

# クロレラの培養ならびに無機養分 要求性について\*

河崎利夫・堀 士郎\*\*・鬼頭俊而\*\*・森次益三

クロレラは単細胞の緑藻であって、その生育速度の大きいこと、光合成作用を営むことなどの理由によって、古くから、細胞の増殖あるいは光合成機作に関する研究の材料としてよく用いられてきた。従来、これらの研究に使用されたクロレラ培養液は、その大部分が硝酸塩を窒素源とするものであった。しかし、植物の無機栄養状態の変化に関連した研究では、培養液の無機養分濃度を変動させる必要の生ずることが多く、そのような研究の材料としてクロレラを用いる場合には、硝酸塩を窒素源とする培養液が必ずしも適当であるとは言えない。そのため、窒素源として尿素を用いる培養液について検討を加えることとした。

尿素を窒素源とするクロレラ培養液は、すでに Walker (19, 20) によって用いられたが、尿素を用いた培養液によるクロレラの培養についての詳細な報告は少なく、また、尿素を窒素源とする培養液に生育したクロレラの生理的特性についての報告はほとんど見られない。したがって、本報文では、窒素源として硝酸塩を用いた培養液と、窒素源として尿素を用いた培養液とを対比して、クロレラの生育ならびに生理的特性について検討し、さらにクロレラの無機養分要求性に関して行なった若干の実験結果を併せて報告する。

## 実験方法および結果

### 1. クロレラの生育

#### (a) 実験方法

本報文の全ての実験において、用いた実験材料は *Chlorella ellipsoidea* であった。

硝酸塩を窒素源とする培養液（硝酸塩培養液と略称）あるいは尿素を窒素源とする培養液（尿素培養液と略称）を用いてクロレラを培養し、培養5日後に収穫、脱塩水で2回洗滌した後、乾物重量を測定し、同時に培養液のpHを測定した。クロレラ培養の条件は下記に示す通りであった。

培養管の大きさ：内径 3.5cm, 高さ 20cm

培養液の量：50ml

クロレラ接種量：5mg（乾物相当）

通 気：5%炭酸ガスを含む空気

照 明：約 5000 lux（白色蛍光灯）

温 度：25°C

\* 本報文の内容の一部は、Annual Report of the Radiation Center of Osaka Prefecture, Vol. 7, p. 86—89 (1966) に発表された。

\*\* 大阪府立放射線中央研究所

使用した培養液の組成は第1表に示すようであって、硝酸塩培養液としては、(N-25)、(N-30) および (N-50) の3種類を用いた。(N-25) および (N-50) は、それぞれ、Stauffer の培養液 (18) および Tamiya の培養液 (15) に若干の変更を加えたものであり、(N-30) は、この実験に用いた尿素培養液と窒素量を等しくした硝酸塩培養液である。

### (b) 実験結果

培養前後における培養液の pH およびクロレラ収量を第1表に示した。第1表から、硝酸塩培養液 (N-25)、(N-30) および (N-50) のいずれに比しても、この実験に用いた尿

第1表 クロレラの生育に対する培養液組成の影響

培養液の種類	培養液の組成* (mM)				培養液の pH		クロレラ収量 (mg)
	KNO <sub>3</sub>	CO (NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	MgSO <sub>4</sub>	培養前	
硝酸塩培養液(N-25)	25	19	1	20	5.2	7.2	227
硝酸塩培養液(N-30)	30	9.5	0.5	10	5.3	7.4	229
硝酸塩培養液(N-50)	50	8.7	0.5	9.2	5.3	7.5	251
尿素培養液	15	2	1	2	6.5	5.8	404

\* Fe: 1.0, Ca: 0.5, Zn: 0.1, Mn: 0.1, Cu: 0.02, Mo: 0.01 ppm

素培養液のクロレラ収量は明らかに大きいことが認められた。また培養液の pH は、クロレラの培養中に、硝酸塩培養液ではアルカリ性側へ大きく変動し、尿素培養液では酸性側へ変動した。

## 2. 硝酸塩培養液および尿素培養液に生育したクロレラの生理的特性

### (a) 実験方法

先の実験における硝酸塩培養液 (N-30) および尿素培養液を用いてクロレラを培養、一定期間後に収穫し、脱塩水で2回洗滌したものを材料として、以下の各項目について測定を行なった。特に記述しないかぎり、クロレラの培養期間は5日間であり、培養条件は先の実験の場合と同様であった。

**クロレラの呼吸量** pH 5.0 のリン酸塩緩衝液 (0.05M) にクロレラを懸濁させ、ワールブルグ検圧計を用いて、直接法 (17) により、クロレラの酸素吸収量および炭酸ガス発生量を測定し、呼吸商を算出した。実験温度は 25°C であった。

**クロレラの光合成能** pH 5.2 のリン酸塩緩衝液 (0.02M) にクロレラを懸濁させ、15000 lux の照明下で、放射性炭素で標識した炭酸ナトリウム溶液を添加し、装置内の空気を循環させ、光合成を行なわせた。光合成時に、窒素源として尿素の共存する場合と共存しない場合の2つの条件で実験を行なった。実験温度は 25°C、光合成時間は5分であった。実験開始5分後に熱エタノールを添加して実験を終了し、クロレラにとり込まれた放射性炭素の放射能強度を薄窓ガスフロー・カウンターにより測定し、クロレラの光合成能を求めた。

**クロレラのクロロフィル量** 培養3日後および5日後にクロレラを収穫、メタノールで抽出した後、Mackinney 法 (1) によって、クロレラのクロロフィル量を測定した。

**低照度で培養したクロレラ細胞の大きさ** 分裂直後の細胞を多く含んだクロレラ集団を

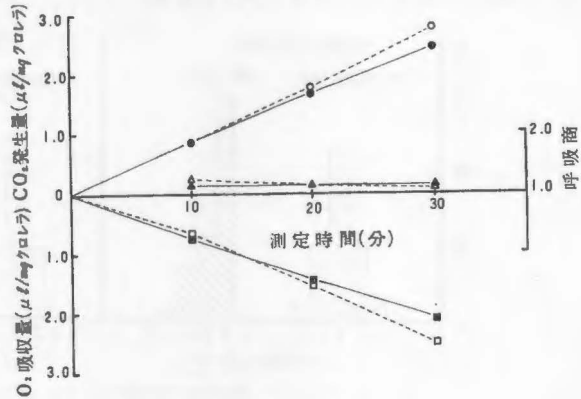
得ることを目的とし、Morimuraの方法(5)を若干変更して、低照度でクロレラを培養した。すなわち、硝酸塩培養液(N-30)あるいは尿素培養液を用い、5000 luxの照明下で5日間培養したクロレラを、それぞれ新しい硝酸塩培養液(N-30)あるいは尿素培養液に移した後、800 luxの照明下で、さらに48時間培養を続けた。この低照度培養の前後におけるクロレラ細胞の直径を顕微鏡下で測定し、集団中における種々の大きさの細胞の割合を算出した。実験温度は25°Cであった。

(b) 実験結果

**クロレラの呼吸量** 測定時間を横軸にとり、実験結果を第1図に示した。クロレラの酸素吸収量、炭酸ガス発生量および呼吸商とも、硝酸塩培養液と尿素培養液の間に大きな相違はなかった。

**クロレラの光合成能** 実験結果を第2表に示した。光合成時に尿素の共存しなかった場合も、共存した場合も、硝酸塩培養液に生育したクロレラに比して、尿素培養液に生育したクロレラの炭素固定量は明らかに大きかった。

**クロレラのクロロフィル量** 実験結果を第3表に示した。培養後



第1図 クロレラの呼吸量

- 硝酸塩培養液 } CO<sub>2</sub>発生量
- 尿素培養液 } CO<sub>2</sub>発生量
- 硝酸塩培養液 } O<sub>2</sub>吸収量
- 尿素培養液 } O<sub>2</sub>吸収量
- △--- 硝酸塩培養液 } 呼吸商
- ▲— 尿素培養液 } 呼吸商

第2表 クロレラの光合成能

培養液の種類	<sup>14</sup> C固定量 (×10 <sup>4</sup> cpm/mg クロレラ)	
	リン酸塩緩衝液	リン酸塩緩衝液+尿素
硝酸塩培養液	6.0	7.8
尿素培養液	9.3	9.3

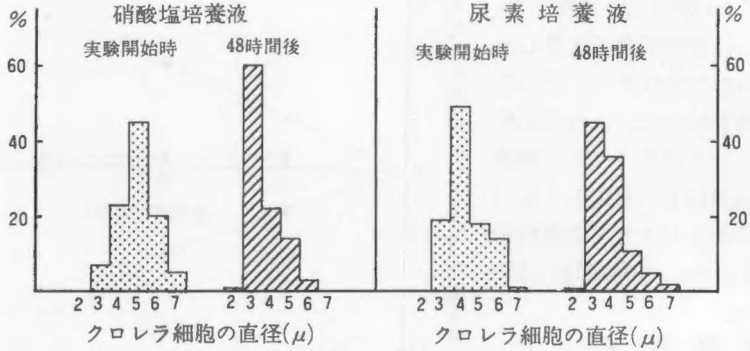
第3表 クロレラのクロロフィル量

培養液の種類	培養期間(日)	クロレラ収量(mg)	クロロフィル量(mg/mgクロレラ)	
			クロロフィルa	クロロフィルb
硝酸塩培養液	3	253	0.014	0.0051
尿素培養液	3	251	0.028	0.0039
硝酸塩培養液	5	281	0.015	0.0044
尿素培養液	5	380	0.019	0.0035

3日あるいは5日のいずれの場合にも、クロロフィルaの含有量は、尿素培養液に生育したクロレラの方が、硝酸塩培養液に生育したクロレラより大きかった。クロロフィルbの含有量は、その絶対量が小さかったので、培養液の種類による差は明瞭ではないが、硝酸

塩培養液に生育したクロレラの方がやや大きいようであった。

**低照度で培養したクロレラ細胞の大きさ** クロレラ細胞の直径を横軸にとり、集団中における種々の大きさの細胞の割合を縦軸にとって、実験結果を第2図に示した。硝酸塩培



第2図 低照度で培養したクロレラ細胞の大きさ

養液および尿素培養液とも、低照度で培養したときには、大部分の細胞が直径3~4μであるようなクロレラ集団を得た。しかし、硝酸塩培養液に比し、尿素培養液の方がやや直径の大きい細胞が多い傾向があった。

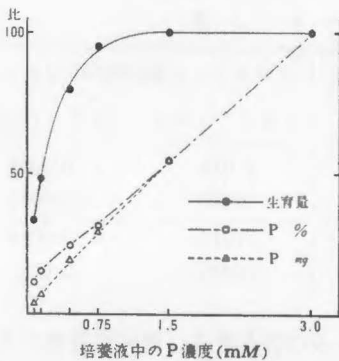
### 3. クロレラの無機養分要求性

#### (a) 実験方法

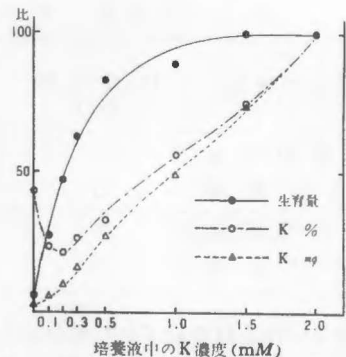
前述の実験に用いた尿素培養液を基準とし、培養液中のリン・カリ・マグネシウム・硫黄およびカルシウム濃度を減少させ、クロレラの生育および各元素含有量を測定した。クロレラの培養条件は、前述の生育試験に用いた条件と同様であった。収穫したクロレラを脱塩水で2回洗浄後、灰化し、リンはモリブデンブルー・比色法(9)、カリウムは炎光分析法、マグネシウムはEDTA滴定法(10)により、硫黄はベンジジン・紫外比色法(11)を若干変更して定量分析を行なった。

#### (b) 実験結果

リン・カリウム・マグネシウム・硫黄およびカルシウムについて行なった実験の結果を、そ

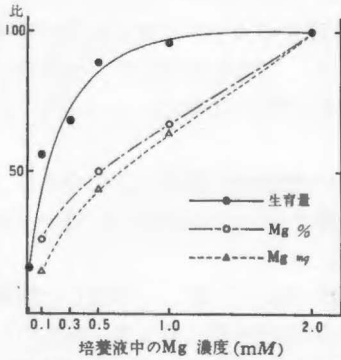


第3図 クロレラの無機養分要求性 (その1. リン)

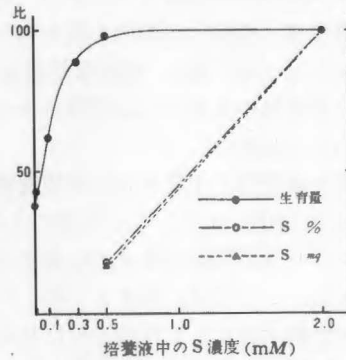


第4図 クロレラの無機養分要求性 (その2. カリウム)

れぞれ第3・4・5・6および7図に示した。培養液中の各元素の濃度を横軸にとり、基準培



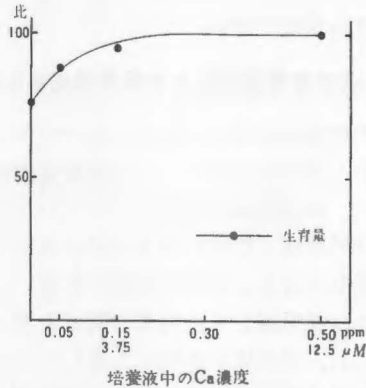
第5図 クロレラの無機養分要求性  
(その3. マグネシウム)



第6図 クロレラの無機養分要求性  
(その4. 硫黄)

養液の濃度における生育量あるいは養分含有量を100としたときの種々の濃度における生育量あるいは養分含有量の比を縦軸に示した。

第3～5図から、リン・カリウムおよびマグネシウムの場合には、培養液中の各元素の濃度が1.5mM以下となるとクロレラの生育量の減少することが認められた。第6図から、硫黄の場合には、培養液の濃度が0.5mM以下となるとクロレラの生育量の減少することが認められた。また、第7図から、カルシウムの場合には、培養液中の濃度が0.15ppm(3.75 $\mu$ M)以下で、クロレラの生育量がやや減少するようであった。



第7図 クロレラの無機養分要求性  
(その5. カルシウム)

## 考 察

### 1. クロレラの生育

従来、クロレラの培養に用いられた培養液の多くは硝酸塩を窒素源とするものであって、硝酸塩培養液の主要構成塩類である硝酸カリウム・リン酸一カリウムおよび硫酸マグネシウムの混合比率とクロレラの生育との関連については、Pratt (7) によって詳細な研究が行なわれた。一方、尿素を窒素源とするクロレラ培養液は、すでに Walker (19, 20) によって用いられたが、クロレラ培養液の窒素源として尿素の好適であることが述べられているだけで、尿素を用いた場合のクロレラの生育あるいは尿素培養液に生育したクロレラの生理的特性についての報告はほとんど見られない。

したがって、新しく考案した尿素培養液を、3種類の硝酸塩培養液と対比して検討した。その結果、Stauffer あるいは Tamiya の培養液に若干の変更を加えた硝酸塩培養液、または尿素培養液と窒素量を等しくした硝酸塩培養液のいずれと比較しても、クロレ

ラの生育量は、尿素培養液の場合に明らかに大きいことが認められた(第1表)。また、クロレラ培養中の培養液のpHは、硝酸塩培養液ではアルカリ性側へ変動し、尿素培養液では酸性側へ変動する傾向が認められたが、そのpH変動の大きさは尿素培養液の場合に小さかった(第1表)。硝酸塩培養液を用いた場合より、尿素培養液を用いた場合に、クロレラ生育量の大きかった原因の一つは、培養液のpH変動の比較的小さかったことにあるのかもしれない。

尿素を窒素源とするクロレラ培養液では、培養液中の無機養分濃度を变化させることが容易であるばかりでなく、上述のように、硝酸塩を窒素源とする培養液を用いた場合より、クロレラの生育も非常に旺盛であることが明らかとなった。

しかし、ここでは、従来よく用いられてきた硝酸塩培養液と、新しく考案した尿素培養液とを比較することを目的としたため、ここに用いた培養液組成(第1表)から明らかのように、3種類の硝酸塩培養液および尿素培養液の各種無機塩類濃度あるいは培養前の培養液のpHには大きな相違があった。したがって、尿素培養液でのクロレラの生育の旺盛であった原因については、なお不明な点が多い。これらの問題については、さらに詳細に検討する予定である。

## 2. 硝酸塩培養液および尿素培養液に生育したクロレラの生理的特性

尿素培養液を用いた場合、クロレラの生育の非常に旺盛なことが認められたので、尿素培養液と窒素量を等しくした硝酸塩培養液(N-30)および尿素培養液を用いてクロレラを培養し、両培養液に生育したクロレラを材料として、呼吸量・光合成能・クロロフィル量および低照度で培養したときのクロレラ細胞の大きさを測定した。

硝酸塩培養液と尿素培養液に生育したクロレラの呼吸量は、酸素吸収量・炭酸ガス発生量および呼吸商とも、両者間で大きな相違は認められなかった(第1図)。

しかし、硝酸塩培養液に生育したクロレラに比して、尿素培養液に生育したクロレラの光合成能は明らかに大きかった(第2表)。また、尿素培養液に生育したクロレラのクロロフィルaの含有量は、硝酸塩培養液に生育したクロレラより大きく、逆に、尿素培養液に生育したクロレラのクロロフィルbの含有量は、硝酸塩培養液に生育したクロレラより小さいようであった(第3表)。一般に、植物の光合成能は、種々の外的および内的要因によって支配されるが、その中で特に重要なものは、光合成作用に関与する種々の酵素の活性とクロロフィル含有量とであると考えられる。光飽和条件においては、光合成速度は必ずしもクロロフィル量に比例しないことが報告されている(14)ので、この実験で、硝酸塩培養液に生育したクロレラより、尿素培養液に生育したクロレラの光合成能の大きかったことは、培養液の相違による種々の内的要因、特に光合成作用に関与する酵素活性の変動に原因するのかもしれない。しかし、光合成機作に重要な関連を有するクロロフィルaの含有量が、尿素培養液に生育したクロレラの場合に大きかったことも、尿素培養液に生育したクロレラの光合成能の大きかった原因の一つであろうと考えられる。

他方、生育段階の等しい細胞集団から出発し、その集団中の全細胞の生育速度を等しく揃えて培養する、いわゆる同調培養(Synchronous culture)は、種々の生理的な研究を行なう場合、非常に有利な実験手段である。そのため、クロレラの同調培養に関しても、多くの研究者によって種々の方法が用いられてきた(3, 5, 6, 12, 13, 16)。Tamiyaら

(15)によれば、クロレラは、その生活環 (Life cycle) において、細胞の増大に光を必要とし、細胞の分裂には光を必要としない。したがって、光の供給を制限した条件でクロレラを培養すれば、分裂直後の小さい細胞、いわゆる娘細胞 (Daughter cells) を多く含んだクロレラ集団を得るはずであり、このクロレラ集団から出発して同調培養を行なうことができる。

そこで、まず、分裂直後の細胞の多い集団を得ることを目的とし、低照度でクロレラを培養した結果、硝酸塩培養液・尿素培養液の両者とも、実験開始時の集団と比較して、娘細胞の多いクロレラ集団を得ることができた (第2図)。しかし、低照度で培養した後のクロレラ集団について、硝酸塩培養液と尿素培養液とを比較すると、尿素培養液の方がやや細胞直径の大きいクロレラの多い傾向があった。これには、(i) 尿素培養液を用いた場合、分裂直後の娘細胞の大きさが硝酸塩培養液の場合より大きい、(ii) 尿素培養液に生育したクロレラでは、低照度における光合成能が大きい、(iii) 尿素が、窒素源としてだけでなく、炭素源としてもクロレラに利用される、という3つの原因が考えられる。尿素の炭素がクロレラによって利用されることは、すでに Ellner ら (2) によって報告された。しかし、Hattori (4) は、尿素の炭素は、一旦、炭酸ガスとなり、クロレラは、その炭酸ガスを通常の光合成経路によって利用すると考えている。いずれにしても、同調培養を行なう場合の尿素培養液使用の可否については、さらに検討を加えなければならないが、同調培養開始のための娘細胞の多いクロレラ集団は、硝酸塩培養液を用いた場合の方が、より細胞直径が小さく、鋭い分布曲線を示す (第2図) ので、同調培養に尿素培養液を用いることはやや不利であろうと考えられる。

### 3. クロレラの無機養分要求性

以上のように、尿素培養液は、クロレラの生育に好適なばかりでなく、尿素培養液に生育したクロレラは、或面では優れた生理的特性を有することが明らかとなった。したがって、前述の尿素培養液を基準として、培養液中のリン・カリウム・マグネシウム・硫黄およびカルシウム濃度を減少させ、クロレラの生育量あるいは各無機養分吸収量を測定した。

リン・カリウムおよびマグネシウムについては、培養液中の各元素の濃度の低下とともに、クロレラ中のそれぞれの元素含有量はほぼ直線的に減少した (第3・4・5図)。しかし、各元素含有量の減少が或範囲内では、クロレラの生育量は減少せず、或範囲を越えるとクロレラの生育量も減少した。クロレラ生育量の減少しはじめる培養液中の各元素の濃度によって、クロレラの無機養分要求性を比較すると、リン・カリウムおよびマグネシウムについては、培養液中の各元素の濃度はほぼ  $1.5mM$ 、硫黄についてはほぼ  $0.5mM$  であり、カルシウムについてはほぼ  $3.75\mu M$  ( $0.15\text{ ppm}$ ) であった。

多くの高等植物において、リン・カリウムおよびマグネシウムに対する要求性の大きいことが認められており、一般に、カルシウムに対しても、同様に大きな要求性のあることが認められている (8)。クロレラについては、カルシウムに対する要求性の非常に小さいことが報告されている (19) が、ここでも、カルシウムに対するクロレラの極端に低い要求性が認められた。このカルシウムに対するクロレラの低い要求性は、高等植物の場合と全く相違する点であり、クロレラを実験材料として用いる場合に留意すべき点であるが、逆に、カルシウム要求性の極端に低い実験材料としてクロレラを用いることができる

と考えられる。

### 摘 要

クロレラの培養には、従来、硝酸塩を窒素源とする培養液が多く用いられてきた。それらの硝酸塩培養液と尿素を窒素源とする培養液とを対比して検討し、次の結果を得た。

1) 従来、よく用いられてきた硝酸塩培養液に比して、尿素培養液でのクロレラの生育量は非常に大きかった。また、クロレラ培養中の培養液の pH 変動は、硝酸塩培養液の場合より、尿素培養液の場合に小さかった。

2) クロレラの呼吸量については、酸素吸収量・炭酸ガス発生量および呼吸商とも、硝酸塩培養液に生育したクロレラと尿素培養液に生育したクロレラの間に大きな相違はなかった。

しかし、尿素培養液に生育したクロレラの光合成能は、硝酸塩培養液に生育したクロレラに比して明らかに大きく、また、尿素培養液に生育したクロレラのクロロフィル a 量も大きかった。

低照度でクロレラを培養したとき、硝酸塩培養液・尿素培養液とも、分裂直後の小さい細胞の多いクロレラ集団を得たが、尿素培養液を用いた場合は、硝酸塩培養液を用いた場合より、クロレラ細胞はやや大きいようであった。

3) クロレラの無機養分要求性は、リン・カリウムおよびマグネシウムに対して大きく、硫黄に対しては小さかった。さらに、クロレラのカルシウム要求性の極端に小さいことが認められた。

### 文 献

1. Colowick, S. P. and Kaplan, N. O. 1957. *Methods in enzymology*, Vol. 4, p. 342, Academic Press Inc., New York.
2. Ellner, P. D. and Steers, E. 1955. Urea as a carbon source for *Chlorella* and *Scenedesmus*. *Arch. Biochem. Biophys.* 59 : 534—535.
3. Hase, E., Morimura, Y. and Tamiya, H. 1957. Some data on the growth physiology of *Chlorella* studied by the technique of synchronous culture. *Arch. Biochem. Biophys.* 69 : 149—165.
4. Hattori, A. 1960. Studies on the metabolism of urea and other nitrogenous compounds in *Chlorella ellipsoidea*. III. Assimilation of urea. *Plant Cell Physiol.* 1 : 107—115.
5. 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 Cell Physiol.* 1 : 49—62.
6. Pirson, A., Lorenzen, H. and Koepper, A. 1959. A sensitive stage in synchronized cultures of *Chlorella*. *Plant Physiol.* 34 : 353—355.
7. Pratt, R. 1941. Studies on *Chlorella vulgaris*. IV. Influence of the molecular proportions of  $\text{KNO}_3$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , and  $\text{MgSO}_4$  in the nutrient solution on the growth of *Chlorella*. *Amer. J. Botany* 28 : 492—497.
8. 植物栄養学実験編集委員会編. 1957. 植物栄養学実験, p. 17, 朝倉書店, 東京.
9. 同 上, p. 24—27.
10. 同 上, p. 51—56.

11. Snell, F. D., Snell, C. T. and Snell, C. A. 1959. Colorimetric methods of analysis, Vol. II A, p. 665—677, D. Van Nostrand Co. Inc., Princeton.
12. Sorokin, C. and Myers, J. 1957. The course of respiration during the life cycle of *Chlorella* cells. *J. Gen. Physiol.* 40 : 579—592.
13. Stange, L., Bennett, E. L. and Calvin, M. 1960. Short-time  $^{14}\text{CO}_2$  incorporation experiments with synchronously growing *Chlorella* cells. *Biochim. Biophys. Acta* 37 : 92—100.
14. Steemann Nielsen, E. 1961. Chlorophyll concentration and rate of photosynthesis in *Chlorella vulgaris*. *Physiol. Plantarum* 14 : 868—876.
15. Tamiya, H., Iwamura, T., Shibata, K., Hase, E. and Nihei, T. 1953. Correlation between photosynthesis and light-independent metabolism in the growth of *Chlorella*. *Biochim. Biophys. Acta* 12 : 23—40.
16. Tamiya, H., Morimura, Y., Yokota, M. and Kunieda, R. 1961. Mode of nuclear division in synchronous cultures of *Chlorella*: Comparison of various methods of synchronization. *Plant Cell Physiol.* 2 : 383—403.
17. Umbreit, W. W., Burris, R. H. and Stauffer, J. F. 1964. Manometric techniques, p. 28—29, Burgess Pub. CO., Minnesota.
18. *Ibidem*, p. 140.
19. Walker, J. B. 1953. Inorganic micronutrient requirements of *Chlorella*. I. Requirements for calcium (or strontium), copper, and molybdenum. *Arch. Biochem. Biophys.* 46 : 1—11.
20. Walker, J. B. 1954. Inorganic micronutrient requirements of *Chlorella*. II. Quantitative requirements for iron, manganese, and zinc. *Arch. Biochem. Biophys.* 53 : 1—8.