藍藻 *Microcystis aeruginosa* を用いた溶存２価鉄の生物利用性の動力学による解明

広島大学大学院工学研究科　学生会員　○濱野祥太、廣田健人、矢野真平
広島大学大学院工学研究科　正会員　尾崎則篤、大橋晶良、金田一智規

１．研究の背景と目的

鉄は生物にとって必須元素のひとつであり、窒素やリンと同様に河川や海洋の生態系を特徴づける重要な元素のひとつである。鉄は水環境中では２価および３価のキレ―ト鉄、イオン鉄、コロイド鉄に分かれて存在している。水圏生態系中での鉄の役割を議論するためには、水中の生物にとってどの形態の鉄が栄養素として生物利用性があるのかを知る必要があるが、その実態が明らかではないというのが現状である。既往の研究では生物利用性のある鉄は２価のイオン鉄（以下 Fe^{2+}）が主であると考えられている[1-2]。しかし水中で生物利用性が高いと考えられている溶存２価鉄は好気的（酸化的）な環境では全溶存鉄の中でも極めて濃度が低く[3]、藻類が溶存２価鉄のみを摂取しているのであれば、極めて限られた鉄しか利用できないということになる。しかし実際には高濃度に藻類が増殖している状況は多く見られ、２価鉄以外の鉄を摂取している可能性がある。本研究では藻類が２価鉄イオン以外の鉄種も直接利用できるという可能性を検証することを目的とする。

本研究では２価鉄を中心とした動力学に着目した。一般的に異なる形態の鉄は酸化還元や水酸化鉄の生成／消滅、溶存有機物との結合／解離などが起きる動的平衡状態にあり、Fe^{2+}自体の濃度は低いとしてもそれを摂取した場合ただちに枯渇するのでは無く、他の形態の鉄から平衡移動を通して供給が生じる可能性がある[4]。本研究では藻類の鉄摂取速度に注目して、藻類の鉄摂取を一種のリガンド結合反応とみなし、Fe^{2+}のみと特異的に結合する Ferrozine（以下 FZ）と鉄の結合速度（Fe^{2+}の供給速度とみなし得る）を比較することによって、藻類が Fe^{2+}の平衡移動分もあわせて摂取している可能性、更には Fe^{2+}以外の鉄種も直接利用している可能性を検証する。藻類の鉄摂取速度と、平衡移動による Fe^{2+}の供給速度を比較し、藻類の鉄摂取速度が Fe^{2+}の供給速度に律速されるのであれば、藻類の鉄摂取は Fe^{2+}の供給に律速されていると考えられる。また平衡移動による Fe^{2+}の供給速度よりも、藻類が鉄を摂取する速度のほうが速ければ、藻類は Fe^{2+}以外の鉄種も直接摂取していると考える。

２．実験方法

実験には代表的な藍藻類である *Microcystis aeruginosa* を用いた。菌体は国立環境研究所から保存株を分譲していただき(NIES-87)、培養に関しては下水道試験方法の AGP 試験における培養方法により十分に濃い濃度まで培養した。溶存鉄は実河川水より以下の様に用意した。広島県東広島市西条にある黒瀬川で採取した河川水を PTFE 製メンブレンフィルター（直径 47mm、孔径 0.2 μm:ADVANTEC 社製）を用いてろ過し、河川水鉄以外の栄養分が律速とならないようにクエン酸鉄を除いた Gorham5 倍希釈培地の成分を加え、適宜 Milli-Q 水で希釈した（希釈河川水)。そこに *M.aeruginosa* または FZ 溶液を添加し、溶存鉄または FZ 結合鉄濃度の経時変化を測定した。

M.a 投入系では、希釈河川水 100 mL に対し *M.a* サンプルを 100 mL 投入し、投入後、経過時間 T=0、0.5、1、5、10 (h)で 15 mL ずつサンプリングし、ろ液の全溶存鉄濃度を測定し、経時変化を調べた（*M.a* 系)。

FZ 添加系では希釈河川水 15 mL に対し、藻類投入系で使用する培養サンプルのろ液を 15 mL 加えた。これは *M.a* 投入系で培養サンプル中にもともと含まれている溶存鉄があり、２つの系で溶存鉄濃度を等しくする必要があるためである。次に FZ 溶液を 3 mL 添加し、添加後、はじめの 30 分は 5 分おきに、その後は T=0.5、1、2、3、5、10 (h)で吸光度を測定し、FZ による Fe^{2+}への平衡移動の速度を測定した。FZ 溶液の添加分希釈された濃度は *M.a* 系と比較するため補正した。pH については FZ が反応しうる 3〜10 の範囲に調整した。(FZ 系)

実験は異なる河川水または希釈率で３回実施した。各系での実験条件を表１に示す。ただし混合溶液の溶存鉄濃度、M.a 濃度については計算上の値を示している。

表１　実験条件

系列名	河川水希釈率	希釈河川水溶存鉄濃度	M.a 溶存鉄濃度	M.a濃度	混合溶液溶存鉄濃度	混合溶液M.a濃度
		μM	μM	mg L^{-1}	μM	mg L^{-1}
M.a系 1	2倍	1.89	0.66	20.0	1.28	10.0
FZ系　1	2倍	1.89	-	-	0.94 *	-
M.a系 2	5倍	0.54	6.13	139.4	3.36	75.85
FZ系　2	5倍	0.54	6.13	-	3.36	-
M.a系 3	10倍	0.38	0.66	20.0	0.52	10.0
FZ系　3	10倍	0.38	-	-	0.19 *	-

*FZ 系に培養藻類ろ液を加えなかったため *M.a* 系と溶存鉄濃度が異なる。

２-２　藻類に対する溶存鉄の物理的な吸着の影響

実験を行う上で、溶存鉄が藻類の細胞に物理的に吸着することの影響を調べる必要がある。そこで *M.aeruginosa*（藻類濃度 64.2 mg L^{-1}）を 80℃30 分オートクレーブにかけ低温殺菌し、*M.a* 系と同様にクエン酸鉄を含む Gorham5 倍希釈培地の成分を加えた（計算上の全溶存鉄濃度 2.51 μM）。生物的な鉄摂取を出来なくさせた不活化条件で経時的な全溶存鉄濃度の変化を調べる実験を行った。結果を図１に示す。この結果を見ると全溶存鉄濃度の経時的な減少は見られず、鉄が藻類へ物理的に吸着する影響は無視できる程度であることが分かった。

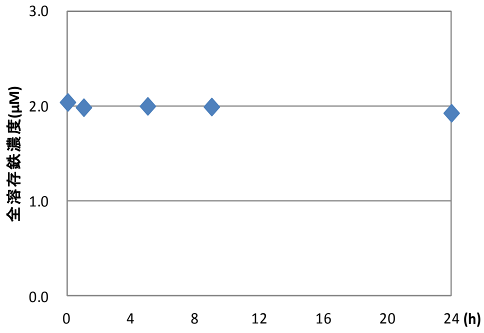

図１　不活化条件での溶存鉄濃度の変化

３．実験結果と考察

各系での藻類の鉄摂取による溶存鉄濃度の経時変化を図２に、FZ による平衡移動の様子を図３に示す。

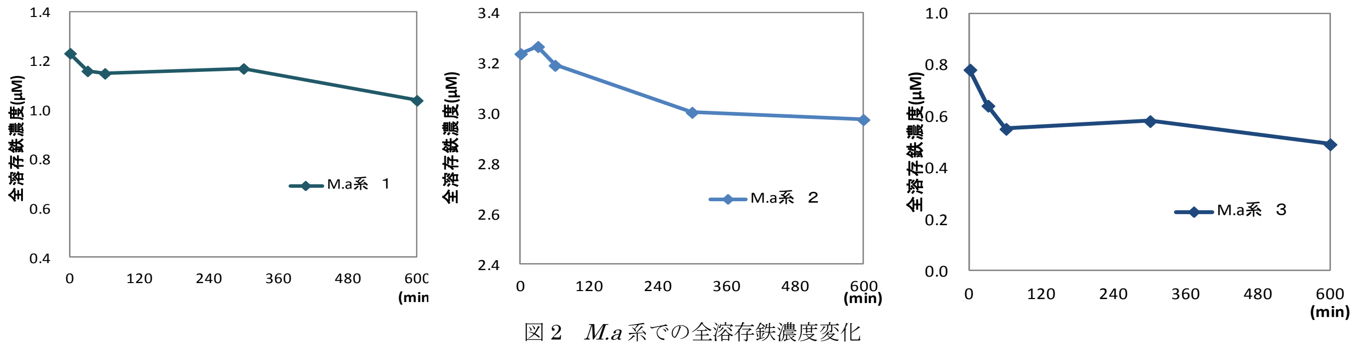

図２　*M.a* 系での全溶存鉄濃度変化

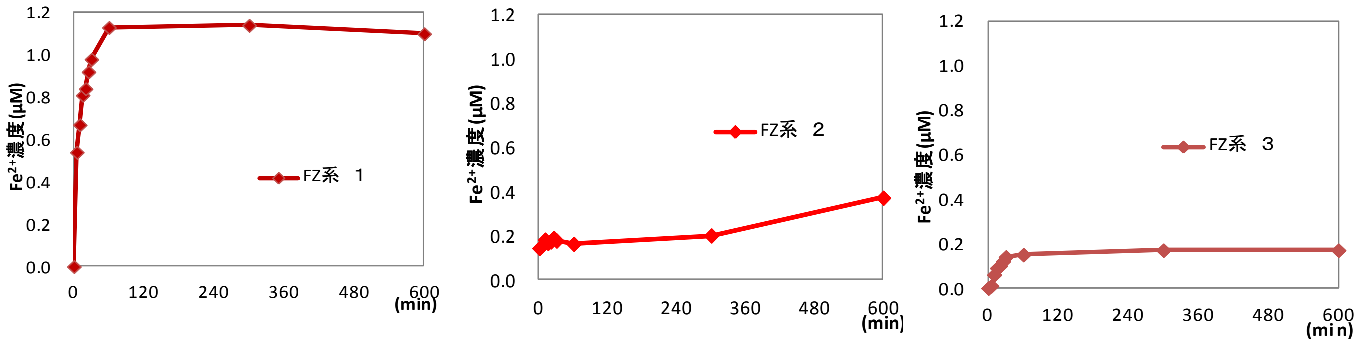

図３　FZ 系での Fe^{2+}への平衡移動

M.a 系では経時的な溶存鉄濃度の減少が見られた。FZ 系では Fe^{2+}への平衡移動の様子が確認できたが、培養藻

類のろ液を加えた FZ 系２では他の２つの系とは若干異なる挙動を示し、初期から Fe^{2+}濃度の値が高かった。*M.a* 系での溶存鉄濃度の変化を藻類が摂取した鉄濃度に変換し（初期全溶存鉄濃度－各時間での溶存鉄）、*M.a* 系と FZ 系での結果をそれぞれ比較し図４に示す。

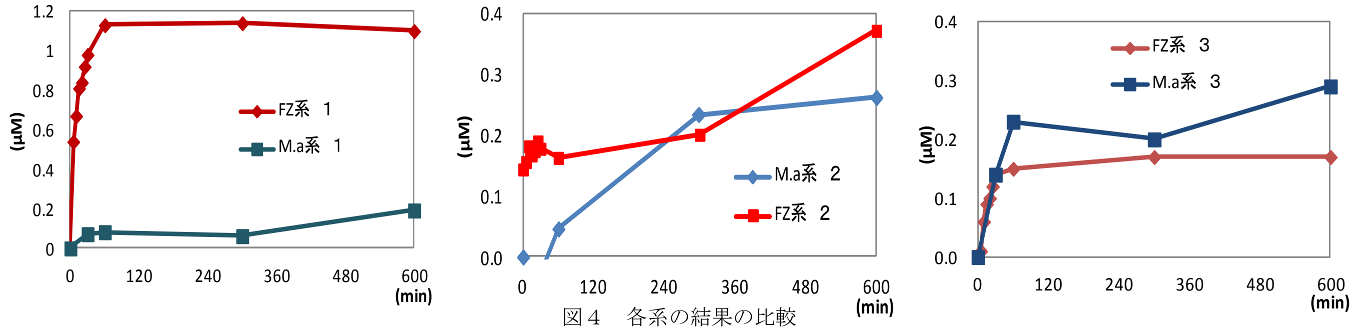

図４　各系の結果の比較

まず系列１の比較であるが、FZ鉄の濃度上昇で表されるFe^{2+}の供給速度に比べ藻類の鉄摂取速度はかなり遅くなった。また系列２の比較でも藻類の鉄摂取速度はFe^{2+}への平衡移動速度を大きく上回ることはなかった。これはFZによる平衡移動の様子からも分かるように、藻類の鉄摂取はFe^{2+}への平衡移動の速度が律速段階となっているからであるという可能性がある。しかしこの結果からだけでは、藻類はFe^{2+}のみしか生物的に利用することが出来ないという証明をするには至らない。それは使用した藻類の鉄摂取ポテンシャルが落ちていたことや、系全体での溶存鉄濃度に対して藻類濃度が不十分であったことが原因として考えられるからである。ここで一般的な鉄摂取速度の実験値との比較を行った。

＜鉄摂取速度の予測＞

藻類の鉄摂取速度の予測には永井ら(2008)の実験に基づく以下のモノー式によるモデル式を用いた[5)]。このモデル式は水中の溶存鉄が全て摂取可能であれば得られるはずの摂取速度であると考えられる。

$$P = \frac{S'}{Kp + S'} \cdot P_{max}$$

表２　モデルの指標

体内最低要求量	Q_{min}	0.0617	$fmol \cdot cell^{-1}$
最大取込速度	P_{max}	0.272	$fmol \cdot cell^{-1} h^{-1}$
最大増殖速度	μ_{max}	0.719	day^{-1}
取込速度に関する半飽和定数	Kp	0.006	μＭ
全鉄濃度	S	－	μＭ
無機鉄濃度	S'	0.0079×S	μＭ
細胞濃度	C	－	$cell \cdot L^{-1}$
鉄取込速度	P	※	$fmol \cdot cell^{-1} h^{-1}$

ただし変数名およびパラメータ値は表２の通りである。P_{max}は鉄濃度が十分にある場合の鉄摂取速度であるが使用藻類の状態が違い、本研究のための培養過程で得られた値と文献値に大きな差が見られたため、本研究で得た値のP=0.062(fmol/cell・hour) についてもあわせて検証した。S については1ｈごとの全溶存鉄濃度を計算して用いている。結果は図５に示す通りである。

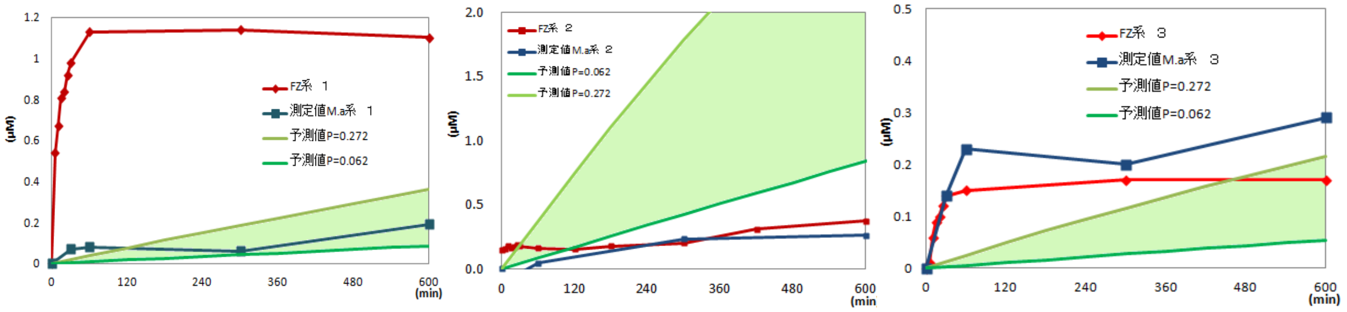

図５　藻類の鉄摂取速度の予測値と測定値の比較

図５の系列１を見るとFZによるFe^{2+}への平衡移動に比べ、藻類が摂取した鉄濃度の予測値が大幅に下回っているため、この系は溶存鉄濃度に対して藻類濃度が不十分であったと言える。また系列２を見るとFZによるFe^{2+}への平衡移動に比べ、藻類が摂取した鉄濃度の予測値が大きくなっているのが分かる。これより、系全体での溶存鉄

濃度に対して藻類濃度は十分であったと言える。しかし実際には実験の時点で藻類の鉄摂取ポテンシャルが低下していた可能性も否定できない。使用した藻類の鉄摂取ポテンシャルが高ければ、Fe^{2+}への平衡移動を待たずに予測していた鉄摂取速度が出ていたかもしれない。本来ならばFe^{2+}のみが溶存している２価鉄標準液を、使用する河川水と同じ鉄濃度になるようにつくり、藻類が十分に鉄を利用できる環境ではどの程度の鉄摂取速度になるかを知る必要があった。しかし今回は藻類のサンプル量などの問題から実験を行うことが出来なかった。またFZ系２のみで初期Fe^{2+}濃度が高くなっており、他のFZ添加系では加えなかった培養藻類のろ液が影響している可能性がある。

次に系列３の比較であるが、この結果をみると藻類の鉄摂取速度がFZによるFe^{2+}の供給速度を上回っているのが分かる。藻類がFe^{2+}のみしか摂取できないのであれば、藻類の鉄摂取濃度はFZ濃度の上昇を越えることは無いと考えられるので、系列Eにおいて藻類の鉄摂取がFe^{2+}の平衡移動量を越えたということは、対象とする藻類がFe^{2+}以外の鉄種を直接摂取していること示している。なお、この系のみ鉄摂取速度測定値が予測値を大きく上回っているが、この原因について検証するためにも標準液を用いた実験を行うべきであったが、今回は実施出来なかった。

４．結論と今後の課題

本研究では*M.aerugimosa*を黒瀬川河川水サンプルに投入する事によって継続的な鉄の摂取が行われることが確認された。また藻類の鉄摂取様態を動的平衡の移動という観点から検証する方法を確立し、それに基づき*M.aeruginosa*を対象として鉄摂取様態を検討した。その結果として*M.aeruginosa*はFe^{2+}以外の鉄種も直接摂取する能力がある可能性があるということを実験的に示したと言える。

しかし今回の実験では、本来行うべき２価鉄標準液を用いた藻類鉄摂取速度の測定実験が行えておらず、実験で使用した藻類の鉄摂取ポテンシャルの確認が出来ていない。また１つの系でしか藻類の鉄摂取速度がFe^{2+}への平衡移動を上回るという結果が残せていないなど、いくつか不十分な点がある。河川水の代わりに２価鉄標準液を用いた実験を行うことで使用藻類の鉄摂取ポテンシャルを確かめ、実験結果がFe^{2+}の供給速度に律速されたものなのかを判断できるようにすることを今後の課題とする。また同時に「溶存鉄に対して十分な濃度の菌体量」に加えて、「利用可能な鉄が存在すればすぐに摂取できるポテンシャルのある藻類」を培養する必要があると考えられる。

参考文献

1) Maldonado et al.　(2001)　*J.phycol*, 37, pp. 298-309
2) Morel et al.　(2008)　*Limmol.Oceanogr*, 53, pp. 400-404
3) 尾崎ら　(2009)　環境工学研究論文集，46，pp. 545-551
4) 廣田ら　(2011)　土木学会論文集，67，pp.531-539
5) Nagai et al.　(2008)　*Limnology*, 8, pp261-270