

クロレラにおけるK欠乏の影響

Effect of Potassium Deficiency on the Growth and the Contents of Potassium and Sodium in the *Chlorella* cells

鷺尾 倭文
Shizu Washio

Abstract

The growth rate of *Chlorella* cells in the normal and K-deficient medium was investigated. In K-deficient medium in which K was replaced by Na, the growth yield was about half of that of normal medium, but if K was replaced Ca the yield was only 20 percent.

The cellular K and Na content cultured in normal and K-deficient medium was measured. The K and Na content was constant and independent of K concentration of the medium in the normal medium, but in K-deficient medium the K content was reduced and the Na increased with the course of growing period. The sum of the K and Na content was almost the same as the normal at the end of the experiment.

The stoichiometry between the loss of K and Na from the medium and the gain in cellular K and Na was investigated. In K-deficient medium the total cellular K content was greater than the loss in K from the medium. The K still remained in the medium, though very few K (0.01m mol/l) was found in the K-deficient medium at the beginning of the experiment. On the contrary the total cellular Na content was lower than the loss in Na from the medium.

緒言

生物にとってKは不可欠の無機成分とされているが、その最適必要量については生物によってかなり相違があるようである。

クロレラの培養には普通、K源として KNO_3 と KH_2PO_4 が用いられ¹⁾、その量は KNO_3 は 5g (50m mol)—0.25g (25m mol), KH_2PO_4 は 3g (22m mol)—0.04g (0.3m mol) と研究者によってかなりの差がみられる。小牧²⁾は食品微生物, *Saccharomyces cerevisiae*, *S. ellipsoideus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium citrinum* など19種類の菌種を用いてKを加えない培地での生育増殖をしらべた

結果、5種類の菌種を除き、他はK欠乏培地（Kを加えない培地でも微量のKが不純物として含まれる）においてもかなりよく生育することを報告した。著者はクロレラを用いてK欠乏培地における生育増殖状況を研究し、またK塩の代りに用いられたNaが生育に及ぼす影響などについても検討したのでここに報告する。

実験材料および方法

1. 実験材料

クロレラ研究所（1965年当時）より入手した *Chlorella ellipsoidea* Gerneck を用いた。

2. 培養装置

容量 500ml の中型扁平フラスコ（合成樹脂—ポリカーボネート製）を25°C に調節した水槽中に2列に並置し、水槽の両側 5cm の距離に20Wの蛍光灯を2本ずつ設置して照射した。

第1表 培地組成

A 培地			
I (標準培地)		II	
KNO ₃	50mmo l / l (5.05g)	KNO ₃	10mmo l / l
KH ₂ PO ₄	9 (1.23)	KH ₂ PO ₄	1.8
MgSO ₄ · 7H ₂ O	10 (2.47)	MgSO ₄ · 7H ₂ O	1
FeSO ₄ · 7H ₂ O	5mg		
Arnon A ₅ 液	1ml	以下 I に同じ	
$\left\{ \begin{array}{l} \text{H}_3\text{BO}_3 \quad 2.85\text{g/l} \\ \text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} \quad 1.81 \\ \text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} \quad 0.22 \\ \text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O} \quad 0.078 \\ (\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O} \quad 0.171 \end{array} \right\}$			
pH	5.0-5.8		
B 培地			
I		II	
NaNO ₃	10mmo l / l	NaNO ₃	5mmo l / l
NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O	1.8	NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O	1.8
KCl	10-2.5	KCl	10-2.5
MgSO ₄	以下A培地に同じ	以下 I に同じ	
C 培地			
I		II	
Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	4.2mmo l / l (1g)	Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	4.2mmo l / l
KH ₂ PO ₄	7.2-1.8	KH ₂ PO ₄	1.8
MgSO ₄ · 7H ₂ O	1 (0.25)	KCl	7.2-3.6
以下A培地に同じ		MgSO ₄ 以下 I に同じ	
D 培地			
I			
Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	4.2mmo l / l		
Ca(H ₂ PO ₄) ₂ · 2H ₂ O	0.93		
MgSO ₄ · 7H ₂ O	1.		
以下A培地に同じ			

K欠乏培地はK塩の代りにNa塩を加える。

3. 通 気

CO₂ を 5 % 含む空気を送った。CO₂ は CO₂ ポンベより、 空気はエアコンプレッサーを用いて夫々、 流量計を通して圧を調節して混合瓶に導き、 1l/min の速度で培養瓶に送った。空気は滅菌した綿をつめたガラス管を通して清浄化したものを混合瓶に送った。

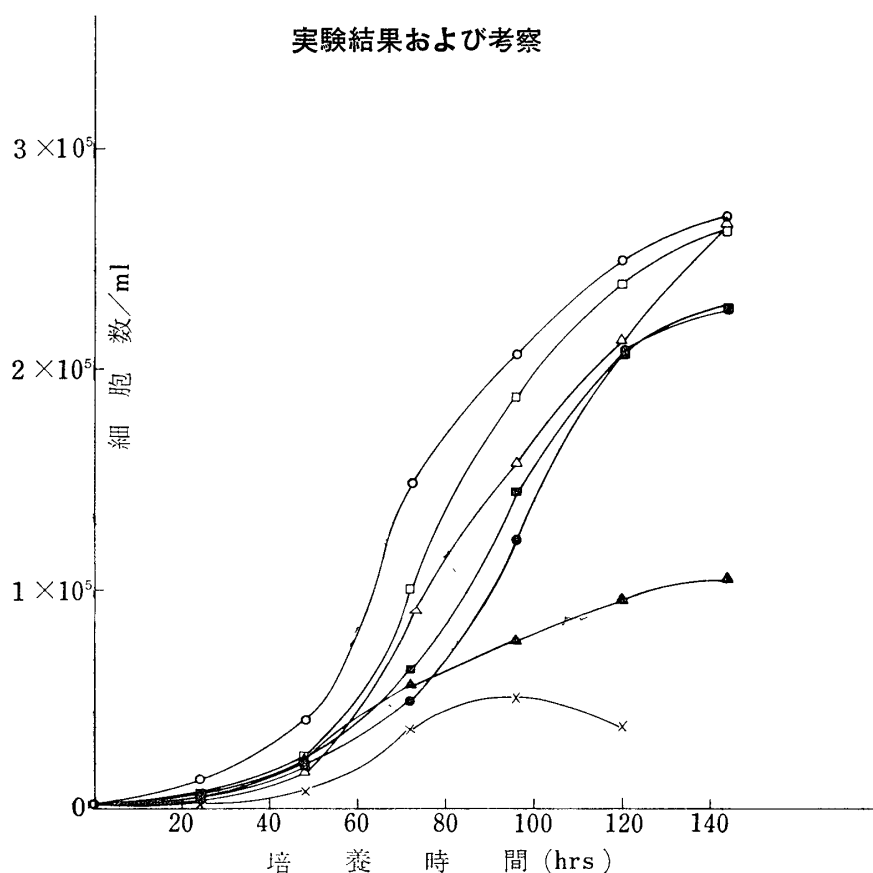
4. 接 種

実験に先だち標準培地を用いて寒天上に斜面培養した試験管数本に滅菌蒸留水を加えて懸濁液をつくり、 一定の濃度 (1×10^6 /ml) に調製したものを 1ml ずつ培養液に加えた。最終濃度は 2×10^3 /ml となる。

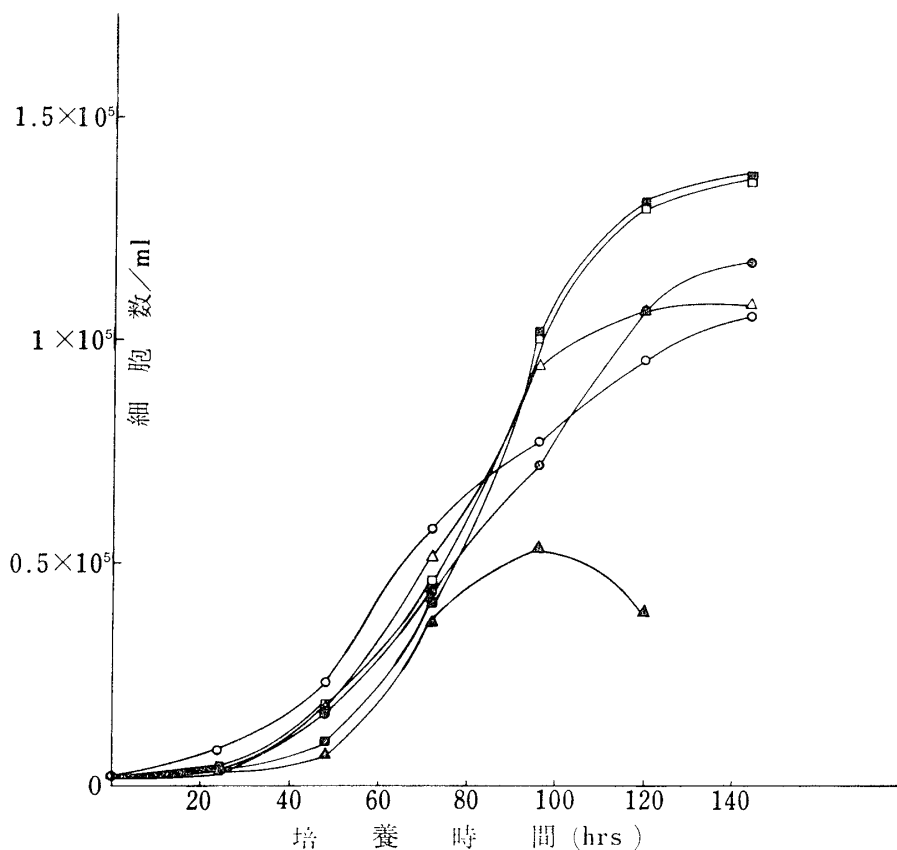
5. 培地の組成

用いられた培地は第 1 表に示す通りである。A 培地は Meyers 4N³⁾—A₅⁴⁾ に準拠したもので A—I を標準培地とした。B 培地は K 塩として KCl を用いたものである。C 培地は N 源として Ca(NO₃)₂ 4H₂O を用いたものである。K 欠乏培地は K 塩の代りに Na 塩を用いた。また K も Na も加えない培地 (D 培地) にはリン酸塩として Ca(H₂PO₄)₂ 2H₂O を用いた。

以上 2—5 において使用した器具および培地はすべて夫々材質に応じ、 乾熱滅菌、 蒸気滅菌、 アルコール洗滌などの方法によって滅菌した。薬品は特級を用いた。



第 1 図 正常培地および K 欠乏培地におけるクロレラの生育増殖状況
培地中の K 濃度 (mmol / l), ○ : 59, □ : 11.8, △ : 7.2,
● : 3.6, ■ : 1.8, 以上正常培地, ▲ : 0.01, × : 0.003,
以上 K 欠乏培地



第2図 K欠乏培地における生育増殖状況
 培地中のNa およびK濃度(m mol / l), ○: Na 59, K 0.01,
 □: Na 11.8, K 0.006, △: Na 7.2, K 0.005, ●: Na 3.6,
 K 0.004, ■: Na 1.8, K 0.003, ▲: Na 0.006, K 0.003

6. 生育増殖量の測定

a. 細胞数の測定

THOMA の hemacytometer を用いた。

b. 乾燥藻体量の測定

遠心法によって藻体を蒸留水で5回洗滌し(最終洗滌上清にはKもNaも含まれていない)蒸発皿にとって湯煎上で乾燥した後, デシケーター中に保存し, 恒量になった時点の重量を乾燥藻体量とした。

7. KおよびNaの定量

a. 試料の調製

乾燥試料 50—100mg を磁製ルツボ* にとり, マッフル中で 500—550°C で灰化する。完全灰化後 1 N-HCl, 1ml を加えて 100° に熱し, 水を加えて 10ml としたものを一定量として測定に供する。

* 磁製ルツボからのKまたはNaの流出について問題があるようであるが⁶⁾ 検討する機会がなかったので一応, 試料を加えない試薬のみの場合の値を blank として実測値からさしひいた。

b. Kの定量

フェニルボロンソーダによる比濁分析法⁶⁾⁷⁾ と炎光分析を併用した。測定の都度, 標準液 (K₂O—25γ) を同時に測定し検量曲線の読みを補正した。文献⁶⁾ によれば試料中の Mn⁺⁺, Cu⁺⁺, Zn⁺⁺, Mg⁺⁺, Ca⁺⁺, Fe⁺⁺, Cl⁻, NO₃⁻, SO₄²⁻, および PO₄³⁻ はKの値に影響しない。Na⁺ の影響は

300倍量で誤差1%以内とされている。

c. Naの定量

炎光分析法によった。

1. 正常培地およびK欠乏培地における生育増殖状況

a. Kを含む培地では第1図に示す通りK濃度が7.2mmol以下ではやや生育が劣るとはいえ1.8mmolの濃度で十分な生育がみとめられる。

b. K欠乏培地では培地にK塩を加えずその代わりにNa塩を加えたが実測の結果、微量のKが含まれていた。第1図に示した曲線(-▲-▲-)は標準培地におけるK塩の代わりに59mmolのNa塩を加えたが0.01mmolのKが含まれた。これは(1)培地に用いた薬品中の不純物、(2)滅菌のさいのガラス器具よりの浸出、(3)K測定中の混入物の何れかによると思われる。いずれにしてもこのような微量のKでもNaが加えられるときはかなりの生育増殖(正常培地の約50%)を示すことが判明した。しかし液体培養を2代継続すると(新しい培地に古い培養液3mlをとって接種する)正常培地では第1代と全く同様の生育増殖を示したのに対し、K欠乏培地では増殖がほとんどみられなかった。これはNaを多量に含んだ細胞が(3の項参照)正常な生理作用を行ないえなかったためであろう。K欠乏培地で生育増殖した細胞の生理作用を調査する必要がある。小牧²⁾は*S. cerevisiae*, *S. ellipsoideus* においてはK欠乏培地に生育した菌もアルコール生産量、総酸生産量などにおいては正常培地のものと大差ないことを報告したが、藤谷⁸⁾は清酒酵母についてK飢餓酵母では正常な酵母に比し、醗酵能が極めて低い水準にまで下ることを報告している。またConway⁹⁾はパン酵母を用いて酵母細胞中のKをNaでおきかえたsodium-yeastを作り、その性質をしらべた結果、CO₂生産量は正常の1/2、O₂消費量は正常の2/3にすぎず、形態的にも正常細胞と異なることを報告した。

第2図は培地のNa塩の濃度と生育の関係をしらべたものでKの微量にもかかわらず、かなりの生育がみられるのはNaが或程度、生育を促進するはたらきがあることを示すものと思われる。

c. 第1図の曲線(-×-×-)はKもNaも加えない培地であるが、やはり極微量のK(0.003mmol)とNa(0.006mmol)を含んでいる。KもNaも微量の場合は生育が極めて低いことを示している。

2. 細胞の形態的所見

K欠乏培地(Naを含む)に培養した細胞は光学顕微鏡で観察した限りにおいては正常培地の細胞と異なるところがみられなかった。

しかしKもNaも加えない培地(D培地)では正常培地の細胞の数倍の大きさの大形細胞が多くみられた。また培養時間が長くなるに従って細胞は培養瓶の底部に塊状をなす傾向がみられた。

3. 正常培地およびK欠乏培地におけるクロレラ細胞内KおよびNa含量

細胞内KおよびNa含量の測定は大体120—144時間培養した細胞について行なった。採取した試料には各生育期の細胞が含まれているが、クロレラ細胞の各生育期によるK含量は金沢¹⁰⁾によれば全生育期を通じ、比較的恒量であることが報告されているので、各生育期別の測定は行わなかった。

a. Kを含む培地(AおよびB培地)では第2表に示すとおり, Kは0.153—0.133mmol/g(of dry wt. of cell) Na は0.061—0.043mmol/g の範囲にあり, 細胞内Kおよび Na 含量は培地のK濃度59—2.5mmol の間ではK濃度による有意の差異は認められない。しかしC培地, 特にC—I培地ではKは平均 0.094mmol, Na は 0.094mmol となり, 他の培地と異なる値を示した。A, B, C 培地と

第2表 クロレラ細胞内KおよびNa含量

			正 常 培 地		K 欠 乏 培 地	
			K	Na	K	Na mmol/g *
A 培 地	I		0.142	0.061	0.040	0.188
	II		0.135	0.061	0.042	0.188
B 培 地	I	KCl mmol 10	0.147	0.043		
		5	0.133	0.050		
		10	0.139	0.059		
	II	5	0.136	0.053	0.038	0.149
		2.5	0.153	0.046		
C 培 地	I	KH ₂ PO ₄ mmol 7.2	0.091	0.098	0.033	0.164
		3.6	0.093	0.093	0.033	0.161
		1.8	0.097	0.090	0.039	0.174
	II	KCl mmol 7.2	0.122	0.052	0.047	0.166
		3.6	0.103	0.054	0.041	0.196
D 培 地	I			0.037	0.042	

各数値は同時に3本以上または同条件で3回以上の培養実験(120—144hrs)を行なって試料をとり、各試料につき3回の測定結果の平均値をとった。

* mmol/g of dry wt. of cell

も生育増殖における顕著な差異は認められないが, C培地にはNa塩が加えられていないので7.2mmol以下のK塩のみでは細胞内Kはあまり増加しないといえる。

b. K欠乏培地ではKは0.047—0.003mmol, Na は0.196—0.149mmol の間にあり, 培地のNa濃度59—1.8mmolの間ではNa濃度による差異は認められない。培地中のNaが大量に細胞に吸収されたことを示した。この結果は小牧¹¹⁾¹²⁾の食品微生物について, K欠乏培地においても菌体K含量は正常培地と大差がないという結果とは一致しない。竹村¹³⁾によれば, 清酒酵母においては培地のK濃度が4 mmol 以下では酵母細胞のK含量は夫々培地のK濃度に応じて減少し, これに対応してNaが増加することを報告した。また藤谷⁸⁾はK欠乏培地では培養の初期には細胞のK含量の急激な減少とNa含量の急激な増加がみられるが, 時間とともにNaは減少し, 後に両者とも極めて低い値に達すると報告している。

c. KもNaも加えない培地(D培地)では細胞内KおよびNa含量はいずれも低い値を示した

第3表 K欠乏培地における細胞内KおよびNa含量の経時的变化

実験例 1			
培養時間	K mmol/g	Na mmol/g	収量 mg/dl
48hrs	0.068	0.184	23.6
72	0.053	0.183	40.4
96	0.040	0.180	68.9
120	0.041	0.183	71.9
144	0.038	0.188	65.5
実験例 2			
48	0.151	0.086	35.9
96	0.036	0.159	68.6
144	0.035	0.183	66.7
実験例 3			
24	0.126	0.091	14.0
48	0.053	0.126	26.9
72	0.053	0.184	39.8
96	0.033	0.188	64.3

培地はA-I培地のK塩をNa塩におきかえたもの。

4. K欠乏培地における細胞内KおよびNa含量の経時的変化標準培地で斜面培養した細胞をK欠乏培地で液体培養すると日を追って細胞内K含量は減少し、Naは増加した。第3表に示すとおりである。

5. 生育に伴う培地中のKおよびNa濃度の変化と細胞内KおよびNa含量の関係

a. 培地中のKおよびNaを培養の前(滅菌後)と後に測定した結果を第4表に示した。正常培地においては培地中のKは培養後、減少し細胞に吸収されたことを示すがそのすべてが吸収されておらず、細胞内K総量よりも多くのKが培地において減少している。Naは不純物と

第4表 生育に伴う培地のKおよびNa濃度の変化と細胞内KおよびNa含量

	培地のK濃度mmol/l			培地のNa濃度mmol/l			細胞内mmol/l	
	培養前	培養後	減少量	培養前	培養後	減少量	総K量	総Na量
正常培地								
A-I	30.23	28.56	1.67	0.0262	0.0305	+0.0043	0.190	0.082
A-II	5.43	4.74	0.69	0.0086	0.0098	+0.0012	0.168	0.076
C-I 7.2*	3.67	3.57	0.10	0.0071	0.0090	+0.0019	0.121	0.130
C-I 3.6*	2.00	1.16	0.84	0.0053	0.0101	+0.0048	0.103	0.103
C-I 1.8*	0.77	0.63	0.14	0.0044	0.0066	+0.0022	0.112	0.104
K欠乏培地								
A-I	0.0094	0.0052	0.0042	32.31	31.40	0.91	0.026	0.120
A-II	0.0062	0.0025	0.0037	6.25	5.97	0.28	0.032	0.141
C-I 7.2*	0.0052	0.0030	0.0022	3.65	3.73	+0.08	0.010	0.021
C-I 3.6*	0.0039	0.0026	0.0013	1.94	1.75	0.19	0.011	0.022
C-I 1.8*	0.0029	0.0022	0.0007	0.95	0.80	0.15	0.027	0.122

培養時間は120または144時間。

培養後の濃度は培養液の濃縮による濃度差を補正した。

総K量、総Na量は1g当りの細胞内KまたはNa量に収量(g/l)をかけたもの。

* C-I培地でKH₂PO₄を夫々7.2,3.6,1.8mmol含むもの。K欠乏培地においても同じ。

して含まれるものであるが培養率増加している。これは対照区（培養液にクロレラを接種しないで同時間incubateしたもの）においても増加しているのでクロレラ細胞以外からの混入があるとみられる。しかし接種したものの方が増加量は大きいのでクロレラ細胞からの流出も考えられる。

b. K欠乏培地でも培地中のK（不純物として含まれるもの）は培養後減少しているが、正常培地と異なる点は細胞内K総量の方が培地のKの減少量よりも多いことである。このKはどこからきたか不明である。対照区（同上）においてもKはいくらか減少しているので培養瓶からの流出は考えられない。Naも培養後減少して細胞に吸収されたことを示すが細胞内Na総量は培地において減少したNa量よりも少ない。

要 約

1. K欠乏培地におけるクロレラ細胞の生育増殖状況を正常培地と比較研究した結果、K欠乏培地においてもK塩の代わりにNa塩が加えられた場合には正常培地の約50%の生育増殖がみられた。KもNaも加えない培地では正常培地の約20%の増殖しかみられなかった。

2. 正常培地で培養した細胞内KおよびNa含量は培地のK濃度が2.5mmol以上ではK濃度に依存せず、常に一定であるが、K欠乏培地（Kの代わりにNaを加えた）では時間の経過と共に細胞内K含量は減少し、Naが増加した。その最終値のKとNaの和は正常培地におけるそれらの和とほぼ等しい値を示した。

3. 生育に伴う培地のKおよびNaの変化と細胞内KおよびNa含量の関係をしらべた結果、生育に伴わない培地のKおよびNaは減少し、細胞内K総量およびNa総量は増加するが、両者の数値は一致しなかった。K欠乏培地では培地に含まれるKは極微量であったにもかかわらず全部は吸収されず、しかも細胞内K総量は培地からの減少量よりもはるかに多かった。これに反しNaは培地において減少した量よりも少ない量しか細胞内に発見出来なかった。

文 献

- 1) 田宮博, 渡辺篤編: 藻類実験法, 南江堂 (1965)
- 2) 小牧久時, 小沢篤子: 栄養と食糧, 19, 40 (1966)
- 3) Tamiya, H., Shibata, K., Sasa, T., Iwamura, T., Morimura, Y. : Carnegie Inst. Wash. Publ., 600, 76 (1953)
- 4) Holm-Hansen, O., Gerloff, G. C., Skoog, F. : Physiol. Plantarum, 7, 665 (1954)
- 5) Fujitani, T. : Agr. Biol. Chem., 29, 473 (1965)
- 6) 向山朝之: 化学の領域, 10, 103 (1956)
- 7) De La Rubia Pacheco, J., F. Blasco Lopez-Rubia : chemist-Analyst, 44, 58 (1955)
- 8) 日本化学会: 実験化学講座, 15, 199, 丸善 (1958)
- 9) Conway, E. J., Moore, P. T. : Biochem. J., 57, 523 (1954)
- 10) Kanazawa, T. : J. Gen. Appl. Microbiol., 4, 102 (1958)
- 11) 小牧久時, 藤本多貴子: 武庫川女子大紀要, 14, 67 (1967)
- 12) 小牧久時, 藤本多貴子: 武庫川女子大紀要, 15, 59 (1967)
- 13) 竹村成三: 農化, 36, 569 (1962)
- 14) Fujitani, T. : Agr. Biol. Chem., 30, 568 (1966)