

# グルコン酸鉄の添加による *Eucampia zodiacus* の培養試験

大山憲一・吉松定昭

Cultivation of the diatom *Eucampia zodiacus* by the addition of ferrous gluconate

Kenichi OYAMA and Sadaaki YOSHIMATSU

資料

## グルコン酸鉄の添加による *Eucampia zodiacus* の培養試験

大山憲一・吉松定昭

Cultivation of the diatom *Eucampia zodiacus* by the addition of ferrous gluconate

Kenichi OYAMA and Sadaaki YOSHIMATSU

To understand the influence of Fe on the growth of *Eucampia zodiacus*, which causes discoloration of nori *Porphyra yezoensis* cultures, *E. zodiacus* was cultivated in the presence of ferrous gluconate. No difference was observed in the growth of *E. zodiacus* between cultures with and without ferrous gluconate. As a result, the starved culture did not provide sufficient data to calculate the growth parameters. However, the culture without ferrous gluconate declined the first among the cultures. The culture rapidly declined over the course of one day. This suggested that the factors necessary for growth were lacking after 11-12 days. Hence, the lack of Fe was assumed to influence the growth of *E. zodiacus*. With an increase in ferrous gluconate, the specific growth rate and maximum fluorescence tended to become lower, indicating that *E. zodiacus* could utilize ferrous gluconate to a certain extent, but that Fe had a negative effect at excess concentration or those factors other than Fe influenced the growth of *E. zodiacus*.

キーワード：グルコン酸鉄, *Eucampia zodiacus*, 増殖応答, ノリ色落ち

ノリ養殖業は香川県の基幹漁業の1つであるが、2002年度以降毎年のようにノリ色落ち現象が発生し、乾ノリ生産枚数は盛期（1992～2001年度平均）の38～80%にまで減少している<sup>1)</sup>。ノリ色落ちの原因の1つとして、香川県を含む瀬戸内海東部海域では海水中の栄養塩、主として溶存態無機窒素（DIN）の不足が挙げられている<sup>2)</sup>。しかしながら2008年度は、漁期当初から低い栄養塩レベルで推移したのにも関わらず、比較的品質のよいノリが漁期終盤まで生産できた地区が多くみられた<sup>3)</sup>。これはDIN以外にもノリの育成に重要な影響を及ぼす要因があることを示唆している。

ところで鉄（Fe）は、植物体内の電子伝達系で働くチトクロームなどのヘムタンパク質の構成成分として細胞呼吸に重要な役割を担うとともに、植物の葉緑素の合成に必要な不可欠な元素である<sup>4)</sup>。沿岸域の海水中の溶存態Fe濃度はおおむね1～5 μg/L前後である<sup>4)</sup>が、ノリ・植物プランクトンなど藻類の成長・増殖を支える量としては不十分と思われ、外洋域のみならず沿岸域においても一次生産の制限因子と考えられている<sup>5-6)</sup>。さらに、溶存態Feの大部分は有機配位子と結合しているため、一般に植物プランクトンが利用可能となる溶存態の無機Fe濃度は極めて低い<sup>7)</sup>。張ら<sup>8)</sup>は、有明海

の色落ちノリを分析した結果、窒素（N）、リン（P）に加えて微量元素のFe、亜鉛（Zn）、マンガン（Mn）、銅（Cu）の欠乏がノリ色落ちに直接関わっていると、特にFeの欠乏とノリ色落ちの関係を論じている。また、山本ら<sup>9)</sup>は、フルボ酸鉄の供給が磯焼け回復に効果があることを北海道日本海沿岸の磯焼け海域の海岸における現場試験で確認している。これらのことから、現在養殖ノリの色落ち対策として、Feの漁場への供給が検討されている。その半面、栄養塩・微量元素をめぐってノリと競合する植物プランクトンの増殖を促進させるマイナス効果も懸念され、実施にあたってはノリとともに植物プランクトンの増殖に及ぼすFeの影響を把握しておく必要がある。

瀬戸内海東部海域でノリ色落ちを引き起こした珪藻として *Coscinodiscus wailesii*<sup>10)</sup>、*Eucampia zodiacus*<sup>11)</sup>、*Thalassiosira diporocyclus*<sup>12)</sup> および *Chaetoceros densus*<sup>13)</sup> が報告されているが、本研究では頻繁に被害を起こしている *E. zodiacus* を対象として、その増殖に及ぼすFeの影響を把握することを目的として、フルボ酸鉄と同様の有機酸鉄であるグルコン酸鉄を用いて培養試験を行った。

## 材料および方法

### 供試株

2009年10月6日に香川県東かがわ市三本松沖の播磨灘で採集し、マイクロピペット洗浄法<sup>14)</sup>により単離した*E. zodiacus*のクローン株を用いた。供試株の継代培養にはESM培地<sup>15)</sup>を用いた。

### グルコン酸鉄に対する増殖応答試験

#### 1) 飢餓培養

飢餓培養液は、EDTA-Feおよび土壌抽出液の添加量を通常の10分の1としたFe不足ESM培地を使用した。培地に使用する海水は播磨灘南部で採水後、孔径8  $\mu\text{m}$ のMilliporeフィルターでろ過し、暗所で半年以上保存した熟成海水を用いた。試験直前に熟成海水の全Fe濃度をJFEミネラル株式会社技術研究所で測定したところ検出限界値(1 ppb)以下であり、熟成海水のFeが*E. zodiacus*の増殖応答に及ぼす影響は極めて低いと判断した。飢餓培養液150 mLをポリカーボネイト製250 mL三角フラスコ(Nalgene製)にとり、ESM培地で継代培養した対数増殖期の*E. zodiacus*を接種した。培養条件は本種が現場海域で優占し始める12月の水温15°Cとし、塩分32 psu、光強度100  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ とした。明暗周期は12hL:12hDとした。

なお、実験に使用した器具は中性洗剤に1晩以上浸漬後、5N-HClに4時間以上浸漬し、超純水で洗浄したプラスチック製のものを用いた。培地のオートクレーブ時には容器をプラスチックフィルムで二重に覆い、Feの汚染を防止した。これは以下の本培養でも同様の処理を行った。

#### 2) 本培養

基本培地にはEDTA-Feおよび土壌抽出液を無添加としたFe欠乏ESM培地を用い、飢餓培養と同様の熟成海水を使用した。本培養ではFe源として、グルコン酸鉄( $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{FeO}_{14}$ )を用いた。グルコン酸は強力なキレート剤であり、グルコン酸鉄は $\text{Fe}^{2+}$ とグルコン酸イオンがキレート配位した溶存態有機錯体である。グルコン酸鉄の原液(全Fe濃度約4万ppb, JFEミネラル株式会社技術研究所測定)を基本培地で8段階に希釈(1, 2, 4, 8, 20, 40, 100および200 ppb)した試験区およびグルコン酸鉄無添加(0 ppb)で基本培地のみの試験区の計9通りを設定した。これらの培養液をポリスチレン製ネジ口試験管(直径13 mm, 長さ100 mm, Fisher healthcare社製)に4 mLとり、飢餓培養を9日間行った*E. zodiacus*の培養液(細胞密度: 13,200 cells  $\text{mL}^{-1}$ )を1 mLずつ接種し、各試験区5本立てで本培養を行った。接種した*E. zodiacus*は対数増殖期に達したもので、細胞質の状態など通常の細胞と変わらないことを顕微鏡

下で確認した。

本培養の培養温度、塩分、光強度および明暗周期は飢餓培養と同様とし、蛍光光度計(TD-700, Turner designs社製)を用いてほぼ毎日蛍光強度を測定した。試験期間中は細胞数の計数のために試験管の蓋を開けるとFe、細菌などの汚染を招く危険性が増すうえ、試料を取り出すことで培養容量が減少することは不都合と考え、蛍光強度を測定することにより*E. zodiacus*のバイオマスの指標とした。測定する蛍光は植物細胞が有するクロロフィルaが発するもので、本種を飢餓培養し、対数増殖期の細胞を希釈して6段階の溶液を作成し、蛍光光度計で蛍光強度を測定するとともに細胞数を計数して蛍光強度と細胞数の関係を求めた(Fig. 1)。両者の間には有意な正の相関関係が認められたので( $r = 0.999$ ,  $p < 0.01$ )、対数増殖期の細胞について蛍光強度から細胞数を見積もることが可能であると判断した。

Fig. 1より蛍光強度から求めた細胞数を次式にあてはめ、対数増殖期の値について最小自乗法により比増殖速度( $\mu$ )を算出した。

$$\mu = 1 / \Delta t \cdot \ln (N_t / N_0)$$

$\Delta t$ : 対数増殖の期間 (days)

$N_0$ : 対数増殖初期の細胞数 (cells  $\text{mL}^{-1}$ )

$N_t$ : 対数増殖終期の細胞数 (cells  $\text{mL}^{-1}$ )

なお、対数増殖期の期間は蛍光強度を片対数グラフにプロットした時に得られる直線部分とした。

## 結果

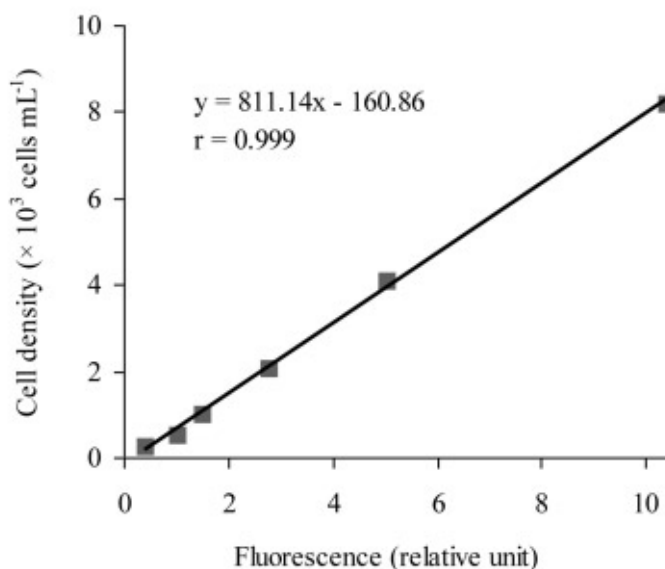


Fig. 1. Relationship between *in vivo* chlorophyll a fluorescence and cell density of *Eucampia zodiacus*.

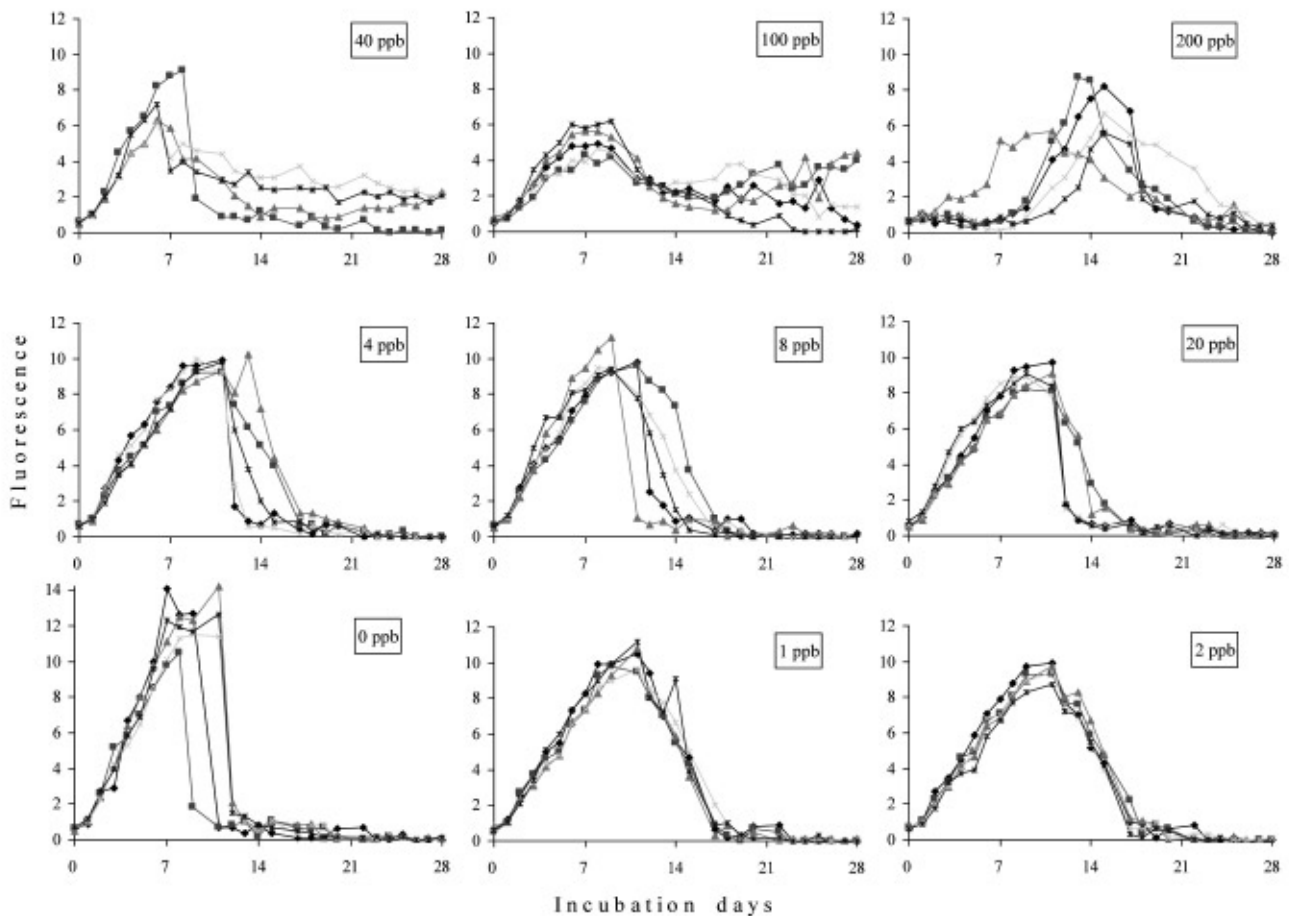
グルコン酸鉄に対する*E. zodiacus*の増殖曲線をFig. 2に、グルコン酸鉄濃度と比増殖速度の関係をFig. 3に、グルコン酸鉄濃度と最大蛍光強度の関係をFig. 4にそれぞれ示す。なお、グルコン酸鉄40 ppb添加区において増殖が不調であった系の1つは、解析の対象外とした。また、グルコン酸鉄100 ppb添加区では、一部の系で衰退期以降に増殖再び増殖したが、比増殖速度および最大蛍光強度には影響ないと考え、解析の対象とした。

グルコン酸鉄無添加 (0 ppb) を含め、全ての試験区で*E. zodiacus*の増殖が確認された。増殖のピークは、グルコン酸鉄0~100 ppbで試験開始後概ね7~10日目であったのに対し、200 ppbでは11~15日目であった。0 ppbでは定常期間が短く、9~12日目に急激に衰退した。対数増殖期の期間は200 ppb以外の試験区では約4日間であったが、200 ppbでは約14日間と最も長かった。比増殖速度はグルコン酸鉄0~100 ppbで0.6 day<sup>-1</sup>前後で、0 ppbが0.67 day<sup>-1</sup>と最も速かった。最も遅かった

のは200 ppbの0.18 day<sup>-1</sup>であった。最大蛍光強度はばらつきが大きかったものの、グルコン酸鉄の増加とともに減少する傾向が見られた。最大蛍光強度は0 ppbのときに最も高く、最も低かった100 ppbの2.5倍の値を示した。

## 考 察

植物プランクトンのFe利用能に関する研究では、水溶液中の組成と濃度を完全に把握できる化学合成培地が必須である<sup>7)</sup>が、今回対象種とした*E. zodiacus*は、未だに完全人工合成培地による培養に成功していない種である。したがって、本種の培養には天然海水をベースとした培地の使用が一般的であり<sup>10)</sup>、我々も天然海水に土壌抽出液等を添加したESM培地をベースに使用した。飢餓培養ではEDTA-Feおよび土壌抽出液の添加量を通常の10分の1としたFe不足ESM培地を、本培養ではEDTA-Feおよび土壌抽出液を無添加としたFe欠乏ESM培地を用いたが、グルコン酸鉄無添加



**Fig. 2.** Growth curves of *Eucampia zodiacus* at different Fe concentrations (in the form of ferrous gluconate). The ESM medium was used. The medium lacked iron, except for that present in the soil extract and EDTA-Fe. The cultivation was performed at 15°C, with 100  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  of light intensity, and 12 h L : 12 h D light cycle.



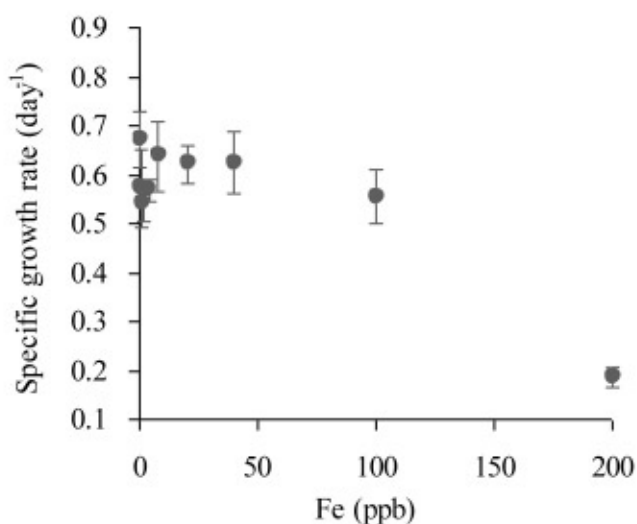


Fig. 3. Specific growth rate of *Eucampia zodiacus* at different Fe concentrations (in the form of ferrous gluconate). Bars indicate standard deviation.

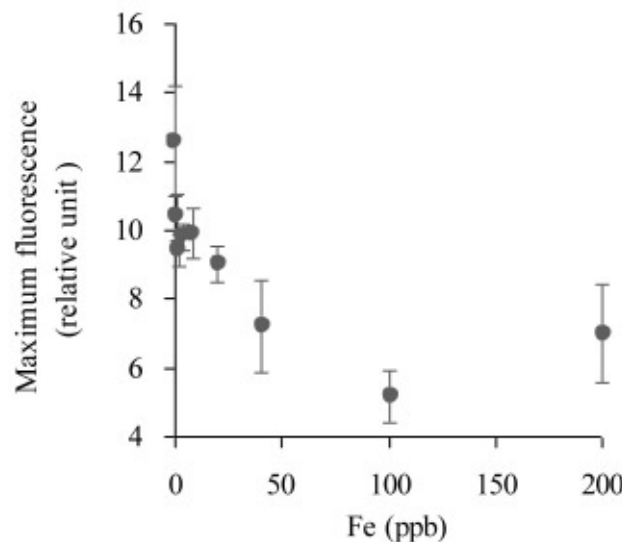


Fig. 4. Maximum fluorescence of *Eucampia zodiacus* at different Fe concentrations (in the form of ferrous gluconate). Bars indicate standard deviation.

(0 ppb) を含め、全ての試験区で *E. zodiacus* の増殖が確認されたことは、増殖応答試験の前提である飢餓培養に問題があったといえ、本試験では半飽和定数 ( $K_m$ )、最大増殖速度 ( $V_{max}$ ) などのパラメーターを求めることができなかった。本結果から Fe の現場海域への供給による本種の増殖への影響を評価することは難しいが、全試験区の中で 0 ppb での増殖が最も速く衰退し、しかも衰退期間がほぼ 1 日と極めて短期間であったことは、培養 11~12 日目には増殖に必要な因子が欠乏した結果、増殖が不能となったと考えられ、Fe の欠乏が *E. zodiacus* の増殖に影響を与えていたと推察された。また、グルコン酸鉄の添加に伴って *E. zodiacus* の比増殖速度は低下し、最大蛍光強度も低下する傾向がみられたことから、*E. zodiacus* はグルコン酸鉄をある程度利用できるが、過剰になると増殖に悪影響を及ぼす可能性や、グルコン酸鉄に含まれる Fe 以外の要因が本種の増殖へ影響を及ぼす可能性も考えられた。

本研究では Fe 源としてグルコン酸鉄を用いたが、珪藻の中にはコロイド状やさらに大きな懸濁態の  $Fe(OH)_3$  を利用する種やキレート鉄を利用しない種が報告されており<sup>4)</sup>、今後の課題として海水中に存在する様々な形態の Fe に対する *E. zodiacus* の利用特性を明らかにする必要がある。そのためには完全人工培地の開発や Fe 汚染のないクリーンルームでの試験などにより、精度の高いデータを得ることが必要である。

## 謝 辞

本研究を行うにあたり、グルコン酸鉄の提供と鉄濃度の測定をしていただいた JFE ミネラル株式会社技術研究所金子諒子氏および培養実験に関する有益な助言をいただいた広島県立大学内藤佳奈子助教に感謝します。本研究は、経済産業省関東経済産業局委託事業「製鋼スラグを用いた藻場造成による  $CO_2$  固定化技術開発と川崎市における実証モデル事業」により行った。

## 文 献

- 1) 中国四国農政局香川統計情報事務所：1994-2008, 香川水産統計年報。中国四国農政局香川統計情報事務所, 香川。
- 2) 松岡 聡・吉松定昭・小野 哲・一見和彦・藤原宗弘・本田恵二・多田邦尚：2005, 備讃瀬戸東部（香川県沿岸）におけるノリ色落ちと水質環境。沿岸海洋研究, **43**, 77-84。
- 3) 藤原宗弘・山賀賢一：2010, 平成20年度ノリ養殖概況。平成20年度香水試事報, 55-58。
- 4) 門谷 茂・岡市友利：1997, 鉄およびその吸収機構。赤潮の科学第二版（岡市友利編），恒星社厚生閣，東京，pp. 227-239。
- 5) Boyd, P. W., T. Jickells, C. S. Law, S. Blain, E. A. Boyle, K. O. Buesseler, K. H. Coale, J. J. Cullen, H. J. W. de Baar, M. Follows, M. Harvey, C. Lancelot, M. Levasseur, N. P. J. Owens, R. Pollard, R. B. Rivkin, J. Sarmiento, V. Schoemann, V. Smetacek, S. Takeda, A. Tsuda, S. Turner,

- A. J. Watson : 2007, Mesoscale iron enrichment experiments 1993-2005: Synthesis and future directions, *Science*, **315**, 612-617.
- 6) Hutchins, D. A., K. W. Bruland : 1998, Iron-limited diatom growth and Si:N uptake ratios in a coastal upwelling regime, *Nature*, **393**, 561-564.
- 7) 内藤佳奈子 : 2007, 有害有毒赤潮の発生における制限要因としての鉄の役割. 海洋と生物, **29**, 432-436.
- 8) 張 経華・佐藤友規・丸山亮馬・高尾雄二・畝中 佑・藤田雄二・山崎素直 : 2009, 有明海のノリの色落ちと微量元素欠乏—特に鉄欠乏について—. 日本海水学会誌, **63**, 158-166.
- 9) 山本光夫, 濱砂信之, 福嶋正巳, 沖田伸介, 堀家茂一, 木曾英滋, 渋谷正信, 定方正毅 : 2006, スラグと腐植物質による磯焼け回復技術に関する研究. 日本エネルギー学会誌, **85**, 971-978.
- 10) Manabe T, Ishio S. : 1991, Bloom of *Coscinodiscus wailesii* and DO deficient of bloom in Seto Inland Sea. *Mar. Poll. Bull.*, **23**, 181-184.
- 11) 西川哲也 : 2002, ノリの色落ち原因藻 *Eucampia zodiacus* の増殖に及ぼす水温, 塩分および光強度の影響. 日水誌, **68**, 356-361.
- 12) Miyahara K, Nagai S, Itakura S, Yamamoto K, Fujisawa K, Iwamoto T, Yoshimatsu S, Matsuoka S, Yuasa A, Makino K, Hori Y, Nagata S, Nagasaki K, Yamaguchi M, Honjo T. : 1996, First record of a bloom of *Thalassiosira diporocyclus* in the Eastern Seto Inland Sea. *Fish. Sci.*, **62**, 878-882.
- 13) 大山憲一・吉松定昭・本田恵二・安部享利・藤沢節茂 : 2008, 2005年2月に播磨灘から備讃瀬戸に至る香川県沿岸域で発生した大型珪藻 *Chaetoceros densus* のブルーム: 発生期の環境特性とノリ養殖への影響. 日水誌, **74**, 660-670.
- 14) 岩崎英雄 : 1967, 微細藻類の分離と培養. 日本水産資源保護協会, 東京. 1-55.
- 15) 国立環境研究所 : 2004, NIES-Collection. List of Strains Seventh Edition Microalgae and Protozoa 2004. 国立環境研究所研究報告, **182**, 54.

も衰退期間がほぼ1日と極めて短期間であったことは、培養11~12日目には増殖に必要な因子が欠乏した結果、増殖が不能となったと考えられ、Feの欠乏が *E. zodiacus* の増殖に影響を与えていたと推察された。また、グルコン酸鉄の添加に伴って本種の比増殖速度は低下し、最大蛍光強度も低下する傾向がみられたことから、本種はグルコン酸鉄をある程度利用できるが、過剰になると増殖に悪影響を及ぼす可能性や、グルコン酸鉄に含まれるFe以外の要因が本種の増殖へ影響を及ぼす可能性も考えられた。

## 要 旨

ノリ色落ち被害の要因の1つである *Eucampia zodiacus* を対象として、その増殖に及ぼすFeの影響を把握することを目的として、グルコン酸鉄を用いた培養試験を行った。グルコン酸鉄無添加の区でも添加区と同様に増殖するなど、飢餓培養が不十分で増殖に関するパラメーターを求めることはできなかった。しかし、グルコン酸鉄無添加の区が最も速く衰退し、しか