

# 培地中の添加鉄イオンがミドリムシの生育に与える影響

## The effect of chelated iron on the growth of *Euglena*

**Abstract :** In this study, we investigated the effect of adding iron on a medium of *Euglena* chloroplasts such as those found in plant. Based on previous studies, we tested cultures using chelated iron compounds EDTA-Fe, DTPA-Fe. As a result, it can be concluded that EDTA-Fe has a negative effect on the growth of *Euglena*, but DTPA-Fe has a positive effect if we select the appropriate amount.

### 1. 研究背景とその目的

ミドリムシとは微生物の一種であり植物性と動物性の両方を持つ。近年はバイオマス燃料、健康食品などへの活用が期待され、研究が進められている。本研究において重要となる鉄は葉緑体生産など植物の代謝にとって必要不可欠であり、しばしば肥料として育成土壌に添加される。本研究は水中でも安定して存在することができ、植物に吸収されやすい形であるキレート鉄化合物を培地に添加することによって、植物と同じく葉緑体を持つミドリムシの育成にどのような影響が生じるかを明らかにすることを目的とした。

### 2. 研究方法

各培地にはキレート鉄化合物を添加した。下図に示すように、キレート化とは有機酸やアミノ酸が金属イオンを挟み込むように結合することであり、これによって物質の水への溶解性を上げて生物に吸収されやすくすることができる。本研究では EDTA-Fe、DTPA-Fe を用いたが、どちらもキレート化された鉄化合物である。

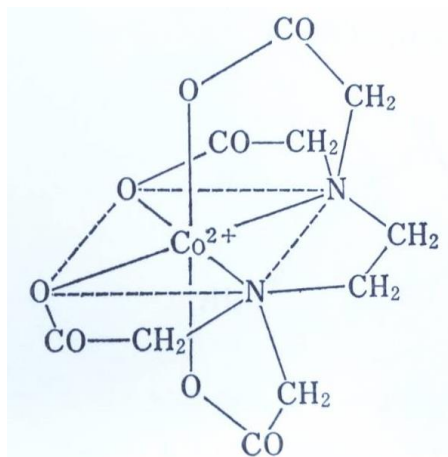


図1 コバルト(II)イオンの EDTA 錯体の構造

培養実験では1つの条件に対して3つのサンプルを用意し、インキュベーター内で3週間培養、1週間ごとに計測した。計測は血球計算板を用いて行い、1mlあたりの個体数の平均値を算出した。また、培養実験では独立栄養培地、従属栄養培地の2種類を用いた。各培地の内容物は表1参照である。

表1 各培地の内容物

	D. W.	ハイポネックス	グルコース
独立栄養培地	100ml	0.1g	
従属栄養培地	100ml	0.1g	0.6g

(1) 実験①[EDTA-Fe の添加]

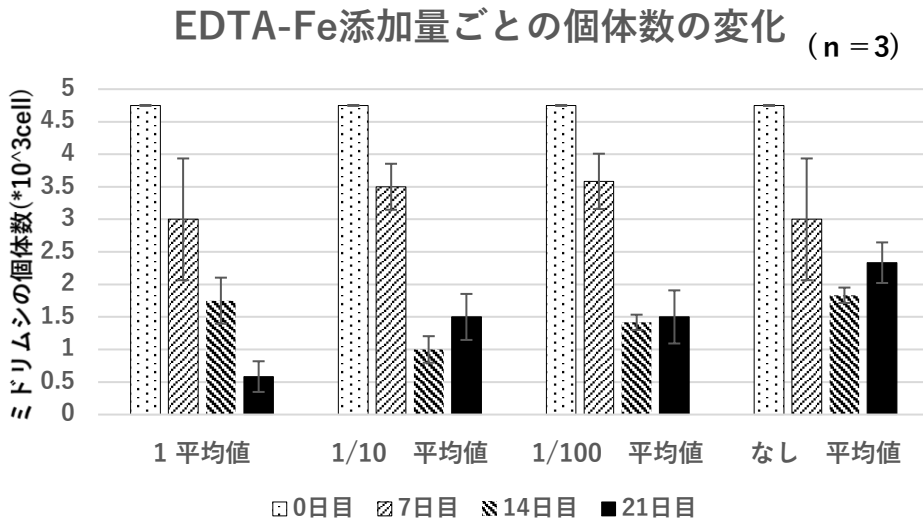
EDTA-Fe を用いて培養実験を行った。EDTA-Fe は国内で最も使用されているキレート鉄であり、安定する pH 領域が 1.5~6 と広いこと、入手が容易であることから使用した。試験管内の独立栄養培地に EDTA-Fe を  $127.51 \mu\text{mol}/\ell$ 、 $12.751 \mu\text{mol}/\ell$ 、 $1.2751 \mu\text{mol}/\ell$  になるように加えた 3 条件で培養した。この  $127.51 \mu\text{mol}/\ell$  は先行研究にある Koren-Hutner 培地に入っている鉄の mol 数と、培地内の EDTA-Fe の mol 数をそろえていることを示す。また、この培養では EDTA-Fe の添加量が少ないため、できるだけ他の物質を加えない方がその効果が分かりやすくなると考え、実験①では独立栄養培地のみを用いた。

(2) 実験②[DTPA-Fe の添加]

DTPA-Fe を用いて培養実験を行った。DTPA-Fe は物理化学的性質が EDTA-Fe と似ており、pH も 7 まで安定することから使用した。実験②では独立栄養培地、従属栄養培地を三角フラスコに入れ、それぞれに実験①と同量の DTPA-Fe を添加した合計 6 条件で培養した。条件数を増やしたことでインキュベーター内のスペースが不足したためサンプル数は 1 である。

3. 実験結果

(1) 実験①

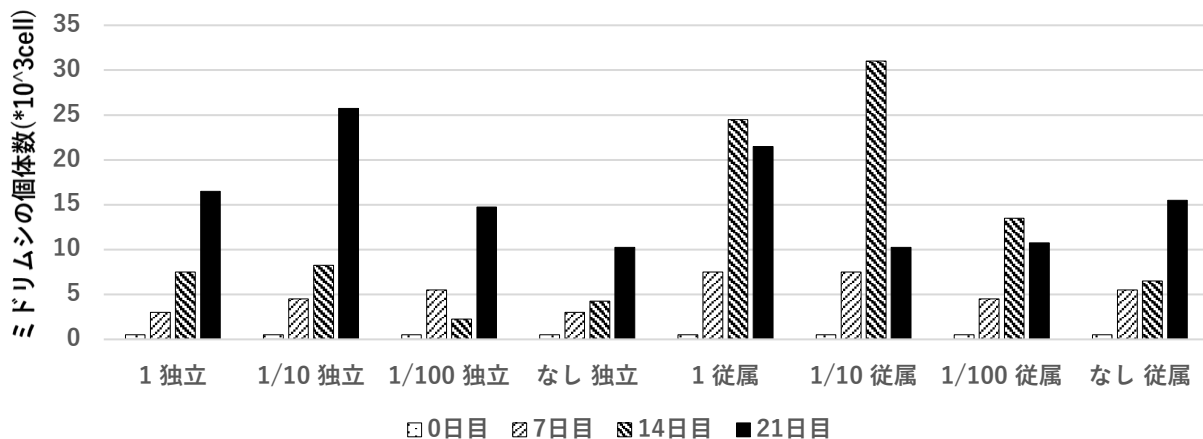


グラフ1 EDTA-Fe 添加量ごとの個体数の変化

どの条件でもミドリムシの個体数は減少傾向にあった。また、EDTA-Fe の添加量を減らすほど個体数の減少は緩やかになった。

## (2) 実験②

### DTPA-Fe添加量ごとの個体数の変化 (n=1)



グラフ 2 DTPA-Fe 添加量ごとの個体数の変化

すべての条件でミドリムシの個体数は増加傾向にあった。また、DTPA-Fe を添加した条件では独立栄養培地を用いた条件よりも従属栄養培地を用いた条件の方が個体数の増加が速かった。従属栄養培養を行った条件の中では 14 日目を境に個体数が減少したのものもあった。

## 4. 考察

### (1) 実験①

EDTA-Fe を添加した培地では個体数が減少したため、EDTA-Fe はミドリムシの生育に悪影響を及ぼすと考えられる。個体数減少の原因として考えられるのは EDTA-Fe の分子量の大きさである。EDTA-Fe は分子量が 421.1 と大きいため、ミドリムシは水中にある EDTA-Fe 分子を吸収するのが困難であったと考えられる。培地中の pH は安定して 3~5 であったため、液性の影響で EDTA-Fe が分解され、ミドリムシに吸収されないリン酸鉄・水酸化鉄となったとは考えられない。しかし、EDTA-Fe は光分解性があり、その半減期は水中では 20 日とされている。これは培養結果の 14 日目と 21 日目に見られる個体数の変化に関係すると考えられる。

### (2) 実験②

DTPA-Fe を添加した培地では全体的に個体数が増加したが、ある条件では増加のあと減少が見られたため、DTPA-Fe は適切な添加量を選択すれば個体数は増加するといえる。

DTPA-Fe を用いた実験②が EDTA-Fe を用いた実験①よりも個体数が増加した原因は 2 つ考えられる。

1 つは DTPA-Fe の分子量が比較的小さいことである。EDTA-Fe の分子量が 421.1 であるのに対し、DTPA-Fe の分子量は 397.35 である。よって DTPA-Fe の方がよりミドリムシに吸収されやすいと考えることができる。

2 つ目は錯体の安定度を示す数値である安定度定数の大きさである。DTPA の安定度定数は 28.6 だが、EDTA の安定度定数は 25.1 と比較的小さい。錯体は安定度定数が大きいほど水中に安定して存在するため、物質がより吸収されやすい形で存在することに大きく関わっている。培地中のキレート鉄が分解され、 $Fe^{3+}$  として鉄が存在していてもミドリムシはそれを吸収できないため、より安定度定数の大きい DTPA を用いた実験②で個体数の増加が見られたと考えられる。

また、DTPA-Feの実験の際、14日目から21日目にかけて個体数が減少したのは、増加したミドリムシが培地内にあるグルコース等の栄養分を吸収しつくしたからであると考えられるが、当実験のサンプル数は1であるため、正確な結果を得るにはより多くの検証を行う必要がある。

従属栄養培地の方が個体数増加が早かったのは、培養当初からグルコースが培地に含まれているため培養初期のエネルギー生産において独立栄養培地よりも有利であったこと、そのエネルギー生産とDTPA-Feの吸収によってより多くの光合成、ATP生成を行うことができたからだと考えられる。

## 5. 今後の課題

本研究では物質を添加した際の、ミドリムシの個体数に着目して研究を行った。個体数の変化はサンプル数や培養開始時のミドリムシのコンディションにも左右されるため確実な結果をとることが難しい。信頼性のある結果を出すにはできる限りサンプル数を増やし、同じ時期に同じ環境下で培養を行う必要がある。今後は、本研究で用いなかった鉄化合物を用いて、鉄イオンの添加が与える影響について、成分分析によるミドリムシ内の鉄の量、吸光光度計を用いた光合成機能への影響の調査なども行いながら研究を進めていきたい。

## 6. 参考文献

北岡正三郎. ユーグレナ 生理と生化学. 学会出版センター. 1989

斎藤一夫. 新しい錯体の科学. 大日本図書株式会社. 1986

同仁科学研究所. EDTA 類似化合物をキレート試薬とする滴定法.

<https://www.dojindo.co.jp/letterj/121/column/01.html> (閲覧日: 2021年11月10日)

経済産業省(2021/1/15). エチレンジアミン四酢酸.

[https://www.meti.go.jp/shingikai/kagakubusshitsu/anzen\\_taisaku/pdf/r02\\_04\\_02\\_01.pdf](https://www.meti.go.jp/shingikai/kagakubusshitsu/anzen_taisaku/pdf/r02_04_02_01.pdf) (閲覧日: 2021年11月10日)