

PIXEによる各種培養液で培養した微細藻類による 遷移金属イオンの生物濃縮の測定

岩田吉弘、陳妍禎、高橋皓介

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、海水から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分析法により微細藻類中の主要および微量元素の定量をおこない、微量金属の生物濃縮を研究してきた³⁻⁵。

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。

本研究では、正確量の遷移金属イオンを含む培養液を調製するため、人工海水を弱陽イオン交換樹脂（キレート樹脂）のChelex100で精製し、栄養塩を添加した培養液を調製した。この精製人工海水による植物プランクトン：*Nannochloropsis sp.*（以下藻類）の培養に成功した。この培養液にMn²⁺、Fe³⁺およびZn²⁺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。

2 実験

2.1 精製人工海水の調製

純水1L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。

2.2 各種培養液の調製

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（PES）を0.4 mL添加し、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。また、未精製人工海水を希釈しPESを4 mL添加した培養液を調製し、未精製人工海水x10（Artificial Seawater x10）とした。

ろ過海水をベースにした培養液については、未精製のろ過海水を希釈してPESを4 mL添加した培養液を、未精製ろ過海水x10（Natural Seawater x10）³、精製ろ過海水を希釈してPESを0.4 mL添加した培養液を、精製ろ過海水培養液（Purified Natural Seawater）⁵とした。

2.3 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

提供され、著者の研究室で継続培養された。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℃で2時間の加圧滅菌を行った。継続培養では、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℃、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。

2.4 遷移金属イオンの生物濃縮

藻類約 4x10⁷ cell/mLを含む培養液に、金属イオンの標準溶液を0.01から10 μg/mLとなるように添加し、1から18時間振とう後、藻類の元素分析をおこなった。

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、細胞約 4x10⁷ cell/mL含む培養液3 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10 mLを吸引ろ過し、85℃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^{9,10}。藻類分析用ターゲットは、均一ターゲットとして単位面積あたりの元素量を求め、別途フェルター上の藻類の乾燥重量を測定し、藻類中の元素濃度 (μg/g) を求めた。

3 結果と考察

3.1 人工海水の精製と精製人工海水での藻類の培養

Na⁺型 Chelex100 を Ca²⁺,Mg²⁺型として、人工海水中の主要な陽イオン種を変化させることなく、遷移金属等を除去した。Ca²⁺,Mg²⁺型となったことは、溶離液中の Ca²⁺,Mg²⁺のキレート滴定により確認した。H⁺型で精製した前法⁵より操作が簡略化できた。藻類の培養では、汽水域の塩分濃度が適するため、ベースの海水はいずれも精製水で希釈して用いた。

精製人工海水で培養した藻類の個体数は、増殖培養開始後約2週間で、約 4x10⁷ cell/mLに達し元素分析と生物濃縮の測定に十分な量となった。

3.2 PIXE 分析法による培養液による藻類の元素組成の比較

ろ過海水ベース、人工海水ベースで培養した藻類の PIXE 分析の結果を Table 1 に示す。藻類中の 12-13 元素が定量できた。精製ろ過海水培養液で培養した藻類中のナトリウムと塩素については、分析結果に再現性が得られなかったため省略している⁵。精製海水と比較して精製人工海水では、マグネシウム、ケイ素が少なく、硫黄、リンは同程度、カルシウムは3倍以上多かった。微量元素については、マンガン、鉄が少なくクロム、ニッケル、銅が検出され、亜鉛は同程度であった。精製人工海水で培養した藻類では、生物濃縮で関心が持たれるいくつかの遷移金属の含有量がやや大きい傾向が見られたが、バックグラウンドとしては十分低く、これらの元素の生物濃縮研究に適合している。また、数百リットル分の ReefSalt をストックしているので、安定な品質の培養液を長期にわたり大量に準備できることになった。ことため、実験室で海産生物を飼育する生物濃縮の研究においては、ReefSalt をもちいる精製人工海水培養液は、従来の精製海水培養液より優れていると言える。

Table 1. PIXE analysis for marine micro algae* cultured by two kinds of culture solutions (μg/g)

	Purified Natural Seawater** n=3	Purified Artificial Seawater n=4
Mg	17000 ± 1000	8400 ± 1500
Si	6800 ± 500	650 ± 550
P	4000 ± 400	8000 ± 800
S	4700 ± 400	6000 ± 300
K	6100 ± 200	7500 ± 700
Ca	600 ± 60	2100 ± 200
Cr	ND	130 ± 60
Mn	400 ± 20	100 ± 20
Fe	1400 ± 250	660 ± 100
Ni	ND	11 ± 6
Cu	ND	9 ± 3
Zn	90 ± 6	110 ± 20

* *Nannochloropsis* sp. ** Ref. 5)

3.3 各種培養液で培養した藻類による微量遷移金属の生物濃縮係数

各種培養液での培養した藻類による遷移金属の濃縮係数を Table 2 に示す。今回報告する精製人工海水培養液では、マンガン、鉄、亜鉛とも濃縮係数は小さく、実験の再現性も低かった。このため概算値として報告する。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。亜鉛の場合は、培養液の純度が上がるほど濃縮係数が小さくなる傾向が見られた。今のところ理由は不明である。3.2 のとおり、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っているかもしれない。

Table 2. Summary of concentration factors for several trace metals by *Nannochloropsis sp.* incubated in several culture solution (in mL/g, dry weight)

	Natural Seawater $\times 10^3$)	Purified Natural Seawater ⁵⁾	Artificial seawater $\times 10$	Purified Artificial seawater
Mn^{2+}	-	-	-	50 <0.05-1.0>
Fe^{3+}	-	18,000 \pm 2,000 <0.028-0.28>	-	50 <0.25-10>
Zn^{2+}	9,000 \pm 500 <0.05-1.0>	3,400 \pm 1,200 <0.01-0.50>	250 <4.0>	310 ¹⁰⁾ <0.05-1.0> 230 <0.05-1.0> 11 <0.5-10>
Cd^{2+}	-	350 <1.0 and 4.0>	-	-
Pb^{2+}	1,100 \pm 100 <0.05-1.0>	-	-	-

< > is concentration of added metal ions added to culture solution.

4 まとめ

本研究で、従来のろ過海水ベースの培養液と未精製人工海水ベースの培養液で同様に、精製人工海水培養液での藻類の *Nannochloropsis sp.* の継続培養が可能であることが確認できた。NMCC サイクロトロンセンターにおける PIXE 分析により、主要から微量の約 12 元素を同時定量できた。培養液による藻類の元素組成の比較においては、精製人工海水で培養した場合、カルシウム含有量が多くなった。また、精製人工海水培養液では、マンガン、鉄、亜鉛とも濃縮係数は小さく、実験の再現性も低かった。このため概算値として報告するにとどまった。

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、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).

- 8、 K. SERA, T. YANAGISAWA, H. TSUNODA, S. FUTATSUGAWA, S. HATAKEYAMA, Y. SAITOU, S. SUZUKI, H. ORIHARA, *Intern. J. PIXE*, 3 (1993) 325.
- 9、 K. SERA, S. FUTATSUGAWA, *Nucl. Instr. Meth., B* 109/110 (1996) 99.
- 10、 第30回PIXEシンポジウム要旨集 2-4

Determination of concentration factors for several trace metals by *Nannochloropsis sp.* incubated in several culture solutions by PIXE

Yoshihiro Iwata, Chin Kentei and Kohsuke Takahashi

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

Abstract

Concentration factors for trace metals in the marine micro organisms are very interesting because they have played the large role in the mass transfer in the ocean. By this research, it has checked that continuous cultivation of marine micro algae (*Nannochloropsis sp.*) by the culture solution based on the artificial seawater purified ion exchange resin was possible like the conventional culture solution based on the filtration seawater. 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 value of the concentration factors for concentration factors for Mn^{2+} , Fe^{3+} and Zn^{2+} were obtained. Measurements were smaller than in the case of sea water (1/50 -1/300).