

原 著

ワカメ胞子体の色落ち現象に対する鉄欠乏の影響

奥村 真子*¹ 三木 理*¹ 上野 聡浩*¹ 小杉 知佳*² 吉村 航*² 加藤 敏朗*²

*1 金沢大学理工研究域サステナブルエネルギー研究センター, 〒920-1192 石川県金沢市角間町

*2 新日鐵住金株式会社技術開発本部先端技術研究所, 〒293-8511 千葉県富津市新富 20-1

2018年5月1日受付, 2018年6月29日採録

Abstract

The present study is an attempt for assessing the relationship between iron deficiency and discoloration in *Undaria pinnatifida* sporophytes. First, thallus discoloration and the decrease in photosynthetic pigment contents were examined in *Undaria pinnatifida* by employing an indoor iron-deficiency experiment. When *Undaria pinnatifida* sporophytes were cultured under iron-deficient conditions, which the iron concentrations were between 2 and 5 µg/L, the growth decreased, the thalli became discolored, and the photosynthetic pigment contents decreased. Iron deficiency caused the sporophytes to become lighter (L^*) and less red (a^*). Therefore, it appears that iron deficiency induces the discoloration of *Undaria pinnatifida* sporophytes, similar to how nitrogen and phosphorus deficiencies perform. Next, we investigated how the mechanism involved in the addition of iron affects the discolored *Undaria pinnatifida* sporophytes due to iron deficiency by performing an indoor iron-addition experiment. *Undaria pinnatifida* sporophyte growth, thallus color, and photosynthetic pigment content were all restored by the addition of dissolved iron solution, which the concentrations were between 10 and 50 µg/L. Iron addition made the sporophytes recover their lightness (L^*) and redness (a^*). In addition, the color was restored more quickly as the amount of added iron was increased. The discoloration of iron-deficient *Undaria pinnatifida* sporophytes can thus be restored by iron addition.

Keywords: iron deficiency, discoloration, *Undaria pinnatifida*, sporophyte, photosynthetic pigment

1. はじめに

1990年代後半から瀬戸内海や有明海などの内湾において、養殖ノリ (*Porphyra yezoensis* Ueda) や養殖ワカメ (*Undaria pinnatifida*) の色落ち (海藻の色調低下現象) が頻発するようになった (天野, 2001; 寺田, 2012; 牧野, 2014; 反田, 2015). 例えば, ノリでは, 藻体の色彩が黒色から茶褐色に退色すると, 食味も低下し, 商品価値が著しく低下する. 近年の色落ちの増加原因の一つとして, 下水道の整備や窒素の排水濃度規制の強化による沿岸海域での窒素やリンなどの栄養塩濃度の低下 (貧栄養化と呼称されている) が推定されている (菊池, 2012; 反田, 2015).

ノリについては, 国内の市場規模が大きく色落ち対策が急務になったことから色落ちと栄養塩濃度の関係について多くの報告例がある. 例えば, 窒素が不足するとノリ葉体中のクロロフィル, カロテノイド, フィコピリンなどの光合成色素の含量が減少するため色落ち現象が発生する (天野, 2001). 窒素欠乏により色落ちしたノリ藻体は, 窒素を添加することで色彩が回復する (坂口, 2003; Niwa *et al.*, 2013). ノリの光合成色素含量の低下は主要な栄養塩である窒素, リンの欠乏だけでなく, 微量元素の一つである鉄の欠乏も影響する (Zhang *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2009). 鉄欠乏によるノリの光合成色素への影響についてはクロロフィル *a* への影響が特に大きく (植木ら, 2010), また, スラグ系施肥材を用いて窒素, リン, 鉄を総合的に供給することによって色落ちの無いノリの生育を促進できる (植木ら, 2011).

一方, ノリと比較するとワカメの色落ち現象と栄養塩

濃度の関係についての報告例が比較的少ない. ワカメの色落ちに直結する栄養塩としては, 窒素が特に注目されている (藤原, 2012). 例えば, 徳島県では, ワカメを培養する冬季に窒素が減少しワカメの色落ち現象の発生が危惧される場合, 色落ちの警戒指標として DIN (溶存態無機窒素) 濃度が 2–3 µmol/L (28–42 µg/L) に設定されている (牧野, 2014). また, 窒素欠乏により色落ちしたワカメに DIN を添加し培養することで色彩が回復する (牧野, 2015). しかし, 鉄欠乏によるワカメの色落ち現象に対する影響についての報告は見られない.

光合成色素の合成を触媒する酵素のいくつかは鉄を含むため, 鉄欠乏はこれらの酵素の活性を低下させ光合成色素の合成が抑制される (Zhang *et al.*, 2009; 植木ら, 2010). したがって, ワカメにおいてもノリと同様に鉄欠乏によって色落ちが生じることが推定されるが, 色落ちが発生する鉄濃度や鉄欠乏が影響する色彩変化や光合成色素についての検討事例は見られない. また, 鉄欠乏で色落ちしたワカメに対して鉄を添加することによって色彩が回復するかも不明である.

日本沿岸海域の溶存態鉄濃度は, サンプリング, ろ過, 定量方法にかなり相違があるため測定値の厳密な比較は難しいが, 河口近くでは 20 µg/L 前後の値もあるものの概ね 1–5 µg/L 前後であろうとの報告がある (門谷ら, 1997). また, 森・川・海のつながりの視点から鉄などの微量元素の挙動調査が実施されるようになり, 例えば, 宮古湾の例では, 流入河川的全鉄濃度が数十から数百 µg/L だが, 湾内では 5–40 µg/L 程度であるとの報告がある. しかし, 沿岸海域の鉄濃度と海の生産性の関係

は明確にはなっていない (佐々木, 2008). さらに, 森林・河川から供給される鉄およびフミン酸等の有機物の多くは沿岸海域で沈降するが, その中でも低分子の有機物が溶存態の形態を維持して沿岸海域の溶存態鉄濃度を決定づけている可能性があり, このような溶存鉄の化学種に着目した研究が重要であるとの指摘がなされている (夏池ら, 2016). このように, 沿岸海域の生物利用可能な溶存鉄は, その形態や濃度およびその経時変化について不明な点が多く残されており, また, ワカメのような大型海藻の生長や色落ちに対する影響についての基礎的知見も十分ではない.

本研究では鉄欠乏とワカメ胞子体の色落ちの關係に焦点をあて, まず, 藻類が利用可能な溶存態キレート鉄 (Fe-EDTA) を用いてワカメ胞子体の鉄欠乏による色落ちの発生や光合成色素の減少を検証した. また, 鉄濃度は前述した日本沿岸海域での測定値を参考にして 2–50 µg/L の範囲に設定した. さらに, 鉄欠乏で色落ちさせたワカメ胞子体を異なる鉄濃度で培養し, ワカメ胞子体の色彩や光合成色素量の回復が可能な鉄濃度を検討した. これらの結果について知見を得たので報告する.

2. 実験方法

2.1. ワカメ胞子体の事前培養

能登海洋深層水施設から入手した海洋深層水 (以下, 海水) を, 孔径 0.45 µm のメンブレンフィルターで濾過した後, オートクレーブ (SN200, ヤマト科学) を使用し 121°C で 20 分間加圧滅菌した. 本海水の溶存態鉄濃度は 0.5 µg/L 以下である (Miki *et al.*, 2016). この濾過・滅菌済み海水 10 mL に PES 培地 (Provasoli, 1968) を 2 v/v% (0.2 mL) 添加し栄養塩濃度を強化した培地をワカメ胞子体の事前培養に用いた. 培地の栄養塩濃度を Table 1 に示す. 本研究で以下に述べる鉄は溶存態のキレート鉄 (Fe-EDTA) である.

6 個の 6well プレートの 1 ウェル毎に培地 10.2 mL とサカイオーボックス (株) より入手したワカメ胞子体 (全長: 約 0.5 mm) 1 個体を添加した. 6well プレートを 15°C に制御した人工気象器 (LTI-1200, 東京理化工機) 内に設置し, ワカメ胞子体 36 個体を 20 日間静置培養した. 培地は 7 日毎に交換した. 人工気象器の光源として白色 LED (SLED-F30D, 日本グローバル照明) を用い, ワカメ胞子体の培養に適した光周期 (明期 12 時間, 暗期 12 時間), 光量子密度 (100 µmol/m²/s) に光照射条件を設定した (馬場, 2008). 投影面積が約 10 mm² となるまで事前培養によって生長させたワカメ胞子体を後述する本実験に用いた.

Table 1 Nutrient quality of culture medium using enriched seawater.

NH ₄ -N (mg/L)	NO ₂ -N (mg/L)	NO ₃ -N (mg/L)	D-P (mg/L)	D-Fe (µg/L)
0.25	<0.01	11.8	1.06	550

2.2. 鉄欠乏によるワカメ胞子体の色落ちの検証実験 (RUN1)

濾過・滅菌済み海水 300 mL に, Fe-free PES 培地 (鉄を添加しない PES 培地) を 2 v/v% (6 mL) 添加した後, Fe-EDTA 溶液を用いて鉄濃度を 2, 5, 20, 50 µg/L に調整した 4 種類の培地を作成した. 培地の窒素, リン濃度は, 事前培養に用いた Table 1 に示す培地と同じである. 各評価系の培地 300 mL と事前培養したワカメ胞子体 6 個体をそれぞれフラスコ (BMF-MF300, バイオメディカルサイエンス) に添加し, 事前培養と同じ条件に設定した人工気象器内に 4 個のフラスコを設置し, 0.1 L/min で連続通気しながら, ワカメ胞子体 24 個体を 20 日間浮遊培養した. 各フラスコの培地は 4 日毎に交換した.

なお, 窒素, リンの残留濃度を確認するため, ワカメ胞子体 6 個体と Table 1 に示した培地 300 mL を用いた同様の 20 日間の培養実験を別途実施した. 4 日毎の培地の交換時に, 培養後の培地を孔径 0.45 µm のメンブレンフィルターで濾過した後, オートアナライザー (QuAAtro39, ビーエルテック) を用いて残留している DIN, DIP の濃度を測定した. この結果, ワカメ胞子体が最も生長した 17–20 日の培養後でも, 培地中の DIN, DIP は各々 9.2 mg/L, 0.05 mg/L 残留しており, 海藻の養殖場で望ましいとされる窒素濃度 (0.04–0.10 mg/L), リン濃度 (0.007–0.014 mg/L) は維持されていることを確認した (日本水産資源保護協会, 2005).

2.3. 色落ちしたワカメ胞子体の鉄添加による色彩回復の検証実験 (RUN2)

事前培養したワカメ胞子体 24 個体を人工気象器内で RUN1 の鉄濃度 2 µg/L の条件で 12 日間培養して色落ちを生じさせた. 続いて鉄濃度を 2, 10, 20, 50 µg/L に調整した 4 種類の培地を RUN1 と同様の方法で作成し, 各評価系の培地 300 mL と色落ちしたワカメ胞子体 6 個体をフラスコ毎に添加し, RUN1 と同様の条件の人工気象器内でワカメ胞子体を 12 日間浮遊培養した. 各フラスコの培地は 4 日毎に交換した.

2.4. 評価方法

2.4.1. 生長

培養期間中, カメラユニット (DS-L3, ニコン) 付の実体顕微鏡 (SMZ745T, ニコン) を用いて, ワカメ胞子体を毎日, 観察, 撮影し, 得られた画像から藻体の投影面積を画像解析ソフト (ImageJ, National Institutes of Health) で測定した. 藻体の投影面積結果から作成した生長曲線から対数増殖期を決定し, 対数増殖期における比増殖速度 μ (/day) を (1) 式から算出した (Nagai *et al.*, 2014; Miki *et al.*, 2016).

$$\mu = \frac{\ln A_2 - \ln A_1}{t_2 - t_1} \quad (1)$$

ここで, t_1 は対数増殖期開始日, t_2 は対数増殖期終了日, A_1 , A_2 は培養日数 t_1 , t_2 時の藻体の投影面積である.

比増殖速度 μ および培養最終日の藻体の投影面積を用いて生長への影響を評価した.

2.4.2. 色彩

分光測色計 (CM-700d, コニカミノルタ) を用いて $L^*a^*b^*$ 表色系でワカメ胞子体の色を数値化し, 鉄欠乏による色彩の変化を評価した. 分光測色計によるワカメ胞子体の測定径は 3 mm である. $L^*a^*b^*$ 表色系とは, ヒトの色感覚や明るさの感覚に合った 3 次元の色空間の一つである (小松原, 2011; 近藤, 2016). L^* は明度を, また, a^* は緑色~赤色方向, b^* は青色~黄色方向の色度を示す数値である. L^* が低いほど黒色が強く, a^* 値が高いほど赤色が, また, b^* 値が高いほど黄色が強い色彩と判断できる.

さらに, 鉄欠乏によるワカメ胞子体の経時的な色彩変化を (2) 式から算出される色差 ΔE^*_{ab} で求めた (小松原, 2011; コニカミノルタ, 2018).

$$\Delta E^*_{ab} = \sqrt{(L_n^* - L_0^*)^2 + (a_n^* - a_0^*)^2 + (b_n^* - b_0^*)^2} \quad (2)$$

ここで, L_0^* , a_0^* , b_0^* は基準とする日の測定値, L_n^* , a_n^* , b_n^* は基準日から n 日後の測定値である.

2.4.3. 光合成色素含有量

実験最終日のワカメ胞子体 3 個体から光合成色素を抽出し, クロロフィル a (以下, Chl. a), クロロフィル $c_1 + c_2$ (以下, Chl. $c_1 + c_2$), フコキサンチンの含有量を測定した. 90 v/v% アセトン溶媒 20 mL に細かく切り出したワカメ胞子体を添加し, 超音波洗浄機 (USK-3R, アズワン) に 10 分間かけ, 冷蔵庫で一晩静置し抽出液を得た. 分光光度計 (U2910, 日立製作所) を用いて抽出液の吸収スペクトルを測定した.

Chl. a , Chl. $c_1 + c_2$ は 630, 664 nm の波長の吸光度から, (3), (4) 式 (Jeffrey *et al.*, 1975) に基づいて抽出溶媒中の濃度を算出した後, 藻体乾重量あたりの色素含有量を求めた. また, フコキサンチンについては, 90% アセトンに溶解させた市販のフコキサンチン (シグマアルドリッチ) の 500 nm の吸光度から (5) 式の検量線を作成し, 抽出溶媒中のフコキサンチン濃度を算出した後, 藻体乾重量あたりの色素含有量を求めた.

$$\text{Chl. } a \text{ } [\mu\text{g/mL}] = 11.47A_{664} - 0.40A_{630} \quad (3)$$

$$\text{Chl. } c_1 + c_2 \text{ } [\mu\text{g/mL}] = 24.36A_{630} - 3.73A_{664} \quad (4)$$

$$\text{Fucoxanthin } [\mu\text{g/mL}] = 18.788A_{500} - 0.0371 \quad (5)$$

ここで, A_{664} , A_{630} , A_{500} はそれぞれ波長 664, 630, 500 nm の吸光度である.

2.5. 統計分析

色落ちの検証実験 (RUN1) では鉄濃度が 50 $\mu\text{g/L}$ 条件で培養した色彩の濃いワカメ胞子体を対照群, また, 色彩回復の検証実験 (RUN2) では鉄濃度 2 $\mu\text{g/L}$ 条件で培養し色落ちが生じたワカメ胞子体を対照群とした. 対照群と他の鉄濃度条件のワカメ胞子体との有意差を Dunnett の平均値の多重比較法で検定した.

3. 結果と考察

3.1. 鉄欠乏によるワカメ胞子体の色落ちの検証 (RUN1)

3.1.1. 生長

ワカメ胞子体の生長曲線を Fig. 1 に, 比増殖速度 μ および培養最終日の藻体面積を Fig. 2 に示す. 培養初期の対数増殖期 (0-8 日) における比増殖速度 μ は, 培地の鉄濃度が 2, 5, 20, 50 $\mu\text{g/L}$ の順に 0.29 ± 0.05 , 0.28 ± 0.02 , 0.30 ± 0.04 , $0.30 \pm 0.04/\text{day}$ となり, 生長速度に大きな差異は見られなかった. しかし, 9 日目以降になると培地の鉄濃度によって生長に差異が生じ, 20 日後の培養最終日の藻体面積は, 鉄濃度 2, 5, 20, 50 $\mu\text{g/L}$ の順に 347 ± 169 , 381 ± 108 , 726 ± 148 , $904 \pm 141 \text{ mm}^2$ となった. 対照群 (鉄濃度 50 $\mu\text{g/L}$) と鉄濃度 2, 5 $\mu\text{g/L}$ の間で有意差が確認された ($p < 0.05$). 培地の鉄濃度が初期の生長速度に影響が無く, 最終到達面積に差異が生じた原因としては, 培地を 4 日毎に交換したものの, ワカメ胞子体の生長に伴って鉄が徐々に不足し生長阻害が発生した結果, ワカメ胞子体の最終到達面積に差が生じたと考えられる.

3.1.2. 色彩

培養最終日における各鉄濃度のワカメ胞子体を Fig. 3

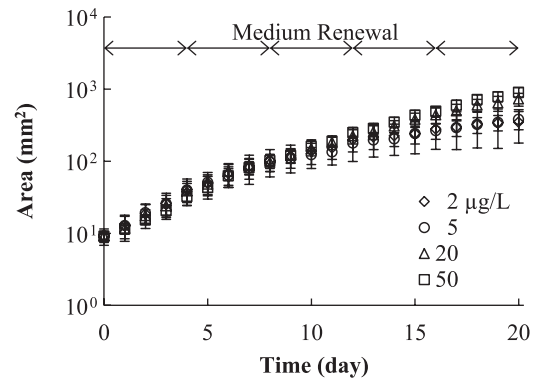


Fig. 1 Growth curves for thallus areas of *U. pinnatifida* using culture media under various Fe concentrations. Values are presented as mean \pm SD. There were 6 replicates for each treatment.

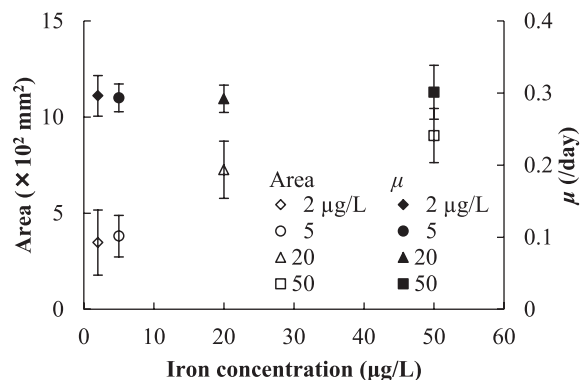


Fig. 2 Effects of Fe concentration on the specific growth rate and the final thallus area of *U. pinnatifida*. Values are presented as mean \pm SD. There were 6 replicates for each treatment.

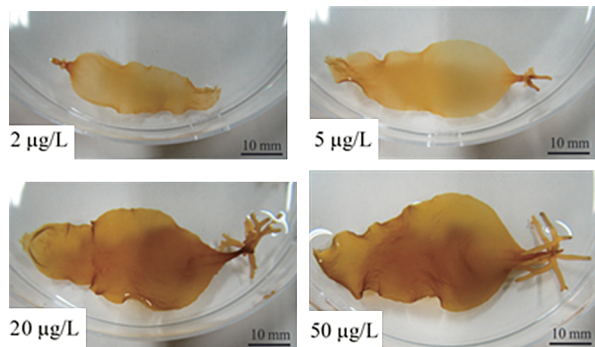


Fig. 3 Contrast of the final thalli of *U. pinnatifida* cultured for 20 days in various Fe concentrations. Scale bar = 10 mm.

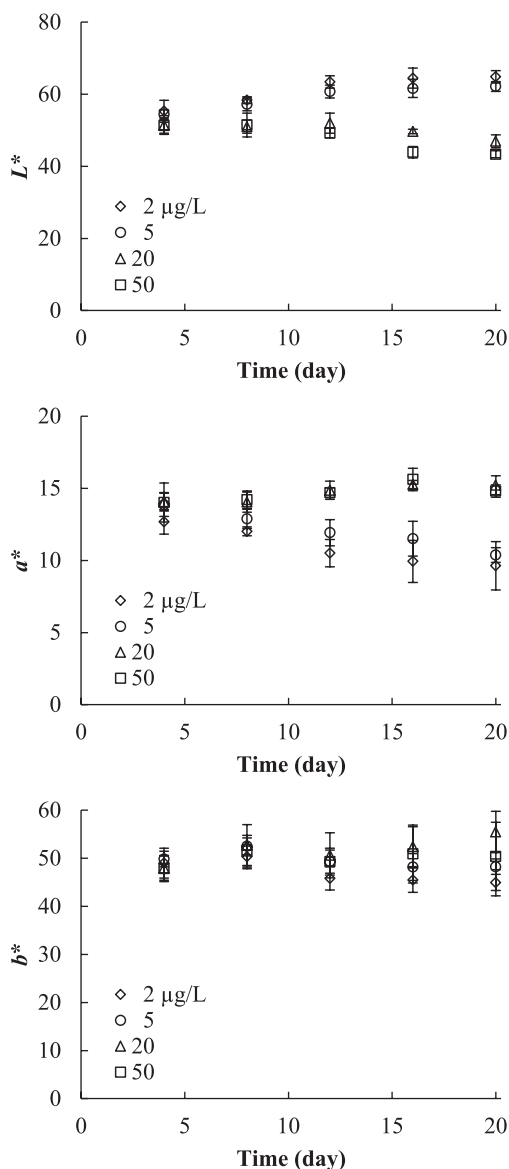


Fig. 4 Time courses changes of lightness L^* , redness a^* , and yellowness b^* of *U. pinnatifida* cultured in various Fe concentrations. Values are presented as mean \pm SD. There were 6 replicates for each treatment.

に示す。対照群（鉄濃度 50 $\mu\text{g/L}$ ）と培地の鉄濃度が 2, 5 $\mu\text{g/L}$ の条件下のワカメ胞子体の色彩を比較すると、視覚によって退色していることが明確に確認された。

また、分光測色計で測定したワカメ胞子体の色彩の経日変化を Fig. 4 に示す。ワカメ胞子体の明度 L^* は、鉄濃度が 2, 5 $\mu\text{g/L}$ の条件下では日数の経過とともに増加し、20, 50 $\mu\text{g/L}$ の条件下では減少した。培養最終日には、対照群（鉄濃度 50 $\mu\text{g/L}$ ）のワカメ胞子体の明度 L^* が 43.3 ± 1.0 であったのに対して、鉄濃度 2, 5 $\mu\text{g/L}$ の培養系では 64.8 ± 1.7 , 62.2 ± 1.4 に増加し、有意差も確認された ($p < 0.05$)。鉄濃度 20 $\mu\text{g/L}$ の培養系のワカメ胞子体では 46.9 ± 1.8 であり対照群（鉄濃度 50 $\mu\text{g/L}$ ）との有意差は認められなかった。このような明度 L^* の挙動は、ワカメ胞子体の色彩が鉄濃度 2, 5 $\mu\text{g/L}$ の培養系では薄く、また、鉄濃度が 20, 50 $\mu\text{g/L}$ の培養系では濃く変化したことを示している。

ワカメ胞子体の赤色度 a^* は、鉄濃度が 2, 5 $\mu\text{g/L}$ の条件下で日数の経過とともに減少、また、20, 50 $\mu\text{g/L}$ の条件下では増加した。培養最終日のワカメ胞子体の赤色度 a^* は、鉄濃度 2, 5, 20, 50 $\mu\text{g/L}$ の順に 9.6 ± 1.7 , 10.4 ± 0.5 , 15.2 ± 1.7 , 14.8 ± 0.4 となり、対照群（鉄濃度 50 $\mu\text{g/L}$ ）と鉄濃度 2, 5 $\mu\text{g/L}$ の培養系の間で有意差が確認された ($p < 0.05$)。鉄濃度 20 $\mu\text{g/L}$ の培養系とでは有意差は認められなかった。一方、ワカメ胞子体の黄色度 b^* については、鉄濃度による差異は生じなかった。

各実験群と対照群（鉄濃度 50 $\mu\text{g/L}$ ）のワカメ胞子体の色差 ΔE^*_{ab} の経日変化を Fig. 5 に示す。色差 ΔE^*_{ab} を用いて色の許容範囲を表現することができ、 ΔE^*_{ab} が 3.2 ~ 6.5 は印象レベルでは同じ色、また、13.0 ~ 25.0 では細分化された系統色名で区別ができる程度の色の差のイメージになる（日本電色工業株式会社, 2018）。この基準に従えば、鉄濃度が 20 $\mu\text{g/L}$ の系では培養期間中、 ΔE^*_{ab} が 6.5 未満であり対照群とほぼ等色であるが、鉄濃度が 2, 5 $\mu\text{g/L}$ の系では 12 日目に 15.2 ± 0.8 , 11.9 ± 0.8 、最終日に 22.8 ± 4.6 , 19.4 ± 5.5 となりいずれも 13.0 を上回っていることから色落ちが明瞭に生じている

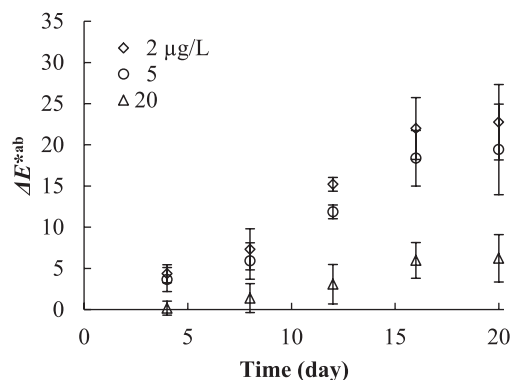


Fig. 5 Time courses changes of color difference between the control group cultured in 50 $\mu\text{g-Fe/L}$ and other samples cultured in various Fe concentrations. Values are presented as mean \pm SD. There were 6 replicates for each treatment.

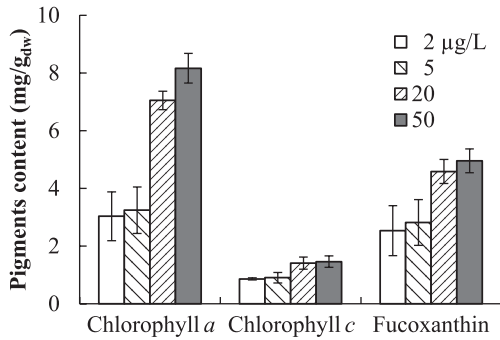


Fig. 6 Contrast of the pigments contents of *U. pinnatifida* cultured in various Fe concentrations. Values are presented as mean ± SD. There were 3 replicates for each treatment.

と判断できる。

このように、色落ちの視覚評価と分光測色計の色彩評価の傾向はほぼ一致しており、鉄欠乏によってもワカメ胞子体の色落ち現象が生じることが明らかになった。

3.1.3. 光合成色素含有量

培養最終日における異なる鉄濃度条件下のワカメ胞子体の Chl. *a*, Chl. *c*₁+*c*₂, フコキサンチンの含有量を Fig. 6 に示す。鉄濃度が 2, 5, 20, 50 µg/L の順に、Chl. *a* が 3.0 ± 0.8, 3.2 ± 0.8, 7.0 ± 0.3, 8.2 ± 0.5 mg/g-dw, Chl. *c*₁+*c*₂ が 0.9 ± 0.0, 0.9 ± 0.2, 1.4 ± 0.2, 1.5 ± 0.2 mg/g-dw, フコキサンチンが 2.5 ± 0.9, 2.8 ± 0.8, 4.6 ± 0.4, 5.0 ± 0.4 mg/g-dw となった。対照群（鉄濃度 50 µg/L）と退色が確認された鉄濃度 2, 5 µg/L の培養系のワカメ胞子体の光合成色素量を比較すると、いずれの光合成色素においても明確に減少していた ($p < 0.05$)。退色が確認されなかった鉄濃度 20 µg/L の培養系のワカメ胞子体の光合成色素量に差異は見られなかった。

このように、退色したワカメ胞子体と退色していないワカメ胞子体では光合成色素量にも大きな差異が生じており、色彩評価の結果とも対応している。

3.1.4. 考察

今回の研究において、鉄欠乏によってワカメ胞子体の生長の鈍化、色落ちの発生および光合成色素量の減少が生じることが確認できた。培地の鉄濃度が 2, 5 µg/L（培地交換：4 日毎）の条件下でワカメ胞子体を培養した場合、その生長に伴い光合成色素の形成に必要な鉄が徐々に不足し、光合成色素の形成が阻害されるため、生長の鈍化とともに退色が発生するものと考えられる。また、既往の研究 (Endo, 2017) では、栄養塩濃度の低下によりワカメ胞子体の明度 L^* が増加、また、赤色度 a^* は変化がなく、黄色度 b^* が低下したことが報告されている。明度 L^* が増加した点では本研究と一致しているが、赤色度 a^* 、黄色度 b^* の挙動が異なっている。これは、既往の研究では窒素、リン、微量栄養源など複数の栄養塩を均一に欠乏させているのに対し、本研究では鉄のみを欠乏させているため色彩の変化に差異が生じたと考えられる。

さらに、ここでは詳述しないが、培地交換を 4 日から

2 日毎に短縮しても培地の鉄濃度が 2 µg/L の条件下ではワカメ胞子体の色落ちや光合成色素量の低下が発生することを確認しており、鉄濃度 2 µg/L がワカメ胞子体の色落ち発生の目安となる数値となると思われる。色落ちとは異なるが、ホソメコンブ胞子体の生長に対する鉄の効果検証実験では鉄濃度が 2.4 µg/L で生長阻害が生じる (藤本ら, 2011) ことが、また、ホンダワラ類アカモクの鉄に関する生長の半飽和定数が 2.35 µg/L である (Miki *et al.*, 2016) ことなどが報告されており、今回の研究でのワカメ胞子体の色落ちが生じた鉄濃度の数値に類似していることは興味深い。また、北海道増毛地区沿岸における施肥試験での溶存鉄濃度の調査 (Yamamoto *et al.*, 2010; 加藤ら, 2014) では、沿岸域から沖合 50 m にかけて鉄濃度が 18 µg/L 前後から 2.6 µg/L 前後まで減少していることが報告されており、鉄濃度 2 µg/L は実際の沿岸海域でも観測される鉄濃度である。ただし、ワカメ胞子体の色落ちが生じる鉄欠乏の条件については、鉄濃度ばかりでなく、単位藻体面積あたりの鉄必要量、生長段階による鉄必要量の変化、流速の影響等も考慮する必要がある、さらに詳細な検討が必要である。

3.2. 色落ちしたワカメ胞子体の鉄添加による色彩回復の検証 (RUN2)

3.2.1. 生長

色落ちしたワカメ胞子体の各鉄濃度における生長曲線を Fig. 7 に、比増殖速度 μ および培養最終日の藻体面積を Fig. 8 に示す。培養初期の対数増殖期 (0-8 日) における比増殖速度 μ は、培地の鉄濃度が 2, 10, 20, 50 µg/L の順に 0.06 ± 0.01, 0.14 ± 0.01, 0.13 ± 0.01, 0.14 ± 0.02/day となった。このように鉄濃度 10, 20, 50 µg/L の培養系の比増殖速度 μ は、対照群（鉄濃度 2 µg/L）の約 2 倍に増大した ($p < 0.05$)。また、培養最終日の藻体面積も、鉄濃度が 2, 10, 20, 50 µg/L の順に 563 ± 221, 1063 ± 215, 992 ± 112, 876 ± 159 mm² となり、鉄濃度 10, 20, 50 µg/L の培養系では、対照群（鉄濃度 2 µg/L）と比較して増大していることが確認された ($p < 0.05$)。一方、鉄濃度が 10, 20, 50 µg/L の間では比

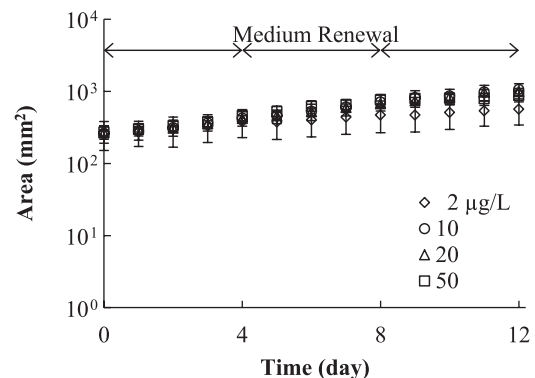


Fig. 7 Growth curves for thallus areas of *U. pinnatifida* using culture media under various Fe concentrations. Values are presented as mean ± SD. There were 6 replicates for each treatment.

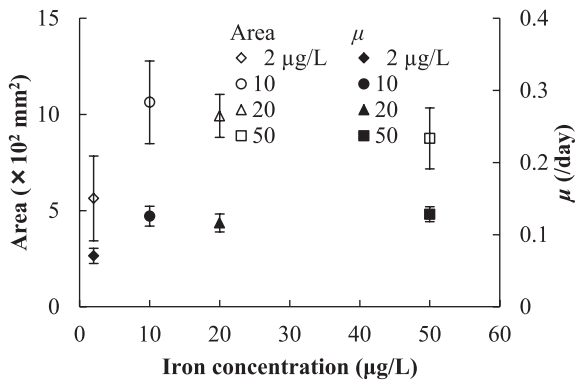


Fig. 8 Effects of Fe concentration on the specific growth rate and the final thallus area of *U. pinnatifida*. Values are presented as mean ± SD. There were 6 replicates for each treatment.

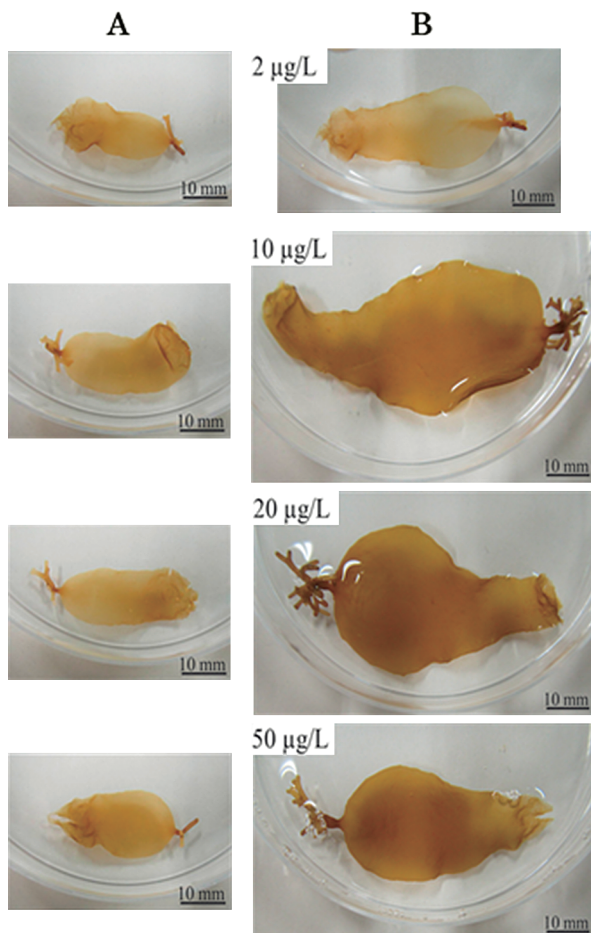


Fig. 9 Contrast the final thalli of *U. pinnatifida* cultured for 12 days in various Fe concentrations (A first day and B final day). Scale bar = 10 mm.

増殖速度 μ , 培養最終日の藻体面積ともに差異は見られなかった。

このように、鉄欠乏によって色落ちしたワカメ胞子体であっても、培地の鉄濃度が 10–50 μg/L (培地交換: 4 日毎) の条件下で培養すると、生育が順調に回復することが明らかになった。

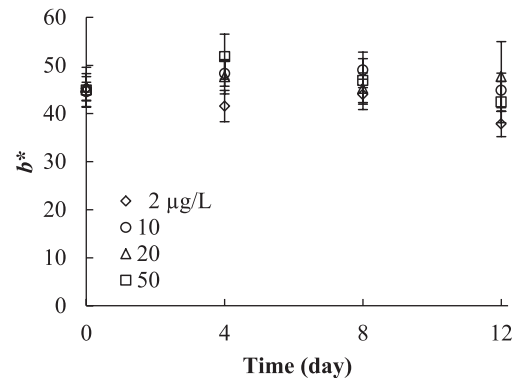
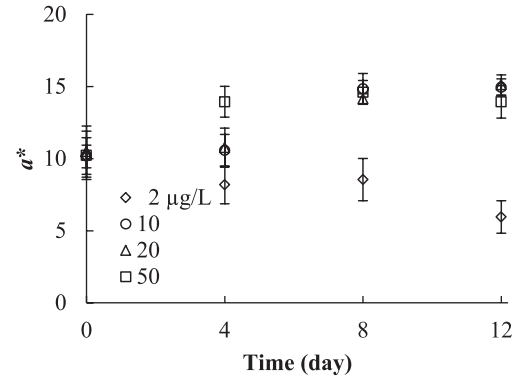
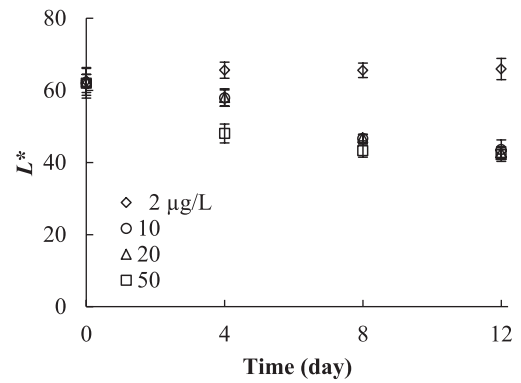


Fig. 10 Time courses changes of lightness L^* , redness a^* , and yellowness b^* of *U. pinnatifida* cultured in various Fe concentrations. Values are presented as mean ± SD. There were 6 replicates for each treatment.

3.2.2. 色彩

色落ちしたワカメ胞子体 (0 日目) と異なる鉄添加の条件下で培養した最終日のワカメ胞子体 (12 日目) を Fig. 9 に示す。0 日目と 12 日目のワカメ胞子体を比較すると、鉄濃度が 2 μg/L の培養条件のワカメ胞子体は退色がさらに進んでいた。一方、鉄濃度が 10, 20, 50 μg/L の培養条件下のワカメ胞子体は色彩の回復が視覚によって明確に確認できた。

分光測色計で測定したワカメ胞子体の色彩の経日変化を Fig. 10 に示す。ワカメ胞子体の明度 L^* は、鉄濃度 2 μg/L (対照群) で培養した場合、当初の 62.6 ± 1.8 から培養最終日に 65.9 ± 2.9 と増加しており、色落ちがやや進行した。一方、鉄濃度 10, 20, 50 μg/L の培養系の明度 L^* は、当初の 61.9 ± 2.5 , 62.5 ± 3.8 , 62.0 ± 4.1

から培養最終日に 43.6 ± 2.7 , 43.7 ± 1.7 , 42.2 ± 1.9 まで低下し、対象群との有意差も確認されたため ($p < 0.05$)、ワカメ胞子体の色彩が回復したと考えられる。特に、鉄濃度が $50 \mu\text{g/L}$ の培養系においては、培養4日目既に L^* が 48 ± 2.6 まで急速に低下しており、高い鉄濃度で培養すると色彩の回復速度が向上する可能性が示唆された。

ワカメ胞子体の赤色度 a^* は、対照群 (鉄濃度 $2 \mu\text{g/L}$) では当初の 10.2 ± 0.8 から培養最終日に 6.0 ± 1.0 まで減少した。一方、鉄濃度 10 , 20 , $50 \mu\text{g/L}$ の培養系の赤色度 a^* は、当初の 10.2 ± 1.3 , 10.5 ± 1.8 , 10.2 ± 1.7 から培養最終日に 14.9 ± 0.6 , 15.1 ± 0.7 , 13.9 ± 1.1 まで赤色が回復し対象群との有意差も確認された ($p < 0.05$)。このように赤色度 a^* も鉄濃度 10 , 20 , $50 \mu\text{g/L}$ の培養で回復することが明らかになった。一方、黄色度 b^* は、いずれの鉄濃度でも顕著な変化は認められなかった。

培養0日目の色落ちワカメを基準に算出したワカメ胞子体の色差 ΔE^*_{ab} の経日変化を Fig. 11 に示す。色差 ΔE^*_{ab} は鉄濃度 10 , 20 , $50 \mu\text{g/L}$ の培養系において日数が経過するに従い上昇した。 ΔE^*_{ab} は、鉄濃度 $50 \mu\text{g/L}$ においては4日目に 16.0 ± 0.2 、また、鉄濃度 10 , $20 \mu\text{g/L}$ では8日目にそれぞれ 16.7 ± 2.2 , 16.0 ± 3.4 となり、細分化された色の識別が可能とされる 13.0 を上回った。特に、鉄濃度 $50 \mu\text{g/L}$ では4日目には明瞭な色差が生じており、 L^* の結果と同様に高い鉄濃度で培養すると色彩の回復速度が向上する可能性が示唆された。一方、対照群 (鉄濃度 $2 \mu\text{g/L}$) のワカメ胞子体も日数が経過するにしたがい、色差 ΔE^*_{ab} がやや大きくなる傾向があったが、これは色彩が逆にやや薄く変化したことを意味している。

このように、鉄欠乏によって色落ちしたワカメ胞子体を培地の鉄濃度が $10 \mu\text{g/L}$ 以上 (培地交換: 4日毎) の添加条件で培養すると、色落ちしたワカメ胞子体であっても色彩が回復することが明らかになった。また、培地に添加する鉄濃度を高めると、色彩の回復速度が向上する可能性が示唆された。

3.2.3. 光合成色素含有量

培養最終日における異なる鉄濃度条件下のワカメ胞子体の Chl. a , Chl. $c_1 + c_2$, フコキサンチンの含有量を Fig. 12 に示す。鉄濃度が 2 , 10 , 20 , $50 \mu\text{g/L}$ の順に Chl. a が 1.1 ± 0.1 , 4.6 ± 0.3 , 4.5 ± 1.0 , $5.4 \pm 0.7 \text{ mg/g-dw}$, Chl. $c_1 + c_2$ が 0.4 ± 0.0 , 0.8 ± 0.1 , 0.7 ± 0.1 , $1.0 \pm 0.2 \text{ mg/g-dw}$, フコキサンチンが 0.7 ± 0.2 , 2.7 ± 0.4 , 2.5 ± 0.5 , $3.1 \pm 0.7 \text{ mg/g-dw}$ となった。色彩が回復していない対照群 (鉄濃度 $2 \mu\text{g/L}$) と色彩が回復した鉄濃度 10 , 20 , $50 \mu\text{g/L}$ の培養系のワカメ胞子体の光合成色素量を比較すると、いずれの鉄濃度でも光合成色素量が増加していることが確認された ($p < 0.05$)。また、鉄濃度が 10 , 20 , $50 \mu\text{g/L}$ の培養条件下では光合成色素間に差異は見られなかった。

このように、鉄欠乏によって色落ちしたワカメ胞子体

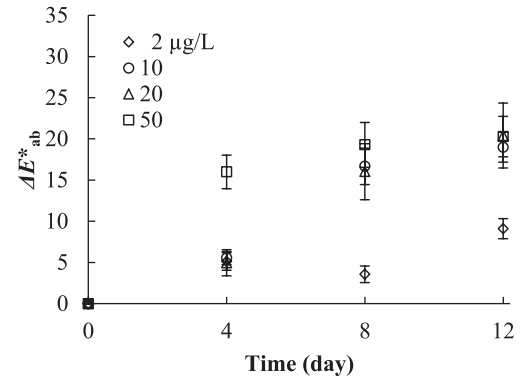


Fig. 11 Time courses changes of the color difference between the discolored sample at first and other samples cultured in various Fe concentrations. Values are presented as mean \pm SD. There were 6 replicates for each treatment.

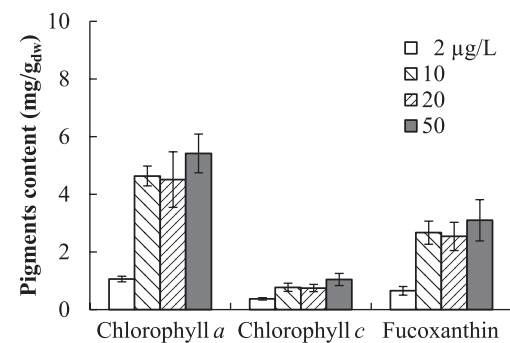


Fig. 12 Contrast of the pigments contents of *U. pinnatifida* cultured in various Fe concentrations. Values are presented as mean \pm SD. There were 3 replicates for each treatment.

であっても、培地の鉄濃度が $10 \mu\text{g/L}$ 以上 (培地交換: 4日毎) の条件下で培養すると、光合成色素量が回復することが明らかになった。

3.2.4. 考察

今回の研究において、鉄欠乏によって色落ちしたワカメ胞子体を培地の鉄濃度が $10\text{--}50 \mu\text{g/L}$ (培地交換: 4日毎) の条件下で培養すると、生長、色彩、光合成色素含有量のいずれも回復することが明らかになった。培地の鉄濃度を上昇させると、光合成色素の形成が速やかに促進されるため、生長や色彩の回復が図れるものと考えられる。また、ワカメ胞子体の色彩の回復速度を高めるためには、 $50 \mu\text{g/L}$ の鉄濃度での培養が効果的であったが、最終的な色彩の回復度や光合成色素含有量は $10 \mu\text{g/L}$ の鉄濃度での場合とかわらないことが明らかになった。したがって、今回の実験結果からは、鉄濃度 $10 \mu\text{g/L}$ 程度が色落ちしたワカメ胞子体再生の目安となる数値であると思われる。北海道増毛地区沿岸における鉄系施肥材を用いた鉄濃度の調査 (Yamamoto *et al.*, 2010; 加藤ら, 2014) では、施肥材近辺 3 m の海水中の溶存鉄濃度が $18 \mu\text{g/L}$ 程度であり、実際の沿岸海域においても適用が可能な鉄濃度であると考えられる。

一方で、RUN1 と RUN2 に共通する鉄濃度 50 $\mu\text{g/L}$ 条件下の培養結果を比較すると、色落ちしたワカメ胞子体を回復させた場合と色落ちが全く生じなかったワカメ胞子体の光合成含有量にかなり差が生じていた。例えば、Chl. *a* 含有量を比較すると、鉄濃度 50 $\mu\text{g/L}$ で継続して 20 日間培養した場合には 8.2 mg/g-dw であったが、鉄濃度 2 $\mu\text{g/L}$ で 12 日間培養して色落ちを生じさせ、その後、鉄濃度 50 $\mu\text{g/L}$ で 12 日間培養して色落ちを回復させた場合には 5.0 mg/g-dw であった。したがって、鉄欠乏によって色落ちしたワカメ胞子体の鉄による再生は可能であるが、品質のより高いワカメ胞子体を安定して得るためにはワカメ胞子体の色落ちを生じさせないことが肝要である。ワカメ胞子体の色落ちが頻発する沿岸海域においては、窒素やリンの欠乏ばかりでなく、鉄欠乏も同時に発生している可能性も考えられる。ワカメの品質維持の観点から、鉄欠乏による色落ちへの影響にも留意し、窒素、リン濃度の測定に加えて溶存鉄濃度の定期的な調査が強く望まれる。

今後の課題として、今回得られた知見をもとに、色落ちしたワカメ胞子体の迅速な回復方法をより正確に把握するためには大型の培養装置を用いた連続通水実験やフィールドによる検証が必要であると思われる。引き続き、鉄欠乏とワカメ胞子体の色落ちの関係を継続して検討する予定である。

4. まとめ

本研究では、鉄欠乏とワカメ胞子体の色落ちの關係に焦点をあて、鉄欠乏によるワカメ胞子体の色落ちの発生や光合成色素の減少を検証した。さらに、鉄欠乏で色落ちさせたワカメ胞子体を様々な鉄濃度の条件下で培養し、ワカメ胞子体の色彩や光合成色素量の回復が可能な鉄濃度を検討した。この結果、以下の結論を得た。

1) 鉄濃度が 2, 5 $\mu\text{g/L}$ の条件下でワカメ胞子体を培養した場合、鉄濃度が 20, 50 $\mu\text{g/L}$ の条件下で培養した場合と比較して、生長が鈍化し、退色とともに光合成色素量が減少した。鉄欠乏によって退色したワカメ胞子体は、明度 L^* が増加、赤色度 a^* が減少した。窒素やリンの欠乏と同様に鉄欠乏によってもワカメ胞子体の色落ち現象が発生する。

2) 鉄欠乏によって色落ちしたワカメ胞子体に対して 10–50 $\mu\text{g/L}$ の鉄を添加し培養することで、ワカメ胞子体の生長や色彩とともに光合成色素量も回復した。鉄添加によってワカメ胞子体の明度 L^* が減少し、赤色度 a^* が増加した。また、鉄添加量が多いほど、色彩の回復速度が増大する傾向があった。鉄欠乏によって色落ちしたワカメ胞子体は、鉄の添加により色彩を回復させることが可能である。

参考文献

天野秀臣, 2001. 有明海のノリにおきたこと 日本のノリ産業に大きな打撃を与えた“色落ち”とは?. 化学と生物, 39, 784–785.

植木知佳, 村上明男, 加藤敏朗, 嵯峨直恆, 本田泰三, 2010. 紅藻スサビノリの光合成色素と葉緑体微細構造における栄養欠乏応答. 日水誌, 73, 375–382.

植木知佳, 加藤敏朗, 三木理, 2011. ノリの生育に対するスラグ系施肥材の効果実証実験. 海洋理工学会誌, 17, 49–55.

Endo, H., Okumura, Y., Sato, Y. & Y. Agatsuma, 2017. Interactive effects of nutrient availability, temperature, and irradiance on photosynthetic pigments and color of the brown alga *Undaria pinnatifida*. J. Appl. Phycol., 29, 1683–1693.

加藤敏朗, 小杉知佳, 木曾英滋, 鳥井孝一, 2014. 転炉系製鋼スラグ資材を用いた海域藻場造成技術の開発. 新日鉄技報, 399, 79–84.

門谷茂, 岡市友利, 1997. 鉄およびその吸収機構. 岡市友利編著, 赤潮の科学第二版. 東京: 恒星社厚生閣, 227–239 pp.

菊池則雄, 2012. アマノリ, 渡邊信編, 藻類ハンドブック. 東京: 株式会社エヌ・ティー・エス, 614–615 pp.

コニカミノルタ, 2018. 測色計で色を数値化(参照 2018-04-01) <https://www.konicaminolta.jp/instruments/knowledge/color/section2/02.html>

小松原仁, 2011. 色差. 日本色彩学会編著, 新編色彩科学ハンドブック(第3版). 577 pp.

近藤直, 2016. 生物を対象とした画像のセンシング. 近藤直, 小川雄一, 鈴木哲仁編著, 生物センシング工学. 東京: コロナ社, 119–120 pp.

坂口研一, 落合昇, Chan Sun Park, 柿沼誠, 天野秀臣, 2003. 色落ちノリの色調評価と硫酸アンモニウム添加海水への浸漬による色調回復. 日水誌, 69, 399–404.

佐々木克之, 2008. 森林からの生物生産物質の供給. 宇野木早苗, 山本民次, 清野聡子編著, 川と海流域圏の科学, 東京: 築地書館, 47–50 pp.

反田實, 2015. 瀬戸内海東部の貧栄養化と漁業生産. 山本民次, 花里孝幸編著, 海と湖の貧栄養化問題. 東京: 地人書館, 101–103 pp.

夏池真史, 菊地哲郎, Lee Ying Ping, 伊藤絃晃, 藤井学, 吉村千洋, 渡部徹, 2016. 自然水中における鉄の化学種と生物利用性—鉄と有機物の動態からみる森・川・海のつながり—. 水環境学会誌, 39, 197–210.

日本水産資源保護協会, 2005. 水産用水基準(2005年版), 16 pp.

日本電色工業株式会社, 2018. 色の許容差の事例(参照 2018-04-09) https://www.nippondenshoku.co.jp/web/japanese/colorstory/08_allowance_by_color.htm

馬場将輔, 2008. 新潟県産ワカメの生育に及ぼす温度, 光量, 塩分の影響. 海生研研報, 11, 7–15.

藤本健一郎, 加藤敏朗, 植木知佳, 堤直人, 2011. 製鉄副生スラグによる海の森づくり(藻場造成技術開発). 新日鉄技報, 391, 206–209.

Jeffrey, S. W. & G. F. Humphr, 1975. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1 and c2 in higher plants, algae and natural phytoplankton. Biochem. Physiol. Pflanzen., 167, 191–194.

牧野賢治, 2014. ワカメの色落ちを計測する. 徳島水研だより, 第91号. (参照 2018-04-09) http://www.pref.tokushima.jp/_files/00740791/s_dayori91-2.pdf

牧野賢治, 2015. ワカメの色落ちを計測するII. 徳島水研だより, 第95号. (参照 2018-04-09) http://www.pref.tokushima.jp/_files/00864510/s_dayori95-3.pdf

Nagai, T., Miki, O. & C. Okumur, 2014. Effects of chelated iron on the growth of Sargassaceae species at the germling and

- immature stages. J. Water Environ. Tech., 12, 285-294.
- 野田宏行, 2007. 微量元素要求. 日本水産学会監修 海藻の生化学と利用 水産学シリーズ (45). 東京: 恒星社厚生閣, 24-25 pp.
- Miki, O., Nagai, T., Marzuki, M., Okumura, C., Kosugi, C. & T. Kato, 2016. Effects of Fe fertilizer eluate on the growth of *Sargassum horneri* at the germling and immature stages. J. Appl. Phycol., 28, 1775-1782.
- Niwa, K. & K. Harada, 2013. Physiological responses to nitrogen deficiency and resupply in different blade portions of *Pyropia yezoensis* f. *narawaensis* (Bangiales, Rhodophyta). J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 439, 113-118.
- Provasoli, L., 1968. Media and prospects for the cultivation of marine algae. In: Watanabe A, Hattori A (eds.). Cultures and collections of algae. Proc. U.S.-Japan Conf. Hakone, Japan, September 1966. Tokyo: Japanese Society of Plant Physiology, 63-75 pp.
- 藤原孝行, 2012. ワカメ, ヒロメ, アオワカメ. 渡邊信編, 藻類ハンドブック. 東京: 株式会社エヌ・ティー・エス, 587 pp.
- Yamamoto, M., Fukushima, M., Kiso, E., Kato, T., Sibuya, M., Horiya, S., Nishida, A., Otsuka, K. & T. Komai, 2010. Application of iron humates to barren ground in a coastal area for restoring seaweed beds. J. Chem. Eng. Jpn., 43, 627-634.
- Zhang, J., Nagahama, T., Ohwaki, H., Ishibashi, Y., Fujita, Y. & S. Yamazaki, 2004. Analytical approach to the discoloration of edible laver "Nori" in the Ariake Sea. Anal. Sci., 20, 37-41.
- Zhang, J., 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.

* * * * *

Effects of iron deficiency on discoloration in *Undaria pinnatifida* sporophytes

Chikako Okumura^{*1}, Osamu Miki^{*1}, Akihiro Ueno^{*1}, Chika Kosugi^{*2}, Ko Yoshimura^{*2}, Toshiaki Kato^{*2}

^{*1} Research Center for Sustainable Energy and Technology, Institute of Science & Engineering, Kanazawa University, Kakuma-machi, Kanazawa, Ishikawa, 920-1192, Japan

^{*2} Advanced Technology Research Laboratories, Technical Research & Development Bureau, Nippon Steel & Sumitomo Metal Corporation, 20-1, Shintomi, Futtsu, Chiba, 293-8511, Japan

Received: May, 1. 2018, Accepted: June, 29. 2018