

人工海水による微細藻類の培養と生物濃縮における有機酸の影響

岩田吉弘、渡邊康平

秋田大学教育文化学部
010-8502 秋田市手形学園町 1-1

1 はじめに

海産生物は海水中の物質移動に大きな役割を果たしている^{1,2}。海産藻類中の元素存在量は、藻類が全ての栄養を直接海水から得ていることと、藻類が海洋における第一次生産者である点から大変興味深い。著者らは、この役割を定量的に評価するため、PIXE分析法により、おもに海産藻類中の主要および微量元素の定量をおこない、藻類による微量金属の生物濃縮を調べ、微量金属の濃縮係数を求めてきた³⁻⁵。

培養液として、天然海水、精製海水、人工海水および精製人工海水にそれぞれ栄養塩強化液を添加して用いた。その結果、藻類による Mn^{2+} 、 Fe^{3+} および Zn^{2+} の濃縮係数が、海水をベースにした培養液に比べ、人工海水を用いると1/50-1/300に減少することを報告した^{6,7}。

本研究では、人工海水に含まれていない物質として有機物に着目した。天然の海水に含まれる有機物は、無機物に比べると量は少ないものの、微量元素の移動に大きな役割を果たすとされ、なかでも有機酸や腐食物質の影響が大きいとされている^{2,8}。そこで、有機酸としてニトリロ三酢酸(NTA)およびイミノ二酢酸(IDA)、腐食物質としてフミン酸をそれぞれモデルとした。これら有機酸を精製人工海水にPESと共に添加し、藻類中の元素組成に対する影響を調べたので報告する。

2 実験

2.1 精製人工海水培養液の調製

純水1 Lあたり Reef Salt (Sea chem社, 熱帯魚用) 34 gを溶解して人工海水を調製した。35 mLのChelex100をカラムに充填し、人工海水を滴下した。初めの溶離液200 mLを廃棄し、その後の溶離液10 Lを精製人工海水とした。精製人工海水に体積割合20%の純水で希釈し、希釈海水250 mLに栄養強化液としてPES⁹を4 mL添加、pHを7.8~8.0に調整し、精製人工海水培養液(Purified Artificial Seawater)とした⁷。

2.2 海産微細藻類の培養

海産藻類(真正眼点藻綱)の*Nannochloropsis sp.* (以下藻類)は、岩手県釜石市の岩手県海洋技術センターから提供され、著者の研究室で継代培養された。藻類は球形で直径2 - 4 μm であった。培養液は使用直前に2気圧、120°Cで2時間の加圧滅菌を行った。継代培養では、培養液250 mLに20 mLの藻類の保存溶液を新しい培養液に移し、22.0°C、3200 lux (12時間明暗)の密閉培養した。藻類の細胞数はビルケルチュルク血球計算版と光学顕微鏡を用いて計数した。

2.3 培養液への有機酸の添加

0.3 M NTA溶液は、ニトリロ三酢酸(特級、ナカライテスク)を、1 M水酸化ナトリウムを加えながら純水に溶解し、pH 7.8の水溶液に調製した。0.3 M IDA溶液は、イミノ二酢酸二ナトリウム一水和物(特級、和光純薬)を純水に溶解し、調製した(pH 7.8)。1-2 $\times 10^7$ cell/mLの藻類をふくむ精製人工海水培養液に、NTA、IDA濃度がそれぞれ、0.004および0.02 mol/Lとなるように添加し、18時間インキュベーションして

分析試料とした。

2.4 培養液へのフミン酸の添加

フミン酸（化学用、和光純薬）1 gを純水100 mLに混合し、攪拌しながら1 M水酸化ナトリウム水溶液を添加し、pH 7.9に調整する。この懸濁液を孔径0.45 μm のメンブランフィルターで吸引ろ過し、ろ液をフミン酸水溶液とした。ろ液の蒸発残渣は0.29 mg/mLであった。1.2 $\times 10^7$ cell/mLの藻類をふくむ精製人工海水培養液に、フミン酸濃度が、0.0038あるいは0.0218 mg/mLとなるようにフミン酸水溶液を添加し、18時間インキュベーションして分析試料とした。

2.5 PIXE分析法による藻類の元素分析

藻類分析用ターゲットは、培養液5 mLをニュークリポア・ポリカーボネートフィルター(25 mm ϕ 、孔径1.0 μm)で吸引ろ過し、風乾し、Mylar製のターゲットフレームにマウントして調製した。吸引ろ過した藻類の質量を求めるため、別に培養液25 mLを吸引ろ過し、85°Cで20分乾燥し、質量を測定した。

ターゲットはNMCCサイクロトロンからの2.9MeVのプロトンビーム（2 mm径、電流値 30 - 60 nA、電荷量 20 - 60 μC ）で照射された。発生するX線はSi(Li)半導体検出器で測定し、スペクトルは非線形最小自乗プログラム(SAPIX)で解析された^{10,11}。フィルター上の藻類の乾燥重量を測定し、藻類中の元素濃度 ($\mu\text{g/g}$)を求めた。有機酸等を添加した試料の場合は、ターゲット上の硫黄 (S) の元素存在量を5,000とし、他の元素の相対存在度をもとめた。

3 結果と考察

3.1 背景

これまでの研究では、微細藻類は、海水に栄養塩を添加した栄養強化海水中で培養された。海水は、岩手県釜石市の太平洋岸から採取し、岩手県海洋技術センターで0.5 μm のフィルターハウジングでろ過されたろ過海水を使用してきた。しかし2011年3月の東日本大震災で岩手県海洋技術センターが罹災したため、ろ過海水の入手が困難となった。そこで前報では、熱帯魚飼育用の人工海水に栄養塩を添加した培養液を調製し、海産藻類と動物プランクトンのワムシの培養を試みた。PIXE分析法を用い、藻類およびワムシの元素分析をおこない、培養液による元素組成の違いを報告した⁶。

つぎに培養液中の微量金属濃度の正確さを向上させ、精度の高い藻類による微量金属の濃縮係数を求めることを試みた。人工海水を弱陽イオン交換樹脂（キレート樹脂）のChelex100で遷移金属イオンをあらかじめ除去し、栄養塩と微量遷移金属を正確量添加した培養液を準備した。この培養液に Mn^{2+} 、 Fe^{3+} および Zn^{2+} の標準溶液を添加し、藻類を培養しPIXE分析した。得られた金属の濃縮係数は50から300と小さく、鉄および亜鉛では、ろ過海水をベースの培養液を用いた場合と比べ、1/50-1/300の値となった。一方精製ろ過海水と精製人工海水で培養した藻類中のカルシウム含有量は、それぞれ600 ppmと3000 ppmと大きく異なっていた。人工海水の場合は、何らかの理由でカルシウムが遷移金属イオンの吸着サイトを占有し、濃縮係数が小さくなることが示唆された⁷。

本研究では、カルシウムと安定な水溶性の錯体を形成するキレート試薬であるNTA、IDAを培養液に添加し藻類の元素存在度の影響を調べた。また錯体が水圏における金属イオンの溶存態の1つとして重要とされるフミン酸⁸についても、同様に調べた。

3.2 藻類に対するNTAおよびIDAの成長阻害

NTAは洗剤ビルダー、硬水軟化剤、界面活性剤の添加剤として広く利用されているため、緑藻類への毒性が調べられている。緑藻類*Pseudokirchneriella subcapitata*への成長阻害試験では、72時間無影響濃度(NOEC)は300 $\mu\text{g/L}$ とされている¹²。本研究では藻類中の主要な無機元素であるカルシウムに対するNTAの影響を調べるため、NOECの2000倍以上培養液に添加する。そのため藻類の培養液にNTAおよびIDAを添加した場合の細胞数の変化を調べた。NTA無添加の場合は、1.8 $\times 10^7$ cell/mLから18時間後に2.0 $\times 10^7$ cell/mLにわずかに増加したが、0.004 mol/L (670 mg/L)では1.5 $\times 10^7$ cell/mLに、0.02 mol/L (3.8 g/L)では1.3 $\times 10^7$ cell/mLに減少した。一方、IDAでは、いずれの添加量（モル濃度）でも40時間まで成長阻

害は観察されなかった。いずれの場合でも、PIXE 分析に必要な細胞数は確保できた。しかし NTA 添加においてインキュベーション中に細胞数の変化が認められたので、元素存在度の比較においては、硫黄 (S) の存在度を 5000 とした各元素の相対存在度 (重量比) で評価することとした。

3.3 NTA および IDA の藻類の元素存在度に対する影響

有機酸の NTA はキレート剤としてはたらし、多くの金属元素と安定な水溶性の錯体を形成する。全生成定数 β_1 は例えば、 $Mg^{2+} : \log \beta_1 = 5.43$ 、 $Ca^{2+} : \log \beta_1 = 6.45$ 、 $Fe^{3+} : \log \beta_1 = 15.9$ 、 $Zn^{2+} : \log \beta_1 = 10.66$ である。また IDE もキレート剤で、 β_1 は例えば、 $Mg^{2+} : \log \beta_1 = 2.94$ 、 $Ca^{2+} : \log \beta_1 = 2.59$ 、 $Fe^{3+} : \log \beta_1 = 11.1$ 、 $Zn^{2+} : \log \beta_1 = 7.2$ である¹³。精製人工海水培養液に NTA あるいは IDE を 0.004、0.02 mol/L 添加し、藻類を 18 時間インキュベートし PIXE 分析した結果を Table 1 に示す。結果は、藻類中の硫黄 (S) を 5000 としている。

Table 1. PIXE analysis for marine micro algae* incubated by purified artificial seawater containing chelating reagent

		Relative elemental abundance in micro algae (S = 5000, based on dry weight)					
Purified Artificial Seawater (n=3)		NTA : Nitrioltriacetic acid		IDE : Iminodiacetic acid			
		0.004 mol/L (n=4)	0.02 mol/L (n=4)	0.004 mol/L (n=4)	0.02 mol/L (n=3)		
Na	38000 ± 8000	43000 ± 2000	42000 ± 12000	33000 ± 10000	29000 ± 16000		
Mg	6200 ± 600	7900 ± 200	7300 ± 1900	6500 ± 1700	6600 ± 1800		
Si	580 ± 380	1200 ± 500	5400 ± 200	ND	1100 ± 300		
P	6900 ± 380	7400 ± 500	6700 ± 400	6700 ± 800	8700 ± 500		
S	<u>5000</u>	<u>5000</u>	<u>5000</u>	<u>5000</u>	<u>5000</u>		
Cl	60000 ± 4000	69000 ± 10000	58000 ± 12000	52000 ± 10000	39000 ± 18000		
K	5000 ± 1500	6700 ± 500	6300 ± 400	7100 ± 600	8400 ± 500		
Ca	2300 ± 200	2300 ± 200	2300 ± 400	1900 ± 400	1700 ± 500		
Cr	48 ± 17	95 ± 71	55 ± 10	13 ± 10	24 ± 11		
Mn	100 ± 12	95 ± 24	90 ± 6	71 ± 13	84 ± 16		
Fe	770 ± 380	650 ± 20	540 ± 20	650 ± 80	730 ± 10		
Ni	14 (n=2)	17 ± 5	15 ± 4	13 ± 40	130 ± 3		
Zn	250 ± 60	170 ± 10	170 ± 10	130 ± 20	140 ± 3		
Sr	42 ± 10	45 ± 12	42 ± 10	54 ± 19	53 ± 26		

* *Nannochloropsis sp.*

PIXE 分析によりキレート剤を添加しなかった場合をふくめ藻類中の主要から微量の 13-14 元素が定量できた。ケイ素は再現性に乏しかったが、他の元素は、繰り返し誤差で数%から大きくとも 30%と再現性良く定量が得られた。精製人工海水培養液中には、 Mg^{2+} 0.043 mol/L、 Ca^{2+} 0.0087 mol/L それぞれ含有しており、添加したキレート剤は、0.02 mol/L まで添加している。NTA と Mg^{2+} 、 Ca^{2+} との安定度定数の大きさからすると、培養液の Ca^{2+} の大部分は錯体となっていると予想される。しかし藻類中のマグネシウム、カルシウムの含有量は、キレート剤の種類や量にかかわらず、無添加の場合と誤差範囲で一致した。これは藻類中のほとんどの金属元素でも同様で有り、藻類中で金属元素は安定な形で取り込まれていることが示唆された。 Zn^{2+} は、キレート剤と大きな安定度定数を持っており、藻類中の亜鉛の含有量は、NTA 添加で約 30%、IDA 添加で約 45%減少した。IDA は NTA より Zn^{2+} に対して小さな生成定数を持っているが、影響は大きかった。これは IDA が NTA より Mg^{2+} 、 Ca^{2+} に対して小さな生成定数を持つため、IDA が Zn^{2+} により反応しやすかったためと考えられる。 Fe^{3+} は NTA、IDA とともに極めて大きな生成定数を持つが、藻類中の鉄の元素存在度に明確な影響を見いだせなかった。 Fe^{3+} は Zn^{2+} より安定な形で取り込まれていると想像される。このように水溶性の金属錯体の存在は、微量金属の取り込みに影響を与える可能性を示唆しており、今後の検討を行いたい。

3.4 フミン酸の藻類の元素存在度に対する影響

海水中に腐食物質は 0.06~0.6 mg/L 含まれているとされ、その主成分のフミン酸は生物地球化学的な反応に寄与し、物質移動を支配する一因とされている⁸。海水中のフミン酸の構造、溶存状態は多様であるため、今回は一般に入手しやすい試薬のフミン酸を用いた。フミン酸は、腐食物質のうち 0.1M の NaOH 溶液に可溶で、1M の塩酸に不溶なものと定義されているが⁸、今回はろ過による試料調製を考慮し、海水の pH7.9 に懸濁させ、孔径 0.45 μ m のメンブランフィルターを通過する分画を添加することとした。今回用いたフミン酸のうち分画は全体の約 3%であった。フミン酸を添加した精製人工海水培養液で 18 時間インキュベートし、PIXE 分析した結果を Table 2 に示す。結果は、藻類中の硫黄 (S) を 5000 としている。各培養条件で 3・4 枚のターゲットを分析したが、標準偏差は省略している。

PIXE 分析によりフミン酸を添加しなかった場合をふくめ藻類中の主要から微量の 14 元素が定量できた。ナトリウム、ケイ素、塩素は再現性が少なかった。キレート剤では効果が見られなかったカルシウムは、フミン酸の添加とともに増加の傾向が見られた。微量金属においても同様の傾向があり、クロム、鉄、ストロンチウムは増加の傾向で、亜鉛は減少の傾向があった。

今回は限定的な検討であったが、フミン酸は、藻類中の元素組成に変化をもたらす可能性が見いだされ、海洋での物質移動で重要な役目を果たすポテンシャルを有することが確認できた。

謝辞

本研究を進めるにあたり御協力下さった、日本アイソトープ協会仁科記念サイクロトロンセンターのスタッフに感謝申し上げます。

文献

- 1、 W. S. BROECKER, Chemical Oceanography, Harcourt Brace Jovanovich Inc., 1974.
- 2、 F. J. MILLERO, Chemical Oceanography 3rd ed., CRC press. 2006.
- 3、 Y. IWATA, J. Radioanal. Nucl. Chem., 249(2001)343
- 4、 岩田吉弘、佐藤専、佐々木裕美子、伊藤亮、倉町宏治、NMCC 共同利用研究成果報文集 10, 162 (2002).
- 5、 Y. IWATA, A.SATO, Y. SASAKI, R. ITO, and K. KURAMACHI, J. Radioanal. Nucl. Chem., 264 (2005) 295.
- 6、 岩田吉弘、高橋祥子、NMCC 共同利用研究成果報文集 19, 146 (2012).
- 7、 岩田吉弘、陳妍禎、高橋皓介、NMCC 共同利用研究成果報文集 21, 208 (2014) .
- 8、 石橋良志ら編著、環境中の腐食物質、三共出版、2008.
- 9、 L. PROVASOLI, Proceeding of US - Japan Conference, Cultures and Collection of Algae, ed. by A. WATANABE, A. HATTORI, p63, Japan Society of Plant Physiology (1968).
- 10、 K. SERA, T. YANAGISAWA, H. TSUNODA, S. FUTATSUGAWA, S. HATAKEYAMA, Y. SAITOU, S. SUZUKI, H. ORIHARA, Intern. J. PIXE, 3 (1993) 325.
- 11、 K. SERA, S. FUTATSUGAWA, Nucl. Instr. Meth., B 109/110 (1996) 99.
- 12、 環境省環境保険部環境リスク評価室、化学物質の環境リスク評価 第4巻、第1編 II.[9] ニトリロ三酢酸 (2005) .
- 13、 日本分析化学会編、分析化学便覧改定第6版、丸善出版(2011)

Table 2. PIXE analysis for marine micro algae* incubated by purified artificial seawater containing humic acid

	Relative elemental abundance in micro algae*		
	(S = 5000, based on dry weight)		
	Purified Artificial Seawater	Humic acid	
		0.0036 mg/mL	0.018 mg/mL
Na	48000	39000	39000
Mg	9000	8000	10000
Si	1000	1800	4000
P	3300	2500	2000
S	5000	5000	5000
Cl	70000	69000	52000
K	3000	3200	2600
Ca	2000	3300	4500
Cr	30	48	90
Mn	50	53	40
Fe	1600	1900	2300
Ni	20	15	20
Zn	120	110	70
Sr	40	80	110

* *Nannochloropsis* sp.

Culture of microalgae by artificial seawater and effect of organic acid on bioaccumulation

Yoshihiro Iwata and Kouhei Watanabe

Department of Chemistry, Faculty of Education and Human Studies, Akita University
1-1 Gakuen-Machi, Tegata, Akita 010-8502, Japan

Abstract

Organic acids such as carboxylic acid and humic acid in the sea water are very interesting because they have played the large role in the mass transfer in the ocean. By this research, it has checked that cultivation of marine micro algae (*Nannochloropsis sp.*) by the culture solution based on the artificial seawater purified ion exchange resin containing chelating reagent, nitrilotriacetic acid (NTA) and iminodiacetic acid (IDE). Although NTA inhibited the growth of algae, the number of cells required for PIXE analysis could be secured. Elemental abundance in micro algae incubated by culture containing chelating reagent or humic acid was quantified with PIXE. A 2.9MeV proton beam from a NMCC cyclotron bombarded the target for PIXE analysis of marine micro algae. The simultaneous determination of the main and trace elements in the algae sample was carried out by PIXE analysis. The temporary effect by chelating reagent and on the elemental abundance was obtained. NTA and IDE did not alter the abundance of calcium, magnesium, iron in algae, but NTA decreased the abundance of zinc. Although it seems that most of the metal elements in the algae exist stably, the possibility that the abundance of trace elements is affected by organic acids was suggested. Humic acid seems to have the potential to increase the abundance of calcium, chromium, iron, strontium in algae. Humic acid reduced the abundance of zinc. In this model experiment, it was shown that organic acids in seawater change elemental composition of micro algae and affect bioaccumulation.