

МАТЕРИАЛЫ
УП ВСЕСОЮЗНОГО РАБОЧЕГО
СОВЕЩАНИЯ
ПО ВОПРОСУ
КРУГОВОРОТА ВЕЩЕСТВ
В ЗАМКНУТОЙ СИСТЕМЕ
НА ОСНОВЕ
ЖИЗНЕДЕЯТЕЛЬНОСТИ
НИЗШИХ
ОРГАНИЗМОВ

Изд-во "Наукова думка", Киев-1972 г.

газоанализаторы, сигналы которых регистрируются самописцами 16 и 17.

Газообмен суспензии при работе с замкнутым газовым контуром рассчитывается исходя из изменения парциального давления кислорода и процентного содержания углекислоты в известном объеме. Газоанализаторы имеют шкалы в 1%, от 0 до 1% по углекислоте и от 20 до 21% по кислороду.

Использование режима работы с накоплением сигнала расширяет возможности установки и позволяет не только измерять величину фотосинтеза и снимать световые кривые, но и изучать процессы дыхания и ассимиляции CO_2 при различных параметрах культивирования.

МАССОВОЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ОДНОКЛЕТОЧНОЙ ВОДОРОСЛИ *CHLORELLA В D₂O*

Л.П.Кавшин, В.П.Кутышенко, А.В.Лазарева, М.С.Скоп,
В.Е.Семенов, Л.А.Сибельдина, Л.И.Поглин, Л.Н.Чекулаева

Спектроскопия ядерного магнитного резонанса (ЯМР) является обещающим подходом при исследовании структуры и комплексообразования белка в растворе. Однако анализ сложного неразрешенного спектра ЯМР протонированного белка сопряжен с большими трудностями. Эффективный способ упростить спектр — заменить определенную часть протонов белковой цепи на дейтерий, резонансная частота которого отличается от резонансной частоты протона. Биосинтез таких селективно дейтерированных белков был проведен в последние годы (1968–1970 гг) только в двух лабораториях мира. В США Марли, Патер и Жардецкий применили следующий метод дейтерирования стафилококковой нуклеазы. Из водоросли, культивированной в D_2O , они выделили полностью дейтерированные белки, которые гидролизовали для получения дейтерированных аминокислот. Затем на синтетической среде, составленной из смеси дейтерированных и протонированных аминокислот, растили стафилококки, из которых выделяли изотопно-замещенный белок.

Н.Л.Красни и Д.Д.Катц культивировали водоросли в D_2O с экзогенными N -аминокислотами и выделяли из них цитохром C , ферридоксин и флавопротеид, полностью дейтерированный, за исключением остатков лейцина, фенилаланина и тирозина.

Изучение спектров ЯМР ряда таких аналогов белка позволяет проанализировать весь спектр ЯМР белка и извлечь из него детальную информацию о конформации, структуре комплексов белка с ингибиторами, субстратами и т.д.

В обоих приведенных случаях избирательного дейтерирования белков было необходимо культивирование одноклеточной водоросли в D_2O . Для получения избирательно дейтерированных белков нами проведена адаптация зеленой водоросли как источника питания микроорганизмов.

В ы б о р ш т а м м а. В настоящее время известно несколько видов зеленых и синезеленых водорослей, способных жить в D_2O при 99,7% обогащения среды дейтерием. Для массового культивирования на тяжелой воде нами был выбран штамм *Chl. Sp.-K*. Штамм хорошо изучен, обладает высокой продуктивностью и довольно большим содержанием белков. Он характеризуется широким температурным и световым оптимумом и высокой устойчивостью к бактериальному заражению.

С х е м а у с т а н о в к и. Адаптация проводилась на среде Тамия с нитратным азотом в малых культуральных сосудах при освещении люминесцентными лампами. Чтобы избежать необходимости осушки газовой смеси, нами был применен замкнутый газовый контур с периодической подпиткой углекислотой (рис.1). Газовая смесь прокачивалась насосом через добавочную емкость и культуральный сосуд. Добавочная емкость позволяла увеличить запас углекислоты для непрерывной работы установки в течение суток. Раз в сутки проводилась продувка емкости смесью азота (93%) и углекислоты (7%). Одновременно продувка исключала возможность накопления выделяющегося кислорода.

А д а п т а ц и я в о д о р о с л и. Как показано в ряде работ Кресни и Катца, Черни и др., адаптация водорослей к D_2O происходит довольно медленно. Во избежание бактериального заражения в период до начала активного роста культуры все элементы схемы тщательно стерилизовались. Продувка газа проводилась через ватные фильтры. Соли для приготовления питательной среды облучали ультрафиолетом и D_2O кипятили в течение 10-20 мин. Питательная среда фильтровалась через бактериальный фильтр. В дальнейшем питательная среда стерилизовалась кипячением с обратным холодильником и ватным фильтром в течение 40 мин.

Адаптация велась ступенчатым повышением концентрации D_2O в питательной среде, начиная с 75%, затем до 93% и далее параллельно в трех разных концентрациях D_2O в питательной среде: 95, 97 и 98,5%. На рис.2 иллюстрирован процесс адаптации *Chl. Sp. - K* к D_2O . Повышение концентрации D_2O приводило к повторению адаптационных эффектов, наблюдавшихся при 75% D_2O .

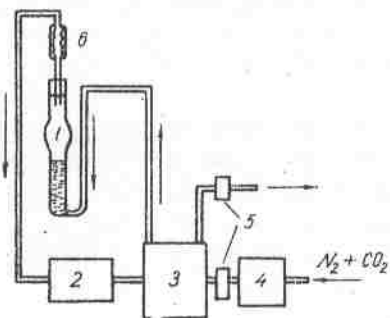


Рис.1. Схема установки для адаптации *Chl. Sp.-K*:

1 - маленький культуральный сосуд; 2 - циркуляционный насос; 3 - добавочная емкость; 4 - ватный фильтр; 5 - краны продувки; 6 - обратный колодильник.

Морфологические изменения клеток при адаптации. При 75% D_2O уже через несколько часов начинается укрупнение клеток и они приобретают резко выраженную зернистую структуру. Через 30-36 час размер клеток увеличивается в 2-3 раза и примерно к этому времени появляются первые делящиеся клетки. В активно растущей суспензии средний размер клеток возвращается к норме и значительно снижается зернистость. Среднее значение размеров клеток повышается с $3,75 \mu$ в H_2O до $4,15 \mu$ в D_2O .

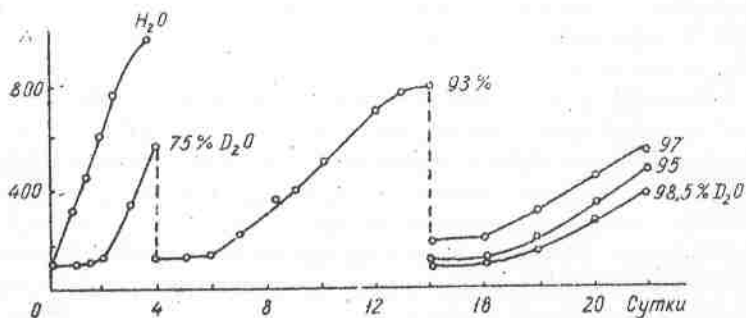


Рис.2. Процесс адаптации *Chl. Sp - K* в D_2O

Особенности роста водоросли на D_2O . При повышении концентрации прирост количества клеток в сутки в период активного роста снижается, уменьшение же скорости прироста биомассы незначительно, так как клетки имеют больший объем.

Массовое культивирование. При переходе к массовому культивированию адаптированная культура сразу начинает активно делиться и не наблюдается процессов замедления роста, характерных для периода адаптации. Допустимо использование питательной среды один раз без коррекции содержания основных элементов и второй раз при добавлении до нормы нитратов и фосфатов.

РЕЖИМ ПИТАНИЯ ХЛОРЕЛЛЫ МИКРОЭЛЕМЕНТАМИ В УСТАНОВКАХ ДЛЯ НЕПРЕРЫВНОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

И.В. Грибовская

Для регенерации газа в условиях биологических систем жизнеобеспечения, рассчитанных на одного человека, требуется ежесуточное синтезирование 400 г и более сухой биомассы хлореллы. Непрерывное стабильное продуцирование столь значительных урожаев водорослей требует применения культиваторов сложных конструкций, которые сами могут быть источниками микроэлементов. В связи с этим особенность минерального питания водорослей в таких установках требует количественной оценки дополнительного снабжения клеток микроэлементами.

Нами был использован культиватор Б.Г.Коврова и А.Г.Буданова (1964), работавший в режиме плотностата. В состав его конструкции входили наиболее часто применяемые экспериментаторами материалы — оргстекло А-90, сталь Х18Н10Т, дюраль Д16Т и красные медицинские резиновые шланги с внешним диаметром 1,1 см и внутренним 0,8 см. Перечисленные материалы в большей или меньшей степени обладали способностью к выделению в окружающую водную среду растворимых микроэлементов.

Спектральный анализ биомассы хлореллы, выращенной в присутствии каждого из названных материалов, показал, что из стали в