

Über die Glukose-Chlorose von *Chlorella luteoviridis*

Hyone Soon Lee

(Bei der Biologie-Abteilung von Sung-Kyun-Kwan Universität)

Chlorella luteoviridis Glukose-Chlorose 對하여

李 賢 順

(成均館大學校 理工大學 生物學科)

Abstrakt

Wir wollten beobachten, ob die Chlorophyllabnahme von *Chlorella luteoviridis* (211/2b) bei Glukose-Zugabe durch Stickstoffmangel hervorgerufen worden ist, wie viele Leute bei Mineralsalz-mangel (Aach (1952), Fogg 1956 Eyster et al (1958), oder Photooxydationschlorose (Kandler 1958) vermuteten. *Chlorella luteoviridis* bildete nicht Chlorophyll bei Glukose-zugabe wie bei Autotrophkultur, obwohl Stickstoffsynthese als Autotrophkultur stark gefördert worden ist. Bei Nitratanzucht mit Glukose (Mixotroph) waren die Zellvermehrung und Kohlenhydratbildung nicht so stark wie bei der Glukoseanzucht mit NH_4Cl , trotzdem nahm Chlorophyll ab. *Chlorella luteoviridis* bildete Chlorophyll im Dunkeln und Stärkeakkumulation erschien nicht bei Glukoseanzucht.

Material und Methoden

1. Algenanzucht. Die Versuche wurden mit *Chlorella luteoviridis* (211/2b) der Algensammlung des Pflanzenphysiologischen Instituts der Universität Göttingen, durchgeführt. Als Stammkulturen dienten auf Schrägagar bei Zimmertemperatur und Tageslicht steril angezogene Chlorellen. Sie wurde in der von Kuhl (1962) angegebenen mineralischen Nährlösung kultiviert; doch wurde die Konzentration des Phosphats um 50% erhöht. Zur Anzucht, die im Dauerlicht erfolgte, diente der bei Lorenzen (1950) beschriebene Lichtthermostat. Sie wurde mit eine CO_2 Luftgemisch (2% Vol. CO_2) begast.

Bei Beleuchtungsstärke wurde durch Veränderung des Abstandes zwischen Lichtquelle (Leuchtstoffröhren, 3 Philips TL 40W 1/32, 2 Philips 40 W 1/55). Für alle Versuche wurden 5000—6000 Lux gewählt. Die Temperatur betrug 25°C . Als Impfmateriale diente in der Regel eine gut gewachsene Flüssigkeitsvorkultur, die alle 3—4 Wochen neu, steril von den Stammkulturen angesetzt wurde.

2. Bestimmungsmethoden-Zur Trockengewichtsbestimmung verwendeten wir Aluminiumtiegel. Die Algenproben wurden durch Zentrifugieren von der Nährlösung befreit, einmal mit Aqua bidest. gewaschen, in die Aluminiumtiegel gefüllt und 7 Std bei 105°C getrocknet.

Der Gehalt an Gesamtkohlenhydrat wurde photometrisch mit der Anthron-Methode nach Roe (1955) bestimmt.

Zur Ermittlung des Gesamtstickstoffs verwendeten wir die Kjeldahl-Methode.

Zur Chlorophyllbestimmung wurde 10 ml Algensuspension zur Entfernung des Wassers zentrifugiert und zur Extraktion mit Methanol (90%) in der mit Glassperlen (0,45—0,50mm ϕ) zu zwei Drittel gefüllten Zertrümmerungsflasche aufgenommen, und 2 Minuten lang zertrümmert, um vollständige Chlorophyllextraktion zu bekommen. Die absolutmenge des Gesamtchlorophylls wurde nach Mackinnocy (1941) mit folgenden, modifizierten Konstanten berechnet:

$$\text{mg Chlorophyll/ml} = E_{650} \cdot 2,55 \cdot 10^2 \div E_{685} \cdot 0,40 \cdot 10^{-2}$$

Zur Stärkebestimmung erfolgten wir nach Wolf (1964).

Versuchsteil

1. Wachstum bei Autotroph:

Chlorella luteoviridis (211.1b) wächst autotroph mit KNO_3 , NH_4Cl oder 0.1% Hefeextrakt als Stickstoffquelle,

aber schlecht. Gibt man ausser KNO_3 oder NH_4Cl noch 0,1% Hefeextrakt dazu, so wird das Wachstum gefördert (Abb. 1).

Chlorella luteoviridis benötigt eine lange Lag-Phase, und sie bildet Chlorophyll jenach der Stickstoffmenge (Abb. 1).

2. Autotroph zum Mixotrophanzucht:

Chlorella luteoviridis wurde 7, Tage lang autotroph angezogen und erhielt dann Glukose. Zellvermehrung, Chlorophyllbildung und wachstum unter diesen Bedingungen werden im Folgenden dargestellt. Zellvermehrung und Kohlenhydratbildung sind höher als Autotrophanzucht in allen Fällen. Bei 0,1% Hefeextrakt als einziger Stickstoffquelle ist das Wachstum fast gleich bei Autotrophanzucht und 1% Glukosezugabe. Aber die Chlorophyll Bildung ist gehemmt bei 1% Glukosezugabe. Bei KNO_3 und NH_4Cl wurde in der Glukosegabeanzucht das Wachstum stark gefördert (Abb. 2a). Aber die Chlorophyllbildung ist nicht proportional, sondern gehemmt. Bei der Autotrophanzucht bildet sich Chlorophyll sehr stark trotz der geringen Stickstoffzunahme. (Abb. 2a). Starke Vermehrung und Kohlenhydratbildung ruft Chloroplasten-Stickstoffmangel hervor, damit ist Chlorophyllbildung gehemmt, weil am 9, 10. und 12. Tage Stickstoff bei KNO_3 stark zunimmt. Stickstoff nimmt bei KNO_3 -Anzucht von 48j auf 122j bei NH_4Cl von 62j auf 92j während dieser Zeit (8. 9. Tage) zu. Das Chlorophyll nimmt aber etwas ab, oder bleibt es fast gleich. Dieser vermehrte

Stickstoff bildet nur Zellmaterial, und am 12 Tag bleibt der Stickstoff gleich Chlorophyll nimmt weiter ab, das Trockengewicht nimmt weiter zu. Man kann vermuten, daß am 12 Tag der Stillstand erreicht ist. Nach der Glukosezugabe ist *Chlorella luteoviridis* einerseits ins Dunkel gestellt worden, um zu untersuchen, ob es zwischen Licht und Dunkeln einen Unterschied gibt. Die Zellvermehrung ist im Dunkeln langsamer als im Licht, etwa ein Drittel (Abb. 3). Die KHO-Bildung ist auch weniger im Dunkeln als im Licht, etwa ein Drittel. Das bedeutet, daß das Licht die Oxidationsphosphorylierung fördert oder die Lichtphosphorylierung zusätzlich wirkt. Der Stickstoff nimmt allmählich zu, aber weniger als die Lichtkultur, und die Chlorophyllbildung ist wie im Licht ab (Abb. 2a.). Hier bedeutet auch, daß das Licht über die Chlorophyllabnahme Keine Beziehung hat.

3. Mixotrophanzucht:

Wenn Glukose auf die Chlorophyllbildung Keinen Einfluß hat, müßte *Chl. lut.* bei Mixotrophanzucht Chlorophyll bilden. Deswegen haben wir *Chl. lut.* von anfang mit 1% Glukose kultiviert. Aber wie Abb. 4 zeigt, unterdrückt die Mixotrophanzucht die Chlorophyllbildung stark bei allen Stickstoffbedingungen. Die Mixotrophanzucht braucht eine längere Lag-Phase als die Autotrophanzucht. Bei Mixotrophanzucht durch rasche Zellvermehrung Chloroplastmultiplikation nicht proportional ist, ist aber

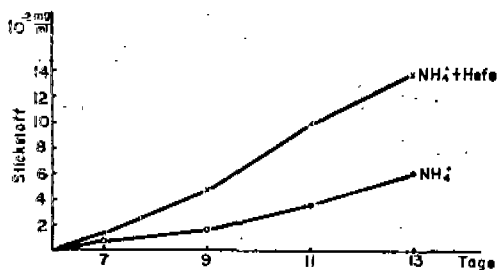


Abb. 1 *Chlorella luteoviridis* (211/2b) Zunahme des Gesamt-Stickstoff pro ml Zellsuspension von Ammoniumsalz mit 0,1% Hefeextrakt oder Ammoniumsalz als Stickstoff (N) Quelle.

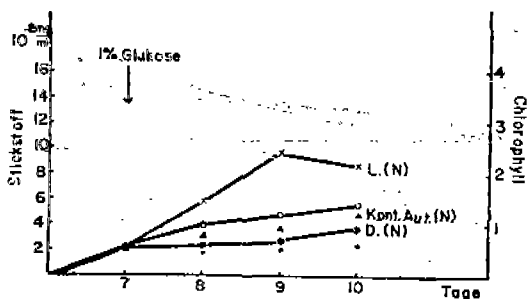


Abb. 2a. Gesamt-N und Chlorophyllhalt von 1% Glukosezugabe bei Ammoniumsalz. Bis 7 Tage lang autotroph angezogen und dann ergab sich 1% Glukose sowohl bei Licht als auch bei Dunkelversuchen. Gesamt-N im Licht (X) und Dunkel (X), Chlorophyll im Licht und Dunkel (●), als Kontrolle Chlorophyll (○) und Gesamt-N (▲) bei Autotrophanzucht

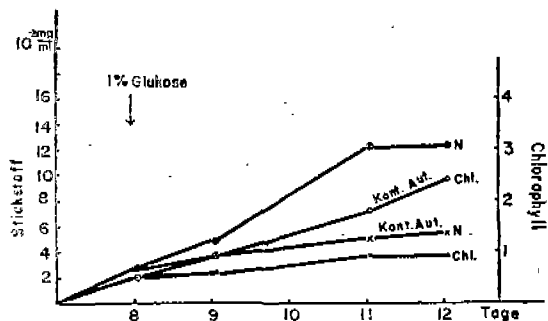


Abb. 2b. Stickstoff und Chlorophyll bei Zugabe von Glukose und Kontrolle bei Autotrophanzucht. Bis 8. Tage lang autotroph angezogen. Ergebnis: Glukose.

dennoch bei Chl. lut. nicht der Fall. Bei KNO_3 Anzucht ist die Zellvermehrung nicht so schnell etwa ein hälfte, trotzdem ist die Chlorophyllbildung gehemmt, wie (Abb. 5) zeigt. Wenn man mit der Autotrophanzucht vergleicht, sind beide Anzuchten am Tag Bezug auf Trockengewicht, Kohlenhydrat Stickstoff zunahme fast gleich, aber die Chlorophyllbildung ist bei der Mixotrophanzucht 1/6. von Autotrophanzucht. Bei NH_4Cl ist die Zellvermehrung größer als bei KNO_3 -Anzucht. Sonst sind alle Vorgänge gleich.

4. Heterotrophanzucht:

Weiterhin wollten wir beobachten, ob Chl. lut. heterotroph gut wachsen kann. Sie wächst sehr langsam und brauchte eine sehr lange Lag-Phase. Chl. lut.

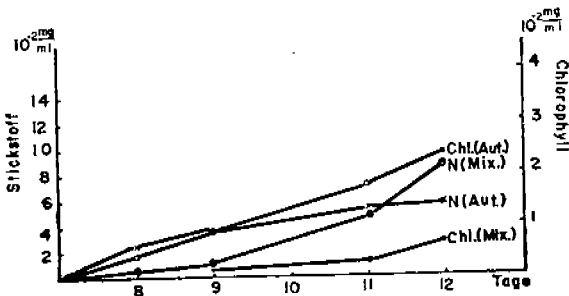


Abb. 4 Zunahme des Chlorophylls und Stickstoffs von Autotroph und Mixotrophanzucht bei Nitrat als N-Quelle.

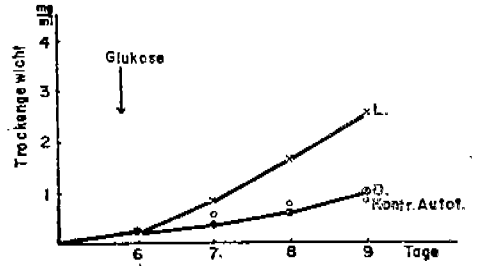


Abb. 3. Zunahme des Trockengewichts von Nitrat im Licht(x) und Dunkel(o) oder als Kontrolle(o) bei Autotrophanzucht. Bis Tage lang autotroph angezogen. Ergebnis 1% Glukose sowohl bei Licht als auch bei Dunkelversuchen.

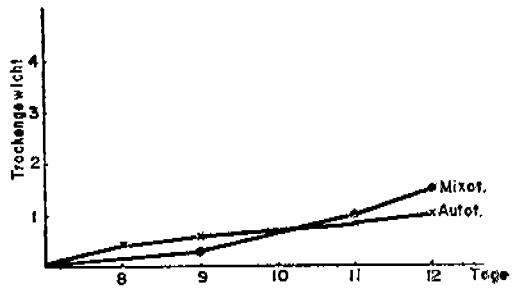


Abb. 5 Vergleich von Zunahme des Trockengewichts im Mixotroph und Autotroph bei Nitrat als N-Quelle.

bildet nicht so viel KOH, aber bildet Chlorophyll allmährlich im Dunkeln.

5. Na-Acetat

Wir wollten beobachten, ob Chl. lut. statt Glukose als C-Quelle Na-Acetat (0.5%) aufnimmt oder nicht. Sie nahmen Na-Acetat auf. Der Unterschied zwischen Glukose und Na-Acetzatzugabe bestand darin, daß es weniger Kohlenhydratbildung und Zellvermehrung bei Na-Acetat gibt als bei Glukosezugabe, nämlich etwa ein halb (Abb. 6). Aber die Chlorophyll is tgehemmt, wenn man sie mit Autotrophanzucht vergleicht (Abb. 7), obwohl die Stickstoffsynthese stärker als bei der Autotrophanzucht ist. Sonst sind andere Vorgänge ähnlich wie bei der 1% Glukoseanzucht. Wenn man sie mit Na-Acetzatzugabe gleichzeitig ins Dunkel steilt, bleiben die Algen bis zum nächsten Tag fast gleich, aber am 10. und 11. Tag nimmt das Wachstum ab und fängt danach allmährlich wieder an zu waschen. Diese Abnehmende Zeit bedeutet Adaptationszeit. Sie könnten vielleicht mit Na-Acetat im Dunkeln wie Glukosezugabe sofort nicht adaptieren. Die Chlorophyllbildung ist auch gehemmt worden und in der späteren Zeit ist etwas Chlorophyll gebildet worden. Aber mit der Autotrophanzucht ergleicht, ist es stark gehemmt worden.

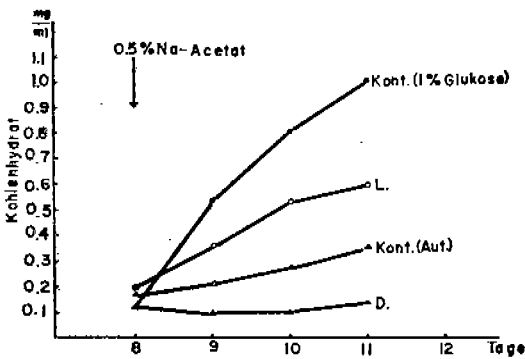


Abb. 6. Zunahme des Gesamt-Kohlenhydrats bei 0.5% Na-Acetat zugabe. Bis 8. Tage lang autotroph angezogen und dann ergab sich 0.5% Na-Acetat sowohl bei Licht als auch bei Dunkelversuchen.

ist es stark gehemmt worden.

Mixotrophanzucht mit Na-Anzucht:

Von Anfang an wurden die Algen mit Na-Acetat wachsen glassen. Wie wir oben erwähnt haben, bildeten sie nicht viel Kohlenhydrat und Zellvermehrung (Abb. 8a), ungefähr die

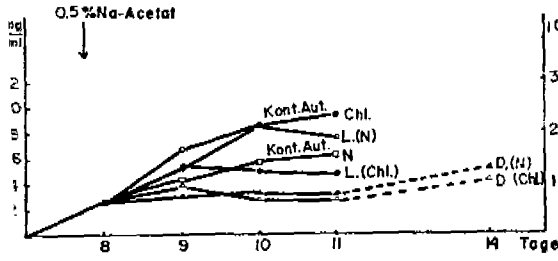


Abb. 7. Stickstoff und Chlorophyll im Licht und Dunkeln von 0,5% Na-Acetat Zugabe bei Ammoniumsalz als N-Quelle.

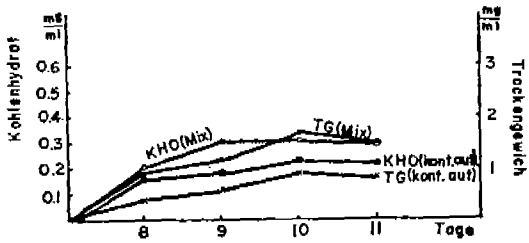


Abb. 8a. Zunahme des Kohlenhydrats und Trockengewichts von Mixotroph mit Na-Acetat bei Ammoniumsalz als N-Quelle.

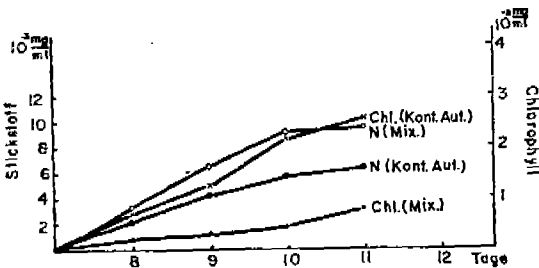


Abb. 8b. Zunahme des Chlorophylls und Stickstoffs in der Mixotrophanzucht von 0,5% Na-Acetat bei Ammoniumsalz als N-Quelle.

Hälfte von der Glukoseanzucht. Die Chlorophyllbildung ist stark verzögert (Abb. 8b).

7. Stärkegehalt:

Wir wollten beobachten, ob Stärkebildung in Chloroplasten auf die Chlorophyllbildung Einfluß hat oder nicht. Der Satz des Stärkegehalts vom Gesamtkohlenhydrat ist von Autotrophanzucht zum Glukosezugabe, von 60% zu 60% gleich und nimmt jeden Tag ab (Abb. 9). Also hat die Chlorophyllabnahme keine Beziehung zu der Stärke.

Diskussion

Chlorella luteoviridis (211. 2b) bildet im Dunkeln allmählich Chlorophyll und sie braucht eine lange Lag-Phase als im Licht. Bei Mixotrophanzucht ist die Stickstoffzunahme doppelt so hoch wie bei der Autotroph, aber die Chlorophyllbildung ist stark verzögert. Bei der Glukoseanzucht von KON_3 als Stickstoffquelle sind Zellvermehrung und KHO-Bildung nicht so stark, trotzdem ist die Chlorophyllsynthese gehemmt worden. Brawaman and Chargaff (1960) erwähnte bei Heat-Chlorosc agar-kultur von *Euglena grac.*, daß Chlorophyllabnahme auf schnelle Zellvermehrung zurückzuführen ist, weil Chloroplast-selbst-Reproduktion nicht proportional ist. Aber bei uns ist es nicht der Fall, wie wir oben erwähnt haben. Also Glukose hat den Einfluß auf die Chlorophyllabnahme.

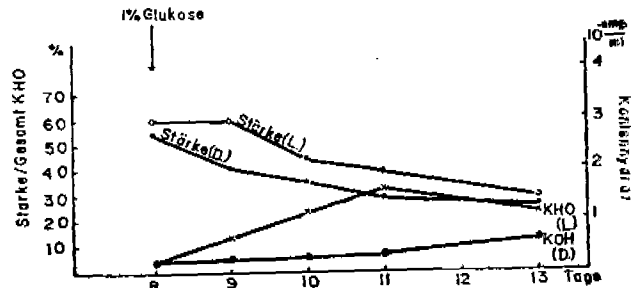


Abb. 9. Abnahme der Stärke in Prozent von Gesamtkohlenhydrat und Zunahme des Kohlenhydrat bei Ammoniumsalz als N-Quelle.

Zusammenfassung

1. Bei Anzucht von Chl. lit. im Glukosemedium wird die Stickstoffsynthese gefördert, aber Chlorophyllbildung ist nicht proportional.
2. Bei Nitratanzucht mit Glukose (Mixotroph) sind Die Zellvermehrung und KHO-Bildung nicht sehr stark wie bei der Glukoseanzucht mit NH_4Cl , trotzdem nimmt Chlorophyll ab.

摘 要

*Chlorella luteoviridis*의 Glukose-Chlorose에 대해서

1. Chl. lut.의 Glukose 배양에 있어서 Stickstoff-Synthese의 증가에 따라 Chlorophyll 생성이 동반되지 않는다는 것이다.

2. Mixotroph 배양(N-原으로서 KNO_3)에서 細胞增殖이나 炭水化物生成이 NH_4Cl 의 Mixotroph 배양에 있어서처럼 증가되지 않았으나 Chlorophyll은 減少되었다.

Literatur:

- Aach, H.G., 1952. Über Wachstum und Zusammensetzung von *Chlorella pyrenoidosa* bei unterschiedlichen Lichtstärke und Nitratmengen. Arch. Mikrob. **17**, 13—46.
- Arnon, D.I., 1961. Cell-free photosynthesis and the energy conversion process In: Light and Life S. 489. (ed. by Elroy, W.D. and Glass, B.)
- Badour, S.S.A., 1961. Kennzeichnung von Mineralsalz-mangelzuständen bei Grünalgen mit analytisch-chemischer Methodik. II. Phosphat-Fraktion bei Kaliummangel im Vergleich mit Mg und Manganmangel. Flora (Jena) **151**, 99—119.
- Bergmann, L., 1955. Stoffwechsel und Mineralsalz ernährung einzelliger Grünalgen. II. Vergleichende Untersuchungen über den Einfluß mineralischen Faktoren bei heterotropher und mixotropher Ernährung. Flora (Jena) **14**, 493—539.
- Bonner, J., 1950. Plant Biochemistry, Acad. Press inc. N. Y. 1,
- Brawerman, G., and Chargaff, E., 1960. A self-reproducing system concerned with the formation of chloroplasts in *Euglena grac.* Bioch. Biophys. Acta **37**, 1—9.
- Egle, K., 1960. Biologischer Chlorophyllabbau. In: Handbuch der Pflanzenphysiologie Bd. V/1 354.
- Finkel, B.J., and Appleman, D., The effect of Mg concentration on chlorophyll and catalase development in *Chlorella*. Plant Phys. **8**, 65—663.
- Gibor, A., and Granick, S., 1962. The plastid system of normal and bleached *Euglena grac.* J. Protozool.
- Jagendorf, A.T., 1965. Purification of chloroplasts by density technique. Plant Physiol. **30**, 138—.
- Kandler, O., u. Schütz, F., 1956. Untersuchungen über die Photooxydative Farbstoffzerstörung und Stoffwechselhemmung bei *Chlorella* Mutanten und panaschierten *Oenotheren*. Z. Naturforsch. **11b** 708—718.
- Kuhl, A., 1962. Zur Physiologie der Speicherung kondensierter anorg. phosphate in *Chlorella*. In: BeitSäge zur Physiologie und Morphologie der Algen. S. 157—166.
- Lorenzen, H., 1959. Die photosynthetische Sauerstoffproduktion von *Chlorella* bei langfristiger intermittierender Belichtung. Flora (Jena) **147**, 382—404.
- Mackinney, G., 1941. Absorption of light by chlorophyll solutions. J. Biol. Chem. **140**, 315—322.
- Myers, J.U., and Johnston, J.A., 1949. Carbon and nitrogen balance of *Chlorella* during growth. Plant physiol. **24**, 111—119.
- Pirson, A., 1955. Function aspects in mineral nutrition of greenplants. Ann. Rev. Plant Physiol. **6**, 71—114.
- 1956. Stoffwechsel organischer Verbindungen 1. Photosynthese. Fortsch. Bot. **19**, 35—.
- Pringsheim, E.G., 1963. Farblose Algen. Gustav Fischer verl. Stuttgart.
- Roe, J.H., 1955. Determination of sugar in blood and spinal fluid with anthronereagent. J. Biol. Chem. **1**, 335—343.
- Schlegel, H.G., 1956. Die Verwertung organischen Säuren durch *Chlorella* im Licht, Planta **47**, 510—516.
- Tamiya, H. Morimura, Y. and Yokota, M., 1962. Effects of various antimetabolites upon the life cycle of *Chlorella*. Arch. Mik. **4**, 4—16.
- Taylor, F.J., The absorption of glucose by *Scenedesmus quadricanda* Proc. Roy. Soc. **151**, 400—418. Wolf, C., 1965 Göttingen Dissertation.