA w komórkach zdolnych do podziału jest proporcjonalna do liczby wytworzonych przez nie autospor (Rys. 11).

Zawartość różnych pierwiastków w komórkach *Chlorella* i objawy ich niedoboru w pożywce

Zagadnienie to opracowywał Hase z współpracownikami (1957) oraz, w pewnym stopniu Lorenzen (1957). Zawartość podstawowych pierwiastków w odniesieniu do suchej masy komórek obrazuje Rys. 12.



Rys. 12. Procentowa zawartość niektórych pierwiastków w suchej masie komórek (Hase i wsp. 1957)

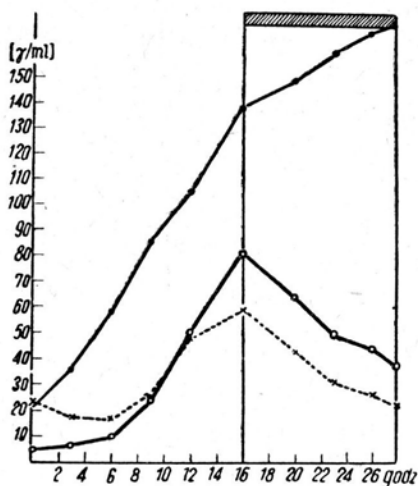
Azot. Procent azotu w suchej masie komórek, oraz stosunek azotu całkowitego do azotu białkowego nie ulega zmianom ani na świetle, ani pod wpływem inkubacji w ciemności. Zawartość białka jest również prawie niezmienna. Stwierdzono, że asymilacja azotu i synteza białka dokonywane są bezpośrednio po fotosyntezie pierwotnej, równoległe ze wzrostem masy komórkowej (Rys. 13).

Przy wyłączeniu azotu z pożywki, komórki rozwijają się normalnie tylko w czasie pierwszych dziesięciu godzin naświetlania. Później ujawnia się ujemny wpływ niedoboru tego pierwiastka. Komórki nie osiągają właściwych rozmiarów. Średnia liczba wytworzonych przez nie autospor (*n*) jest mniejsza i wynosi 2,4 (w kontroli 6—6,5). Wytworzone autospory są mniejsze, etiolowane i niezdolne do wzrostu i następnego podziału. Po dodaniu azotu do pożywki wzrost i rozwój komórek wraca do normy.

Fosfor. Zawarty jest w komórkach w mniejszym procencie niż azot. Ilość jego zmniejsza się w stadiach Da i D—L, a wzrasta w stadiach L₁ i L₂. Przy braku

fosforu w środowisku, podobnie jak przy braku azotu, komórki są mniejsze, a średnia liczba autospor (n) wynosi 3,5. Potomne komórki D są wprawdzie normalnej wielkości i barwy, lecz nie są zdolne do wzrostu i następnego podziału.

Potas. Przy braku tego pierwiastka przekształcanie komórek D w L jest zwolnione. Komórki zaczynają się dzielić wcześniej od kontrolnych, nie osiągnąwszy normalnej wielkości. Podział ten nie jest jednoczesny. Liczba autospor jest nieco mniejsza, wzrastają one słabo i nie dzielą się.



Rys. 13. Zmiany w zawartości białka w synchronicznej hodowli *Chlorella pyrenoidosa* przy rytmie światło—ciemność 16 : 12, 30°C, 9000 lx (Lorenzen i Ruppel 1960)

Magnez. Przekształcanie komórek D w L, w środowisku pozbawionym magnezu, zachodzi normalnie. Podziały komórkowe są nieco opóźnione, lecz liczba autospor jest taka, jak w próbie kontrolnej. Komórki potomne są normalnej wielkości, jednak silnie etiolowane i niezdolne do następnego podziału. Dane te potwierdził Lorenzen (1957) dodając jednocześnie, że brak magnezu nie narusza synchronizacji — po dodaniu brakujących jonów podziały zachodzą rytmicznie.

Ogólnie daje się zauważyć, że objawy niedoboru któregoś z omówionych wyżej pierwiastków są tym wyraźniejsze, im więcej go wchodzi w skład normalnych komórek.

Siarka nie podlega podanej prawidłowości. Występuje ona w komórkach w ilości niewielkiej, bo około 0,5% suchej masy. W przebiegu cyklu rozwojowego komórek obserwuje się powolny wzrost jej procentu w stadiach L_2 i L_3 i nagły w stadium L_4 . Przyrost procentu siarki przy przejściu komórek L_3 w L_4 wskazuje, że asymilacja tego pierwiastka następuje późno po fotosyntezie i związana jest z podziałem komórki. Obserwacje hodowli prowadzonych na pożywkach bezsiarkowych potwierdzają to przypuszczenie. Przy braku siarki komórki dorastają jedynie do wczesnego stadium L nie osiągając zdolności do podziału.

Związki siarki występujące w komórkach *Chlorella* i ich losy w przebiegu cyklu rozwojowego były przedmiotem dokładniejszych badań. Ze względu na ich szczególnie charakter zostaną omówione w następnym artykule.

LITERATURA

- Hase E., Morimura Y., Tamiya H., 1957: Some data of the growth physiology of *Chlorella* studied by the synchronous culture. Arch. Biochem. Biophys. 69, p. 149—156.
- Iwamura T., 1955: Change of nucleic acid content in *Chlorella* cells during the course of their life-cycle. Journ. Biochem. 42, 5, p. 575—589.
- Iwamura T., Hase E., Morimura Y., Tamiya H., 1955: Life cycle of the green alga *Chlorella* with special reference to the protein and nucleic acids contents of cells in successive formative stages. Ann. Acad. Scient. Fennicae Ser. A, 2, 60, p. 89—103.
- Lorenzen H., 1957: Synchrone Zellteilungen von *Chlorella* bei verschieden Licht—Dunkel—Wechseln. Flora 144, 4, p. 477—496.
- Lorenzen H., Ruppel H. G., 1960: Versuche zur Gliederung des Entwicklungsverlaufs der *Chlorella* — Zelle. Planta 54, p. 394—403.
- Morimura Y., 1959: Synchronous culture of *Chlorella*. I Kinetic analysis of the life cycle of *Chlorella* ellipsoidea as affected by changes of temperature and light intensity. Plant and Cell Physiol. 1, p. 49—62.
- Morimura Y., 1959: Synchronous culture of *Chlorella*. II Changes in content of various vitamins during the course of the algal life cycle. Plant and Cell Physiol. 1, p. 63—69.
- Nihei T., Sasa T., Miyachi S., Suzuki K., Tamiya H., 1954: Change of photosynthetic activity of *Chlorella* cells during the course of their normal life cycle. Archiv f. Microbiol. 21, p. 156—166.
- Pirson A., Senger H., 1961: Synchronisations-typen bei *Chlorella* im Licht—Dunkel—Wechseln. Naturwissensch. 48, 3, p. 81.
- Tamiya H., Iwamura T., Shibata K., Hase E., Nihei T., 1953: Correlation between photosynthesis and light independent metabolism in the growth of *Chlorella*. Biochim. Biophys. Acta, 12, 1/2, p. 23—40.
- Tamiya H., Sasa T., Nihei T., Ishibashi S., 1955: Effect of variation of day length, day and night temperatures and intensity of day light upon the growth of *Chlorella*. J. Gen. Appl. Microbiol., 4, p. 298—307.
- Zurzycki J., 1958: Cykl Tamiya. Wiad. Bot. 2, 1, p. 3—13.